СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 4, 2020

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Перспективы металлооксидных нанорадиосенсибилизаторов: влияние элементного состава частиц и характеристик источников излучения на увеличение поглощенной дозы

В.Н. Морозов, А.В. Белоусов, В.И. Зверев, А.А. Штиль, М.А. Колыванова, П.В. Кривошапкин 629

Изменение линейной передачи энергии клинического пучка протонов при добавлении в облучаемую мишень наночастиц золота

А.В. Белоусов, В.Н. Морозов, Г.А. Крусанов , А.Н. Моисеев, А.С. Давыдов, А.А. Штиль, В.А. Климанов, М.А. Колыванова, А.С. Самойлов 638

Цепная реакция автоокисления адреналина – модель хиноидного окисления катехоламинов

Т.В. Сирота 646

Эффекты низкочастотного электрического поля на активность рекомбинантной люциферазы

А.А. Олешкевич, В.Э. Новиков, М.А. Данилова 656

Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля

Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Л.Р. Гусарук, Г.П. Ильченко 664

Изменение выходного сигнала ДНК-биосенсора, индуцированного адсорбцией лигандов на дуплексы ДНК в флуктуирующей среде

В.Б. Аракелян, А.П. Антонян, М.А. Парсаданян, М.А. Шагинян, П.О. Вардеванян 670

Использование нейронных сетей с памятью

Л.А. Урошлев, Н.В. Баль, Е.А. Чеснокова 676

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Изохинолизиновые производные кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции в реакциях липидной пероксидации

Л.А. Ромодин, Ю.А. Владимиров, С.В. Шангин, Г.К. Владимиров, Н.П. Лысенко, Е.И. Демихов 680

Радикалы в структурах клетки

Ю.А. Шаповалов, П.П. Гладышев, С.Т. Тулеуханов, Е.В. Швецова, Ж.Т. Абдрасулова 691

Фототермическая инактивация микроорганизмов при релаксации высоковозбужденных состояний сенсибилизаторов

С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян 705

Свойства ионных каналов в липидных мембранах, модифицированных ароматическим антибиотиком леворином A_2

Т.П. Таги-заде, Х.М. Касумов 713

Влияние газомедиаторов на Ca^{2+}-зависимую калиевую проницаемость мембраны красных клеток крови

И.В. Петрова, Ю.Г. Бирулина, С.Н. Беляева, О.А. Трубачева, А.В. Сидехменова, Л.В. Смаглий, И.В. Ковалев, С.В. Гусакова 722

Эффекты ингибиторов ионных каналов на генерацию электрических импульсов у клеток водителя ритма правого предсердия десятисуточного куриного эмбриона

Е.А. Лебедева, В.А. Головко 728

Снижение продукции супероксидного анион-радикала в нейтрофилах в результате действия «нулевого» магнитного поля

В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Е.Е. Фесенко 735

Способ минимизации повреждений при введении микроэлектрода в нейрон

В.И. Орлов, С.А. Ивлев, Г.Г. Бондарь 741

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Новые стимуляторы роста растений на основе водорастворимых наночастиц *n*-замещенных моноаминокислотных производных фуллерена C_{60} и изучение механизма их действия

В.А. Волков, О.В. Ямскова, М.В. Воронков, Д.В. Курилов, В.С. Романова, В.М. Мисин, И.Н. Гагарина, Н.Е. Павловская, И.В. Горькова, А.В. Лушников 745

Изменения архитектуры кроны деревьев пихты сибирской при нарушении гомеостаза

Е.В. Бажина 753

Влияние состава липосомных комплексов на антиокислительную активность плазмы крови и липидов печени и мозга мышей

Н.Н. Сажина, М.Г. Семенова, А.С. Антипова, Е.И. Мартиросова, Н.П. Пальмина 760

Оценка биораспределения магнитолипосом в опухоли и органах мышей методом электронного парамагнитного резонанса

Н.А. Марнаутов, В.А. Сереженков, Л.Х. Комиссарова, Н.А. Ткачев, А.С. Татиколов, А.Н. Голощапов, А.Ф. Ванин 769

Влияние ионизирующего облучения на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии и поведение крыс линии Крушинского–Молодкиной

И.И. Полетаева, О.В. Перепелкина, Г.М. Николаев, И.Б. Федотова, М.Г. Плескачева, И.В. Кошлань , Ю.В. Богданова, Н.А. Кошлань, Г.В. Павлова, А.В. Ревищин 773

Оценка сохранности миокарда крысы и изолированного сердца барана после пролонгированной 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода

Е.Е. Фесенко (мл.), Е.Л. Гагаринский, А.С. Аверин, Н.В. Грудинин, А.Е. Гурин, Н.В. Шишова, Н.Э. Швирст, М.В. Гольтяев, А.Л. Ковтун 780

Морфологическая дифференциальная диагностика первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с использованием компьютерного кластерного анализа мегакариоцитарного ростка миелоидной ткани

З.П. Асауленко, Л.Б. Полушкина, А.И. Лепский, Ю.А. Криволапов 792

Контрастная чувствительность зрительной системы в условиях «сухой» иммерсии

И.И. Шошина , И.С. Соснина, К.А. Зеленский, В.Ю. Карпинская, В.А. Ляховецкий, С.В. Пронин 798

Галактические факторы, молодое Солнце, Земля и биофизика живых систем

М.В. Рагульская, В.Н. Обридко, Е.Г. Храмова 804

ДИСКУССИИ

Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут как доноры катионов нитрозония подавлять вирусные инфекции (гипотеза)

А.Ф. Ванин 818

Изменение антигенных детерминант S-белка вируса SARS-CoV-2 как возможная причина антителозависимого усиления инфекции и цитокинового шторма

Ю.Д. Нечипуренко, А.А. Анашкина, О.В. Матвеева 824

Contents

Vol. 65, No. 4, 2020

Molecular Biophysics

Perspectives of Metal Oxide Nanoradiosensitizers: Impact of Elemental Composition of Particles, Characteristics and Effects of Radiation Sources on Enhancement of the Absorbed Dose

V.N. Morozov, A.V. Belousov, V.I. Zverev, A.A. Shtil, M.A. Kolyvanova, and P.V. Krivoshapkin 629

Change in Linear Energy Transfer of Clinical Proton Beam in the Presence of Gold Nanoparticles

A.V. Belousov, V.N. Morozov, G.A. Krusanov, A.N. Moiseev, A.S. Davydov, A.A. Shtil, V.A. Klimanov, M.A. Kolyvanova, and A.S. Samoylov 629

A Chain Reaction of Adrenaline Autoxidation Is a Model of Quinoid Oxidation of Catecholamines

T.V. Sirota 629

Effects of Low-Frequency Electric Field on Recombinant Luciferase Activity

A.A. Oleshkevich, V.E. Novikov, and M.A. Danilova 629

Oxidative Damage to DNA under the Influence of an Alternating Magnetic Field

E.E. Tekutskaya, M.G. Baryshev, L.R. Gusaruk, and G.P. Ilchenko 629

Adsorption of Ligands on DNA Duplexes under the Influence of the Fluctuating Medium Causes a Change in DNA-Biosensor Output Signal

V.B. Arakelyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, M.A. Shahinyan, and P.O. Vardevanyan 629

Prediction of the Exon-Intron Structure of a Gene Based on Long Short-Term Memory Neural Network

L.A. Uroshlev, N.V. Bal, and E.A. Chesnokova 680

Cell Biophysics

Isoquinoline Coumarin Derivatives as Chemiluminescence Activators in Reactions of Lipid Peroxidation

L.A. Romodin, Yu.A. Vladimirov, S.V. Shangin, G.K. Vladimirov, N.P. Lysenko, and E.I. Demikhov 629

Radicals in the Structures of a Cell

Yu.A. Shapovalov, P.P. Gladyshev, S.T. Tuleukhanov, E.V. Schvetsova, and Zh.T. Abdrasulova 691

Photothermic Inactivation of Microorganisms at Relaxation of Highly Excited States of Sensitizers

S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.T. Ishemgulov, and A.N. Nikiyan 705

Properties of Ion Channels in Lipid Membranes Modified by Levorin A_2, an Aromatic Antibiotic

T.P. Taghi-zada and Kh.M. Kasumov 713

The Effects of Gasomediators on the Ca^{2+}-Dependent Potassium Permeability of the Red Blood Cells Membrane

I.V. Petrova, Yu.G. Birulina, S.N. Belyaeva, O.A. Trubacheva, A.V. Sidekhmenova, L.V. Smagliy, I.V. Kovalev, and S.V. Gusakova 722

Effects of Ion Channel Inhibitors on the Generation of Electrical Impulses in Right Atrial Pacemaker Cells of a 10-Day-Old Chicken Embryo

E.A. Lebedeva and V.A. Golovko 728

Attenuation in Superoxide Anion Radical Production in Neutrophils after Exposure to Near Null Magnetic Field

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, and E.E. Fesenko 735

Approach to Minimize Damage Resulting from Microelectrode Insertion into Neuron

V.I. Orlov, S.A. Ivlev, and G.G. Bondar 741

Complex Systems Biophysics

New Plant Growth Stimulants Based on Water-Soluble Nanoparticles of N-Substituted Monoamino Acid Derivatives of Fullerene C_{60} and the Study of Their Mechanisms of Action

V.A. Volkov, O.V. Yamskova, M.V. Voronkov, D.V. Kurilov, V.S. Romanova, V.M. Misin, I.N. Gagarina, N.E. Pavlovskaya, I.V. Gorkova, and A.V. Lushnikov 745

Changes in *Abies sibirica* Crown Architecture when Homeostatic Balance is Disrupted

E.V. Bazhina 753

The Influence of Liposomal Nanocomplex Composition on Antioxidant Activity of Mice Blood Plasma, Liver and Brain Lipids

N.N. Sazhina, M.G. Semenova, A.S. Antipova, E.I. Martirosova, and N.P. Palmina 760

Evaluation of the Biodistrubution of Magnetoliposomes in Murine Tumor and Mice Organs Using Electron Spin Resonance

N.A. Marnautov, V.A. Serezhenkov, L.Kh. Komissarova, N.A. Tkachev, A.S. Tatikolov, A.N. Goloshchapov, and A.F. Vanin 769

Influence of Ionizing Radiation on Audiogenic Seizure Pronones and Behavior in Krushinsky–Molodkina Rats

I.I. Poletaeva, O.V. Perepelkina, G.M. Nikolaev, N.A. Ogienko, I.B. Fedotova, M.G. Pleskacheva, I.V. Koshlan, Yu.V. Bogdanova, N.A. Koshlan, G.V. Pavlova, and A.V. Revishchin 773

Evaluation of Preservation of Rat Myocardium and Isolated Sheep Heart Following Prolonged (24 Hour) Hypothermic Preservation after Exposure to a Gaseous Mixture Composed of Carbon Monoxide and Oxygen

E.E. Fesenko (Jr.), E.L. Gagarinsky, A.S. Averin, N.V. Grudinin, A.E. Gurin, N.V. Shishova, N.E. Shvirst, M.V. Goltyaev, and A.L. Kovtun 780

Morphological Differential Diagnosis of Primary Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia with Computer Cluster Analysis of Megakaryocytic Lineage in Myeloid Tissue

Z.P. Asaulenko, L.B. Polushkina, A.I. Lepsky, and Yu.A. Krivolapov 792

Contrast Sensitivity of the Visual System in the "Dry" Immersion Conditions

I.I. Shoshina, I.S. Sosnina, K.A. Zelenskiy, V.Yu. Karpinskaya, V.A. Lyakhovetskii, and S.V. Pronin 798

Galactic Factors, the Young Sun and Earth, and Biophysics of Living Systems

M.V. Ragulskaya, V.N. Obridko, and E.G. Khramova 804

Discussions

Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Donors of Nitrosonium Cations Suppress Viral Infections (Hypothesis)

A.F. Vanin 818

Change of Antigenic Determinants of SARS-CoV-2 Virus S-Protein as a Possible Cause of Antibody-Dependent Enhancement of Virus Infection and Cytokine Storm

Yu.D. Nechipurenko, A.A. Anashkina, and O.V. Matveeva 824

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 629–637

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 615.849.114,577.34

ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОРАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ: ВЛИЯНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ЧАСТИЦ И ХАРАКТЕРИСТИК ИСТОЧНИКОВ ИЗЛУЧЕНИЯ НА УВЕЛИЧЕНИЕ ПОГЛОЩЕННОЙ ДОЗЫ

© 2020 г. В.Н. Морозов*, **, А.В. Белоусов*, В.И. Зверев*, А.А. Штиль*, ****, *****, М.А. Колыванова*, **, П.В. Кривошапкин******

**Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182 Москва, ул. Живописная, 46*

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

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

*****Химико-биологический кластер Национального исследовательского университета ИТМО, 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9*

******Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Каширское шоссе, 24*

E-mail: morozov.v.n@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2019 г.
После доработки 02.04.2020 г.
Принята к публикации 07.04.2020 г.

Наночастицы с высоким атомным номером представляют интерес в качестве радиосенсибилизаторов для лучевой терапии онкологических заболеваний. Широкий выбор наночастиц и источников излучения делает актуальной задачу подбора их оптимальных комбинаций для достижения максимальной эффективности облучения. В настоящей работе рассчитаны значения факторов увеличения дозы элементных композиций металлооксидных наночастиц (Al_2O_3, TiO_2, MnO_2, Fe_2O_3 и Fe_3O_4, NiO, GeO_2, ZrO_2, CeO_2, Gd_2O_3, Tm_2O_3, HfO_2, Ta_2O_5, Bi_2O_3), а также GeO_2 и HfO_2, допированных редкоземельными элементами лантаном или иттербием в комбинации с монохроматическими фотонами (1–500 кэВ) и рентгеновским излучением, соответствующим излучению рентгенотерапевтических аппаратов. При концентрации наночастиц, равной 10 мг/мл, максимальные значения факторов увеличения дозы составили от 1.03 до 2.55 для монохроматического излучения и от 1.01 до 2.33 для рассмотренных спектров рентгеновского излучения. Допирование GeO_2 20% лантана или иттербия привело к увеличению максимального значения факторов увеличения дозы на ~10%. Допирование HfO_2 не привело к существенным изменениям значения факторов увеличения дозы. Таким образом, все исследованные элементные композиции наночастиц, за исключением Al_2O_3 (фактор увеличения дозы $\leqslant 1.02$), имеют перспективы использования в рентгенотерапии. В то же время сложная зависимость факторов увеличения дозы от спектрального состава излучения требует детальных исследований влияния условий облучения на величину радиомодифицирующего действия наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы, лучевая терапия, радиосенсибилизаторы, фактор увеличения дозы.

DOI: 10.31857/S0006302920040018

Лучевая терапия используется для радикального и паллиативного лечения широкого спектра новообразований, а также заболеваний неопухолевой природы [1, 2]. Несмотря на интенсивное развитие, все еще существует значительный потенциал для повышения эффективности лучевого лечения [3, 4]: радиорезистентность опухолей и дозовая нагрузка на окружающие нормальные ткани могут существенно ограничивать применение лучевой терапии. Добиться увеличения эффективности облучения позволяют различные способы модификации радиочувствительности клеток: гипербарическая оксигенация [5], гипертермия [6, 7], использование химических радиомодификаторов, сенсибилизаторов и протекторов [8–14].

Сокращение: ФУД – фактор увеличения дозы.

В последнее время внимание в этом качестве привлекают продукты нанотехнологий [15–17]. Многообещающим классом радиосенсибилизаторов являются наночастицы, содержащие элементы с высоким (относительно биологических тканей) атомным номером (Z) [18–23]. Наиболее перспективным для их использования считается диапазон рентгеновских энергий фотонов (30–300 кэВ): благодаря высокому сечению взаимодействия с излучением наночастицы продемонстрировали в этой области наибольшую эффективность [24–26], а методика с их использованием получила название NEXT (Nanoparticles Enhanced X-ray Therapy) [27].

Нанотехнологии предлагают широкий выбор наночастиц для лучевой терапии. Несмотря на то что со времен пионерской работы [28] наибольшее внимание уделяется наночастицам золота, интерес привлекают и другие материалы, в том числе оксиды металлов [18, 23, 29, 30]. Благодаря своим физико-химическим свойствам, биосовместимости, широким возможностям синтеза и модификации кристаллической решетки, металлооксидные наночастицы перспективны для широкого круга биомедицинских приложений [31, 32]. В качестве противоопухолевых радиосенсибилизаторов эффективность продемонстрировали наночастицы оксидов титана [33], железа [34, 35], тулия [36], церия [37], гафния [38, 39], тантала [40], висмута [41].

Для достижения наибольшего радиомодифицирующего эффекта наночастиц необходимо оптимизировать сочетание их параметров с характеристиками излучения. Поскольку поглощение энергии фотонов зависит в первую очередь от элементного состава, выбор материала наночастиц, при прочих равных условиях, будет определяться именно свойствами излучения. В NEXT может быть использован широкий набор источников фотонов с различными спектральными характеристиками: рентгенотерапевтические аппараты, источники для брахитерапии, монохроматические излучатели [42]. Опубликованные результаты компьютерных расчетов эффективности наночастиц выполнены в основном для отдельных моноэлементных композиций частиц или ограниченного набора источников излучения [43–46]. Таким образом, задача подбора оптимальных комбинаций наночастиц и условий облучения все еще остается актуальной. Открытым также остается вопрос о влиянии допирования наночастиц. Целью настоящей работы является расчет увеличения поглощенной дозы для ряда элементных композиций металлооксидных наночастиц, в том числе допированных редкоземельными элементами, при использовании излучения различного спектрального состава: монохроматических фотонов и рентгеновского излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки эффективности исследуемых элементных композиций наночастиц рассчитаны значения фактора увеличения дозы (ФУД), определяемого как отношение поглощенной дозы в объеме интереса в присутствии наночастиц (D_2) к поглощенной дозе в том же объеме при их отсутствии (D_1):

$$\text{ФУД} = D_2/D_1. \quad (1)$$

Если известна поглощенная доза D_1 в некотором веществе «1», то при выполнении условий электронного равновесия поглощенная доза D_2 в другом веществе «2» в той же самой точке радиационного поля определяется выражением

$$D_2 = \frac{(\mu/\rho)_2}{(\mu/\rho)_1} D_1, \quad (2)$$

где $(\mu/\rho)_i$ – массовый коэффициент поглощения энергии фотонного излучения для i-го вещества. В случае монохроматического излучения и не очень больших величин объема условия электронного равновесия выполняются достаточно хорошо, ошибка определения поглощенной дозы по формуле (2) не превышает 10%. В случае излучения непрерывного спектра область интереса необходимо располагать на глубине, не меньшей, чем пробег самых быстрых электронов, высвобожденных в веществе фотонами. При этом действующий спектр рентгеновского излучения в области интереса будет отличаться от номинального. В этом случае выражение (2) запишется в виде

$$D_2 = \frac{\int_0^{E_{\max}} \varphi(E)\, E \left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)_2 dE}{\int_0^{E_{\max}} \varphi(E)\, E \left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)_1 dE} D_1 = \frac{\overline{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_2}}{\overline{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_1}} D_1 = \frac{\overline{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)^2}}{\overline{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_1}} D_1. \quad (3)$$

В выражении (3) через $\varphi(E)dE$ обозначен поток фотонов, энергия которых заключена в интервале $(E, E + dE)$. Окончательно для рентгеновского излучения имеем

Таблица 1. Характеристики рентгеновских трубок, используемых при моделировании рентгеновских спектров

Напряжение, кВ	Материал анода	Фильтрация*
300	W	0.4 мм Cu
250	W	1.6 мм Cu + 4.0 мм Al
200	W	1.2 мм Cu + 4.0 мм Al
160	W	Без дополнительной фильтрации
110	W	1.3 мм Cu + 5.5 мм Al
85	W	2.0 мм Al
40	W	0.8 мм Al

Примечание. * – Для всех вариантов фильтрации по умолчанию учтено бериллиевое окно толщиной 4.0 мм.

$$\text{ФУД} = \overline{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_1^2}. \quad (4)$$

Значения массового коэффициента поглощения энергии фотонного излучения для различных химических элементов были получены в программе XMuDat [47] на основе данных работы [48]. Для вещества, представляющего собой смесь различных химических элементов, массовый коэффициент поглощения может быть рассчитан как

$$\frac{\mu_{en}}{\rho} = \sum_i w_i \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_i, \quad (5)$$

где $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_i$ – коэффициент поглощения энергии фотонного излучения для i-го элемента в смеси, а w_i – массовое содержание данного элемента в смеси.

Увеличение поглощенной дозы было рассчитано для следующих элементных композиций металлооксидных наночастиц: Al_2O_3 ($Z_{Al} = 13$), TiO_2 ($Z_{Ti} = 22$), MnO_2 ($Z_{Mn} = 25$), Fe_2O_3 и Fe_3O_4 ($Z_{Fe} = 26$), NiO ($Z_{Ni} = 28$), GeO_2 ($Z_{Ge} = 32$, полуметалл), ZrO_2 ($Z_{Zr} = 40$), CeO_2 ($Z_{Ce} = 58$), Gd_2O_3 ($Z_{Gd} = 64$), Tm_2O_3 ($Z_{Tm} = 69$), HfO_2 ($Z_{Hf} = 72$), Ta_2O_5 ($Z_{Ta} = 73$), Bi_2O_3 ($Z_{Bi} = 83$). Концентрации наночастиц в воде принимали равной 10 мг/мл. Для оценки влияния допирования на величину ФУД были выбраны редкоземельные элементы La ($Z_{La} = 57$) и Yb ($Z_{Yb} = 70$). Содержание допантов в элементных композициях наночастиц принимали равным 20%.

Расчеты выполнены для моноэнергетических фотонов с энергией от 1 до 500 кэВ (с шагом 1 кэВ), а также рентгеновского излучения со спектральными характеристиками, соответствующими излучению различных рентгенотерапевтических аппаратов. Энергетические спектры фотонов рассчитаны методом Монте-Карло в программном коде Geant4 [49] для рентгеновских трубок с параметрами, представленными в табл. 1. Подробное описание методики расчета спектров приведено в работе [50].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С физической точки зрения механизм радиомодифицирующего действия наночастиц с высоким атомным номером основан на локальном увеличении поглощенной дозы и генерации вторичного излучения. Эффективность наночастиц определяется увеличением поглощенной энергии первичного излучения и продуктивностью ее конверсии в энергию вторичных частиц. Если на выход вторичного излучения влияет множество параметров наночастиц [51–56], то вероятность взаимодействия с первичными фотонами в основном определяется значением массового коэффициента поглощения энергии, соответствующего данному элементному составу наночастиц.

На рис. 1а приведены отношения массовых коэффициентов поглощения энергии фотонного излучения для исследуемых элементных композиций и воды. Зависимости ФУД исследуемых элементных композиций наночастиц (10 мг/мл) от энергии фотонов для случая моноэнергетического излучения приведены на рис. 1б. Энергия, при которой наблюдается максимальное значение ФУД для данной элементной композиции наночастиц, соответствует оптимальной энергии моноэнергетического излучения. При облучении фотонами такой энергии ожидается наибольшее увеличение поглощенной дозы, следовательно, наибольшая эффективность радиосенсибилизации. Наибольшую эффективность в различных областях энергий фотонов продемонстрировали следующие элементные композиции: 20–57 кэВ (Bi_2O_3), 58–60 кэВ (CeO_2), 61–70 кэВ (Gd_2O_3), 71–85 кэВ (Tm_2O_3), 86–105 кэВ (HfO_2), 106–500 кэВ (Bi_2O_3). Наибольшее значение ФУД,

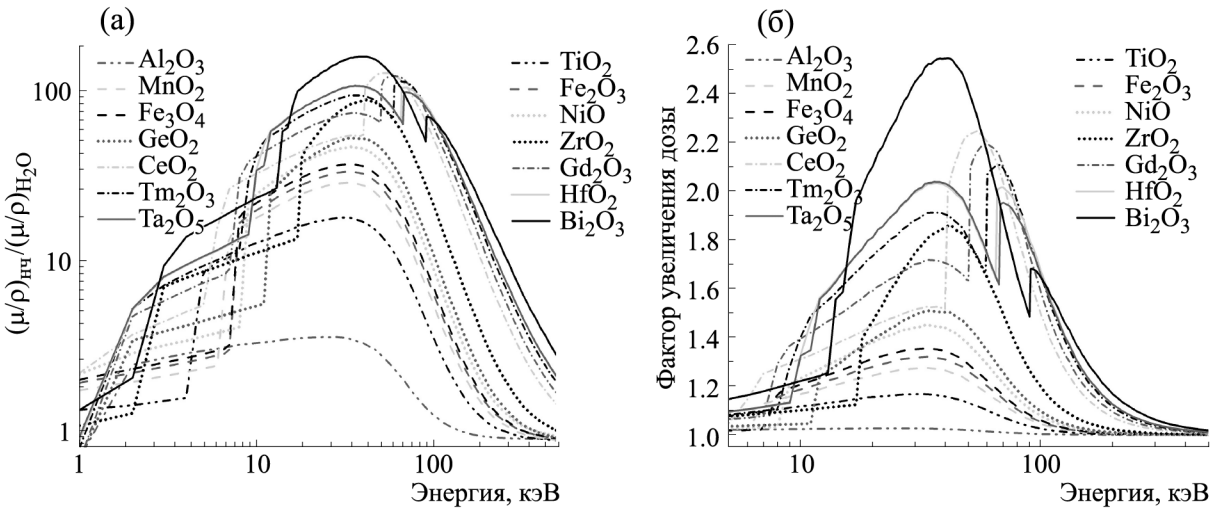


Рис. 1. (а) – Отношение массовых коэффициентов поглощения энергии исследуемых элементных композиций наночастиц и воды; (б) – зависимости величины фактора увеличения дозы элементных композиций металлооксидных наночастиц (10 мг/мл) от энергии фотонов.

равное 2.55 продемонстрировал Bi_2O_3. Максимальные значения ФУД CeO_2 (2.25), Gd_2O_3 (2.19) и Tm_2O_3 (2.11) оказались выше, чем соответствующие элементным композициям с более высоким Z – HfO_2 (2.03) и Ta_2O_5 (2.04). Максимальные значения ФУД элементных композиций TiO_2, MnO_2, Fe_2O_3, Fe_3O_4, NiO и GeO_2 составили от 1.17 до 1.51. Существенного увеличения поглощенной дозы в присутствии Al_2O_3 установлено не было.

В рентгенотерапевтических аппаратах, классических установках для близкофокусной лучевой терапии, источником излучения являются рентгеновские трубки, генерирующие фотонное излучение в диапазоне энергий от 30 до 300 кэВ. Спектральный состав излучения помимо напряжения на трубке определяется конструктивными особенностями аппарата (материал анода, используемые фильтры) [57]. Рассчитанные энергетические спектры излучения рентгеновских трубок с характеристиками, представленными в табл. 1, приведены на рис. 2.

Рассчитанные значения ФУД для различных комбинаций наночастиц и спектров рентгеновского излучения представлены в табл. 2. Как и в случае моноэнергетического излучения, наименьшее увеличение поглощенной дозы ($\leqslant 2\%$) продемонстрировал Al_2O_3. Увеличение поглощенной дозы на ~5–30% было обнаружено для TiO_2, MnO_2, Fe_2O_3, Fe_3O_4, NiO и GeO_2. Значительно большие значения ФУД продемонстрировали ZrO_2, CeO_2, Gd_2O_3, Tm_2O_3, HfO_2, Ta_2O_5, Bi_2O_3. Однако все эти значения оказались существенно меньше максимальных ФУД, полученных для моноэнергетического излучения.

Сложный характер зависимости ФУД от спектрального состава излучения не позволяет сделать однозначных выводов по подбору оптимальных энергетических спектров для каждой элементной композиции. В то же время полученные данные демонстрируют, что не всегда наночастицам с более высоким Z соответствуют наибольшие значения ФУД [43]. Так, значение ФУД Bi_2O_3, продемонстрировавшего наибольшее увеличение поглощенной дозы среди всей исследованной линейки элементных композиций наночастиц, для спектров с максимальной энергией фотонов 110 и 250 кэВ оказалось меньше, чем значение ФУД Gd_2O_3. Аналогично, для спектров с максимальной энергией 85, 110 и 300 кэВ некоторым элементным композициям с меньшим Z (например, CeO_2 и Gd_2O_3) соответствовали большие значения ФУД. Однако поскольку для аппаратов различных производителей спектры излучения могут значительно отличаться, а их виды не ограничиваются исследованными в настоящей работе, установление зависимости эффективности различных элементных композиций наночастиц от спектральных характеристик источников излучения является достаточно сложной задачей. Кроме того, по мере проникновения фотонов в вещество происходит изменение спектрального состава излучения, которое также необходимо учитывать при расчетах.

Отличительной особенностью металлооксидных наночастиц являются широкие возможности допирования кристаллической решетки, благодаря которому они приобретают новые свойства: люминесценцию в ультрафиолетовом, видимом и

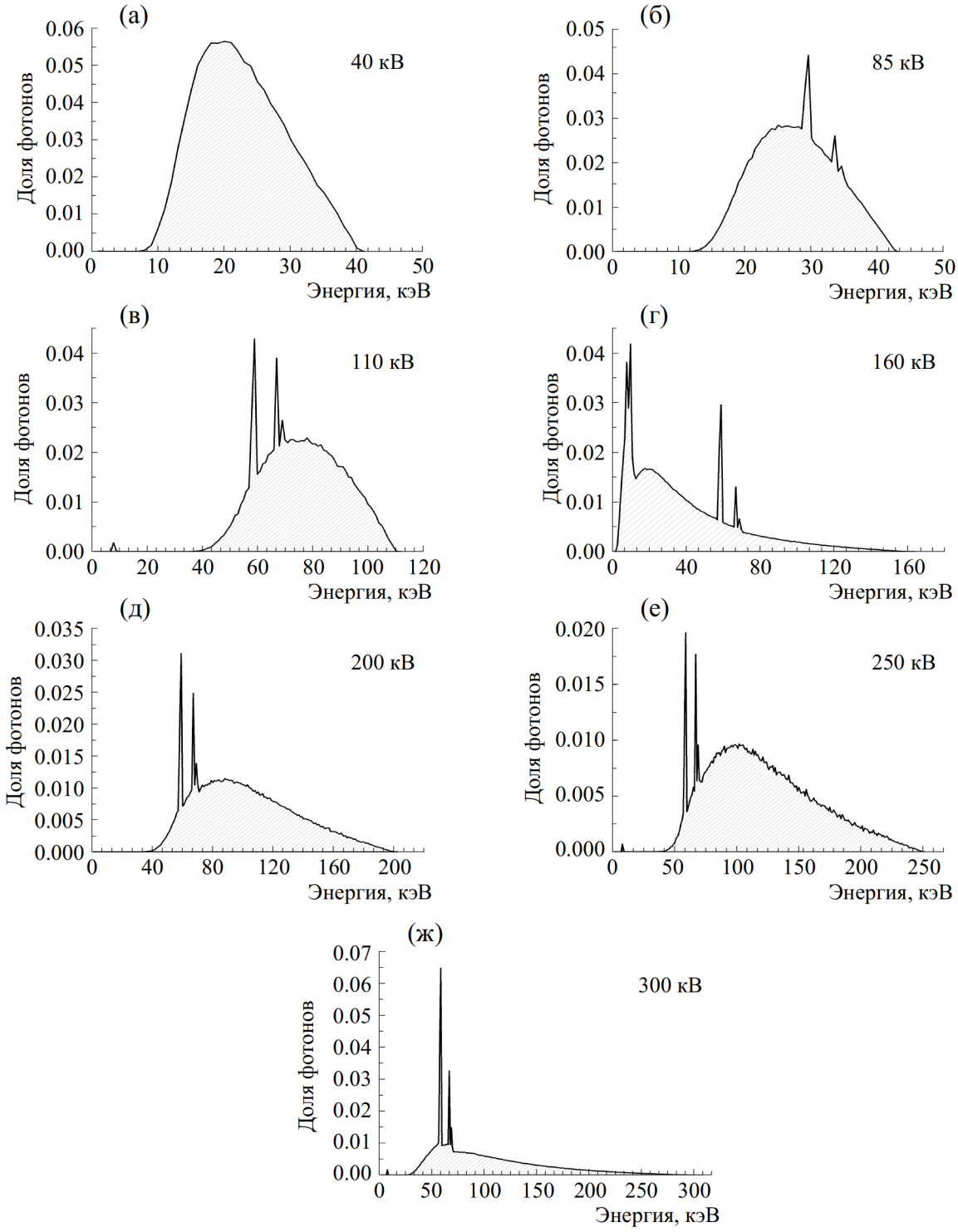


Рис. 2. Спектры рентгеновского излучения при напряжении на лучевых трубках 40 кВ (а), 85 кВ (б), 110 кВ (в), 160 кВ (г), 200 кВ (д), 250 кВ (е) и 300 кВ (ж).

инфракрасном диапазонах, способность выступать контрастными агентами для магниторезонансной томографии [58–62]. В то же время изменение элементного состава наночастиц может оказывать влияние на поглощение первичных фотонов и генерацию вторичного излучения, что,

Таблица 2. Значения фактора увеличения дозы исследуемых элементных композиций металлооксидных наночастиц для различных рентгеновских спектров

Материал	Максимальная энергия фотонов в спектре						
	40 кэВ	85 кэВ	110 кэВ	160 кэВ	200 кэВ	250 кэВ	300 кэВ
Al_2O_3	1.01	1.02	1.01	1.02	1.01	1.01	1.01
TiO_2	1.09	1.13	1.07	1.08	1.04	1.05	1.08
MnO_2	1.14	1.21	1.12	1.08	1.06	1.07	1.12
Fe_2O_3	1.16	1.25	1.14	1.08	1.09	1.08	1.14
Fe_3O_4	1.18	1.28	1.15	1.08	1.10	1.09	1.15
NiO	1.21	1.36	1.20	1.08	1.13	1.08	1.13
GeO_2	1.21	1.42	1.24	1.06	1.16	1.09	1.15
ZrO_2	1.21	1.73	1.46	1.10	1.30	1.18	1.29
CeO_2	1.25	1.99	1.93	1.18	1.64	1.43	1.54
Gd_2O_3	1.33	1.89	**1.96**	1.18	1.68	**1.47**	1.55
Tm_2O_3	1.41	1.89	1.90	1.17	1.67	1.44	1.45
HfO_2	1.45	1.93	1.86	1.17	1.66	1.44	1.46
Ta_2O_5	1.45	1.92	1.81	1.17	1.63	1.42	1.45
Bi_2O_3	**1.56**	**2.33**	1.88	**1.21**	**1.69**	**1.47**	**1.59**

Примечание. Полужирным шрифтом отмечены наибольшие значения ФУД для данного рентгеновского спектра.

в свою очередь, может сказаться на эффективности радиосенсибилизации.

На рис. 3 представлены зависимости ФУД от энергии фотонов для оригинальных и допированных редкоземельными элементами La и Yb (20%) элементных композиций GeO_2 (рис. 3а) и HfO_2 (рис. 3б). Такое содержание допантов было выбрано как обеспечивающее эффект люминесценции при сохранении кристаллической структуры наночастиц. Допирование GeO_2 привело к увеличению максимального значения ФУД на ~12% (La) со сдвигом положения максимума с 34 до

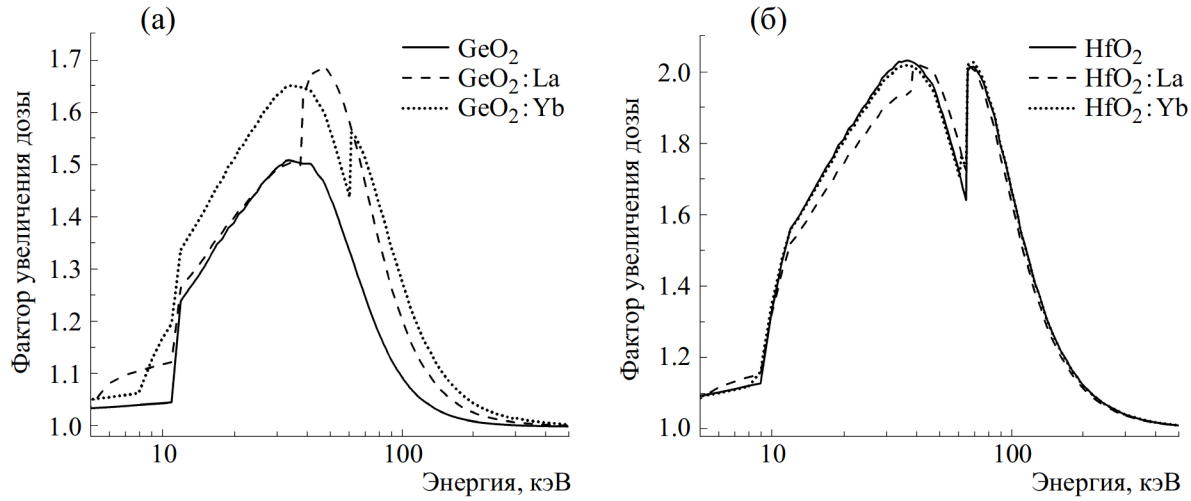


Рис. 3. Зависимости величины фактора увеличения дозы оригинальных и допированных 20% La и 20% Yb элементных композиций GeO_2 (а) и HfO_2 (б) от энергии фотонов.

Таблица 3. Значения фактора увеличения дозы оригинальных и допированных 20% La и 20% Yb элементных композиций GeO_2 и HfO_2 для различных рентгеновских спектров

Материал	Максимальная энергия фотонов в спектре						
	40 кэВ	85 кэВ	110 кэВ	160 кэВ	200 кэВ	250 кэВ	300 кэВ
GeO_2							
GeO_2	1.21	1.42	1.243	1.060	1.156	1.092	1.152
GeO_2:La	1.22	**1.59**	1.439	1.094	1.293	1.186	**1.265**
GeO_2:Yb	**1.28**	1.57	**1.452**	**1.099**	**1.321**	**1.206**	1.251
HfO_2							
HfO_2	**1.45**	1.93	**1.86**	1.17	**1.66**	**1.44**	1.46
HfO_2:La	1.41	**1.94**	**1.86**	1.17	1.65	1.43	**1.47**
HfO2:Yb	**1.45**	1.92	**1.86**	**1.18**	**1.66**	**1.44**	1.46

Примечание. Полужирным шрифтом отмечены наибольшие значения ФУД для данного рентгеновского спектра.

47 кэВ и на ~10% (Yb) без существенного сдвига. Увеличения ФУД в результате допирования HfO_2 не наблюдалось, напротив, ФУД допированной 20% La элементной композиции оказался заметно меньше оригинального в области энергий 10–40 кэВ. Сдвиг положения максимума ФУД для HfO_2 с 37 кэВ наблюдался при использовании обоих допантов: до 42 кэВ (La) и до 69 кэВ (Yb).

Значения ФУД оригинальных и допированных GeO_2 и HfO_2 для спектров рентгенотерапевтических аппаратов приведены в табл. 3. Видно, что значения ФУД допированных композиций GeO_2 оказались заметно выше оригинальной для всей линейки энергетических спектров. Допирование HfO_2 не привело к существенным изменениям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе эффективность металлооксидных наночастиц в качестве радиосенсибилизаторов для рентгенотерапии была рассмотрена исключительно с физической точки зрения. Все исследованные элементные композиции наночастиц, за исключением Al_2O_3, продемонстрировали значительное по клиническим (и радиобиологическим) меркам ($\geqslant$ 10%) увеличение поглощенной дозы, что свидетельствует о перспективности их использования в технологии NEXT. Следует отметить, что кроме физических факторов радиосенсибилизация может быть обусловлена также химическим и/или биологическим действием наночастиц. Таким образом, эффект, наблюдаемый в рамках эксперимента, может существенно превосходить предсказанный теоретически.

Наибольшие значения ФУД исследованных элементных композиций наночастиц были получены в комбинации с моноэнергетическим излучением, таким образом, его использование может позволить наиболее эффективно раскрыть способность наночастиц с высоким атомным номером к радиомодификации. Обнаружено, что различия в спектральном составе излучения могут приводить к значительному разбросу значений ФУД отдельных элементных композиций, что свидетельствует о важности дальнейших исследований с использованием большего набора источников излучения. Полученные результаты позволяют в целом положительно оценить влияние допирования, поскольку помимо приобретения новых свойств, присутствие примесей может способствовать повышению радиомодифицирующего потенциала наночастиц, в особенности элементных композиций с небольшими значениями *Z*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития ядерной медицины АО «Наука и инновации» ГК «Росатом» (проект АААА-А19-119122590084-4) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-11078).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, et al., Int. J. Med. Sci. **9** (3), 193 (2012).
2. 2. L. Gunderson and J. Tepper, *Clinical Radiation Oncology* (Elsevier, Philadelphia, 2016).
3. M. Baumann, M. Krause, J. Overgaard, et al., Nat. Rev. Cancer **16** (4), 234 (2016).
4. H. H. W. Chen and M. T. Kuo, Oncotarget **8** (37), 62742 (2017).
5. K. Stępień, R. P. Ostrowski, and E. Matyja, Med. Oncol. **33** (9), 101 (2016).
6. P. Kaur, M. D. Hurwitz, S. Krishnan, et al., Cancers (Basel) **3** (4), 3799 (2011).
7. J. C. Peeken, P. Vaupel, and S. E. Combs, Front. Oncol. **7**, 132 (2017).
8. C. K. Nair, D. K. Parida, and T. Nomura, J. Radiat. Res. **42** (1), 21 (2001).
9. P. Wardman, Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.) **19** (6), 397 (2007).
10. D. Citrin, A. P. Cotrim, F. Hyodo, et al., Oncologist **15** (4), 360 (2010).
11. R. M. Johnke, J. A. Sattler, and R. R. Allison, Future Oncol. **10** (15), 2345 (2014).
12. J. Linam and L. X. Yang, Anticancer Res. **35** (5), 2479 (2015).
13. M. Z. Kamran, A. Ranjan, N. Kaur, et al., Med. Res. Rev. **36** (3), 461 (2016).
14. H. Wang, X. Mu, H. He, et al., Trends Pharmacol. Sci. **39** (1), 24 (2018).
15. Y. Mi, Z. Shao, J. Vang, et al., Cancer Nanotechnol. **7** (1), 11 (2016).
16. L. A. Kunz-Schughart, A. Dubrovska, C. Peitzsch, et al., Biomaterials **120**, 155 (2017).
17. S. Goel, D. Ni, and W. Cai, ACS Nano **11** (6), 5233 (2017).
18. Retif, S. Pinel, M. Toussaint, et al., Theranostics **5** (9), 1030 (2015).
19. A. Subiel, R. Ashmore, and G. Schettino, Theranostics **6** (10), 1651 (2016).
20. S. Her, D. A. Jaffray, and C. Allen, Adv. Drug Deliv. Rev. **109**, 84 (2017).
21. S. Rosa, C. Connolly, G. Schettino, et al., Cancer Nanotechnol. **8** (1), 2 (2017).
22. L. Cui, S. Her, G. R. Borst, et al., Radiother. Oncol. **124** (3), 344 (2017).
23. Y. Liu, P. Zhang, F. Li, et al., Theranostics **8** (7), 1824 (2018).
24. W. N. Rahman, N. Bishara, T. Ackerly, et al., Nanomedicine **5** (2), 136 (2009).
25. D. B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, et al., Radiat. Res. **173** (6), 719 (2010).
26. S. Jain, J. A. Coulter, A. R. Hounsell, et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **79** (2), 531 (2011).
27. N. P. Praetorius and T. K. Mandal, Recent Pat. Drug Deliv. Formul. **1** (1), 37 (2007).
28. J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz, Phys. Med. Biol. **49** (18), N309 (2004).
29. X. Y. Su, P. D. Liu, H. Wu, et al., Cancer Biol. Med. **11** (2), 86 (2014).
30. D. R. Cooper, D. Bekah, and J. L. Nadeau, Front. Chem. **2**, 86 (2014).
31. S. Andreescu, M. Ornatska, J. S. Erlichman, et al., in *Fine Particles in Medicine and Pharmacy*, Ed. by E. Matijević (Springer, Boston, 2012), pp. 57–100.
32. A. P. Ramos, M. A. E. Cruz, C. B. Tovani, et al., Biophys. Rev. **9** (2), 79 (2017).
33. C. Mirjolet, A. L. Papa, G. Créhange, et al., Radiother. Oncol. **108** (1), 136 (2013).
34. S. Khoei, S. R. Mahdavi, H. Fakhimikabir, et al., Int. J. Radiat. Biol. **90** (5), 351 (2014).
35. K. Khoshgard, P. Kiani, A. Haghparast, et al., Int. J. Radiat. Biol. **93** (8), 757 (2017).
36. E. Engels, M. Westlake, N. Li, et al., Biomed. Phys. Eng. Express **4** (4), 044001 (2018).
37. A. Montazeri, Z. Zal, A. Ghasemi, et al., Pharm. Nanotechnol. **6** (2), 111 (2018).
38. L. Maggiorella, G. Barouch, C. Devaux, et al., Future Oncol. **8** (9), 1167 (2012).
39. J. Marill, N. M. Anesary, P. Zhang, et al., Radiat. Oncol. **9**, 150 (2014).
40. R. Brown, S. Corde, S. Oktaria, et al., Biomed. Phys. Eng. Express **3** (1), 015018 (2017).
41. C. Stewart, K. Konstantinov, S. McKinnon, et al., Phys. Med. **32** (11), 1444 (2016).
42. E. Brauer-Krisch, J. F. Adam, E. Alagoz, et al., Phys. Med. **31** (6), 568 (2015).
43. J. C. Roeske, L. Nunez, M. Hoggarth, et al., Technol. Cancer Res. Treat. **6** (5), 395 (2007).
44. M. Hossain and M. Su, J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces **116** (43), 23047 (2012).
45. S. J. McMahon, H. Paganetti, and K. M. Prise, Nanoscale **8** (1), 581 (2016).
46. V. N. Morozov, A. V. Belousov, G. A. Krusanov, et al., Optics and Spectroscopy **125** (1), 104 (2018). [В. Н. Морозов, А. В. Белоусов, Г. А. Крусанов и др., Оптика и спектроскопия **125** (1), 101 (2018)]
47. R. Nowotny, XMuDat: Photon attenuation data on PC, https://www-nds.iaea.org/publications/iaea-nds/iaea-nds-0195.htm (1998).
48. J. H. Hubbell and S. M. Seltzer, Tables of X-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients, http://www.nist.gov/pml/data/xraycoef (1996).
49. Geant4: A Simulation Toolkit, https://geant4.web.cern.ch.
50. A. V. Belousov, U. A. Bliznyuk, P. Y. Borschegovskaya, et al., Mosc. Univ. Phys. Bull. **69** (2), 157 (2014).
51. E. Lechtman, N. Chattopadhyay, Z. Cai, et al., Phys. Med. Biol. **56** (15), 4631 (2011).
52. B. Koger and C. Kirkby, Phys. Med. Biol. **62** (21), 8455 (2017).
53. N. Ma, F. G. Wu, X. Zhang, et al., ACS Appl. Mater. Interfaces **9** (15), 13037 (2017).

54. A. V. Belousov, V. N. Morozov, G. A. Krusanov, et al., Dokl. Phys. **63** (3), 96 (2018).
55. A. V. Belousov, V. N. Morozov, G. A. Krusanov, et al., Biomed. Phys. Eng. Express **4** (4), 045023 (2018).
56. A. V. Belousov, V. N. Morozov, G. A. Krusanov, et al., Biophysics **64** (1), 23 (2019).
57. F. M. Khan and G. P. Gibbons, *The Physics of Radiation Therapy* (Wolters Kluwer, Philadelphia, 2014).
58. A. Lauria, I. Villa, M. Fasoli, et al., ACS Nano **7** (8), 7041 (2013).
59. A. D. Furasova, A. F. Fakhardo, V. A. Milichko, et al., Colloids Surf. B. Biointerfaces **1**, 154 (2017).
60. G. Singh, B. H. McDonagh, S. Hak, et al., J. Mater. Chem. B **5**, 418 (2017).
61. I. Villa, C. Villa, A. Monguzzi, et al., Nanoscale **10** (17), 7933 (2018).
62. H. Deng, F. Chen, C. Yang, et al., Nanotechnology **29** (41), 415601 (2018).

Perspectives of Metal Oxide Nanoradiosensitizers: Impact of Elemental Composition of Particles, Characteristics and Effects of Radiation Sources on Enhancement of the Absorbed Dose

V.N. Morozov*, **, A.V. Belousov*, V.I. Zverev*, A.A. Shtil*, ****, *****, M.A. Kolyvanova*, **, and P.V. Krivoshapkin******

**Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123182 Russia*

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

****Department of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskye Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

*****Biochemistry Cluster, ITMO University, ul. Lomonosova 9, St. Petersburg, 119002 Russia*

******Blokhin National Medical Center of Oncology, Kashirskoye shosse 24, Moscow, 115478 Russia*

Nanoparticles of high atomic number materials have gained interest as they seem to be perfect as radiosensitizers for radiation therapy used in cancer treatment. A variety of nanoparticles and radiation sources make actual the challenge to select their optimal combinations to improve as much as possible the therapeutic outcome of radiation therapy. In this study the values of dose enhancement factors were calculated for elemental compositions of metal oxide nanoparticles (Al_2O_3, TiO_2, MnO_2, Fe_2O_3 and Fe_3O_4, NiO, GeO_2, ZrO_2, CeO_2, Gd_2O_3, Tm_2O_3, HfO_2, Ta_2O_5, Bi_2O_3) as well as GeO_2 and HfO_2 doped with rare earth La or Yb in combination with monochromatic photons (1-500 keV) and X-ray radiation equivalent to that generated by kilovoltage X-ray therapy machines. The maximum values of dose enhancement factors, which were achieved with 10 mg/ml of nanoparticles, for monochromatic photons and tested X-ray spectra were found to fall in the range of 1.03 to 2.55 and 1.01–2.33, respectively. Doping of GeO_2 with 20% La or Yb increased maximum dose enhancement factor by ~10%. Doping of HfO_2 occurred without significant changes in the value of dose enhancement factor. Thus, all investigated elemental compositions of nanoparticles, except Al_2O_3 (dose enhancement factor $\leqslant 1.02$), are promising for kilovoltage X-ray radiotherapy. However, complex dependence of DEF on the composition of X-ray radiation spectra requires detailed studies of the impact of irradiation conditions on the magnitude of the radiomodifying effect of nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, radiation therapy, radiosensitizers, dose enhancement factor

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 638–645

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 615.849.114, 577.34

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧИ ЭНЕРГИИ КЛИНИЧЕСКОГО ПУЧКА ПРОТОНОВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В ОБЛУЧАЕМУЮ МИШЕНЬ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

© 2020 г. А.В. Белоусов*, В.Н. Морозов*, **, Г.А. Крусанов*, *, А.Н. Моисеев****, А.С. Давыдов*, А.А. Штиль*, *****, В.А. Климанов*, ******, М.А. Колыванова*, **, А.С. Самойлов***

**Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182, Москва, ул. Маршала Новикова, 23*

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

****Научно-исследовательский институт им. Д.В. Скобельцына Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2*

*****Научно-исследовательской институт технической физики и автоматики, 115230, Москва, Варшавское шоссе, 46*

******Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Каширское шоссе, 24*

*******Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Москва, Каширское шоссе, 31*

E-mail: morozov.v.n@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2019 г.
После доработки 03.04.2020 г.
Принята к публикации 07.04.2020 г.

Наночастицы золота являются перспективными радиосенсибилизаторами для протонной лучевой терапии, физические механизмы действия которых до сих пор не до конца изучены. В настоящей работе для протонного пучка с энергией 150 МэВ методом Монте-Карло в программном коде Geant4 оценены изменения вкладов в поглощенную в дозу первичных и вторичных частиц, среднедозового значения линейной передачи энергии и относительной биологической эффективности, вызванные добавлением 50 мг/мл наночастиц золота в облучаемый водный фантом. Присутствие наночастиц золота не привело к существенному изменению поглощенной дозы и положения пика Брегга, однако привело к перераспределению вкладов вторичных частиц: в области ~10 мм за пиком наблюдалось увеличение вкладов протонов (~16%), ядер отдачи (~58%), α-частиц (~400%), дейтронов (~900%), тритонов (~3000%) и фотонов (~7000%); вклад вторичных электронов уменьшился на ~35%. Такое перераспределение привело к примерно пятикратному увеличению среднедозового значения линейной передачи энергии на дистальном краю кривой Брегга, что в свою очередь может приводить к росту относительной биологической эффективности в этой области от ~1.4 до ~2.2 раза. Таким образом, во избежание нежелательных повреждений перифокальных тканей критически важным является учет наличия наночастиц золота при планировании протонной лучевой терапии.

Ключевые слова: наночастицы золота, радиосенсибилизация, протонная лучевая терапия, относительная биологическая эффективность, Geant4.

DOI: 10.31857/S000630292004002X

Ионизирующие излучения повсеместно используются для лечения широкого спектра заболеваний. Помимо наиболее распространенных фотонов могут быть использованы электроны и различные тяжелые частицы: нейтроны, ионы, а также протоны [1–3]. Тяжелые частицы привлекательны благодаря высокой биологической эффективности [4], кроме того, ионам и протонам свойственно специфическое взаимодействие с веществом: количество передаваемой ему энергии резко возрастает в конце пробега частиц, в области пика Брегга [5]. Это означает, что линейная передача энергии (ЛПЭ), линейная плотность ионизации, выход вторичных частиц и свободных радикалов в области пика Брегга резко возрастают. Изменяя начальную энергию адронного пучка, можно регулировать глубинное положение пика Брэгга с точностью до миллиметра, что позволяет лучше контролировать размер и

Сокращения: ЛПЭ – линейная передача энергии, НЧЗ – наночастицы золота, ОБЭ – относительная биологическая эффективность.

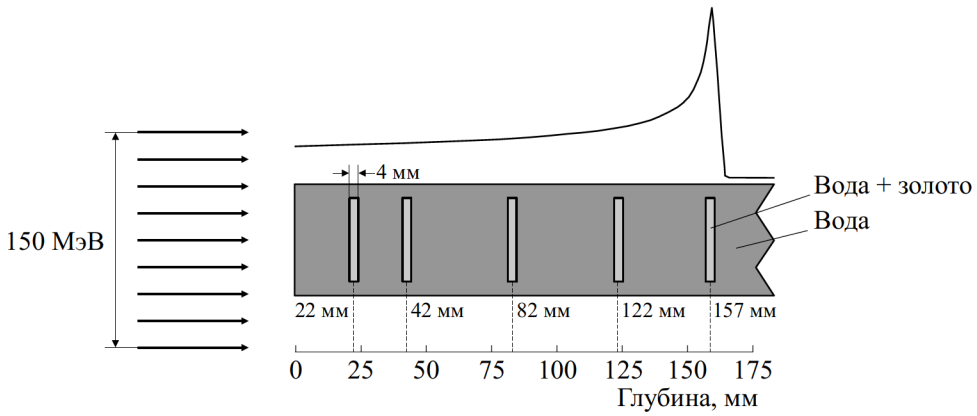


Рис. 1. Схематичное изображение используемой модели.

форму облучаемой области, а также значительно уменьшить нежелательное лучевое воздействие на окружающие нормальные ткани.

Несмотря на доказанную для ряда случаев эффективность протонной лучевой терапии [6, 7] и интенсивное развитие этого метода (по данным на февраль 2020 года по всему миру действует уже 89 установок протонной лучевой терапии, 4 из которых открылись в 2017 году, 11 – в 2018 году, 13 – в 2019 году [8]), ее возможности значительно менее изучены по сравнению с классической фотонной терапией. Актуальными вопросами протонной лучевой терапии остаются сочетание с химио- и иммунотерапией, а также использование противоопухолевых радиосенсибилизаторов, среди которых в отдельный класс выделяются наночастицы с высоким атомным номером, такие как наночастицы золота (НЧЗ) [9–11]. Хотя наночастицы продемонстрировали высокую эффективность в комбинации с протонным облучением как *in vitro*, так и *in vivo* [12–17], физические механизмы радиосенсибилизации представляются не до конца понятными. Компьютерные расчеты показали, что в присутствии наночастиц наблюдается локальное увеличение поглощенной дозы [18, 19], однако экспериментально значительного макроскопического увеличения поглощенной дозы в присутствии элементов с высоким атомным номером выявлено не было [20, 21]. При протонном облучении наночастицы способны увеличивать радиационно-химический выход свободных радикалов [22], а также генерировать вторичное излучение [21–24]. При этом помимо прямой ионизации вторичные электроны могут образовываться при возбуждении плазмонных колебаний на поверхности НЧЗ [25].

Рассмотрение роли вторичных частиц, образующихся под действием протонного пучка в присутствии НЧЗ, представляется крайне важным для изучения физико-химических механизмов радиосенсибилизации. Из-за разных значений ЛПЭ эти частицы могут иметь различную биологическую эффективность, кроме того, со вторичными частицами связаны риски повреждения окружающих опухоль нормальных тканей [26, 27].

В настоящей работе методом Монте-Карло оценивали вклады в поглощенную дозу в водном фантоме различных первичных и вторичных частиц, образующихся при прохождении монохроматического протонного пучка, в том числе в присутствии НЧЗ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вычисления методом Монте-Карло были выполнены в программном коде Geant4 [28] на суперкомпьютерном кластере «Ломоносов-1» (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва). В качестве облучаемой мишени использовали водный фантом размером 20 × 20 × 30 см. Присутствие НЧЗ моделировали изменением элементного состава образца, полагая однородное распределение частиц в объеме. Золото добавляли в пять областей в фантоме на различной глубине проникновения протонного пучка: 20–24 мм, 40–44 мм, 80–84 мм, 120–124 мм и 155–159 мм (рис. 1). Концентрация НЧЗ составляла 50 мг/мл [29, 30]. Вычисления проводили для двух моделей: фантома, однородно заполненного водой (без НЧЗ), и фантома с пятью заполненными НЧЗ областями по ходу протонного пучка. Для накопления данных фантом делили на 500 слоев толщиной 0.08 см, в каждом из которых определяли энергию всех первичных и вторичных частиц. При моделировании устанавливали минимальный пробег вторичных частиц в 10 мкм, при меньшем пробеге их энергия выделялась локально в точке рождения. Среднедозовое значение ЛПЭ (L_D) рассчитывали по следующей формуле [31]:

$$L_D = \frac{\sum_i E_i^2 / l_i}{\sum_i E_i}, \quad (1)$$

где E_i – энергия выделяющаяся на i-м шаге моделирования; l_i – длина i-го шага.

Значение относительной биологической эффективности (ОБЭ) определяли по формуле

$$ОБЭ_{max} = 1.00 + \varepsilon L_D, \quad (2)$$

где значения коэффициента ε варьируют от 0.006 до 0.16 кэВ/мкм [32].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нормированное глубинное распределение поглощенной дозы, формируемое в фантоме моноэнергетическим пучком протонов с начальной энергией 150 МэВ, представлено на рис. 2а. Доза на входе в фантом составляет ~20% от максимального значения, пик Брегга располагается на глубине ~156 мм. Ширина области l_{80-80} между проксимальным и дистальным краями пика составляет ~4 мм, а ширина дистального спада дозы l_{80-20} равна ~2 мм.

Поскольку взаимодействие протонов с веществом сопровождается образованием большого количества вторичных частиц [5, 33], поглощенная в фантоме доза формируется как первичными протонами, так и вторичными частицами. Вклады первичных и вторичных частиц в поглощенную дозу на различных глубинах проникновения протонного пучка представлены на рис 2б. На графике показаны только те типы вторичных частиц, чей вклад в поглощенную дозу составляет более 10^{-6}, а именно α-частицы, Не-3, дейтроны, тритоны, электроны, γ-кванты и ядра отдачи. Наибольший вклад (~70–90% в области пика Брегга) вносят первичные и вторичные протоны. Вклад вторичных электронов на различных участках кривой Брегга составляет ~10–30%, ядер отдачи и α-частиц ~1%, прочих частиц – менее 1%.

Присутствие в водном фантоме НЧЗ не привело к значительному изменению поглощенной дозы, а также не повлияло на положение пика Брегга и величины l_{80-80} и l_{80-20}. В то же время наблюдалось заметное перераспределение вкладов вторичных частиц в поглощенную дозу, причем наиболее значительные изменения отмечены на дистальном краю кривой Брегга, в области ~10 мм за пиком. Отношения вкладов вторичных частиц в поглощенную дозу при наличии и в отсутствии НЧЗ в облучаемом фантоме приведены на рис. 3. Для всех частиц, за исключением вторичных электронов и Не-3, в присутствии НЧЗ наблюдалось увеличение вкладов в поглощенную дозу на дистальном краю пика Брегга. Для протонов максимальное увеличение составило ~16% (рис. 3а), для ядер отдачи ~58% (рис. 3в), для α-частиц ~400% (рис. 3г), для дейтронов ~900% (рис. 3ж), для тритонов ~3000% (рис. 3е). Наиболее значительно увеличивается вклад в поглощенную дозу вторичных фотонов (рис. 3з): в областях локализации НЧЗ наблюдалось увеличение более чем в 10 раз, а в области за пиком Брегга более чем в 70 раз. Такое увеличение вклада вторичных фотонов может быть связано с различиями в сечении образования характеристического излучения для золота и воды. Однако несмотря на столь значительное увеличение, вклад фотонов в поглощенную дозу на всем участке кривой Брегга составляет не более 0.1%, что в очередной раз [34, 35] демонстрирует ошибочность выдвинутого в работе [12] предположения об основной роли вторичных фотонов в эффекте радиосенсибилизации наночастиц в комбинации с протонным облучением.

Вторичные электроны играют важную роль при радиационно-индуцированных повреждениях биомолекул [36], а увеличение выхода этого вида частиц в присутствии НЧЗ считается ключевым механизмом радиосенсибилизации [9]. Однако в настоящей работе увеличения вклада вторичных электронов в поглощенную дозу обнаружено не было. Результаты расчетов свидетельствуют об уменьшении вклада этого типа частиц в области пика и на дистальном краю кривой Брегга до 35% (рис. 3б). Отсутствие изменений в области до пика Брегга и последующее уменьшение наблюдалось также для вклада в поглощенную дозу Не-3 (рис. 3д).

Перераспределение вкладов вторичных частиц, наблюдаемое в присутствии НЧЗ, привело к изменению среднедозового значения ЛПЭ L_D. Глубинное распределение L_D в водном фантоме в отсутствии НЧЗ приведено на рис. 4а. Начиная от входа в фантом, значение L_D монотонно снижается с ~8.5 до ~6 кэВ/мкм. Затем в области пика Брегга наблюдается резкий подъем до ~13 кэВ/мкм, спадающий на дистальном краю кривой. В присутствии НЧЗ на начальном участке кривой Брегга, проксимальном крае, а также в области пика существенные изменения L_D не наблюдались. Однако на дистальном краю кривой Брегга в присутствии НЧЗ наблюдается резкое, более чем пятикратное, увеличение L_D (рис. 4б).

На рис. 5 показаны отношения глубинных зависимостей ОБЭ в присутствии и в отсутствие НЧЗ, рассчитанных по формуле (2) для значений коэффициента наклона ε, равных 0.01, 0.02 и 0.04 мкм·кэВ$^{-1}$ согласно методике [32]. Наглядно видно отсутствие изменения ОБЭ в области от входа протонного пучка в фантом плоть до дистального

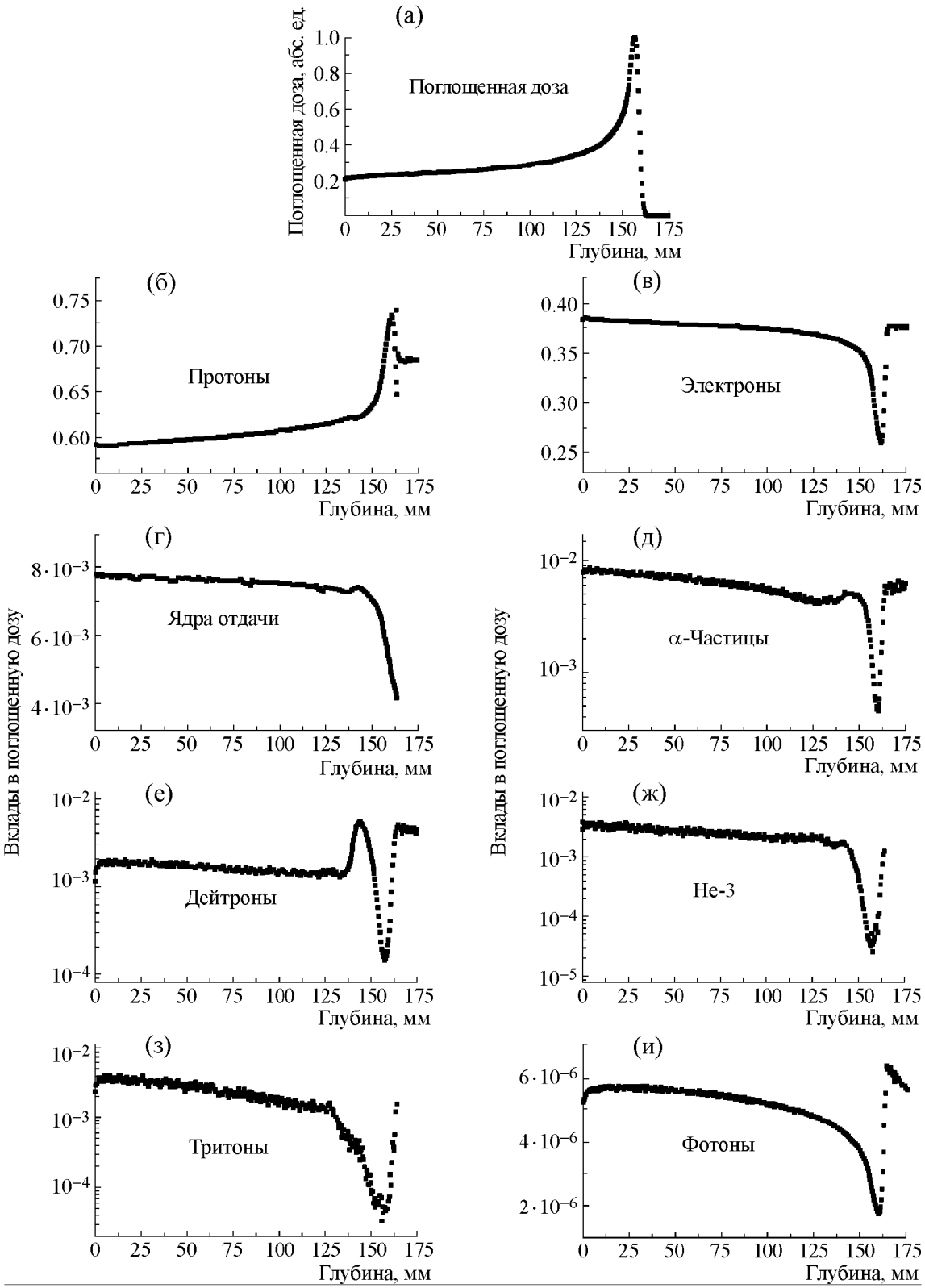


Рис. 2. Глубинное распределение поглощенной дозы при прохождении пучка протонов с начальной энергией 150 МэВ через водный фантом (а); вклады в поглощенную дозу первичных и вторичных частиц: (б) – протоны, (в) – электроны, (г) – ядра отдачи, (д) – α-частицы, (е) – дейтроны, (ж) – He-3, (з) – тритоны, (и) – фотоны. Показаны типы частиц, чей вклад составляет более 10^{-6}.

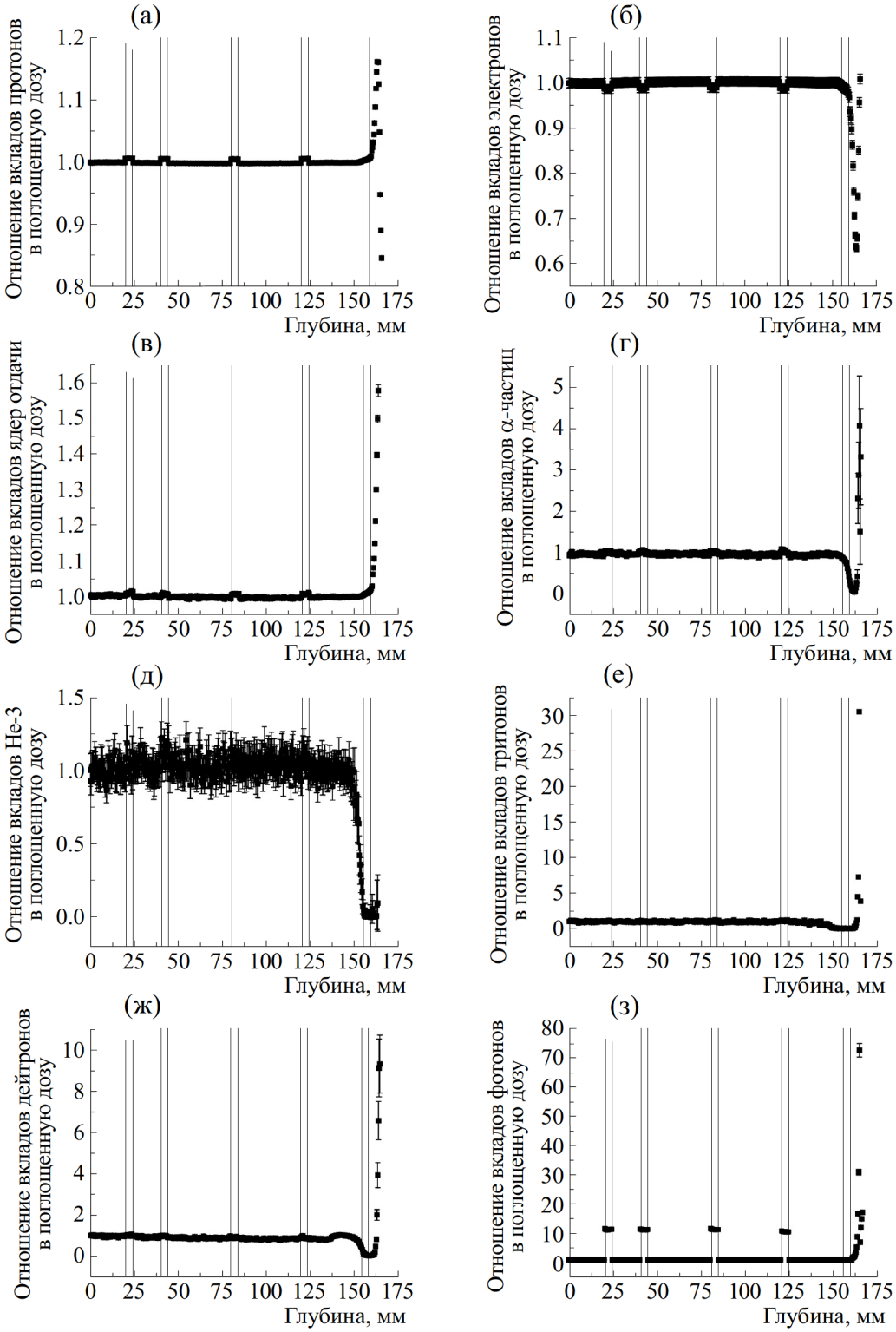


Рис. 3. Отношение вкладов в поглощенную дозу первичных и вторичных частиц при наличии и в отсутствии 50 мг/мл НЧЗ в фантоме: (а) – протоны, (б) – электроны, (в) – ядра отдачи, (г) – α-частицы, (д) – He-3, (е) – тритоны, (ж) – дейтроны, (з) – фотоны.

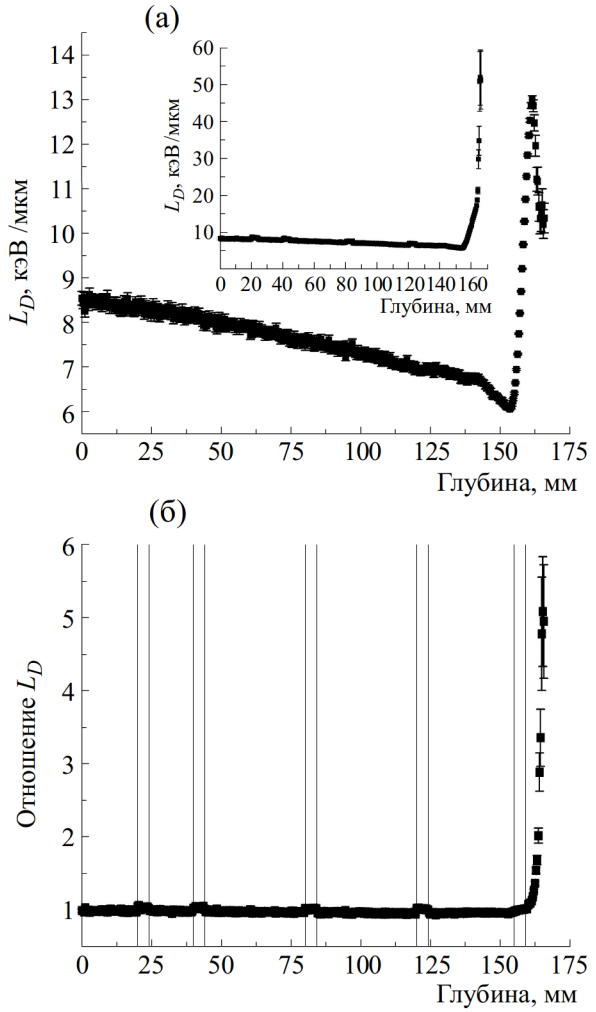


Рис. 4. (а) – Глубинная зависимость среднедозового значения ЛПЭ в отсутствие НЧЗ (на вставке – в присутствии 50 мг/мл НЧЗ); (б) – отношения среднедозовых значений ЛПЭ в присутствии и в отсутствие 50 мг/мл НЧЗ в фантоме.

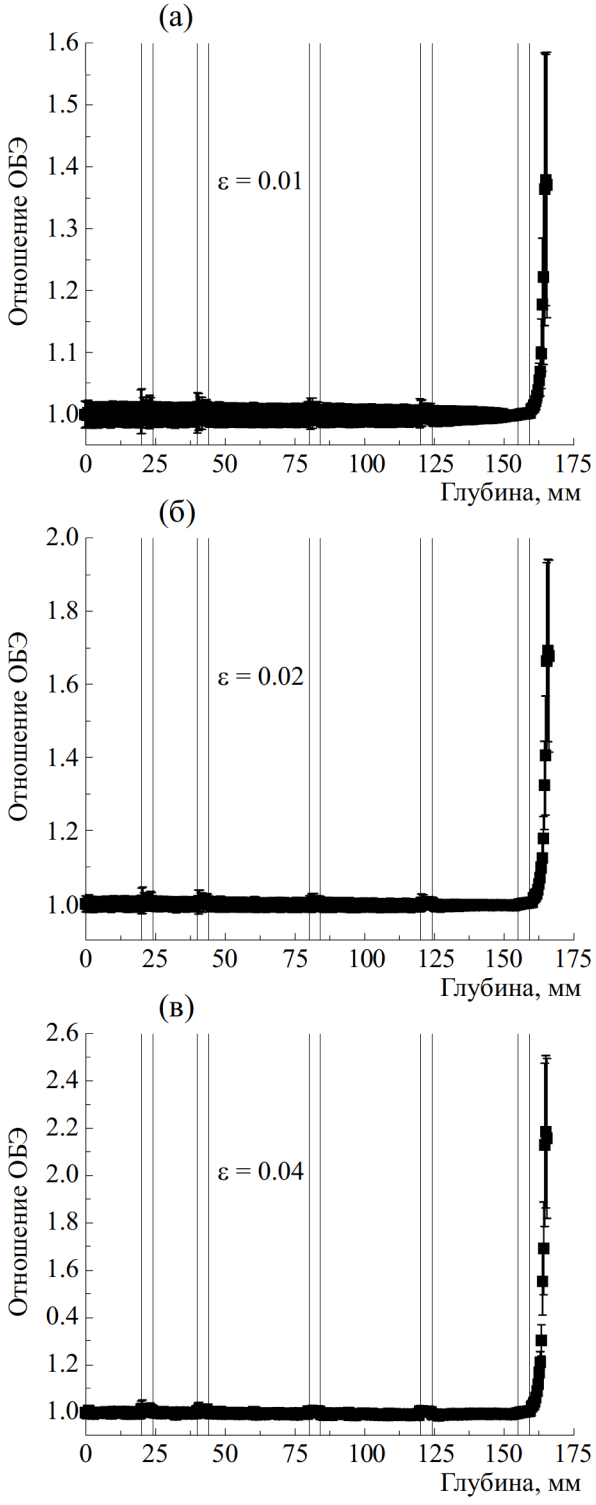


Рис. 5. Отношение глубинных распределений ОБЭ в присутствии и в отсутствие 50 мг/мл НЧЗ в фантоме при различных значениях коэффициента ε: (а) – ε = 0.01, (б) – ε = 0.02, (в) – ε = 0.04.

края кривой Брегга. Увеличение среднедозового значения ЛПЭ в присутствии НЧЗ может приводить к росту ОБЭ на дистальном краю кривой Брегга, т.е. на границе опухоли и здоровой ткани, от ~1.4 до ~2.2 раза в зависимости от величины коэффициента ε.

Следует отметить, что вклад в дозу в области пика Брэгга максимален именно на дистальном конце мишени облучения из-за суперпозиции пучков с разной энергией, применяемой для создания равномерного по объему мишени дозового распределения [37, 38]. Вторым важным моментом является высокая чувствительность пробега протонов и, следовательно, позиции пика Брэгга от анатомических изменений и точности определения физического состава тканей пациента вдоль пробега протонов [39]. Таким образом, поскольку основой протонной лучевой терапии является высокая точность воздействия на опухоль, применение НЗЧ в качестве радиосенсибилизаторов требует повышенной осторожности.

Увеличение среднедозового значения ЛПЭ и, следовательно, ОБЭ на дистальном краю кривой Брегга, т.е. в области границы опухоли и нормальной ткани, может приводить к незапланированным повреждениям последней, что может сказаться на качестве и безопасности лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Присутствие НЧЗ в облучаемом фантоме в концентрации 50 мг/мл не привело к значительным изменениям характеристик дозных полей, в том числе к увеличению поглощенной дозы. В присутствии НЧЗ показано существенное перераспределение вкладов первичных и вторичных частиц в поглощенную дозу в водном фантоме. Основные изменения наблюдались на дистальном краю кривой Брегга, т.е. на границе между опухолью и нормальной тканью. Перераспределение вкладов в поглощенную дозу привело к более чем пятикратному увеличению среднедозового значения ЛПЭ на дистальном краю кривой Брегга, что в свою очередь привело к росту ОБЭ от ~1.4 до ~2.2 раза. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости учета НЧЗ при планировании протонного облучения во избежание нежелательных повреждений граничащих с опухолью нормальных тканей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М. В. Ломоносова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития ядерной медицины АО «Наука и инновации» ГК «Росатом» (проект АААА-А19-119122590084-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Schulz-Ertner and H. Tsujii, J. Clin. Oncol. **25**, 953 (2007).
2. T. Mitin and A. L. Zietman, J. Clin. Oncol. **32**, 2855 (2014).
3. D. I. Yurkov, S. V. Syromukov, V. V. Tatarskiy, et al., Acta Naturae **11**, 99 (2019).
4. B. S. Sørensen, J. Overgaard, and N. Bassler, Acta Oncol. **50**, 757 (2011).
5. W. D. Newhauser and R. Zhang, Phys. Med. Biol. **60**, R155 (2015).
6. R. Mohan and D. Grosshans. Adv. Drug Deliv. Rev. **109**, 26 (2017).
7. X. Tian, K. Liu, Y. Hou, et al., Mol. Clin. Oncol. **8**, 15 (2018).
8. *Particle Therapy Co-Operative Group. Particle therapy facilities in clinical operation*. URL: https://www.ptcog.ch/index.php/facilities-in-operation (дата обращения 24.02.2020).
9. S. Lacombe, E. Porcel, and E. Scifoni, Cancer Nanotechnol. **8**, 9 (2017).
10. Y. Liu, P. Zhang, F. Li, et al., Theranostics **8**, 1824 (2018).
11. D. Peukert, I. Kempson, M. Douglass, and E. Bezak, Phys. Med. **47**, 121 (2018).
12. J. K. Kim, S. J. Seo, K. H. Kim, et al., Nanotechnology **21**, 425102 (2010).
13. J. C. Polf, L. F. Bronk, W. H. Driessen, et al., Appl. Phys. Lett. **98**, 193702 (2011).
14. J. K. Kim, S. J. Seo, H. T. Kim, et al., Phys. Med. Biol. **57**, 8309 (2012).
15. J. C. Jeynes, M. J. Merchant, A. Spindler, et al., Phys. Med. Biol. **59**, 6431 (2014).
16. S. Li, S. Penninckx, L. Karmani, et al., Nanotechnology **27**, 455101 (2016).
17. S. Li, S. Bouchy, S. Penninckx, et al., Nanomedicine. **14**, 317 (2019).
18. C. Wälzlein, E. Scifoni, M. Krämer, and M. Durante, Phys. Med. Biol. **59**, 1441 (2014).
19. S. McKinnon, S. Guatelli, S. Incerti, et al., Phys. Med. **32**, 1584 (2016).
20. R. Ahmad, G. Royle, A. Lourenço, et al., Phys. Med. Biol. **61**, 4537 (2016).
21. J. Cho, C. Gonzalez-Lepera, N. Manohar, et al., Phys. Med. Biol. **61**, 2562 (2016).
22. H. N. Tran, M. Karamitros, V. N. Ivanchenko, et al., Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B **373**, 126 (2016).
23. J. Gao and Y. Zheng, Int. J. Cancer Ther. Oncol. **2**, 02025 (2014).
24. A. C. Heuskin, B. Gallez, O. Feron, et al., Med. Phys. **44**, 4299 (2017).
25. A. V. Verkhovtsev, A. V. Korol, and A. V. Solov'yov, J. Phys. Chem. C **119**, 11000 (2014).
26. H. Jiang, B. Wang, X. G. Xu, et al., Phys. Med. Biol. **50**, 4337 (2005).
27. P. J. Taddei, D. Mirkovic, J. D. Fontenot, et al., Phys. Med. Biol. **54**, 2259 (2009).
28. 28. J. Allison, K. Amako, J. Apostolakis, et al., Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A **835**, 186 (2016).
29. W. Ngwa, G. M. Makrigiorgos, and R. I. Berbeco, Phys. Med. Biol. **55**, 6533 (2010).
30. M. Hossain and M. Su, J. Phys. Chem. C **116**, 23047 (2012).

31. F. Guan, C. Peeler, L. Bronk, et al., Med. Phys. **42**, 6234 (2015).
32. A. V. Belousov, R. B. Bahtiosin, M. A. Kolyvanova, et al., Med. Radiol. Radiat. Safety **64**, 5 (2019).
33. G. Kraft, Prog. Part. Nucl. Phys. **45**, S473 (2000).
34. G. Dollinger, Nanotechnology **22**, 248001 (2011).
35. C. Le Sech, K. Kobayashi, N. Usami, et al., Nanotechnology **23**, 078001 (2012).
36. E. Alizadeh, T. M. Orlando, and L. Sanche, Annu. Rev. Phys. Chem. **66**, 379 (2014).
37. S. Brousmiche, K. Souris, J. O. de Xivry, et al., Phys. Med. Biol. **62**, 8226 (2017).
38. M. Goitein and G. T. Chen, Med. Phys. **10**, 831 (1983).
39. F. Tommasino, M. Rovituso, E. Bortoli, et al., Physica Medica **58**, 99 (2019).

Change in Linear Energy Transfer of Clinical Proton Beam in the Presence of Gold Nanoparticles

A.V. Belousov*, V.N. Morozov*, **, G.A. Krusanov*, *, A.N. Moiseev****, A.S. Davydov*, A.A. Shtil*, *****, V.A. Klimanov*, ******, M.A. Kolyvanova*, **, and A.S. Samoylov***

**Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency of Russian Federation, ul. Marshala Novikova 23, Moscow, 123182 Russia*

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

****Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

*****Research and Development Institute for Technical Physics and Automation, Varshavskoye Shosse 46, Moscow, 115230 Russia*

******Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoye Shosse 24, Moscow, 115478 Russia*

*******National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Kashirskoye Shosse 31, Moscow, 115409 Russia*

Gold nanoparticles are promising radiosensitizers for proton beam therapy. However, the physical mechanisms of action of gold nanoparticles remain unclear. In the present study, GEANT4 Monte Carlo toolkit was used to make estimations of the changes in the contribution to the absorbed dose of primary and secondary particles, in dose-averaged linear energy transfer values, and the relative biological effectiveness of 150 MeV proton beam, caused by addition of 50 mg/ml of gold nanoparticles in the irradated water. In the presence of gold nanoparticles no significant changes were found in the absorbed dose and the Bragg peak position while redistribution of the contribution of secondary particles to the absorbed dose was occured. An increase in the contributions of protons (~16%), recoil nuclei (~58%), α-particles (~400%), deuterons (~900%), tritons (~3000%) and photons (~7000%) was observed ~10 mm beyond the Bragg peak region. Contributions from the secondary electrons decreased by ~35%. This redistribution led to the ~ 5-fold increase in the dose-averaged linear energy transfer value along distal end of a Bragg curve, that, in turn, may cause an increase in relative biological effectiveness within this region by ~1.4 to ~2.2. Thus, it is critical to take in account the presence of gold nanoparticles in planning proton radiotherapy in order to avoid unwanted damage to the normal tissues around the tumor.

Keywords: gold nanoparticles, radiosensitization, proton radiotherapy, relative biological effectiveness, Geant4

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 646–655

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.32; 57.03

ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА – МОДЕЛЬ ХИНОИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

© 2020 г. Т.В. Сирота

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

E-mail: sirotatv@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.11.2019 г.
После доработки 07.04.2020 г.
Принята к публикации 07.04.2020 г.

Обзор посвящен литературным данным и собственным исследованиям нетривиального хиноидного пути окисления адреналина. Подобным образом могут окисляться все катехоламины с образованием соответствующих аминохромов. Этот процесс моделируется *in vitro* в щелочной среде и известен как цепная реакция автоокисления адреналина, продуктами которой являются адренохром и соединения радикальной природы – супероксид-анионы ($O_2^{-\bullet}$) и другие. Как супероксидгенерирующая модель эта реакция была ранее использована для определения активности супероксиддисмутазы. Нами были предложены различные новые методические подходы, которые позволяют определять активность фермента и выявлять анти/прооксидантные свойства различных соединений и материалов. Этот путь превращения одного из катехоламинов (дофамина) в настоящее время описан как «доклиническая модель болезни Паркинсона». В связи с этим реакция автоокисления адреналина предложена нами для поиска веществ, способных ингибировать процесс хиноидного окисления, т.е. выявлять потенциальные нейропротекторы. Экспериментальные и теоретические исследования этой реакции расширяют представления о механизмах свободно-радикальных процессов, происходящих в организме

Ключевые слова: катехоламины, аминохромы. адреналин, адренохром, супероксид, хиноидное окисление.

DOI: 10.31857/S0006302920040031

ХИНОИДНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

Гормон-медиатор адреналин, участвующий в регуляции функционального состояния симпатоадреналовой системы, вырабатываемый в основном хромаффинной тканью мозгового слоя надпочечников, метаболизируется в организме, как и другие катехоламины, несколькими путями. Основные пути его превращения – оксиметилирование с образованием метанефрина (~70%) и окислительное дезаминирование с участием моноаминооксидазы (~20%). Кроме того, при определенных условиях может происходить и так называемое хиноидное окисление адреналина с образованием хинонов – до адренохрома и далее, возможно, до адренолютина и индола [1, 2]. Специфические ферменты этого пути окисления адреналина не выявлены, но образующиеся продукты существуют и известны ферменты, их утилизирующие [2–6]. Удаление продуктов хиноидного окисления адреналина и других аминохромов происходит с участием ферментов глутатион-S-трансферазы [2, 3] и хинонредуктазы [4]. Адренохром может быть также субстратом гидролазы, липазы, эстеразы [5] и ксантиноксидазы [6]. Подобным образом способны окисляться до соответствующих аминохромов все известные природные катехоламины (биогенные амины) [7–10].

Процесс хиноидного окисления адреналина *in vitro* происходит при внесении его в щелочной карбонатный буфер. Этапы процесса превращения адреналина представлены на рис. 1. Кроме конечного продукта реакции адренохрома в процессе автоокисления происходит и образование $O_2^{-\bullet}$. При попадании адреналина в буфер происходит внутримолекулярная перестройка его молекулы, депротонизация с последующей циклизацией и образование промежуточных продуктов, таких как радикал семихинон (II), адреналинхинон и другие, до соединения хиноидной природы – адренохрома (VI) (рис. 1а). Этот процесс сопровождается высвобождением электронов и последующим одноэлектронным восста-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; БП – болезнь Паркинсона, СОД – супероксиддисмутаза.

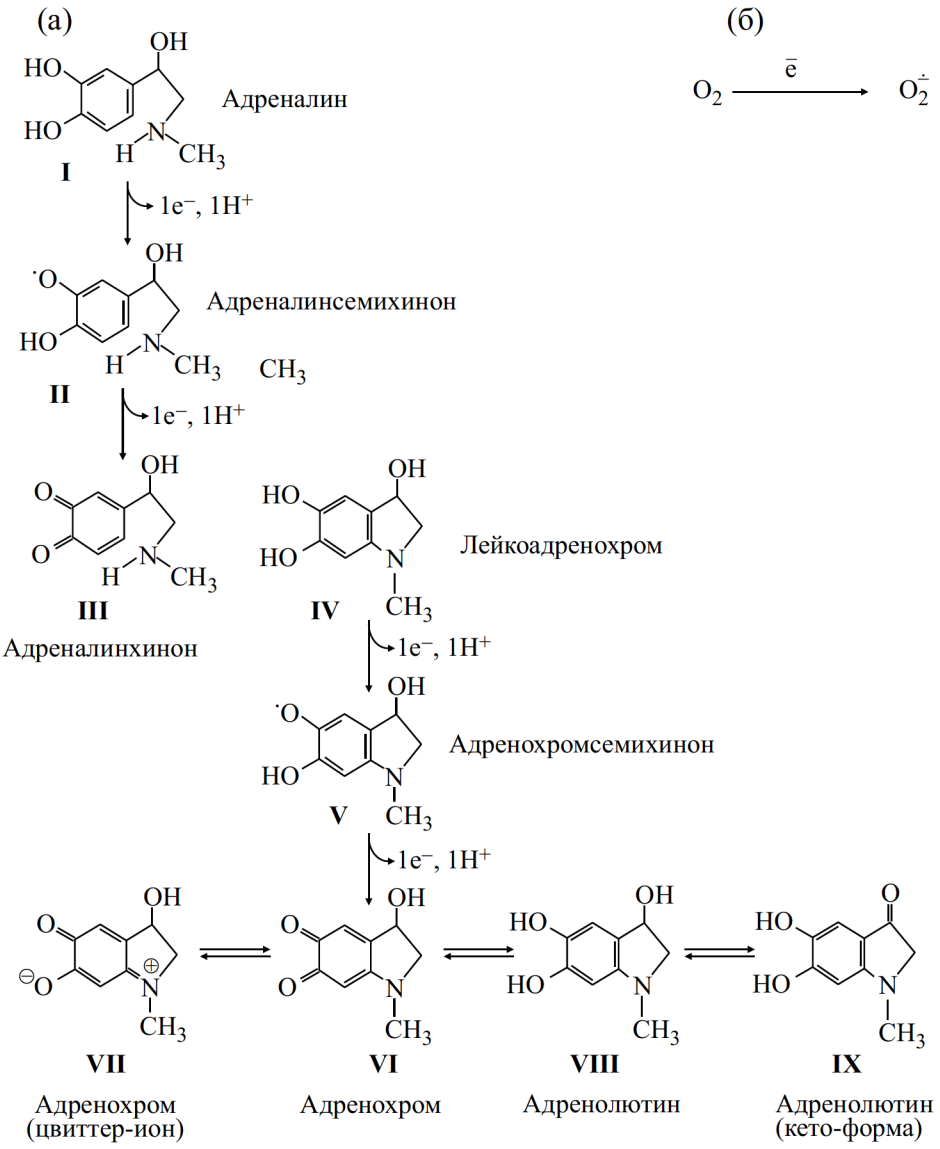


Рис. 1. (а) – Химические превращения адреналина в процессе его хиноидного окисления до адренохрома (VI). Промежуточные продукты реакции – II–V; возможные взаимные переходы конечных продуктов от адренохрома (VI) до VII, VIII и IX. (б) – схема сопряженного процесса образования супероксид-анионов. Составлено согласно работам [7, 8] с некоторыми изменениями и добавлениями [9, 11].

новлением растворенного в среде кислорода и таким образом происходит образование супероксидных радикалов (рис. 1б), т.е. химическое превращение адреналина сопряжено с образованием $O_2^{-\bullet}$. На рис. 2 представлена результирующая схема этого процесса. Эта модельная система известна как супероксидгенерирующая и супероксиддетектирующая цепная реакция автоокисления адреналина [7–11].

Нетривиальный путь окисления относят к аномальному метаболизму катехоламинов, с которым связывают его нейро- и кардиотоксичность [7, 9, 10, 12–23]. Причина токсичности, как предполагается, обусловлена не только накоплением продуктов окисления катехоламинов аминохромов, но и образующимися в этом процессе активными формами кислорода (АФК), а именно $O_2^{-\bullet}$ [13–17]. При недостаточности антиоксидантной защиты АФК могут вызывать окислительный стресс и воспаление. Нейротоксическое действие адренохрома и последующего продукта окисления адренохрома – адренолютина – связывают с так называемой «адренохромной» гипотезой этиологии шизофрении [12, 14–17]. Они известны также как адреномиметики, обладающие галлюциногенными свойствами [12].

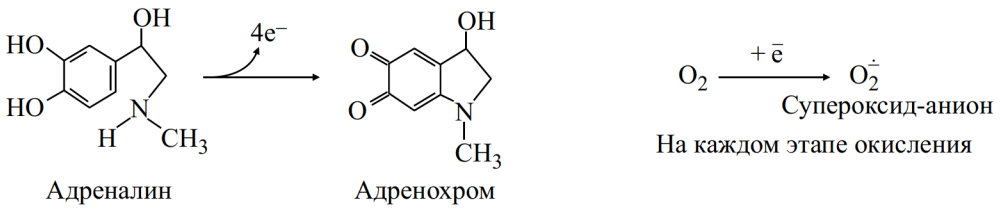


Рис. 2. Краткая схема-резюме хиноидного окисления адреналина.

Описанный много лет назад хиноидный путь окисления адреналина в настоящее время активно обсуждается в литературе в связи с его способностью генерировать АФК. Интерес к этой теме обусловлен также и тем, что продукты окисления адреналина, белки-хиноны, глутатионовые конъюганты адреналина и адренохрома, влияют на редокс-состояние клеток и тканей [15–18]. Их действие обусловлено участием в митохондриальных процессах [19, 20], в регуляции NO-зависимой гуанилатциклазы [21] и функционировании тиреоидных гормонов [22]. Следует отметить, что АФК важны при выполнении нормальных физиологических функций как вторичные мессенджеры внутриклеточной сигнализации, однако избыточное их накопление, нарушение баланса между образованием и их утилизацией приводит к развитию патологического процесса [23].

Особо следует отметить участие аминохрома, производного от катехоламина дофамина, в этиологии болезни Паркинсона (БП) [16, 18] (см. ниже в отдельном разделе).

МЕТОДИЧЕСКИЕ АВТОРСКИЕ ПРИЕМЫ РЕГИСТРАЦИИ ПРОЦЕССА АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

Как описано выше, в условиях *in vitro* хиноидное превращение адреналина с образованием адренохрома происходит в щелочной среде. Методически специально создается высокое значение pH среды, необходимое для более продолжительного существования супероксид-аниона, чтобы была возможность его детектировать. Известные супероксидгенерирующие модели, такие как ферментативная ксантин–ксантиноксидаза [24], химическая ФМС/НАДН [25], адреналиновая по Misra & Fridovich [26] и наши новые разработки «адреналинового» метода [27–29], функционируют при щелочных условиях, что позволяет регистрировать $O_2^{-\bullet}$. Процесс автоокисления происходит по механизму цепной реакции и начинается после внесении адреналина в щелочной раствор (рис. 1 и 2).

Впервые этот процесс окисления адреналина был описан в работе [30] и впоследствии использован в работе [26] для определения активности фермента супероксиддисмутазы (СОД). СОД, перехватывая $O_2^{-\bullet}$, тормозит накопление адренохрома, регистрацию которого проводили спектрофотометрически при длине волны 480 нм [26]. Таким способом определяют активность фермента, а именно по его способности ингибировать скорость образования адренохрома. Нами было установлено, что образование адренохрома в реакции автоокисления адреналина можно регистрировать и в другой области спектра – в диапазоне 330–365 нм [27–29]; используемая длина волны – 347 нм (рис. 3а). Величина оптической плотности в выявленном диапазоне существенно выше (почти на порядок), чем при 480 нм [26]. Рис. 3б иллюстрирует преимущество использования длины волны 347 нм в сравнении с длиной волны 480 нм для регистрации адренохрома. СОД и анти/прооксидантные соединения ингибировали или активировали процесс автоокисления адреналина при регистрации кинетики реакции на этой длине волны [27–29, 31–37, 39].

Последующие исследования этой реакции, связанные с использованием полярографического метода [11] и применением красителя нитросинего тетразолия [38], напрямую показали генерацию $O_2^{-\bullet}$ в этом процессе и затем, в результате диспропорционирования, образование пероксида [11]. На основании этих исследований нами были разработаны новые методические приемы, позволяющие оценивать активность СОД и выявлять анти/прооксидантные свойства различных биологических материалов и химических веществ, используя полярографическую установку или применяя краситель нитросиний тетразолий [29, 31–37]. Обобщенные данные и выработанные критерии оценки антиоксидантной активности и активности СОД, включая стандартизацию условий, описаны в работе [39] и представлены на рис. 4.

УЧАСТИЕ КАРБОНАТ/БИКАРБОНАТНЫХ ИОНОВ В ПРОЦЕССЕ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

Обнаружено, что скорость накопления адренохрома и скорость образования $O_2^{-\bullet}$ (опыты с нитросиним тетразолием) существенно зависят от концентрации карбонат/бикарбонатных ионов в используемом буфере и что эти ионы существенно ускоряют автоокисление адреналина, проявляя прооксидантные свойства [40]. Кроме того, графики исследования зависимости степени ингибирования процесса образования адренохрома и $O_2^{-\bullet}$ от концентрации СОД показали, что в реакции автоокисления адреналина образуются не только супероксид-анионы, но и другие радикальные соединения, т.е. происходит не только одноэлектронное восстановление кислорода, растворенного в буфере, с образованием $O_2^{-\bullet}$, но и одноэлектронное восстановление компонентов буфера с образованием продуктов радикальной природы [40]. Вероятными претендентами могут быть растворенный в буфере диоксид углерода (CO_2) и собственно карбонат/бикарбонатные ионы. В рабочем 0.2 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 10.5 диффузно растворены как атмосферный кислород, так и CO_2, причем растворимость последнего, как известно, в 70 раз выше, чем растворимость O_2 [41–43]. Вероятно, CO_2, подобно кислороду, может принимать электроны, высвобождающиеся в процессе автоокисления адреналина, что приводит к образованию радикалов диоксида углерода. Анализ литературных данных позволил сделать такое предположение [44–49]. На представленной схеме (рис. 5), позиции (1), (2) и (3а) иллюстрируют это положение.

Образование карбонатных анион-радикалов в данной модели также возможно, поскольку все необходимые для этого компоненты присутствуют в среде: буфер $Na_2CO_3/NaHCO_3$, растворенные в буфере атмосферный O_2 и CO_2 и вносимый в систему адреналин, в процессе окисления которого высвобождаются электроны. Эти электроны поступают на кислород, образуя супероксидные анион-радикалы. Супероксид-радикалы могут спонтанно диспропорционировать с образованием пероксида водорода, присутствие которого нами было установлено в полярографических экспериментах с использованием каталазы [11]. Таким образом, в реакционной среде, где происходит автоокисление адреналина, присутствует и образовавшийся пероксид водорода. Согласно литературным данным, бикарбонатный ион HCO_3^-, взаимодействуя с пероксидом, образует промежуточный интермедиат пероксимонокарбонат ($HOOCO^{2-}$) (рис. 5, позиция 3б), формирующий впоследствии карбонатный анион-радикал ($CO_3^{-\bullet}$) [44–49]. Такая логика событий позволяет предположить возможность образования карбонатных радикалов в реакции автоокисления адреналина, что и было показано нами ранее [40]. В пользу этих представлений указывают и работа [50], где описаны интересные «взаимоотношения» в карбонат/бикарбонатных водных системах и цитируются работы относительно возможности одноэлектронного восстановления диоксида углерода с образованием анион радикала $CO_2^{-\bullet}$. Кроме того, в работе [50] также показано, что в обычных условиях в водных растворах карбонат/бикарбонатных ионов постоянно продуцируются супероксид-радикалы и другие АФК и особую роль играют именно эти ионы. Сигнал

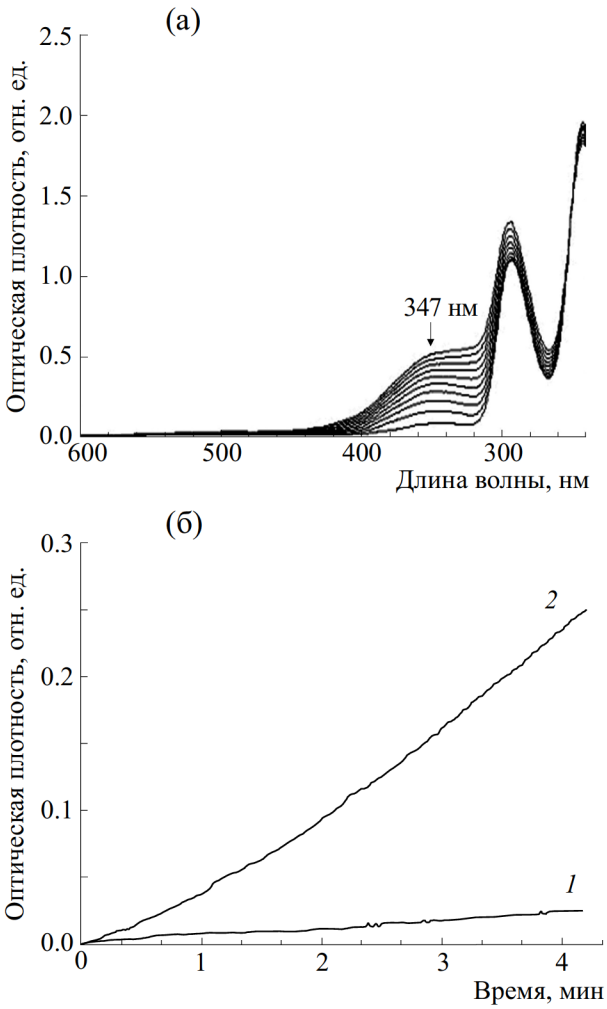


Рис. 3. (а) – Кинетика автоокисления адреналина в 0.2 М карбонатном буфере, pH 10.5; (б) – измерение величины оптической плотности при длине волны 480 нм (кривая 1) и 347 нм (кривая 2). Пояснения в тексте.

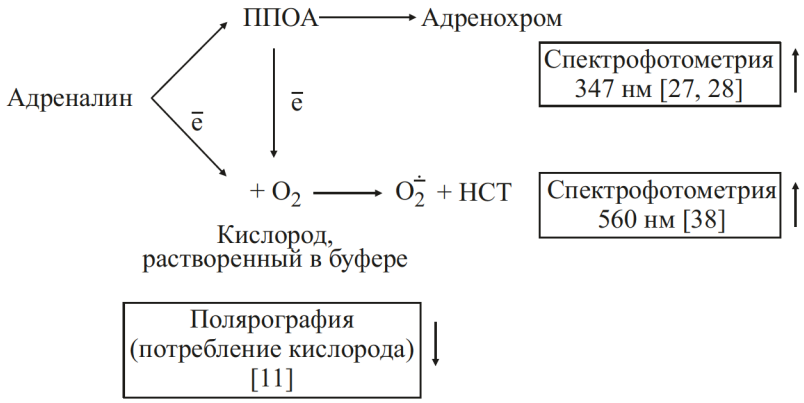


Рис. 4. Различные авторские методические приемы регистрации продуктов реакции автоокисления адреналина (схема). Обозначения: ППОА – промежуточные продукты окисления адреналина, НСТ – нитросиний тетразолий. Стрелками показано нарастание оптической плотности при соответствующей длине волны или убыль (потребление) кислорода из кюветы.

тайрона, специфического ЭПР-зонда супероксидных анион-радикалов, не обнаруживается, если в исследуемой системе pH доведен с помощью NaOH и отсутствуют бикарбонатные ионы. Показано также, что амплитуда сигнала ЭПР тайрона возрастает с ростом концентрации HCO_3^-/CO_3^{2-} (рис. 5, позиция 3в) [50].

В исследуемой нами реакции в результате преобразования адреналина происходит активная «доставка» в буфер электронов, которые, очевидно, «потребляются» как кислородом и CO_2, так и другими компонентами буфера. Полученные результаты и анализ литературных данных впервые позволили предположить, что в данной модельной системе реакции автоокисления адреналина, а это возможно и в организме, образуются не только супероксид-анионы, но и карбонатные радикалы и радикалы диоксида углерода. Уникальная биологическая активность карбонат/бикарбонатных ионов, несомненно, связана и с этой их способностью.

Представленная на рис. 5 схема обобщает наши и литературные данные, показывая, как возможно образование АФК в процессе автоокисления адреналина.

Окисляющийся до адренохрома адреналин и его промежуточные продукты – доноры электронов (этап 1). Высвобождающиеся электроны могут поступать не только на растворенный в буфере кислород, образуя супероксидные анион-радикалы (этап 2), но и на другие компоненты используемого буфера, а именно – на растворенный в буфере атмосферный диоксид углерода, что приводит к образованию радикала диоксида углерода (этап 3а). При взаимодействии бикарбонатных ионов буфера и пероксида водорода, продукта спонтанного диспропорционирования супероксида, могут образовываться карбонатные радикалы (этап 3б, согласно работе [48]). Карбонатные анион-радикалы также могут образовываться из бикарбонатных ионов при участии гидроксил-радикала ($HO^{\bullet}$), продукта одноэлектронного окисления воды (этап 3в, согласно работе [50]).

Поскольку в организме карбонат/бикарбонатные ионы присутствуют повсеместно, нельзя исключить их участие как акцепторов, а затем доноров электронов. Эти буферы – не инертные системы, а биологически активные участники в окислительно-восстановительных реакциях и могут быть мощными прооксидантами. Необходимо это учитывать при использовании подобных буферов в ситуациях, где происходят свободно-радикальные реакции. А это, как известно, постоянно протекающие в организме нормальные окислительно-восстановительные процессы, определяющие редокс-статус и возникающие патологические случаи, связанные с окислительным стрессом.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА ДЛЯ ПОИСКА НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ

Как было отмечено выше, один из механизмов этиопатогенеза болезни Паркинсона (БП) связывают с процессом хиноидного окисления катехоламина дофамина, прогрессирующего нейродегенеративного заболевания, приводящего к гибели (аутофагии) дофаминергических нейронов [15–19, 51–54]. Этот путь превращения катехоламинов описывается как «доклиническая модель БП для поиска нового фармакологического лечения, которое остановило бы развитие этого заболевания» [18, 52, 53]. Катехоламин дофамин – это нейротрансмиттер, который играет важную роль в осуществлении движений. При БП происходит

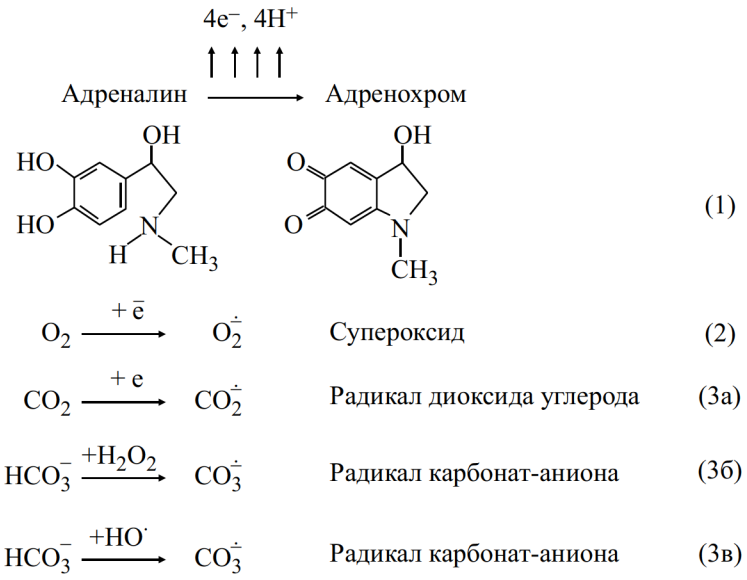


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая окисление адреналина в щелочной среде и связанные с ним процессы образования различных радикалов. Объяснения в тексте. Этап 3б – цитировано по работе [48], этап 3в – цитировано по работе [50].

неконтролируемое цитоплазматическое накопление продукта хиноидного окисления дофамина вещества меланина (он же нейромеланин) в катехоламиноергических нейронах, происходит отложение белка альфа-синуклеина, Parkin-белков, образование телец Леви, ингибирование протеасом, дисфункция митохондрий, а на ранних этапах заболевания – окислительный стресс и нейровоспаление. Нейромеланину приписывают роль нейротоксина, его избыточное образование и вызывает вышеназванные процессы. В работе [18] детально представлена биохимия БП и химизм процесса хиноидного окисления дофамина, объясняющий один из возможных молекулярных механизмов развития этой болезни. В биохимию БП вовлечены различные ферментативные системы – моноаминооксидаза, катехол-орто-метилтрансфераза, DT-диафораза и другие [18, 54–56]. И особое место принадлежит неферментативному хиноидному окислению дофамина, при нарушении метаболизма которого происходит избыточное образование нейротоксина нейромеланина [18, 51–56]. Из аминохрома дофамина в результате его последующих химических превращений возникает нейромеланин: аминохром → 5,6-дигидроксииндол → 5,6-индолхинон → последующая полимеризация с образованием нейромеланина [18]. Процесс происходит в дофаминергических нейронах, а также астроцитах и микроглии в конкретных структурах мозга: *s. nigra, locus ceruleus, nucleus dorsalis n. vagi*. В норме этот процесс происходит в этих структурах мозга, однако при БП характерно чрезмерное накопление нейромеланина.

В своей работе мы использовали модельную реакцию автоокисления катехоламина адреналина как модель хиноидного окисления катехоламина для поиска соединений, способных тормозить этот процесс [57]. В проведенном исследовании была сделана переоценка применения реакции автоокисления адреналина, и она использована не только как супероксидгенерирующая модель, но и как модель хиноидного окисления катехоламина с целью поиска веществ нейропротекторов.

Было показано, что вещества, содержащие сульфгидрильную и, что особенно интересно и важно и впервые показано в нашей работе, дисульфидную группу, могут быть ингибиторами хиноидного окисления. Установлено, что серосодержащие соединения цистеин и восстановленный глутатион, а также окисленный глутатион ингибируют этот процесс. Они рассматриваются, таким образом, как ингибиторы хиноидного окисления и оцениваются как антиоксиданты. IC_{50} цистеина и восстановленного глутатиона близки и составляют 7.5 мкМ. Ингибирование окисленным глутатионом слабее и составляет приблизительно 50–70% относительно цистеина и восстановленного глутатиона. Другие серосодержащие соединения, отличающиеся химическим строением, – аминокислоты таурин и метионин – были неэффективны. Сделано заключение, что биологически активные серосодержащие соединения цистеин, а также восстановленный и окисленный глутатион являются специфическими ингибиторами хиноидного окисления катехоламина и смогут, вероятно, выполнять роль нейропротекторов. Предлагается

использовать эти вещества в лечении и профилактике БП путем направленного воздействия на систему синтеза этих соединений в организме. Такой подход может быть одним из способов защиты клетки от токсического действия продуктов хиноидного окисления катехоламина и окислительного стресса [57].

ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ Ca^{2+} и Mg^{2+} НА РЕАКЦИЮ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

Известно, что ионы металлов переменной валентности (Fe, Mn, Cu, Mo и др.) являются непосредственными участниками цепных и окислительно-восстановительных каталитических реакций. Информация об участии в таких процессах ионов металлов постоянной валентности, биологически активных ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, не найдена. В нашей работе [58] было изучено действие ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на свободно-радикальный процесс автоокисления адреналина. Показано, что Ca^{2+} и Mg^{2} ускоряли реакцию, причем более эффективными были ионы кальция по сравнению с ионами магния. Активация процесса автоокисления адреналина, наблюдаемая при 25–100 мкМ Ca^{2+} или 100–200 мкМ Mg^{2+}, проявлялась в сокращении времени инициации цепной реакции (лаг-период реакции) и увеличении как скорости потребления кислорода, так и образования продукта реакции окисления адреналина адренохрома [58]. Хотя феномен действия ионов металлов был обнаружен значительно раньше [29], объяснить механизм их действия нам помогла работа [59]. Используя методы спектроскопии, полярографии и ЭПР, авторы установили механизм активирующего действия «редокс-инертного кальция и других металлов II группы с постоянной валентностью на процесс хиноидного окисления катехоламина дофамина и пирокатехина». Авторы заключили, что ионы Ca^{2+} активируют процесс автоокисления пирокатехина и дофамина за счет дополнительного депротонирования при образовании комплексов с Ca^{2+}, что и ускоряет перенос электронов на кислород, а также за счет образования комплексов Ca^{2+} с семихиноном, промежуточным продуктом автоокисления катехоламина, продолжая таким образом процесс окисления [59]. Следовательно, причина исследуемого феномена – комплексообразование с кальцием, приводящее к изменению кислотно-основных свойств с ускорением переноса электронов на кислород и ростом концентрации *орто*-семихинона кальция в реакции окисления [59]. Адреналин авторы этой работы не исследовали. Очевидно, что такой механизм действия имеет место и в процессе автоокисления катехоламина адреналина, который исследован в нашей работе [58]. Условия проведения экспериментов в каждом их этих исследований [58, 59] существенно различаются, и тем ценнее полученный результат: биологически важные ионы металлов постоянной валентности Ca^{2+} и Mg^{2+} активируют процесс хиноидного окисления исследованных катехоламинов – адреналина [58], дофамина и пирокатехина [59].

Обнаруженное действие вышеназванных катионов может указывать на их участие в свободно-радикальных процессах, связанных с окислительно-восстановительными реакциями в клетке.

Наше исследование на модельной реакции автоокисления адреналина [58] и работа [59] с использованием непосредственно дофамина показали, что ионы металлов с постоянной валентностью активируют процесс хиноидного окисления катехоламинов. Возвращаясь к теме БП: известно, что ионы металлов переменной валентности (марганец, железо) участвуют в патогенезе БП [18, 23, 51]. Вероятно, и ионы металлов постоянной валентности Ca^{2+} и Mg^{2+}, которые, как показано, активируют процесс хиноидного окисления катехоламинов, также могут принимать участие в этих событиях, и скорее, именно ионы кальция, поскольку они непосредственно задействованы в синаптической передаче. Свободно-радикальные процессы, происходящие при окислении катехоламинов и восстановлении аминохромов и сопровождающиеся образованием АФК, имеют место при патогенезе многих заболеваний: как отмечено выше – в случае БП, при различных формах шизофрении, кардиологических и онкологических заболеваниях [7, 12, 16, 18, 23, 60, 61]. Биологически активные ионы Ca^{2+} и Mg^{2} могут, таким образом, модулировать действие катехоламина в организме.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА КАК СУПЕРОКСИДГЕНЕРИРУЮЩЕЙ И СУПЕРОКСИДДЕТЕКТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ И КАК МОДЕЛИ ХИНОИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

Наши предыдущие работы и материал настоящего обзора, где описаны методические возможности данной модельной системы, подытоживают и определяют область практического ее применения. Можно определять активность фермента СОД и антиоксидантную активность биологических материалов – цитоплазматических фракций гомогенатов тканей и биологических жидкостей, в том числе гемолизата цельной крови и гемолизата отмытых эритроцитов; также антиоксидантную/прооксидантную активность фармацевтических форм (настойки, экстракты и

т. д.), растворов различных субстанций и веществ [27–29, 31–39, 62–64]. Особо необходимо отметить, что данная методика позволяет определять антиоксидантную/прооксидантную активность гидрофобных соединений [34, 35], а именно жидких масел. Обнаруженное проксидантное свойство амарантового масла проявилось, по нашим данным, в его биологическом действии [34, 35].

Следует отметить, что данная модель, ранее обозначенная только как супероксидгенерирующая система, «раскрыла» и иные свои возможности: использована нами и как модель хиноидного окисления катехоламина, открывая большие перспективы ее применения для поиска нейропротекторов (см. выше соответствующую главу и работу [57]). Выявлена специфическая ингибирующая активность серосодержащих соединений (цистеина, восстановленного и окисленного глутатиона): эти вещества тормозили именно хиноидный процесс окисления катехоламина и не проявили своих антиоксидантных свойств в другой супероксидгенерирующей системе *in vitro* – ксантин–ксантиноксидазе [57]. Известны важность и значимость гомеостаза тиолов при болезни Паркинсона [51, 65–67], поэтому нами и были выбраны именно эти вещества для исследования в используемой модели. Лекарственные формы цистеина и глутатиона имеются на фармацевтическом рынке («Цистеин», «N-ацетил-L-цистеин» и «Цистин», а также «Глутатион» и «N-ацетил-глутатион»), однако применение их неоднозначно: существует проблема их биодоступности и дороговизна, а прием перорально этих препаратов – исключительно для микрофлоры желудочно-кишечного тракта [68–72]. Перспективно, на наш взгляд, активировать внутриклеточный синтез этих соединений, которые могут предотвращать хиноидное окисление, и вести поиск путей воздействия на систему антиоксидантной защиты в нейронах. Подобный подход (активации синтеза тиоловых соединений) был предложен ранее, но не был связан с БП [65]. Современные знания дают возможность пытаться это делать на уровне генетических и молекулярно-клеточных действий, а именно, через активацию пути Nrf2-ARE (ARE-редокс-чувствительная сигнальная система), что может быть эффективным средством предотвращения гибели нейронов [73–76].

Необходимо также отметить следующее: поскольку установлено, что ионы кальция активируют эту реакцию и механизм их действия выяснен [58, 59], следует учитывать возможность присутствия Ca^{2+} в тестируемых препаратах, особенно растительных и других биологических образцах, что может приводить к сокрытию антиоксидантного эффекта собственно субстанции.

Уникальность данной модели и в том, на наш взгляд, что многостадийность химических превращений катехоламинов в этой реакции, сопряженных также с образованием различных радикалов, позволяет устанавливать механизм действия тестируемых материалов, а не только выявлять феноменологию. Для уточнения механизма действия исследуемых субстанций также следует привлекать и другие модельные системы.

Список изучаемых нами веществ из биохимического/химического и фармацевтического арсенала как известных, так и новых, достаточно интересен. Антиоксидантные свойства некоторых веществ подтверждаются [37], а некоторых, например таурина [57], ставятся под сомнение. Следует отметить, что достаточно большое количество нами исследованных веществ были не эффективны. Те же соединения, которые имеют отношение к окислительно-восстановительным процессам, были сильнейшими анти- или прооксидантами, т.е. ингибировали или активировали автоокисление адреналина (данные не опубликованы). В настоящее время нами проводится скрининг различных биологически активных соединений. Подобные исследования *in vitro* не только выявляют наличие анти/прооксидантных свойств изучаемого препарата, но и определяют в дальнейшем стратегию исследований *in vivo*.

Таким образом, полученные экспериментальные данные и теоретические исследования этой реакции расширяют представления о механизмах свободно-радикальных процессов, происходящих в организме. Разработанные нами подходы имеют и важное практическое значение, поскольку дают возможность использовать реакцию автоокисления адреналина как супероксидгенерирующую и супероксиддетектирующую систему и также как модель хиноидного окисления катехоламинов, что позволяет выявлять потенциальные нейропротекторы.

Автор благодарит главного специалиста Н.Е. Лямину за техническую помощь в проведении экспериментов и в подготовке публикаций.

Работа в основном проводилась в рамках бюджетного финансирования ИТЭБ РАН по теме 04, направление 63.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Меньшиков и Т. Д. Большакова, в сб. *Адреналин и норадреналин* (Наука, М., 1964), с. 284.
2. S. Baez, J. Segura-Aguilar, M. Widersten, et al., J. Biochem. **324**, 25 (1997).
3. M. P. Rigobello, G. Scutari, R. Boscolo, and A. Bindoli, Nitric Oxide **5**, 39 (2001).
4. Y. Fu, L. Buryanovskyy, and Z. Zhang, J. Biol. Chem. **283**, 23829 (2008).
5. V. S. Fluxá, D. Wahler, and J. L Reymond, Nat. Protoc. **3**, 1270 (2008).

6. C. Foppoli, R. Coccia., C. Cini, and M. A. Rosei, Biochim. Biophys. Acta 1**334**, 200 (1997).
7. A. Bindoli, M. P.Rigobello, and L. Galzigna, Toxicol. Lett. **48**, 3 (1989).
8. F. Marques, R. O. Duarte, J. J. Moura, and M. P. Bicho, Biopl. Signals **5** (5), 275 (1996).
9. A. Bindoli, M. P. Rigobello, and D. J. Deeble, Free Radic. Biol. Med. **13**, 391 (1992).
10. K. Polewski, Biochim. Biophys. Acta **1523**, 56 (2000).
11. Т. В. Сирота, Биомед. химия **58** (1), 77 (2012).
12. В. Г. Колпаков, Журн. невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова **74**, 1254 (1974).
13. S. Baez, and J. Segura-Aguilar, Biochem. Mol. Med., **56**, 37 (1995).
14. A. F. Rump, J. Schierholz, R. Rösen, et al., Arzneimittelforschung **51**, 964 (2001).
15. V. M. Costa, R. Silva, L. M. Ferreira, et al., Chem. Res. Toxicol. **20**, 1183 (2007).
16. J. Smythies, A. De Iuliis, L. Zanatta, and L. Galzigna, Neurotox. Res. **4** (1), 77 (2002).
17. J. Smythies, Antioxid. Redox. Signal, **2** (3), 575 (2000).
18. P. Muñoz, S. Huenchuguala, I. Paris, and J. Segura-Aguilar, Parkinsons Dis. **2012**, 920953 (2012). DOI: 10.1155/2012/920953.
19. M. L. Genova, N. M. Abd-Elsalam, S. M. el-Mahdy, et al., Arch. Biochem. Biophys. **447** (2)**,** 167 (2006).
20. С. О. Тапбергенов, Вопр. мед. химии **28**, 52 (1982).
21. И. С. Северина, Н. В. Пятакова, А. Ю. Щеголев и Т. А. Сидорова, Биомед. химия **54**, 679 (2008).
22. А. М. Утевский и С. О. Тапбергенов, Укр. биохим. журн. **54**, 307 (1982
23. K. Jomova and M. Valko, Toxicology **283** (2-3), 65 (2011).
24. C. Beauchamp and I. Fridovich, Anal. Biochem. **44** (1), 276 (1971).
25. M. Nishikimi, N. A. Rao, and K. Yagi, Biochem. Biophys. Res. Commun. **46** (2), 849 (1972).
26. H. P. Misra and I. Fridovich, J. Biol. Chem., **247**, 3170 (1972).
27. Т. В. Сирота, Вопр. мед. химии **45**, 263 (1999).
28. Т. В. Сирота, Патент РФ на изобретение № 2144674, Б.И. № 2 (2000).
29. T. V. Sirota, N. V. Lange, N. I. Kosjakova, et al., Curr. Topics Biophys. **24**, 185 (2000).
30. S. Green, A. Mazur, and E. Shorr, J. Biol. Chem., **220**, 237 (1956).
31. Т. В. Сирота, А. И. Мирошников и К. Н. Новиков, Биофизика **55** (6), 990 (2010).
32. А. Б. Щербаков, В. К. Иванов, Т. В. Сирота и Ю. Д. Третьяков, Докл. РАН **437** (2), 197 (2011).
33. Т. В. Сирота, М. В. Захарченко и М. Н. Кондрашова, Биомед. химия **60** (1), 63 (2014).
34. K. O. Semen, G. J. M. den Hartog, D. V. Kaminsky, et al., Nat. Products Chem. Res. **2**, 122 (2013). DOI: 10.4172/2329-6836.1000122
35. O. P. Yelisyeyeva, K. O. Semen, G. V. Ostrovska, et al., Food Chem. **147**, 152 (2014).
36. Т. В. Сирота, Бюлл. эксперим. биол. мед. 149 (4), 396 (2010).
37. Т. В. Сирота, Н. Е. Лямина и Л. И. Вайсфельд, Биофизика **62** (5), 846 (2017).
38. Т. В. Сирота, Биомед. химия **59** (4), 254 (2013).
39. Т. В. Сирота, Биомед. химия **62** (6), 650 (2016).
40. Т. В. Сирота, Биомед. химия **61** (1), 115 (2015).
41. http://www.dpva.info/Guide/GuidePhysics/Solvability/SolvabilityOfSomeGases.
42. 42. http://www.o8ode.ru/article/learn/ugaz.htm.
43. http://www.o8ode.ru/article/answer/voda_bez_vozduha_gazov.htm.
44. C. Karunakaran, H. Zhang, J. Joseph, et al., Chem. Res. Toxicol. **18** (3), 494 (2005).
45. D. C. Ramirez, S. E. Gomez Mejiba, and R. P. Mason, Free Radic Biol Med. **38**, 201 (2005).
46. S. P. Goss, R. J. Singh, and B. Kalyanaraman, Biol. Chem. **274**, 28233 (1999).
47. D. B. Medinas, G. Cerchiaro, D. F. Trindade, and O. Augusto, IUBMB Life **59**, 255 (2007).
48. M. G. Bonini, S. A. Gabel, K. Ranguelova, et al., J. Biol. Chem. **284**, 14618 (2009).
49. D. B. Medinas, J. C. Toledo, Jr., G. Cerchiaro, et al., Chem. Res. Toxicol. **22** (4), 639 (2009).
50. В. Л. Воейков, Н. Д. Виленская, До Минь Ха и др., Журн. физ. химии **86**, 1 (2012).
51. Е. Е. Дубинина, в сб. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток* (Санкт-Петербург, 2006), с. 111.
52. C.C. Santos, F. M. Araújo, R. S. Ferreira, et al., Toxicol. in Vitro **42**, 54 (2017). DOI: 10.1016/j.tiv.2017.04.004
53. J. Segura-Aguilarand, and S. Huenchuguala,_Front Neurosci. **12**, 106 (2018). DOI: 10.3389/fnins.2018.00106
54. J. Segura-Aguilar, I. Paris, З. Muñoz, et al., Neurochem, **129** (6), 898 (2014). DOI: 10.1111/jnc.12686
55. A. Herrera-Soto, G. Díaz-Veliz, S. Mora, et al., Neurotox. Res. **32** (1), 134 (2017). DOI: 10.1007/s12640-017-9719-8
56. S. Huenchuguala, P. Muñoz, R. Graumann, et al., Neurotoxicology **55**, 10 (2016). DOI: 10.1016/j.neuro.2016.04.014
57. Т. В. Сирота, Биомед. химия **65** (4), 316 (2019).
58. Т. В. Сирота, Биофизика **61** (1), 22, (2016).
59. А. В. Лебедев, М. В. Иванова, А.А. Тимошин и Э. К. Рууге, Биомед. химия **54** (6), 687 (2008).
60. J. Smythies, Neurotox. Res. **4** (2), 147 (2002).
61. G. S. Behonick, M. J. Novak, E. W. Nealley, and S. L. Baskin, J. Appl. Toxicol. **21** (1) 15 (2001).
62. T. V. Sirota, V. I. Novoselov, V. G. Safronova, et al., IEEE Trans. Plasma Sci. **34** (4), 1351 (2006).

63. А. И. Грицук, Т. В. Сирота, Л. В. Дравица и Е. А. Крэддок, Биомед. химия **52** (6), 601 (2006).
64. Т. В. Сирота, В. Г. Сафронова, А. Г. Амелина и др., Биофизика **53** (5), 886 (2008).
65. В. И. Кулинский и Л. С. Колесниченко, Успехи биол. химии **31,** 157 (1990).
66. Н. К. Зенков, В. З. Ланкин и Е. Б. Меньщикова, в сб. *Окислительный стресс* (Наука/Интерпериодика, М., 2001), с. 154.
67. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., в сб. *Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты* («Слово», М., 2006), с. 394.
68. G. F. Rushworth and I. L. Megson, Pharmacol. Ther. **141** (2), 150 (2014). DOI: 10.1016/ j.pharmthera. 2013.09.006
69. M. A. Martínez-Banaclocha, Med. Hypotheses **79** (1), 8 (2012).
70. D. S. Goldstein, Y. Jinsmaa, P. Sullivan, and Y Sharabi, Neurochem. Res. **42** (11), 3289 (2017). DOI: 10.1007/s11064-017-2371-0
71. L. D. Coles, P. J. Tuite, G. Öz, and U. R. Mishra, J. Clin. Pharmacol. **58** (2), 158 (2018). DOI: 10.1002/jcph.1008
72. https://natureweight.ru/glutation.
73. Y. Izumi, Yakugaku Zasshi **133** (9), 983 (2013).
74. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова и В. О. Ткачев, Биохимия **78** (1), 27 (2013).
75. J. A. Lee, H. J. Son, J. W. Choi, et al., Neurochem. Int. **112**, 96 (2018). DOI: 10.1016/j.neuint.2017.11.006.
76. F. I. Tarazi, Z. T. Sahli, M. Wolny, and S. A. Mousa, Pharmacol. Ther. **144** (2), 123 (2014). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.010.

A Chain Reaction of Adrenaline Autoxidation Is a Model of Quinoid Oxidation of Catecholamines

T.V. Sirota

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

The focus of this review is on published data and our own studies of the non-trivial quinoid pathway for the oxidation of adrenaline. Similarly, all catecholamines can be oxidized with the formation of the corresponding aminochromes. This process is simulated in vitro in alkaline medium and is known as a chain reaction of adrenaline autoxidation, the reaction products of which are adrenochrome and compounds in the radical form such as superoxide anions ($O_2^{-\bullet}$) and others. As a superoxide-generating model, this reaction was used to determine the activity of superoxide dismutase. In our studies, some new approaches have been proposed to determine the activity of the enzyme and reveal the anti/prooxidant properties of various compounds and materials. This pathway of the conversion of one of catecholamines (dopamine) currently is described as “a preclinical model of Parkinson's disease”. In this regard, we offered that the reaction of adrenaline autoxidation can be used for a search for substances that are able to inhibit the process of quinoid oxidation, in other words, to detect potential neuroprotectors. Experimental and theoretical studies of this reaction provide new insights into understanding the mechanisms of free radical processes that occur in the body.

Keywords: catecholamines, aminochromes, adrenaline, adrenochrome, superoxide, quinoid oxidation

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 656–663

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ЭФФЕКТЫ НИЗКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ

© 2020 г. А.А. Олешкевич, В.Э. Новиков, М.А. Данилова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Скрябина, 23

E-mail: kompsotita@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.
После доработки 04.04.2020 г.
Принята к публикации 07.04.2020 г.

Проведены исследования действия электрического поля на активность рекомбинантной люциферазы в системе «люцифераза–люциферин–АТФ-Mg^{2+}». Ферментативную активность определяли по уровню биохемилюминесценции на стандартном хемилюминометре. Выявлены эффективные частоты, вызывающие необратимые изменения активности фермента. Критерием уровня активности люциферазы служили интенсивность хемилюминесценции ($I_{хл}$) после ее выхода на стационарный уровень свечения и величина постоянной времени кривой затухания после окончания стационарного свечения в связи с расходом АТФ. При действии поля с частотой 6 Гц величина I0 резко возрастала по сравнению с контролем от (250 ± 47) имп/с до (1250 ± 75) имп/с. При этом длительность стационарного свечения сократилась приблизительно в пять раз (от 30 до 5.5 мин). Затухание свечения τ также значительно ускорилось (в девять раз относительно контроля). При исследовании влияния остальных экспериментально отобранных частот был обнаружен противоположный эффект. Так, на частотах 12, 48 и 96 Гц активность люциферазы по сравнению с контролем была подавлена от двух (48 и 96 Гц) до четырех (12 Гц) раз. При действии поля с частотой 24 Гц активность люциферазы не отличалась от контроля.

Ключевые слова: фермент, активность, люцифераза, электромагнитное поле.

DOI: 10.31857/S0006302920040043

В основе биолюминесценции – свечения живых организмов – лежит катализируемая хемилюминесцентная реакция, обусловленная окислением субстрата люциферина в присутствии фермента люциферазы [1–3]. При этом люминесцентные методы лабораторного анализа с использованием современных высокочувствительных физических детекторов люминесценции обладают явными преимуществами по сравнению с визуальными люминесцентными и флуорометрическими методами. В обзоре И.В. Березина с соавт. [4] достаточно подробно описаны физико-химические особенности данной системы. Там же приводятся наиболее общепринятые представления о механизме реакции, который удобно описывать в две стадии:

$$1)\ E + LH_2 + АТФ \xrightarrow[-CO_2]{Mg^{2+}} E^{\bullet}LH_2{-}АМФ + PP$$

$$2)\ E^{\bullet}LH_2{-}АМФ + O_2 \rightarrow [P^*{-}E^{\bullet}АМФ] \rightarrow h\nu$$

где: E – люцифераза (фермент), LH_2 – люциферин, АТФ – аденозинтрифосфосная кислота, PP – пирофосфат, АМФ – аденозинмонофосфорная кислота, P* – продукт реакции, образовавшийся в элетронно-возбужденном состоянии и служащий источником люминесценции.

Кинетической особенностью данной реакции является жесткое соответствие уровня биохемилюминесценции, сопровождающей окисление субстратов (люциферина и MgАТФ), скорости реакции (скорости образования продукта) (формула 1):

$$I_{хл} = \frac{dN}{dt} = \frac{d[EP]}{dt} = V, \qquad (1)$$

где $I_{хл}$ – интенсивность биохемилюминесценции; N – количество квантов света; EP – количество образовавшегося продукта.

Квантовый выход люминесценции продукта равен единице. Реакция суммарно подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Поэтому до тех пор, пока фермент насыщен по обоим субстратам, уровень свечения имеет стационарный ха-

рактер. Дефицит какого-либо из субстратов приводит к быстрому затуханию свечения.

Следует отметить, что сегодня также успешно развиваются работы в направлении исследования воздействия колебаний акустической природы на различные биологические объекты. Хотя однозначной теории формирования частотно-зависимых ответов на акустическое воздействие все еще не выработано, показаны существенные отличия на уровне ткани в биологических эффектах непрерывных и модулированных волн различной физической природы [5–7]. При этом вызываемые изменения при воздействии модулированных волн выше, а степень и выраженность в большой степени зависят от частоты модуляций. Также было показано, что модулированное электромагнитное или ультразвуковое воздействие на некоторых частотах модуляции могут вызывать изменение ферментативной активности как в сторону активирования, так и ингибирования [8, 9]. В исследованиях на мозге золотых рыбок выявлены эффективные частоты модуляции, активирующие и подавляющие активность нейронов [10] после действия амплитудно-модулированных ультразвуковых волн терапевтического диапазона интенсивностей. При работе с непрерывным ультразвуком нами на модельном объекте – клетках бактериальной культуры *Aliivibrio fischeri* – были найдены оптимальный режим и закономерности химико-биологического и физического воздействия при использовании по отдельности и комбинированно для стимуляции пролиферации и эмиссионной активности светящихся бактерий [11, 12]. Увеличение интенсивности фотоэмиссии после воздействия ультразвука интенсивностью 0.4 Вт/см^2 составила 35–45% по сравнению с контролем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на кафедрах биофизики и физики Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина. В связи с тем, что лабораторный стенд и часть биофизических методов разработаны непосредственно авторским коллективом, ниже будет полностью представлено описание методов, использованных в данной работе.

При исследовании действия электрических полей на активность люциферазы применяли систему «люцифераза–люциферин–АТФ-Mg^{2+}», для чего использовали биолюминесцентный реагент из стандартного набора «ЛЮМТЕК» № К-10 (на основе люциферазы, выделенной из рекомбинантных клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном люциферазы светлячков).

Концентрации реагентов. Содержимое флакона лиофильно высушенного АТФ-реагента предварительно разводили в 2 мл «раствора для реконструкции АТФ-реагента» (также из набора «ЛЮМТЕК» № К-10). Реконструированный раствор АТФ-реагента инкубировали в течение часа; для измерений использовали стандартные разведения – к 2 мл воды для инъекций добавляли 0.05 мл реконструированного АТФ-реагента, в результате чего рабочий раствор АТФ-реагента содержал рекомбинантную люциферазу и люциферин в избытке [13].

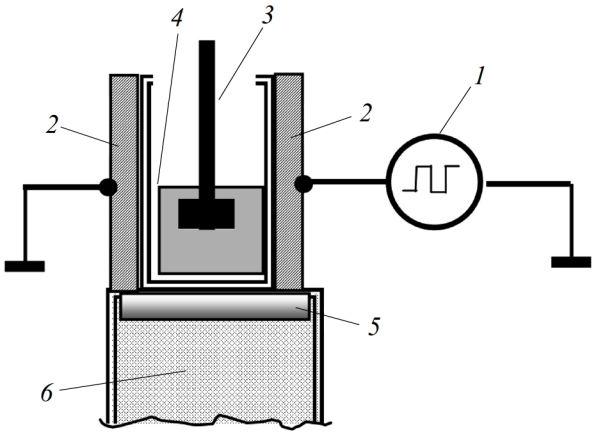


Рис. 1. Фрагмент схемы модифицированного хемилюминометра: *1* – низкочастотный генератор, *2* – конденсаторные платины (металлические обкладки) кюветы люминометра, *3* — механическая мешалка (тефлон), *4* — кювета люминометра с реакционной средой, *5* — фотокатод ФЭУ, *6* — ФЭУ.

Активность рекомбинантной люциферазы определяли по уровню биохемилюминесценции на стандартном хемилюминометре ХЛ-003 ((УГАТУ, Уфа, Россия)). Регистрация сигнала происходила в режиме подключения хемилюминометра к компьютеру; в качестве программного обеспечения служила универсальная программа «PowerGraph». Критерием уровня активности люциферазы служили: интенсивность хемилюминесценции ($I_{хл}$), после ее «выхода» на стационарный уровень свечения и величина постоянной времени кривой затухания после окончания стационарного свечения в связи с расходом АТФ.

Кюветное отделение хемилюминометра было дополнительно оборудовано гнездом-вкладышем квадратного сечения (2 × 2 см). В одну пару противоположных сторон вкладыша были встроены металлические пластины, к которым подводилось переменное напряжение от специального низкочастотного генератора лабораторного изготовления (рис. 1).

Генератор обеспечивал сигнал, по форме близкий к симметричным прямоугольным биполярным импульсам (меандр, скважность близка к единице), с частотой следования в диапазоне от 6 до 100 Гц. Максимум амплитудного значения –

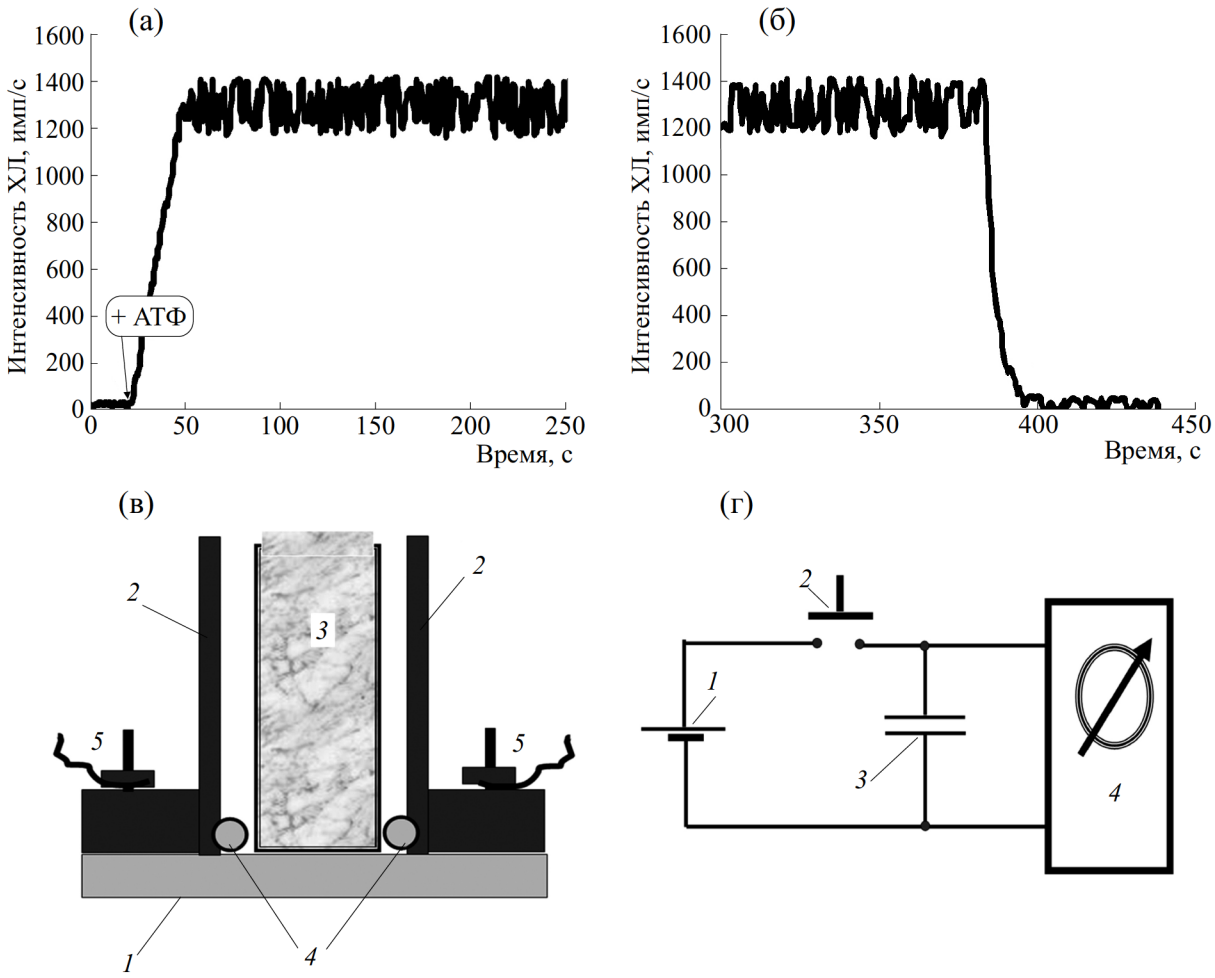


Рис. 2. (а) – Динамика хемилюминесценции «системы люциферин–люцифераза» (зависимость интенсивности люминесценции от времени от момента внесения АТФ в систему – регистрация в реальном времени). Выход на стационарный уровень хемилюминесценции. (б) – Динамика хемилюминесценции системы «люциферин–люцифераза». (в) – «Измерительный конденсатор»: *1* – стеклянная пластина-подложка; *2* – металлические пластины-обкладки конденсатора; *3* – полистироловая кювета с измеряемой средой; *4* – стеклянные ограничители; *5* – клеммы для подключения. (г) – Электрическая схема измерения заряда конденсатора: *1* – аккумулятор; *2* – кнопка-замыкатель («нормально разомкнута») цепи; *3* – «измерительный конденсатор»; *4* – потенциометр.

100 В. Исследование активности фотоэмиссии проводили на частотах 6, 12, 24, 48 и 96 Гц, которые были экспериментально установлены авторами в серии предварительно проведенных испытаний на биологических объектах разной природы. Расстройка по частоте составляла около ±2 Гц. Электрическое поле подавали на кювету в течение всего времени измерения. Контролем служили аналогичные измерения без подачи напряжения от генератора на конденсаторные пластины кюветы.

Исходно в кювете люминометра реакционная среда содержала люциферазу и в избытке люциферин. Далее шла регистрация фонового значения хемилюминесценции. Затем реакцию инициировали введением в кювету через штуцер раствора АТФ (рис. 2а). Во всех случаях использовали одну и ту же начальную концентрацию АТФ – $5 \cdot 10^{-7}$ М.

В качестве критериев активности люциферазы использовали интенсивность хемилюминесценции ($I_{хл}$) после выхода на стационарный уровень свечения и величину постоянной времени кривой затухания после окончания стационарного свечения в связи с расходом АТФ (рис. 2б, формула 2):

$$I_{ст} = I_0 \exp(-t/\tau) \qquad (2)$$

где I_0 – стационарный уровень свечения; t – время от начала затухания; τ – постоянная времени экспоненты затухания свечения (увеличению τ соответствует рост скорости расхода АТФ и более высокая активность фермента).

Таблица 1. Диэлектрическая проницаемость реакционной смеси и полистироловой кюветы

Параметр	Частота, Гц						
	0	6*	10	12	24	48	96
ε_1	84.2	99.2	81.4	83.2	87.0	86.0	84.7
Стандартное отклонение	8.1	21.9	8.6	11.3	7.9	9.6	9.0
ε_2	3.1	3.0	3.0	3.0	3.1	3.0	2.8
Стандартное отклонение	0.2	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1

Примечание. * – На частоте 6 Гц ошибка воспроизводимости превышала 25%, что вызвано неустойчивой работой генератора на граничной частоте.

Оценка коэффициента поглощения энергии. Полагая, что

$$SAR = \sigma E^2/\rho, \quad (3)$$

где SAR – коэффициент поглощения энергии, E – напряженность электрического поля внутри образца. В приближении об однородности поля внутри образца:

$$E = E_0/\varepsilon, \quad (4)$$

где E_0 – внешнее приложенное поле; ε – относительная диэлектрическая проницаемость внутреннего содержимого кюветы-конденсатора.

Определение диэлектрической проницаемости инкубационных смесей, использованных в работе. Проводили измерение емкости конденсатора при наличии между обкладками исследуемых сред (смесей), с последующим сравнением с емкостью того же конденсатора без наличия между обкладками исследуемых смесей (сред). В этом случае относительная диэлектрическая проницаемость среды равнялась

$$\varepsilon = C_j/C_0, \quad (5)$$

где C_j – емкость конденсатора со средой, C_0 – емкость аналогичного воздушного конденсатора.

Определение статической величины относительной диэлектрической проницаемости. Для проведения измерений был собран лабораторный стенд (рис. 2в,г).

Металлические пластины-обкладки размером 10×10 см устанавливали на стеклянную подложку (во избежание утечки). Между обкладками помещали полистироловую кювету (объем 50 мл, толщина 9 мм). Для предотвращения утечки по поверхности кюветы был предусмотрен зазор (около 0.5 мм) между стенкой кюветы и обкладкой, что обеспечивалось стеклянным капилляром.

Замыканием кнопки к обкладкам конденсатора подключали аккумулятор. Величину разности потенциалов ($U_0 = 1.5$ В) регистрировали высокоомным ($R_{вх} = 10^{12}$ Ом) потенциометром. При помещении в кювету измеряемой среды разность потенциалов падает до величины U_1. Относительная статическая диэлектрическая проницаемость среды (ε_1) в этом случае составляет

$$\varepsilon_1 = U_1/U_0. \quad (6)$$

Аналогичным образом определяли статическую диэлектрическую проницаемость полистироловой кюветы без среды (ε_2). Измеряли величину U_1 для конденсатора без кюветы, а величину U_2 – вставляя кювету; избегали соприкосновения обкладок со стенками кюветы:

$$\varepsilon_{кр} = \varepsilon_1 + \varepsilon_2. \quad (7)$$

Определение величины относительной диэлектрической проницаемости при действии переменного электрического поля. Определение проводили мостовым методом с использованием стандартной аппаратуры. Особенность измерения состояла в том, что в соответствующую диагональ измерительного моста вместо синусоидальных колебаний подавалось напряжение от внешнего генератора импульсов (меандр) в диапазоне частот следования 10–100 Гц. (параметры импульсов те же, что и в основном тексте статьи)

$$\varepsilon = \varepsilon_1 + \varepsilon_2. \quad (8)$$

Измеряемая среда (реакционная смесь). К 50 мл воды для инъекций добавляли 0.125 мл АТФ-реагента ЛЮМТЕК (лиофильно высушенный реагент из набора, разведенный в 2 мл раствора для реконструкции АТФ-реагента).

Значения диэлектрической проницаемости реакционной смеси и полистироловой кюветы, напряженности электрического поля внутри образца, при которых проводили экспериментальные исследования, приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 2. Напряженность электрического поля внутри образца

Напряженность	Частота, Гц						
	0	6*	10	12	24	48	96
E, В/м	57	49	59	58	55	56	57

Примечание. ε_1 – Значения диэлектрической проницаемости реакционной смеси, ε_2 – полистироловой кюветы. * – На частоте 6 Гц ошибка воспроизводимости превышала 25%, что вызвано неустойчивой работой генератора на граничной частоте.

Таблица 3. Значения удельной проводимости реакционной смеси (σ, См/м), определенные при ряде частот следования импульсов

σ, См/м	Частота, Гц				
	6	12	24	48	96
Среднее значение	1586	1576	1577	1574	1575
Стандартное отклонение	18	9	9	7	5

Примечание. σ – Удельная проводимость. При измерении величин σ и ε на частотах 6 и 12 Гц мостовым методом в качестве нуль-индикатора баланса моста использовали специально сконструированный измерительный усилитель. На остальных частотах нуль-индикатором служил стандартный осциллограф.

Массовую плотность реакционной смеси (ρ, кг/м^3) определяли гравиметрически стандартным способом, используя пикнометр на 2 мл. В результате шестикратного измерения была получена средняя величина, равная 1004.4 ± 0.2 кг/м^3.

Удельную электропроводность инкубационной смеси (σ, См/м) определяли на кондуктометре стандартным способом (мостовая схема измерения) на переменном (импульсном) токе при тех же частотах. Результаты определения (табл. 3) свидетельствуют о примерно равных значениях удельной проводимости реакционной смеси. Бóльшая точность совпадения заданных значений в данном эксперименте авторам не требовалась.

Расчетные экспериментальные значения *SAR* (табл. 4) позволяли контролировать допустимое колебание физических параметров.

Воспроизводимость результатов. На каждой из частот было проведено по семь повторных измерений + одно контрольное измерение при выключенном поле, т. е. после каждых семи измерений под действием поля проводили одно контрольное для поправки на изменение реагентов во времени (ферментативная активность не менялась; реагент хранится без изменения активности до семи-десяти суток при комнатной температуре).

Статистическая обработка данных проведена в пакете прикладных программ Statistica 6.0. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении исследований по поиску неконтактных способов управления активностью ферментов *in vitro* изучали действие переменного (пульсирующего) электрического поля на интенсивность биохемилюминесценции – активность люциферазы, системы «люцифераза–люциферин–АТФ-Mg^{2+}». Авторами выявлены эффективные частоты, вызывающие необратимые изменения активности фермента. Влияние переменных магнитных полей в последнее время изучается в многочисленных химических и биохимических экспериментах [14, 15]. Известно, что взаимодействие физических полей с биологическими объектами вследствие разной глубины

Таблица 4. Значения коэффициента поглощения энергии реакционной смеси, рассчитанные для исследуемых частот

Частота, Гц	6	12	24	48	96
SAR, Вт/кг	1602	1574	1572	1568	1570

Примечание. SAR – коэффициент поглощения энергии. При измерении величин σ и ε на частотах 6 и 12 Гц мостовым методом в качестве нуль-индикатора баланса моста использовали специально сконструированный измерительный усилитель. На остальных частотах нуль-индикатором служил стандартный осциллограф.

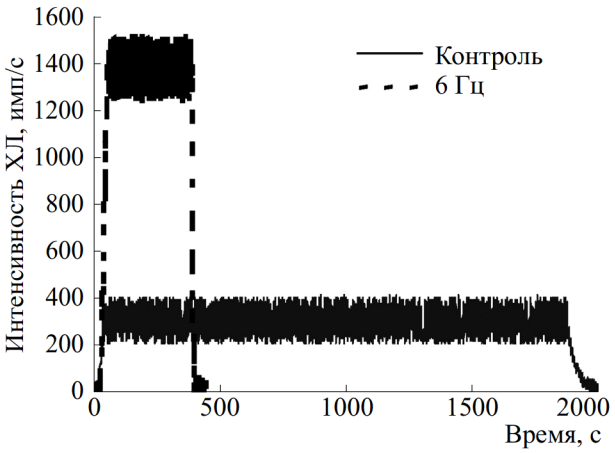


Рис. 3. Динамика хемилюминесценции при действии поля 6 Гц.

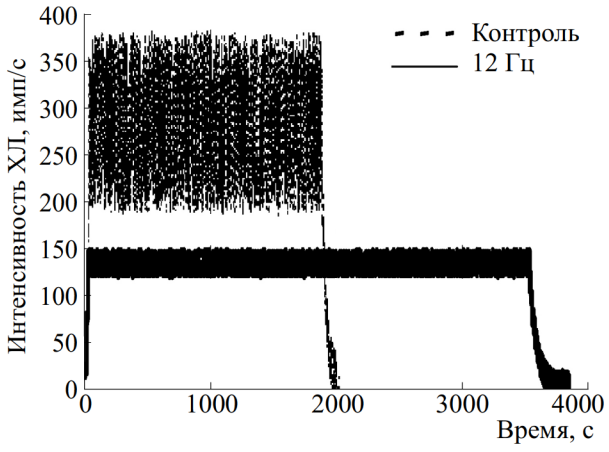


Рис. 4. Динамика хемилюминесценции при действии поля 12 Гц.

проникновения может происходить как интегрально – на низких частотах, так и локально – на частотах электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, когда во взаимодействие с полями включаются только клетки или ферменты. Так как биологические макро- и микросистемы являются колебательными и динамическими, они могут находиться на разных стадиях функционирования, следовательно, каждая из них может как иметь разную чувствительность к фактору воздействия, так и проявлять «индивидуальный» ответ. А в системе будут возникать вынужденные колебания с частотой внешнего электрического поля.

Анализ полученных нами результатов показал, что при действии поля с частотой 6 Гц величина I_0 резко возрастала по сравнению с контролем – от 250 ± 47 имп/с до 1250 ± 75 имп/с. При этом ($p < 0.05$) длительность стационарного свечения сократилась приблизительно в пять раз – от 30 мин до 5.5 мин. Затухание свечения также значительно ускорилось: значение t возросло в девять раз относительно контроля (рис. 3).

Таким образом, воздействие электрического поля с частотой 6 Гц значительно повысило активность фермента.

При исследовании на остальных частотах был обнаружен противоположный эффект. Так, на частотах 12, 48 и 96 Гц активность люциферазы по сравнению с контролем была подавлена от двух (48 и 96 Гц) до четырех (12 Гц) раз (рис. 4).

При действии поля с частотой 24 Гц активность люциферазы не отличалась от контроля. Сводные данные приведены в табл. 1.

Теория, объясняющая механизмы биологического действия магнитных полей на биологические системы, основана на факте существования биологических эффектов комбинированных (постоянного и переменного) магнитных полей при определенных, теоретически предсказуемых значениях частот переменной компоненты поля, формально соответствующих циклотронным частотам ряда ионов (кальция, калия, магния). В основе расчета частот воздействия лежит Ларморова прецессия как результат влияния магнитного поля на электронную орбиту с появлением дополнительного орбитального электронного тока

Таблица 5. Параметры хемилюминесценции системы люциферин-люцифераза при действии электрического поля различных частот

Параметр	Частота электрического поля, Гц					
	Контроль	6	12	24	48	96
$I_{ст}$, имп/с	250 ± 47	1250 ± 75	48 ± 17	212 ± 33	115 ± 41	123 ± 44
$t_{ст}$, мин	30 ± 7	$5 \pm 1{,}5$	> 120	34 ± 6	67 ± 19	55 ± 12
T, с	29 ± 3	$3 \pm 1{,}7$	Не установлено	32 ± 6	50 ± 7	44 ± 6

и индуцированного магнитного момента электрона [16].

Особое внимание следует обратить на действие физических полей на активность ферментов из-за особенностей функционирования как отдельных клеток (систем активного транспорта, участие в проведении нервного импульса, в наработке энергетических эквивалентов и так далее), так и биологических систем в целом. В связи с этим изменение активности ферментов и показателей углеводного обмена при воздействии физических полей и вибрации может приводить к фатальным для клеток и тканей последствиям [17].

Результаты изучения особенностей импеданса биологических объектов животного происхождения под действием переменного электрического тока в диапазоне частот от 20 до 10^6 Гц выявили сложный характер частотной зависимости [18]. В ряде работ была теоретически рассмотрена возможность резонансного поглощения электромагнитного поля белковыми молекулами в связи с так называемыми дисперсионными силами взаимодействия [19, 20]. В белках, содержащих ряд нейтральных и отрицательно заряженных основных боковых групп, среднеквадратичная величина дипольного момента отлична от нуля, даже если их средний постоянный момент равен нулю. Это обусловлено тем, что число поляризованных боковых групп в белковой молекуле обычно превышает число связанных с ними протонов, поэтому существует множество возможных конфигураций распределения протонов в молекуле, мало отличающихся по свободной энергии (за исключением случая сильно кислых растворов). Если предположить непрерывное распределение основных групп молекул ферментов, то происходящие за счет флуктуации распределения протонов диполь-дипольные взаимодействия между группами могут вызывать поглощение кванта энергии, соответствующего частоте 10 ГГц. Однако в наших экспериментах и ингибирующая, и активирующая частота были в 10^9 раз ниже.

Ранее [20] уже было изучено изменение относительной активности холинэстеразы при действии модулированного сверхвысокочастотного электромагнитного излучения в опытах *in vitro*. Анализ результатов экспериментов позволил установить, что значимое влияние на активность холинэстеразы – от выраженного стимулирующего действия до уровня исходной активности и наоборот – оказывали частота и интенсивность воздействия. Это позволяет выделить модулированное электромагнитное поле в особую группу излучений, биологический эффект которых зависит и от величины поглощенной энергии, и от типа модуляции, «адресованной» к первичной мишени в функционирующей системе. Все выявленные нами и другими авторами особенности могут быть связаны с параметрическими резонансными воздействиями модулирующих частот на процессы жизнедеятельности. Следовательно, для выработки практических рекомендаций по применению электромагнитных и других видов полей необходимо будет учитывать амплитудно-частотную структуру воздействия наравне с величиной поглощенной энергии.

ВЫВОДЫ

1. Выбранный объект (система «люциферин–люцифераза») и критерии хемилюминесценции в качестве модели для изучения влияния переменных электрических (и других) полей на активность ферментов хорошо соответствует поставленной задаче.

2. Существуют частоты колебаний электрического поля, при которых возможна значительная активация фермента, равно как и существуют частоты, на которых возможно подавление активности фермента.

3. Выраженный характер частотной зависимости (активация при 6 Гц) не связан с амплитудой воздействия: при всех частотах была использована одна и та же амплитуда.

4. Показанные в работе эффекты по значительному неконтактному влиянию слабых электрических полей на активность ферментов позволяют считать данное направление перспективным в плане совершенствования методов биотехнологии.

Результаты, послужившие основой для данной статьи, были предварительно представлены на VI съезде биофизиков России (Сочи, 16–21 сентября 2019 г.) [21].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. V. Dunlap and K. Kita-Tsukamoto, in *The Prokaryotes. Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry*, ed. by M. Dworkin (Springer, New York, 2006), pp. 863–892.
2. Н. С. Родионова, Автореферат дис. ... канд. биол. наук (Ин-т биофизики СО РАН, Красноярск, 2004).
3. А. В. Соснов и др., Разработка и регистрация лекарственных средств, № 4, 108 (2017).

4. И. В. Березин, Л. Ю. Бровко и Н. И. Угарова, Биоорган. химия **3** (12), 1589 (1977).
5. В. К. Утешев, Т. Н. Пашовкин и Э. Н. Гахова, Вестн. новых мед. технологий, № 4, 7 (2010).
6. A. A. Oleshkevich, Biophysics **62** (4), 603 (2017).
7. D. J. Panagopoulos, A. Karabarbounis, and L. H. Margaritisa, Biochem. Biophys. Res. Commun. **298**, 95 (2002).
8. М. С. Пашовкина, И. Г. Акоев и Т. Н. Пашовкин, в сб. *Биологические эффекты слабых электромагнитных излучений* (Пущино, 2002), сс. 26–37.
9. М. С. Пашовкина и И. Г. Акоев, Биофизика **45** (1), 130 (2000).
10. T. N. Pashovkin, in *Abstr. Book of 5th Int. Symp. on Therap. Ultrasound* (Harvard Medical School, Boston, 2005), p. 77.
11. А. А. Олешкевич, А. М. Носовский и Е. В. Каминская, Биомед. радиоэлектроника, № 2, 53 (2014).
12. А. А. Олешкевич, Ветеринарная медицина, № 3–4, 35 (2012).
13. Н. Н. Угарова, М. И. Кокшаров и Г. Ю. Ломакина, Патент RU 2420594 (2009).
14. А. Д. Усанов и др., Биомед радиоэлектроника, № 8, 32 (2015).
15. А. Д. Усанов и др., Химико-фармацевтич. журн. **39** (8), 65 (2005).
16. В. В. Леднев, Биофизика **41** (1), 224 (1996).
17. М. А. Дерхо и Т. И. Середа, Изв. Оренбургского гос. аграрного ун-та, № 1 (57), 72 (2016).
18. И. М. Голев и др., Биомед. радиоэлектроника, № 8, 25 (2015).
19. М. С. Пашовкина и Т. Н. Пашовкин, Радиац. биология. Радиоэкология **51** (3), 1 (2011).
20. L. D. Johns, J. Athletic Training **37** (3), 293 (2002).
21. В. Э. Новиков, А. А. Олешкевич и М. А. Данилова, в сб. *Научные труды VI Съезда биофизиков России* (Полиграфическое объединение «Плехановец», Краснодар, 2019), т. 2, с. 48.

Effects of Low-Frequency Electric Field on Recombinant Luciferase Activity

A.A. Oleshkevich, V.E. Novikov, and M.A. Danilova

Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, ul. Scryabina 23, Moscow, 109472 Russia

Studies on the effects of electromagnetic field on recombinant luciferase activity in the "luciferase–luciferin–ATP-Mg^{2+}" system were conducted. The enzymatic activity was measured with a standard chemiluminometer by the intensity of biochemiluminescence. Frequencies which cause effectively irreversible changes in enzyme activity were identified. The criteria for the luciferase activity level were the intensity of chemiluminescence (I_{cl}), after it "reached" the stationary level of luminescence and the value of a time constant of the decay curve after cessation of the stationary luminescence coupled to ATP consumption. In the 6 Hz electromagnetic field exposure system, the I_0 value sharply increased from (250 ± 47) imp/s to (1250 75) imp/s as compared to control while the duration of the stationary luminescence decreased by approximately five times (from 30 to 5.5 min). Also, the decay of luminescence t accelerated significantly (by nine times relative to control). In contrast, the opposite results were obtained while studying the effects of electromagnetic field in other experimentally chosen frequencies. Thus, exposure to electromagnetic field in the frequency bands of 12, 48, and 96 Hz caused a decrease of luciferase activity by 2 (48 and 96 Hz) and 4 (12 Hz) times as compared to control. Following the 24 Hz electromagnetic field exposure, no difference was found between luciferase activity and control.

Keywords: enzyme, activity, luciferase, electromagnetic field

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 664–669

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

© 2020 г. Е.Е. Текуцкая*, М.Г. Барышев*, Л.Р. Гусарук, Г.П. Ильченко***

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

***Кубанский государственный медицинский университет, 350000, Краснодар, ул. Седина, 4*

E-mail: tekytska@mail.ru

Поступила в редакцию 28.10.2019 г.
После доработки 06.04.2020 г.
Принята к публикации 06.04.2020 г.

С помощью иммуноферментного анализа определено содержание повреждений азотистых оснований 8-гидрокси-2-деоксигуанозина в ДНК крови здоровых доноров и больных буллезным эпидермолизом после воздействия переменным магнитным полем напряженностью 550 ± 30 А/м в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro*. Степень окислительного повреждения ДНК при буллезном эпидермолизе почти в два раза выше по сравнению со здоровыми донорами. Показано, что после обработки магнитным полем наблюдается достоверное повышение уровней содержания 8-оксогуанина в ДНК для обеих групп, сложным образом зависящее от частоты. Полученный эффект объясняется генерацией активных форм кислорода при воздействии магнитного поля и нарушением процессов репарации ДНК.

Ключевые слова: окислительное повреждение ДНК, 8-оксогуанин, низкочастотное электромагнитное поле, активные формы кислорода, флуоресцентная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302920040055

Переменные магнитные поля (МП) низкой частоты занимают особое место в медицинских исследованиях особенно в области лечения рака и обезболивании [1–4]. Сообщается, что сочетание МП с химиотерапевтическими препаратами дает многообещающие результаты [4]. Предполагается, что под действием электромагнитного поля может изменяться скорость диффузии через биологические мембраны, ориентация и конформация биологических макромолекул, а также состояние свободных радикалов [1, 5].

Известными проявлениями стресс-реакции в клетках являются повреждения биологически значимых молекул и, прежде всего, ДНК. Определенные клеточные процессы, и среди них генерация активных форм кислорода (АФК), многими авторами считаются ответственными за влияние на структуру ДНК [5–8]. Образование АФК приводит к повреждению первичной структуры ДНК и накоплению однонитевых разрывов при воздействии на лимфоциты периферической крови человека электромагнитного поля [7]. МП низкой частоты не вызывают тепловые эффекты напрямую, эти поля могут воздействовать опосредованно, изменяя концентрацию или активность некоторых кинетически значимых молекул в водном растворе, в частности перекиси водорода, как это теоретически было показано в работе [9].

Наиболее часто образующимся продуктом модификации азотистых оснований и одним из ключевых биомаркеров окислительных повреждений нуклеиновых кислот, опосредованных с генерацией активных форм кислорода, является образование 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) в ДНК [10, 11]. Появление в генетическом материале клетки 8-оксогуанина (8-oxoG) приводит к дестабилизации генома, повышение уровней содержания 8-OHdG и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина связывают с мутагенезом, старением и воспалением [12].

Буллезный эпидермолиз (БЭ) – это клинически и генетически гетерогенная группа орфанных заболеваний, характеризующихся врожденной склонностью к образованию булл (пузырей) на коже и слизистых оболочках пищевода, кишечника, дыхательной системы. Эрозивно-язвенные дефекты могут сохраняться на коже от одного месяца до нескольких лет, являясь предрасполагаю-

Сокращения: МП – магнитные поля, АФК – активные формы кислорода, 8-OHdG – 8-гидрокси-2-деоксигуанозин, 8-oxoG – 8-оксогуанин, БЭ – буллезный эпидермолиз.

щим фактором к образованию плоскоклеточного рака кожи – основной причины преждевременной смерти больных [13]. Заболевание обусловлено 1500 мутациями более чем в восемнадцати различных генах структурных белков дермо-эпидермального соединения (KRT5 и KRT14, LAMB3, LAMA3, LAMC2, COL17A1 и др.).

Вопросы, связанные с возможностью инициации окислительного стресса низкоинтенсивными факторами, такими как низкочастотное МП, а также с вкладом МП в поддержание уже развившегося окислительного стресса, остаются малоизученными.

Цель работы заключалась в оценке степени окислительных повреждений ДНК периферической крови здоровых доноров и больных буллезным эпидермолизом после воздействия переменным МП в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro* путем определения уровня содержания 8-OHdG в ДНК с использованием иммуноферментного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований были образцы периферической крови, собранные у добровольцев и больных БЭ, а также водные растворы ДНК.

Выделение ДНК из крови человека. Выделение ДНК проводили с помощью реактивов готовых коммерческих наборов «ДНК–сорб–В» («АмплиСенс», ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва) сорбционным способом по методике, подробно описанной в работе [14]. Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $E_{260нм} = 200$.

Обработка проб магнитным полем. В ходе экспериментов использовали разработанное нами устройство для автоматизированного исследования биологических жидкостей в переменном МП [15]. Обработку растворов ДНК и образцов крови МП низкой частоты проводили в химически чистой стерильной пластиковой посуде при толщине слоя 2 мм. Образец помещали в центр соленоида, где МП с достаточной точностью можно считать однородным, поскольку размеры соленоида много больше размеров образца. Эффективное значение напряженности МП в месте нахождения образца составляло 550 ± 30 А/м. Измерение напряженности МП проводили с помощью прибора «Экофизика-110А» (ООО «ПКФ Цифровые приборы», Москва) с цифровым измерительным преобразователем для измерения переменных электрических и магнитных полей П3-80-ЕН500 (ГК «Новые технологии», Москва).

В модуль для измерения физических характеристик биологических жидкостей помещали водный раствор ДНК или образцы крови. Температуру контролировали с помощью датчика температуры с точностью до 0.2°С, она составляла 22°С. Задавали начальную частоту МП и соответствующую напряженность и проводили обработку образца в течение 30 мин. Затем регистрировали интенсивность флуоресценции раствора ДНК при соответствующей длине волны возбуждения, а для образцов крови измеряли содержание 8-OHdG. Далее микроконтроллер изменял частоту МП с шагом в 0.2 Гц.

Степень окислительных повреждений ДНК. Степень повреждений ДНК оценивали по уровням концентрации 8-оксогуанина (8-oxoG) в сыворотке крови, полученным в выборке из шести больных БЭ и такого же количества здоровых доноров (мужчины 20–25 лет, некурящие). Сведения о больных БЭ в регионах Краснодарского края, их возрасте и типе заболевания были получены по данным информационного центра Департамента здравоохранения Краснодарского края.

Взятие крови проводили в пластиковые пробирки объемом 2.5 мл с добавлением в качестве антикоагулянта динатриевой соли этилендиаминтетрацетата в конечной концентрации 2.0 мг/мл. Определение проводили методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к 8-oxoG. Использовали готовый набор DNA Damage ELISA Kit, определение осуществляли согласно протоколу. После внесения стоп-растворов измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Multiskan (Thermo Fisher Scientific, США). В каждом опыте проводили измерение не менее трех раз, определяли среднее значение. Количественную оценку содержания 8-oxoG в ДНК проводили с использованием предварительно построенной калибровочной кривой, которая была линейной в диапазоне концентраций 8-oxoG 0.94–60 нг/мл. Чувствительность метода Stress Xpress DNA Damage ELISA составила 0.59 нг/мл.

Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре F-2700 (Hitachi, Япония).

Результаты обрабатывали статистически (программное обеспечение StatPlus, AnalystSoft Inc., США). Достоверность различий между выборками оценивали, используя непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Водные растворы ДНК, выделенной из крови здоровых доноров, обрабатывали магнитным полем в диапазоне частот от 3 до 60 Гц при напряженности 550 ± 30 А/м. На рис. 1 приведены спектры флуоресценции растворов ДНК с концентрацией 0.25 мкг/мл и длиной волны возбуж-

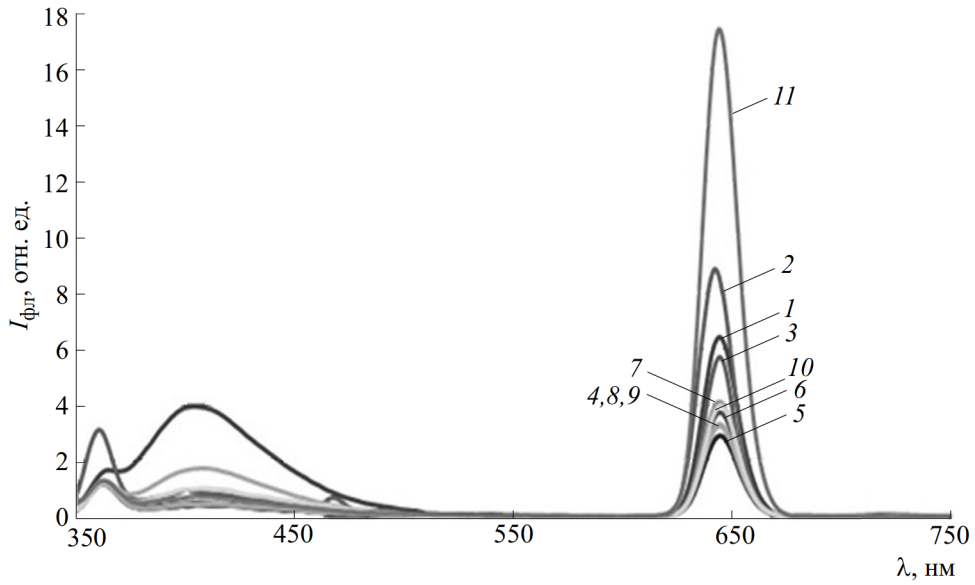


Рис. 1. Спектры флуоресценции водного раствора ДНК, выделенной из крови здорового донора, после обработки МП разной частоты, Гц: *1* – 3 Гц, *2* – 5 Гц, *3* – 10 Гц, *4* – 15 Гц, *5* – 20 Гц, *6* – 25 Гц, *7* – 30 Гц, *8* – 35 Гц, *9* – 40 Гц, *10* – 45 Гц, 11 – 50 Гц. Длина волны возбуждения $\lambda_{возб}$ = 320 нм, время облучения образцов – 30 мин, $C_{ДНК}$ = 0.25 мкг/мл, t = 22°C.

дения 320 нм, полученные после обработки растворов МП. Наблюдаемые на спектрах максимумы интенсивности в районе от 350 до 450 нм связаны с флуоресценцией основных хромофоров нуклеиновых кислот – сопряженных π-связей пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеотидов. Как видно из рис. 1, интенсивность флуоресценции значительно изменялась в районе второго пика при длине волны 642 ± 2 нм для всех изучаемых концентраций ДНК в растворе. Это, по-видимому, связано с изменением содержания АФК в растворе, преимущественно с образованием синглетного кислорода, поскольку, как известно, молекулы синглетного кислорода могут образовывать возбужденные эксимеры $(^1O_2)_2$, которые переходят в основное состояние с испусканием фотона в видимом диапазоне в районе 635–645 нм [7, 16].

На рис. 2 приведена усредненная зависимость интенсивностей флуоресценции в диапазоне второго пика водных растворов ДНК, выделенных из крови здоровых доноров, от частоты МП. Изменение концентрации ДНК в растворе в целом не сказывалось на вид полученной зависимости. Интенсивности флуоресценции растворов ДНК при λ_{max} = 642 нм были максимальны после обработки растворов МП с частотами 3, 30 и 50 Гц (рис. 2).

Образцы периферической крови доноров обрабатывали МП с частотами 3, 30 и 50 Гц. При этих частотах наблюдалось наибольшее образование АФК в растворах ДНК, согласно данным, приведенным на рис. 2. Уровни концентрации 8-oxoG в ДНК сыворотки крови здоровых лиц (контрольная группа) и больных БЭ до и после обработки ЭПМ частотами 3, 30 и 50 Гц представлены на рис. 3. В контрольной группе этот параметр варьируется от 4 до 11 нг/мл, в среднем составляя 7.70 ± 1.41 нг/мл. В группе больных БЭ уровень содержания 8-oxoG в ДНК изменяется от 10 до 22 нг/мл и в среднем достигает 14.8 ± 2.12 нг/мл. Это свидетельствует о том, что степень окислительного повреждения ДНК при БЭ почти в два раза выше по сравнению с контрольной группой. После обработки образцов МП наблюдается достоверное повышение уровней содержания 8-oxoG в ДНК сыворотки крови для обеих групп (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженное двукратное увеличение содержания 8-oxoG в ДНК сыворотки крови больных БЭ могло привести к структурным изменениям спирали ДНК, представляющей из себя практически жесткие кольца оснований с несколькими протон-донорными и протон-акцепторными центрами и конформационно лабильный сахарофосфатный остов со множеством степеней свободы [17, 18]. При повышении содержания 8-oxoG в ДНК возможно изменение конформации ДНК за счет изменения торсионных углов сахаро-фосфатного остова из-за увеличения массы окисленных азотистых оснований [19] или нарушения стэкинга азотистых оснований [20]. Это может

оказывать определенное влияние на изменение активности соответствующих генов в промоторных участках ДНК больных БЭ [13].

Изменение количества 8-oxoG в ДНК крови как здоровых доноров, так и больных БЭ при воздействии низкочастотного МП не может быть вызвано депуринизацией модифицированных оснований, поскольку данная модификация приводит не к ослаблению, а к повышению устойчивости гликозидной связи. Известно, что гуанин в ДНК имеет самый низкий окислительно-восстановительный потенциал среди природных оснований [17] и в большей степени подвержен окислению. Как донор электронов, он способен отдавать свой электрон различным акцепторам, образуя гуанин-радикал-катион, который затем мигрирует вдоль цепи ДНК по гуанинам прыжковым способом, пока не происходит его окисление с образованием 8-oxoG [21]. Возможно, что под действием МП с частотами 3, 30 и 50 Гц происходит и дальнейшее окисление 8-oxoG до таких продуктов, как оксазолон, гуанидиногидантоин.

Увеличение уровня окисленных модификаций азотистых оснований 8-oxoG в ДНК сыворотки крови здоровых доноров после обработки МП и еще более существенное увеличение для уже измененной ДНК больных БЭ (рис. 3), по-видимому, связано с генерацией АФК при воздействии низкочастотного МП [5, 7, 20]. Установлено, что первичной мишенью при воздействии таких низкоинтенсивных физических факторов, как тепло, видимый свет и лазерное излучение (632.8 нм), является растворенный в водной фазе кислород [9, 16]. Как отмечают авторы, начальным этапом для этого процесса является переход кислорода из триплетного в синглетное состояние. Этот переход осуществляется под воздействием квантов света с длинами волн, соответствующими полосам поглощения молекулярного кислорода. В работах [22, 23] было показано, что образование синглетного кислорода ($^1O_2$) может быть надежно обнаружено при прямом лазерном возбуждении кислорода в насыщенных воздухом растворах с помощью оксигенации ловушек синглетного кислорода. Молярные коэффициенты поглощения молекулярного кислорода, растворенного при нормальных условиях в воде, составляют при 765 нм $1.2 \cdot 10^{-3}$ $М^{-1}$ $см^{-1}$ [23]. По оценке, проведенной в работе [24], время жизни синглетного кислорода в биологических системах невелико – от 0.2 для цитоплазмы до 1 мкс для плазмы крови и 0.05 мкс для мембраны эритроцитов, коэффициент диффузии находится в пределах от $4 \cdot 10^{-6}$ до $7 \cdot 10^{-7}$ $см^2$ $с^{-1}$. Даже этого короткого времени достаточно для запуска дальнейших процессов – восстановления синглетного кислорода до супероксидного анион-радикала, протонированная

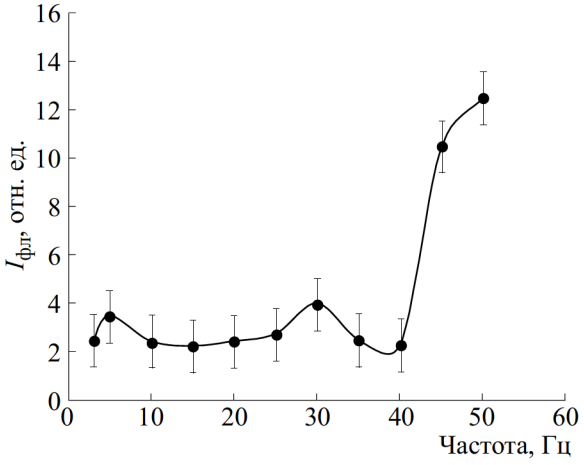


Рис. 2. Усредненная зависимость интенсивности флуоресценции при λ_{max} = 642 нм растворов ДНК, выделенной из крови здоровых доноров, после обработки МП от частоты магнитного поля ($n = 5$, $p = 0.95$, $t_{0,95} = 2.78$), $C_{ДНК}$ = 2.5 мкг/мл, t = 22°C.

форма которого дисмутирует с образованием наиболее долгоживущей АФК – перекиси водорода. Процессы образования АФК в водной среде происходят по типу химического осциллятора [10, 20] и постепенно затухают, если не поддерживаются внешней энергией низкоинтенсивных факторов, к которым можно отнести низкочастотное МП. Процессы такого характера крайне чувствительны к слабым резонансным воздействиям [16].

Несмотря на то что энергия низкочастотного МП чересчур мала для какого-нибудь значитель-

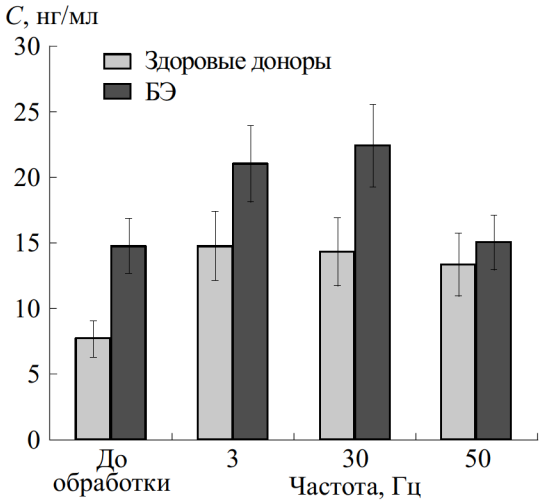


Рис. 3. Содержание 8-oxoG в сыворотке крови здоровых доноров (контроль) и больных буллезным эпидермолизом (БЭ), после обработки переменным магнитным полем с частотами 3, 30 и 50 Гц ($U_{эмп}$ = 1.5, $U_{кр}$ = 3 при $p < 0.01$; $U_{кр}$ = 7 при p < 0.05). .

ного повреждения ДНК, ее может быть достаточно для перехода растворенного кислорода из триплетного в синглетное состояние и дальнейшей генерации каскада АФК. В хромосомах ДНК-связывающие белки защищают ее от окислительных повреждений, что связано как с компактной упаковкой молекулы ДНК, так и с взаимодействием белковых молекул с образующимися АФК. Однако установлено [21], что долгоживущие белковые радикалы являются источниками продолжительного образования АФК, посредниками окислительного стресса в биологических системах и способны к переносу радикальных повреждений на ДНК. Так, гидропероксиды гистона H1 индуцируют образование 8-оксогуанина в ДНК [21]. Таким образом, все образующиеся при воздействии на растворы ДНК и образцы крови переменным магнитным полем АФК и белковые радикалы могут атаковать молекулу ДНК, тем самым приводя к окислительным повреждениям азотистых оснований и накоплению 8-oxoG в ДНК. Это согласуется с результатами, полученными в экспериментальной работе [25], в которой на суспензии нейтрофилов мышей была показана зависимость величины эффекта МП (изменение внутриклеточной продукции АФК) от концентрации молекулярного кислорода.

В работе [26] показано, что воздействие низкочастотного МП вызывает намагниченность среды, в которой протекают химические реакции. В частности, рассмотрена реакция взаимодействия молекулярного кислорода с произвольным радикалом с образованием перекисного радикала. Наличие ядерной поляризации снимает вырождение между квартетным и дуплетным состояниями реакционного центра. При этом МП увеличивает выход перекисного радикала, поскольку продукт реакции образуется из дуплетного состояния.

В организме выработана многоуровневая система защиты и репарации повреждений, возникающих при действии АФК на ДНК. Повышенное содержание 8-oxoG в ДНК сыворотки крови больных БЭ может служить биологическим маркером физиологического неблагополучия организма. Очевидно, что для восстановления повреждений ДНК, вызванных действием АФК, требуются не только ферменты антиоксидантной защиты, но и ферменты эксцизионной репарации. По-видимому, их функционирование при БЭ резко снижено, что не позволяет обеспечить восстановление структуры ДНК. С другой стороны, накопление 8-oxoG в ДНК, возникающее при воздействии низкочастотного МП, может приводить к появлению новых мутаций, в том числе и таких, которые в целом ослабляют процессы репаративной регенерации. Тем самым воздействие низкочастотного МП поддерживает и усиливает уже развившийся окислительный стресс у больных БЭ.

Таким образом, появление и накопление окислительных повреждений 8-OHdG в ДНК после обработки крови здоровых доноров и больных БЭ МП может свидетельствовать, с одной стороны, о генерации АФК при воздействии низкочастотного МП, а с другой – об участии АФК в повреждении ДНК.

ВЫВОДЫ

Повышение уровня концентрация 8-oxoG в ДНК почти в два раза в выборке больных БЭ свидетельствует о нарушении структуры молекулы ДНК и о значительных окислительных повреждениях в ней при данной патологии. Генерация активных форм кислорода при воздействии переменным магнитным полем на образцы крови *in vitro* приводит к накоплению содержания 8-oxoG в ДНК и дальнейшему нарушению процессов репарации ДНК, тем самым оказывая существенное влияние на функциональные метаболические свойства биосистем в целом. Полученный эффект объясняется генерацией активных форм кислорода при воздействии МП и нарушением процессов репарации ДНК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Лабораторные диагностические обследования были выполнены в соответствии с обязательным соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 1983 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. I. Wolf, A. Torsello, B. Tedesco, et al., Biochim. Biophys. Acta **1743**, 120 (2005).
2. C. A. Buckner, A. L. Buckner, S. A. Koren, et al., PLoS One **10** (4): e0124136 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0124136
3. T. Wang, Y. Nie, S. Zhao, et al., Bioelectromagnetics **32** (6), 443 (2011).
4. F. Sanie-Jahromi and M. Saadat, Mol. Biol. Reports **45**, 807 (2018). DOI: 10.1007/s11033-018-4223-7
5. I. Vijayalaxmi and T. J. Prihoda, Int. J. Radiat. Biol. **85**, 196 (2009). DOI: 10.1080/09553000902748575
6. R. J. Buldak, R. Polanniak, I. Buldak, et al., Bioelectromagnetics **33**, 641 (2012).
7. Е. Е. Текуцкая, М. Г. Барышев и Г. П. Ильченко, Авиакосмич. экологич. медицина **52** (1), 56 (2018). DOI: 10.21687/0233-528X-2018-52-1-56-61

8. A. K. Dharmadhikari, H. Bharambe, J. A. Dharmadhikari, et al., Phys. Rev. Lett. **112**, 138105 (2014).
9. В. О. Пономарев, В. В. Новиков, А. В. Карнаухов и О. А. Пономарев, Биофизика **53** (2), 197 (2008).
10. С. В. Смирнова, С. В. Гудков и В. И. Брусков, *8-оксогуанин и продукты его окисления. Образование в ДНК под действием тепла, ионов уранила и гамма-излучения* (Lambert Acad. Publ., Saarbrucken, 2011).
11. М. В. Лукина, А. А. Кузнецова, Н. А. Кузнецов и О. С. Федорова, Биоорган. химия **43** (1), 4 (2017) DOI: 10.7868/S0132342317010055
12. X. Ba, L. Aguilera-Aguirre, Q. T. Rashid, et al., Int. J. Mol. Sci. **15**, 16975 (2014). DOI: 10.3390/ijms150916975
13. А. А. Кубанов, А. Э. Карамова, В. И. Альбанова и др., Вестн. дерматологии и венерологии **4**, 28 (2017). DOI: 10.25208/0042-4609-2017-0-4-22-27
14. E. E. Tekutskaya, M. G. Barishev, and G. P. Ilchenko, Biophysics **60** (6), 913 (2015). DOI: 10.1134/S000635091506024X
15. G. P. Il'chenko, M. G. Baryshev, E. E. Tekutskaya, et al., Measur. Techniques **60** (6), 632 (2017). DOI: 10.1007/s11018-017-1247-7
16. С. В. Гудков, О. Э. Карп, С. А. Гармаш и др., Биофизика **57** (1), 5 (2012).
17. Л. Страйер, Биохимия (Москва: Мир. 1985), т. 3.
18. В. И. Полтев, В. М. Анисимов, К. Санчес, и др., Биофизика **61** (2), 259 (2016).
19. M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Lukashin, and V. V. Anshelevich, J. Biomol. Struct. Dynam. **2**, 1005 (1985).
20. P. Yakovchuk, E. Protozanova, and M. D. Frank-Kamenetskii, Nucl. Acids Res. **34** (2), 564 (2006). DOI: 10.1093/nar/gkj454
21. И. Н. Штаркман, С. В. Гудков, А. В. Черников и В. И. Брусков, Биофизика **73** (4), 576 (2008).
22. A. A. Krasnovsky and J. B. Kozlov, J. Biomed. Photonics **3** (1), 1 (2017).
23. A. A. Krasnovsky, N. N. Drozdova, A. V. Ivanov, et al., Biochemistry **68**, 963 (2003).
24. A. A. Krasnovsky, Membrane Cell Biol. **15**, 530 (1998).
25. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **63** (2), 277 (2018).
26. В. О. Пономарев и В. В. Новиков, Биофизика **54** (2), 235 (2009).

Oxidative Damage to DNA under the Influence of an Alternating Magnetic Field

E.E. Tekutskaya*, M.G. Baryshev*, L.R. Gusaruk, and G.P. Ilchenko***

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

***Kuban State Medical University, ul. Sedina, 4, Krasnodar, 350000 Russia*

An enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the content of nitrogenous bases, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, the form of oxidative damage, in DNA from blood of healthy donors and patients with epidermolysis bullosa after exposure to an alternating magnetic field of strength 550 ± 30 A/m in the frequency ranging from 3 to 60 Hz in vitro. The degree of oxidative damage to DNA during epidermolysis bullosa is almost two times higher as compared to that in healthy donors. It was shown that after exposure to a magnetic field, a significant increase in the level of 8-oxoguanine in DNA was observed in all groups. This increase depended on the frequency in a complex manner. The resulting effect is explained by the generation of reactive oxygen species under the influence of a magnetic field and DNA repair defects.

Keywords: oxidative damage to DNA, 8-oxoguanine, low-frequency electromagnetic field, reactive oxygen species, fluorescence spectroscopy

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 670–675

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.323

ИЗМЕНЕНИЕ ВЫХОДНОГО СИГНАЛА ДНК-БИОСЕНСОРА, ИНДУЦИРОВАННОГО АДСОРБЦИЕЙ ЛИГАНДОВ НА ДУПЛЕКСЫ ДНК В ФЛУКТУИРУЮЩЕЙ СРЕДЕ

© 2020 г. В.Б. Аракелян*, А.П. Антонян, М.А. Парсаданян**, М.А. Шагинян**, П.О. Вардеванян****

**Факультет физики Ереванского государственного университета, ул. А. Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения*

***Факультет биологии Ереванского государственного университета, ул. А. Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения*

E-mail: v.arakelyan@ysu.am

Поступила в редакцию 25.11.2019 г.
После доработки 14.04.2020 г.
Принята к публикации 17.04.2020 г.

Исследовано связывание лигандов с ДНК-дуплексами в ДНК-биосенсоре, когда под воздействием флуктуаций среды (внешнего шума) флуктуирует количество лигандов в растворе. Для случая малого заполнения получено стохастическое дифференциальное уравнение мультипликативного типа, описывающее изменение во времени числа адсорбированных лигандов на ДНК-дуплексах. Вычислены средняя величина и время релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленные адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексы в флуктуирующей среде. Показано, что мультипликативный шум уменьшает среднюю величину выходного сигнала ДНК-биосенсора. Уменьшение сигнала имеет пороговый характер – при некотором соотношении между параметрами адсорбции и интенсивностью внешнего шума не происходит уменьшение сигнала. Показано, что с увеличением интенсивности внешнего шума увеличивается время релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора.

Ключевые слова: адсорбция лигандов, флуктуация среды, мультипликативный шум, ДНК-биосенсоры.

DOI: 10.31857/S0006302920040067

В настоящее время широко используются аналитические устройства нового поколения – биосенсоры. Наиболее важными и актуальными из всех видов биосенсоров являются ДНК-биосенсоры, которые применяются как в фундаментальных исследованиях, так и в прикладных областях – в медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды и т. д. [1–5]. Следует отметить, что, в отличие от традиционных аналитических устройств, ДНК-биосенсоры обладают высокой избирательностью и огромной чувствительностью [6]. Принцип работы ДНК-биосенсора чрезвычайно прост – в основе всех ДНК-биосенсоров лежит регистрация высокоспецифического распознавания последовательностей распределения нуклеиновых кислот [7]. Конструкция ДНК-биосенсора такова, что одноцепочная молекула ДНК иммобилизована на подложке и образует слой для распознавания. Если в растворе есть одноцепочные ДНК, комплементарные иммобилизованной ДНК, то при их гибридизации образуются дуплексы ДНК. Образование дуплекса активизирует сигнал, который передается регистрирующему устройству. Величина выходного сигнала ДНК-биосенсора пропорциональна числу ДНК-дуплексов.

Проблеме гибридизации ДНК посвящено большое число работ и имеются впечатляющие успехи [8–11]. Исследования в области термодинамики [8] и кинетики гибридизации ДНК [9] представляют большой практический интерес, поскольку их результаты используются на практике при изготовлении и использовании ДНК-сенсоров. Следует отметить важную работу [10], где показано, что методы статистической физики позволяют исследовать фундаментальную проблему биологии – регуляцию генетической экспрессии. Теоретически разработан подход, описывающий процесс гибридизации ДНК на микрочипах [11], который служит основой не только для анализа многочисленных экспериментальных данных по гибридизации ДНК, но и для практики изготовления микрочипов.

В подавляющем большинстве случаев ДНК-биосенсор «работает» в среде, содержащей большое количество разнообразных лигандов, которые могут адсорбироваться как на дуплексы ДНК, так и на одиночные иммобилизованные

молекулы ДНК. Наибольший интерес представляет случай, когда изменение выходного сигнала происходит в результате обратимой адсорбции лигандов на ДНК-дуплексы. Адсорбированные лиганды неизбежно приводят к изменению величины выходного сигнала ДНК-биосенсора. Рассмотрим более естественный случай малости константы скорости диссоциации ДНК-дуплекса, когда относительно быстрая адсорбция и десорбция лигандов происходит в условиях постоянства числа ДНК-дуплексов. Отметим, что параметры среды, в которой «работет» ДНК-биосенсор, как правило, не строго постоянны, а случайно флуктуируют. Эти случайные флуктуации среды (внешний шум) влияют на процесс формирования выходного сигнала ДНК-биосенсора. Внешние флуктуации не имеют микроскопического происхождения и избавиться от них практически невозможно. В работе [12] были определены характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора, когда под воздействием флуктуаций среды флуктуировало число адсорбционных центров (фактически сродство) на ДНК-дуплексе. Было показано, что шум выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленный адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексы, является ланжевеновским. В данной работе рассмотрен случай, когда под воздействием флуктуаций среды флуктуирует число лигандов в растворе. В этом случае шум, связанный с адсорбцией и десорбцией лигандов на ДНК-дуплексы, оказывается мультипликативным. Определены характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленные адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Чтобы исследовать «работу» ДНК-биосенсора в флуктуирующей среде, исключим влияние осложняющих факторов. Для этой цели примем, во-первых, что ДНК-биосенсор работает в пространственно-однородной системе, т.е. нет диффузионных ограничений в кинетике связывания лиганда с ДНК; во-вторых, что ДНК-биосенсор работает в макроскопически большой системе, такой, что можно пренебречь внутренними флуктуациями, интенсивность которых уменьшается с увеличением размеров системы. Квазихимическая реакция, описывающая связывание лиганда с адсорбционным центром на ДНК-дуплексе, будет иметь вид

$$\mathrm{L} + \mathrm{M} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} \mathrm{LM}, \qquad (1)$$

где LM – комплекс лиганда с адсорбционным центром на ДНК-дуплексе, k_1 и k_{-1} – константы скоростей образования и распада комплекса лиганда с ДНК-дуплексом. ДНК-дуплекс представим в виде одномерного кристалла с числом адсорбционных центров N, а лиганд, имеющий намного меньшие линейные размеры, при адсорбции занимает n подряд расположенных центров адсорбции на ДНК-дуплексе. Если принять, что число адсорбированных лигандов равно x, для случая малого заполнения уравнение, описывающее изменение во времени числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов, будет иметь следующий вид [12, 13]:

$$dx/dt = k_1 c_\mathrm{f}(N - (2n-1)x), \qquad (2)$$

где c_f – число свободных лигандов в растворе. Заметим, что при $n = 1$ уравнение (2) описывает адсорбцию при произвольном заполнении. Чтобы в дальнейшем при переходе к концентрациям не вводить новые обозначения, будем считать, что адсорбция происходит в единичном объеме. Рассмотрим случай, когда флуктуирует число свободных лигандов в растворе c_f. Чтобы анализ результатов сделать однозначным, оставим значения других параметров на уровне их средних значений. В подавляющем большинстве случаев причиной флуктуации является действие не одного выделенного фактора, а действуют множество независимых факторов. В этом случае, как известно, их суммарное воздействие, согласно центральной предельной теореме, имеет гауссово распределение, $c_\mathrm{f}(t)$ можно представить в виде суммы среднего $\overline{c_\mathrm{f}}$ и гауссового шума $\xi(\tau)$, среднее значение которого равно нулю, т.е. $\overline{\xi(t)} = 0$:

$$c_\mathrm{f}(t) = \overline{c_\mathrm{f}} + \sigma_\mathrm{c}^2 \cdot \xi(t), \qquad (3)$$

где σ_c^2 – интенсивность шума. Примем, что интенсивность шума не зависит от t, т.е. имеем стационарный шум. Принимаем, что время корреляции флуктуаций внешней среды намного меньше характерного времени изменения переменной в системе, так что, согласно работе [14], в выражении (3) можно перейти к пределу гауссового белого шума. Таким образом, принимаем, что имеем гауссов белый шум с характеристиками: $\overline{\xi(t)} = 0$, $\overline{\xi(0) \cdot \xi(t)} = \delta(t)$, где $\delta(t)$ – дельта-функция. Подставив выражение (3) в выражение (2), получим

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= f_\mathrm{c}(x) + \sigma_\mathrm{c} \cdot g(x) \cdot \xi(t), \\ f_\mathrm{c}(x) &= k_1 \overline{c_\mathrm{f}}(N - (2n-1)x) - k_{-1}x, \\ g(x) &= k_1(N - (2n-1)x). \end{aligned} \qquad (4)$$

Чтобы не вводить новых обозначений в уравнении (4) и далее, знак черты усреднения над параметрами опущен, оставлен лишь у параметра, флуктуирующего под воздействием внешнего шума. Поскольку, как это видно из уравнения (4),

случайная функция умножается на переменную x, то уравнение (4) относят к классу мультипликативных стохастических дифференциальных уравнений. Процедура решения уравнения (4) следующая. Вначале для уравнения (4) выписывается соответствующее уравенение Фоккера–Планка, а затем, используя это уравнение, получают уравнение для моментов. Поскольку флуктуирующий параметр аппроксимирован гауссовым белым шумом, то, согласно работе [14], в этом случае стохастическое дифференциальное уравнение (4) интерпретируется в смысле Стратановича и соответствующее уравнение Фоккера–Планка для него, как показано в работе [14], имеет вид

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}\left(\left(f_c(x) + \frac{\sigma_c^2}{2} g(x)g'(x)\right)P(x,t)\right) + \frac{\sigma_c^2}{2}\frac{\partial^2}{\partial x^2}\left(g^2(x)P(x,t)\right), \quad (5)$$

где $P(x,t)$ – вероятность того, что в системе в момент времени t имеется ровно x адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов. Для получения уравнения для моментов перепишем уравнение (5) в виде

$$\begin{aligned} &\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}\left(A(x)P(x,t)\right) + \frac{1}{2}\frac{\partial^2}{\partial x^2}\left(B(x)P(x,t)\right), \\ &A(x) = f_c(x) + \frac{\sigma_c^2}{2} g(x)g'(x), \\ &B(x) = \sigma_c^2 g^2(x). \end{aligned} \quad (6)$$

В работе [15] приводится подробный вывод уравнений для моментов произвольного порядка. Следуя работе [15], легко получить дифференциальное уравнение для $\overline{x}$, которое имеет вид

$$\frac{d\overline{x}}{dt} = \overline{A(x)}. \quad (7)$$

Подставив в уравнение (7) значение $A(x)$ из уравнения (6) с учетом явных выражений для $f_c(x)$ и $g(x)$, получим следующее окончательное уравнение, описывающее изменение во времени среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов $\overline{x}$ в виде

$$\begin{aligned} &\frac{d\overline{x}}{dt} = -\alpha\overline{x} + \beta, \\ &\alpha = k_{-1} + (2n-1)k_1\overline{c_f} - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)^2, \\ &\beta = k_1\overline{c_f}N - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)N. \end{aligned} \quad (8)$$

Принимаем, что в начальный момент времени на ДНК-дуплексе не было лигандов, т.е. при начальном условии $\overline{x(0)} = 0$. Из решения уравнения (8) получим следующее выражение для среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов:

$$\overline{x(t)} = \frac{\beta}{\alpha}(1 - \exp(-\alpha t)). \quad (9)$$

Для случая малого шума, когда можно принять $\alpha > 0$, из уравнения (9) при стремлении времени к бесконечности получим стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов $\left(\overline{x}\right)_{st}$ в виде

$$\left(\overline{x}\right)_{st} = \frac{k_1\overline{c_f}N - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)N}{k_{-1} + (2n-1)k_1\overline{c_f} - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)^2}. \quad (10)$$

Принимаем, что выходной сигнал ДНК-биосенсора через единицу площади биосенсора $I(t)$, обусловленный адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексе, пропорциален числу адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов $x(t)$, т.е. $I(t) = \gamma x(t)$, где γ – коэффициент пропорциональности. В этом случае среднее значение выходного сигнала ДНК-биосенсора равно $\overline{I(t)} = \gamma\overline{x(t)}$, т.е.

$$\overline{I(t)} = \gamma\frac{\beta}{\alpha}(1 - \exp(-\alpha t)) \quad (11)$$

а стационарное значение сигнала равно

$$\left(\overline{I}\right)_{st} = \gamma\frac{k_1\overline{c_f}N - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)N}{k_{-1} + (2n-1)k_1\overline{c_f} - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)^2}. \quad (12)$$

Важной характеристикой выходного сигнала ДНК-биосенсора является время релаксации сигнала. Из формулы (11) следует, что время ре-

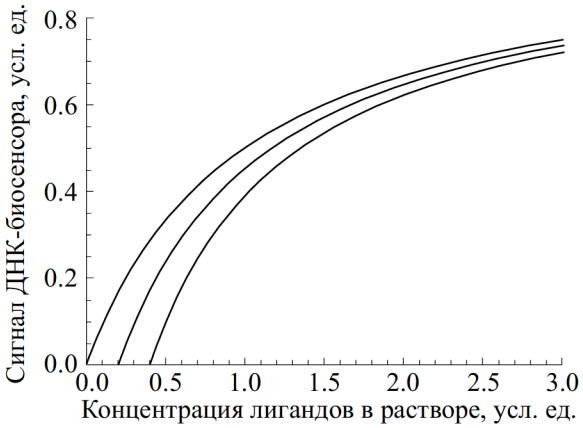


Рис. 1. Зависимости сигнала ДНК-биосенсора Y от концентрации лигандов в растворе X. Графики рассчитаны по формуле (15) при $n = 1$. Верхняя кривая соответствует детерминированному случаю, когда отсутствует внешний шум ($\sigma_c = 0$). Средняя кривая соответствует случаю, когда $C = D = 0.2$, нижняя кривая когда $C = D = 0.4$.

лаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора равно

$$\tau = \left(k_{-1} + (2n-1)k_1\overline{c_f} - \frac{\sigma_c^2}{2}k_1^2(2n-1)^2 \right)^{-1}. \qquad (13)$$

Из уравнения (13) видно, что с увеличением концентрации лигандов в растворе время релаксации сигнала уменьшается.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и следовало ожидать, при отсутствии внешнего шума, т.е. при условии $\sigma_c = 0$, стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов (10) в точности совпадает с соответствующим решением детерминированного уравнения (2) (для определения стационарного значения адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов следует приравнять правую часть уравнения (2) к нулю и найти x_{st}). Как следует из уравнений (10) и (11), стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов и среднее значение сигнала зависят от интенсивности внешнего шума σ_c^2, что является прямым следствием мультипликативности шума [14]. Заметим, что в случае аддитивного ланжевеновского шума это не так – стационарное значение среднего числа адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов не зависит от интенсивности внешнего шума [12]. Из уравнения (11) видно, что зависимость среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора, обусловленного адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексе, от интенсивности внешнего шума имеет пороговый характер. Анализ уравнения (11) показывает, что при заданном уровне интенсивности внешнего шума сигнал отсутствует, когда число лигандов в растворе меньше некоторого определенного значения, которое определяется из условия равенства нулю числителя в выражении (12). Это значение равно

$$\overline{c_f^*} = \frac{\sigma_c^2 k_1(2n-1)}{2}. \qquad (14)$$

Для удобства построения графиков и анализа результатов, перепишем выражение (12) в безразмерном виде:

$$Y = \frac{X - C}{1 + (2n-1)X - D},$$
$$Y = \left(\overline{I}\right)_{st} / (N\gamma), \quad X = K\overline{c_f}, \quad K = k_1 / k_{-1}, \qquad (15)$$
$$C = \frac{\sigma_c^2 K k_1}{2}(2n-1), \quad D = \frac{\sigma_c^2 K k_1}{2}(2n-1)^2,$$

где Y – безразмерный сигнал ДНК-биосенсора, X – безразмерная концентрация лигандов в растворе, K – константа равновесия квазихимической реакции (1). Графики зависимостей (15) представлены на рис. 1. Кривые построены при $n = 1$ (при других значениях n кривые качественно не отличаются от случая $n = 1$). Из рис. 1 видно, что наличие внешнего мультипликативного шума приводит к уменьшению сигнала ДНК-биосенсора, обусловленного адсорбцией и десорбцией лигандов на ДНК-дуплексы. Из рис. 1 также видно, что если интенсивность внешнего шума отлична от нуля, то существует область малых чисел лигандов в растворе $\overline{c_f}$ (малых концентраций), при которых отсутствует сигнал ДНК-биосенсора. Из выражения (12) также следует, что с увеличением как интенсивности внешнего шума, так и k_1 эта область расширяется.

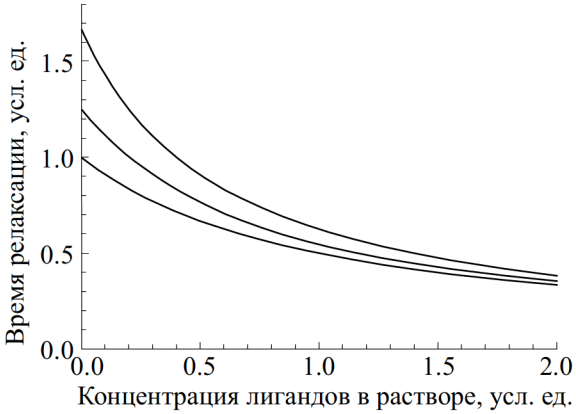


Рис. 2. Зависимости времени релаксации от концентрации лигандов в растворе. Графики рассчитаны по формуле (16) при $n = 1$. Нижняя кривая соответствует детерминированному случаю, когда отсутствует внешний шум ($(\sigma_c = 0)$. Средняя кривая соответствует случаю, когда $C = D = 0.2$, верхняя кривая – $C = D = 0.4$.

Для удобства построения графиков и анализа результатов перепишем уравнение (13) в безразмерном виде:

$$Y = \left(1 + (2n-1)X - D\right)^{-1}$$
$$Y = \tau k_{-1}, \quad X = K\overline{c_f}, \quad K = k_1 / k_{-1}, \quad D = \frac{\sigma_c^2 K k_1}{2}(2n-1)^2, \tag{16}$$

где Y – безразмерное время релаксации сигнала, X – безразмерная концентрация лигандов в растворе, K – константа равновесия квазихимической реакции (1). На рис. 2 представлена зависимость времени релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе. Кривые построены при $n = 1$ (при других значениях n кривые качественно не отличаются от случая $n = 1$). Из рис. 2 видно, что с увеличением интенсивости как внешнего шума, так и k_1 увеличивается время релаксации, причем при малых концентрациях лигандов это увеличение проявляется более значительно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе в условиях, когда под воздействием внешнего шума флуктуирует число лигандов в растворе, вычислены среднее число лигандов, адсорбированных на ДНК-дуплексе, а также средняя величина сигнала ДНК-биосенсора, обусловленная адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексах ДНК-биосенсора. Определены некоторые характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. K. Metkar and K. Girigoswami, Biocatalysis and Agricult. Biotech. **17**, 271 (2019).
2. M. S. Mufamadi and P. R. Sekhejane, in *Nanotechnology. An Agricultural Paradigm* (Springer, Singapore, 2017), pp. 263–278.
3. T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. Barton, Nature Biotechnol. **21** (10), 1192 (2003).
4. J. Wang, Anal. Chem. Acta **469,** 63 (2002).
5. E. Palecek, M. Fojta, and F. Jelen, Bioelectrochemistry **56,** 85 (2002).
6. Ю. А. Ахапкин и др., *Биотехника – новое направление компьютеризации* (Наука, М., 1990).
7. V. Kavita, J. Bioengineer. Biomed. Sci. **7** (2), 222 (2017).
8. A. Halperin, A. Buhot, and E. B. Zhulina, J. Phys. Condens. Matter **18**, S463 (2006).
9. B. A. Baker and V.T. Milam, Nucl. Acids Res. **39** (15), e99 (2011).
10. М. В. Головкин , Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, Биофизика **54** (4), 581 (2009).
11. Ю. Д. Нечипуренко, в кн. *Физико-химические механизмы и регуляция процессов трансформации энергии в биологических структурах*, под ред. Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубина (Институт

компьютерных исследований, М.-Ижевск, 2017), сс. 522–530.
12. А. Т. Карапетян, Г. А. Аветисян и В. Б. Аракелян, Докл. НАН РА **110** (4), 376 (2010).
13. V. Arakelyan, Y. Babayan, and G. Potikyan, J. Biomol. Struct. Dyn. **18,** 231 (2000).
14. В. Хорстхемке и Р. Лефевр, *Индуцированные шумом переходы. Теория и применение в физике, химии и биологии* (Мир, М., 1987).
15. С. А. Ахманов, Ю. Е. Дьяков и А. С. Чиркин, *Введение в статистическую радиофизику и оптику* (Наука, М., 1981).

Adsorption of Ligands on DNA Duplexes under the Influence of the Fluctuating Medium Causes a Change in DNA-Biosensor Output Signal

V.B. Arakelyan*, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan**, M.A. Shahinyan**, and P.O. Vardevanyan****

**Faculty of Physics, Yerevan State University, ul. A. Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia*

***Faculty of Biology, Yerevan State University, ul. A. Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia*

In this study we report on ligand binding to DNA-duplexes in DNA-biosensor when the number of ligands in the solution fluctuates under the influence of the fluctuating medium (external noise). A multiplicative stochastic differential equation, which takes into account the time-dependent change in the number of bound ligands to DNA-duplexes is obtained for a system with small amounts of the studying samples. DNA-biosensor output signal average value and relaxation time that depend on adsorption of ligands on DNA-duplexes in fluctuating medium have been calculated. It is shown that multiplicative noise decreases the average value of DNA-biosensor output signal. The deterioration in the signal has its threshold level –at a certain ratio between the adsorption parameters and the intensity of external noise no deterioration in the signal occurs. It is shown that the relaxation time of the output signal of DNA-biosensor increases along with increasing external noise intensity.

Keywords: adsorption of ligands, medium fluctuation, multiplicative noise, DNA-biosensors

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 676–679

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ С ПАМЯТЬЮ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ИНТРОН-ЭКЗОННОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНА

© 2020 г. Л.А. Урошлев, Н.В. Баль, Е.А. Чеснокова

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а

E-mail: leonidurоshlev@gmail.com

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.
После доработки 21.04.2020 г.
Принята к публикации 29.04.2020 г.

Построены несколько типов нейросетей с памятью. Каждая из них была обучена на полном геноме мыши для предсказания интрон-экзонной структуры гена. Было проведено сравнение нейросетей в работе как на тестовой выборке, так и на экспериментальном материале, полученном после секвенирования культуры мозга крысы, обработанного реагентами, ингибирующими сплайсинг.

Ключевые слова: рекуррентные нейросети, сплайсинг, LSTM-сеть, GRU-сеть, пладиенолид.

DOI: 10.31857/S0006302920040079

Сплайсинг – один из ключевых механизмов в обеспечении белкового разнообразия у эукариотических организмов. Сплайсинг также регулирует стабильность различных вариантов мРНК. Сравнение экспрессии транскриптов в разных тканях человека показало, что мозг, печень и семенники имеют самые высокие уровни альтернативного сплайсинга, при этом в разных тканях могут преобладать разные типы альтернативного сплайсинга [1].

В нервной системе важным фактором, зависящим от альтернативного сплайсинга, является пространственная локализация транскриптов [2]. Кроме того, обнаружено, что активность нейронов может оказывать влияние на вырезание интронов [3], что, в свою очередь, влияет на экспрессию целевых белков и является механизмом тонкой настройки работы нейронов в различных условиях их функционирования [4].

Альтернативный сплайсинг обеспечивает разнообразие транскриптов не только внутри клеток, но и между ними. При формировании нервной системы происходит дифференцировка клеток-предшественников в различные типы нейронов и глии. С помощью выделения рибосомо-ассоциированной РНК из разных типов нейронов было обнаружено достоверное различие наборов альтернативных сплайс-изоформ РНК в разных типах клеток, что может свидетельствовать о том, что альтернативный сплайсинг вовлечен в процесс дифференциации нейронов в ходе развития нервной системы [5].

В настоящее время существует множество алгоритмов для поиска и аннотации сплайс-изоформ *in silico*. В качестве основы алгоритма могут быть использованы графы де Брюина, жадные алгоритмы, графы перекрытий и другие. Однако почти все алгоритмы предназначены для обработки данных, полученных с помощью различных вариаций секвенатора Illumina. Если же для получения данных используется иной секвенатор, алгоритмы могут ошибаться, так как большая часть современных алгоритмов для определения сплайс-изоформ работает с множеством небольших отдельных чтений (100 п.н.), выровненных на референсный геном. Последовательности, получаемые с помощью таких приборов как IonTorrent или Oxford Nanopore, представляют собой небольшой набор достаточно длинных (свыше 500 пар нуклеотидов) контигов, которые должен последовательно обрабатывать алгоритм. Еще одной возможной областью применения алгоритма, работающего с длинными последовательностями нуклеотидов, является поиск и аннотация интронов в NGS-данных различного происхождения, уже собранных в транскрипты, что может быть полезно при аннотации сборок.

Чтобы выстроить достаточно эффективный алгоритм выделения сплайс-изоформ, необходимо воспользоваться методами, которые способны эффективно выделять паттерны из последовательности. К таковым можно отнести методы машинного обучения, которые успешно используются в самых разных областях вычислительной молекулярной биологии. В частности, примерами использования этих методов могут служить классификация событий сплайсинга [6] и влияния полиморфизмов на патогенность [7].

МЕТОДЫ

Для поиска интрон-экзонной структуры генов использовали несколько моделей машинного обучения с памятью, подходящих для обработки одномерных последовательностей. Модель должна запоминать самые устойчивые паттерны и забывать незначимые. Такие задачи очень распространены в различных областях вычислительной лингвистики и обработки изображений. Для этих целей используются различные виды рекуррентных нейронных сетей. Дополнительным аргументом в пользу выбора этих моделей может служить то, что, при правильной стратегии обучения, модель может быть устойчива к ошибкам секвенирования.

В качестве первого слоя нашей нейронной сети (см. рис. 1) мы использовали одномерный сверточный слой нейронов с размером окна в 2 п.н. На втором слое нашей модели мы используем два вида рекуррентных сетей – однонаправленная GRU-сеть [9] и LSTM-сеть [8], двунаправленная GRU и LSTM-сеть. Третий слой используется для предотвращения переобучения модели с помощью дропаута. Все реализации нейросетей строили с помощью пакета keras для языка программирования Python версии 3.8.

Тестирование нейросетей проходило в два этапа – на первом этапе нейросеть обучалась с помощью искусственных данных. Данные об интрон-экзонной структуре генов брали из аннотации. При помощи аннотации генома мыши были выделены полные последовательности генов, для которых были сформированы характеристические векторы по следующему правилу: 0 соответствует нуклеотидам, попавшим в интроны, 1 – в экзоны. Далее выборка делилась на обучающую и тестовую в соотношении 80% (обучающая выборка) и 20% (тестовая). Вычислительные эксперименты по обучению сетей проводили для разных объемов окон последовательности, а именно 600, 700, 800, 1000 п.н. Для поиска коэффициентов моделей использовался метод оптимизации ADAM [10]. Результаты для наших моделей показаны в таблице.

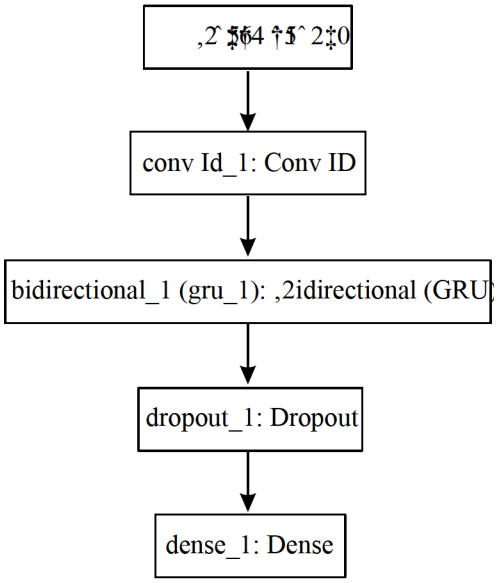


Рис. 1. Схема нейросети, используемой для предсказания интрон-экзонной структуры гена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В определенных условиях вырезание интронов может быть подавлено, поэтому сети, обученные отличать участки интронов от участков экзонов, могут использоваться для опознавания ситуации, в которой происходит такое подавление. Это дает возможный путь для экспериментальной проверки разработанного алгоритма.

На втором этапе уже предобученную сеть тестировали на наборе экспериментальных данных, полученных с помощью секвенатора IonTorrent. Для этого были отсеквенированы транскриптомы образцов нейроглиальной культуры гиппокампа крысы [11], два из которых были обработаны пладиенолидом – реагентом, который ингибирует процесс сплайсинга, два же были оставлены в качестве контроля. Экспериментальный и контрольный образцы были собраны с помощью сборщика SPAdes [12] в контиги. N50 для получившейся сборки был равен 1022 п.н. для кон-

Таблица 1. Средняя величина корректно предсказанной принадлежности нуклеотидов для разных типов нейронных сетей

Тип сети	600	700	800	1000
Однонаправленная GRU	65%	74%	71%	80%
Двунаправленная GRU	82%	84%	91%	92%
Однонаправленная LSTM	72%	72%	80%	82%
Двунаправленная LSTM	93%	71%	67%	81%

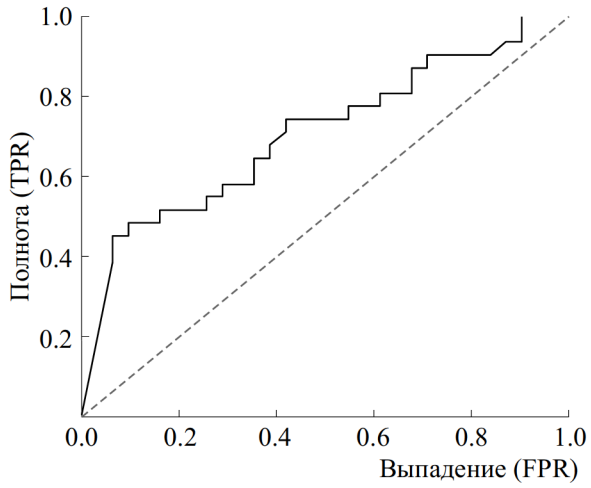


Рис. 2. ROC-кривая нейросетевого классификатора «эксперимент–контроль».

трольных образцов и 913 п.н. для экспериментальных образцов.

Вычислительный эксперимент заключался в следующем: разделить контрольные и экспериментальные (с «застрявшими» интронами) контиги. С этой целью для каждой группы были выбраны 50 случайных контигов, для которых была произведена разметка интрон-экзонной структуры с помощью разработанной программы. Предполагалось, что те последовательности, в которых длина интронов больше пороговой, – экспериментальные. В противном случае контиг определялся как принадлежащий к контрольной группе. Далее на основе количества обнаруженных интронов контиги классифицировались на контрольные и экспериментальные. Для иллюстрации классификации построена ROC-кривая (рис. 2) для нейросети, которая на этапе тестирования показала наилучший результат. Как видно, полученные нейросети обеспечивают достаточно неплохой уровень классификации, даже при использовании обучения на организмах, с близкой, хотя и иной видовой принадлежностью.

Работа большей части нейросетей, в том числе свойства обучающей выборки и архитектура каждой отдельно взятой сети по-прежнему является «черным ящиком» для исследователей, и параметры, обеспечивающие эффективную работу сети на тех или иных данных, подбираются эмпирически. В дальнейших исследованиях планируется подробно разобрать вопросы эффективности той или иной архитектуры, особенно связанные с методами выбора и обучения тех или иных нейронных сетей. Например, в ходе подготовки данной работы были также рассмотрены архитектуры Seq2Seq и сети, основанные на механизмах внимания. Несмотря на более сложное внутреннее устройство, эти сети не показали каких-либо значимых результатов в предсказании интрон-экзонной структуры.

Отдельным вопросом для исследования являются границы применимости нейросетей, обученных на одних видах, для предсказания интронов в геномах других видов, эволюционно достаточно далеких. Это чрезвычайно важно для аннотации геномов новых модельных организмов, таких как, например, виноградная улитка. С одной стороны, ее геном и транскриптом чрезвычайно важны для задач по исследованию памяти [13]. С другой стороны, из-за обилия повторов и отсутствия близкородственных видов ее аннотация имеющимися алгоритмами крайне затруднена.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-74-00141.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Yeo, D. Holste, and G. Kreiman, Genome Biol. **5** (10), R74 (2004).
2. E. Furlanis and P. Scheiffele, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **34**, 451 (2018).
3. O. Mauger, F. Lemoine, and P. Scheiffele, Neuron **92** (6), 1266 (2016).
4. G. Biamonti, A. Amato, E. Belloni, et al., Aging Clin. Exp. Res. (2019). DOI: 10.1007/s40520-019-01360-x
5. E. Furlanis, L. Traunmüller, G. Fucile, and P. Scheiffele, Nat. Neurosci. **22** (10), 1709 (2019).
6. Louadi Z. et al. Genes **10** (8), 587 (2019).
7. J. Cheng, T. Y. D. Nguyen, K. J. Cygan, et al., Genome Biol. **20** (1), 48 (2019).
8. F. A. Gers, J. Schmidhuber, and F. Cummins, in *Neural Nets WIRN Vietri-99* (Springer, Lond., 1999), pp. 133–138.
9. J. Chung, C. Gulcehre, K. H. Cho, and Y. Bengio, arXiv, 1412.3555 (2014).
10. D. P. Kingma and J. Ba, arXiv preprint: arXiv, 1412.6980 (2014).
11. O. Mauger, F. Lemoine, and P. Scheiffele, Neuron **92** (6), 1266 (2016).

12. A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, et al., J. Comput. Biol. **19** (5), 455 (2012).
13. N. Aseyev, A. K. Vinarskaya, M. Roshchin, et al., Front. Cell. Neurosci. **11**, 348 (2017).

Prediction of the Exon-Intron Structure of a Gene Based on Long Short-Term Memory Neural Network

L.A. Uroshlev, N.V. Bal, and E.A. Chesnokova

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia

This paper suggests several models of long short-term memory neural networks. We trained every model on a full mouse genome to predict the exon-intron structure of a gene. In this work we compare the performance of the neural networks in the test sample and experimental material obtained after screening rat brain cells treated with splicing inhibitors.

Keywords: recurrent neural networks, splicing, LSTM-neural network, GRU-neural network, pladienolide

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 680–690

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.115.08

ИЗОХИНОЛИЗИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КУМАРИНА В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РЕАКЦИЯХ ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ

© 2020 г. Л.А. Ромодин*, Ю.А. Владимиров, ***, ****, *****, С.В. Шангин*, Г.К. Владимиров**, *****, Н.П. Лысенко*, Е.И. Демихов*******

**Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23*

E-mail: rla2904@mail.ru

***Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2*

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

*****Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1*

******Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59*

*******Физический институт имени П.Н. Лебедева РАН. 119991, Москва, Ленинский просп., 53*

Поступила в редакцию 16.03.2020 г.
После доработки 23.03.2020 г.
Принята к публикации 24.03.2020 г.

Изучено участие изохинолизиновых производных кумарина в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином. Исследованы производные кумарина, известные как С-314 (coumarin-314), С-334 (coumarin-334) и С-525 (coumarin-525) и считающиеся специфическими физическими активаторами хемилюминесценции, сопровождающей реакции липидной пероксидации. Спектрофотометрически исследовано действие метанола на структуру цитохрома *c*, изучены оптические свойства указанных веществ в среде фосфатного буфера. Также проведено спектрофотометрическое исследование с параллельной регистрацией хемилюминесценции смеси, в которой протекает липопероксидазная реакция, катализируемая комплексом цитохрома *c* с кардиолипином в присутствии изохинолизиновых производных кумарина. Установлена обратимость действия метанола на структуру цитохрома *c*, что доказывает возможность использования данного спирта при исследовании этого белка, определены положения максимумов поглощения и соответствующие им значения коэффициентов молярного поглощения в среде 20 мМ фосфатного буфера (pH 7.4) для С-314 (λ_{max} = 447.5 нм; ε = 32360.4 л/моль·см), С-334 (λ_{max} = 460 нм; ε = 44012 л/моль·см) и С-525 (λ_{max} = 460 нм; ε = 32703.6 л/моль·см). Показано, что изохинолизиновые производные кумарина являются субстратами пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, расход этих веществ за время среднестатистического опыта по измерению хемилюминесценции (322 с) для С-314, С-334 и С-525 составляет 32, 38 и 26% соответственно.

Ключевые слова: апоптоз, хемилюминесценция, комплекс цитохрома с с кардиолипином, пероксидаза, изохинолизиновые кумарины, спектрофотометрия.

DOI: 10.31857/S0006302920040080

Апоптоз, или запрограммированная гибель клеток организма, является причиной многих патологий [1–6]. Ключевую роль при запуске апоптоза по митохондриальному пути играет комплекс цитохрома *c* с кардиолипином (ЦитС-КЛ), обладающий липопероксидазной активностью, обуславливающей разрушение мембран митохондрий [7–23], что приводит к выходу различных проапоптотических факторов в цитозоль [24–28].

Собственная и активированная хемилюминесценция. Хемилюминесценция – это свечение, которое является результатом перехода различных метаболитов из электронно-возбужденного со-

Сокращения: ЦитС-КЛ – комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, ТОКЛ –тетраолеилкардиолипин, С-314 – изохинолизиновое производное кумарина, coumarin-314, С-334 – изохинолизиновое производное кумарина, coumarin-334, С-525 – изохинолизиновое производное кумарина, coumarin-525.

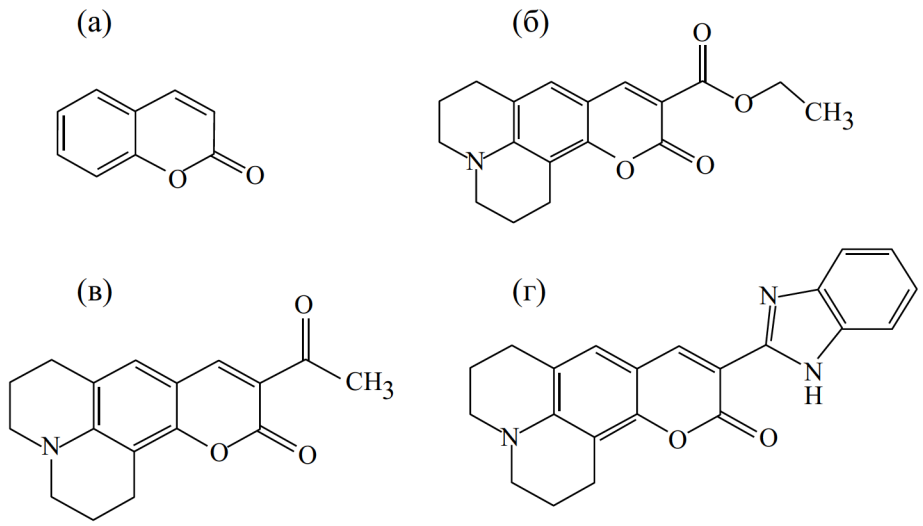


Рис. 1. Формулы кумарина и изучаемых изохинолизиновых его производных [47]: (а) – кумарин, базовое вещество группы кумаринов, к которому присоединяются различные заместители и/или циклические группы; (б) – Coumarin-314; (в) – Coumarin-334; (г) – Coumarin-525.

стояния в основное, причем далеко не каждый акт подобного перехода сопровождается высвечиванием фотона [29, 30].

Впервые испускание биообъектами светового излучения очень слабой интенсивности было обнаружено в конце первой трети прошлого века В.В. Лепешкиным [31, 32] и А.Г. Гурвичем [33]. Впоследствии было показано, что хемилюминесценция обусловлена протеканием свободнорадикальных реакций, главным образом – взаимодействием жирнокислотных пероксил-радикалов [34, 35].

Благодаря образованию большого количества энергии в элементарном акте радикальной реакции, часть которой выделяется в виде фотонов, хемилюминесцентная методика изучения свободнорадикальных процессов дает адекватное представление об их протекании в исследуемой системе [30, 37], позволяя оценить скорость реакции образования свободных радикалов [29, 36], на что не способен метод электронного парамагнитного резонанса [30, 36].

С тех пор, как собственная хемилюминесценция была показана на объектах растительного [38] и животного [39] происхождения, при помощи ее регистрации исследуют различные биологические системы [30, 35, 40–42]. Однако интенсивность собственной хемилюминесценции крайне мала, к тому же зачастую перед исследователями стоит задача изучить не свободнорадикальные процессы в исследуемом образце в общем и целом, а исследовать вполне конкретные радикалы, к примеру, оценить наличие в исследуемой системе радикалов липидов, но данный метод регистрации абсолютно неспецифичен [30].

В силу этого приходится применять так называемые активаторы, обуславливающие гораздо более высокий квантовый выход, нежели при собственной хемилюминесценции. Их можно разделить на две группы: 1) хемилюминесцентные зонды, или химические активаторы, – вещества, химически реагирующие с участниками или продуктами свободнорадикальной реакции и переходящие при этом в электронно-возбужденное состояние [30]; 2) физические активаторы – вещества, которые усиливают свечение за счет физического процесса миграции (перехвата) электронно-возбужденного состояния от участников и/или продуктов свободнорадикальной реакции без непосредственного химического взаимодействия с ними [30, 35, 36, 41, 43].

Изохинолизиновые производные кумарина. В настоящей работе мы исследовали изохинолизиновые производные кумарина, известные в англоязычных источниках как coumarin-314, coumarin-334 и coumarin-525 (сокращенно C-314, C-334 и C-525 соответственно, структурные формулы приведены на рис. 1), которые до настоящего исследования практически общепринято считались специфичными для липидных радикалов физическими активаторами хемилюминесценции, не реагирующими с участниками реакции [12, 41, 44–46].

Кумарины – группа ненасыщенных ароматических лактонов, в основе которых лежит лактон *цис-орто*-оксикоричной кислоты – 5,6-бензо-α-пирон (кумарин) [50]; многие из этих веществ используются в качестве лазерных красителей [51].

Из трех изучаемых нами производных кумарина в литературе уделяется наибольшее внимание кумарину C-525, показанному в качестве актива-

тора хемилюминесценции в 1995 г. [46]. Он использовался как физический активатор хемилюминесценции во многих работах с целью определения гидропероксидов липидов в системе «липидный субстрат – Fe^{2+}» [41, 44–46, 49, 53]. В данной системе механизм этого усиления хемилюминесценции – это, по-видимому, перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии (первичного продукта рекомбинации пероксил-радикалов) на флуоресцентный уровень С-525 [44]. Однако стоит заметить, что С-525 за счет наличия в своей структуре пуриновой группировки в определенных условиях проявляет антиоксидантные свойства, т.е. взаимодействует со свободными радикалами [48]. В работе [12] методом индуцированной С-525 хемилюминесценции изучалось радикальное окисление кардиолипина, находящегося в комплексе с цитохромом *c*, т.е., по сути, эту работу можно в определенной степени считать предтечей нашего исследования. Авторами работы [51] в качестве механизма действия С-525 был назван перенос энергии из триплетных состояний карбонилов, образующихся в самореакции перекисного радикала через механизм Рассела или разложением 1,2-диоксетана. Исходя из вывода авторов [51], что С-525 не подходит для изучения перекисного окисления липидов, катализируемого пероксидазой хрена, в силу его нестабильности в этой системе, можно предположить, что в системе, где в роли пероксидазы выступает цитохром *c* в комплексе с кардиолипином [7, 12, 14, 18, 19, 48, 54–57], С-525 может быть сам субстратом этой реакции.

Настоящее исследование проводилось нами с целью выяснения того, справедливо ли считать изохинолизиновые производные кумарина С-314, С-334 и С-525 физическими активаторами хемилюминесценции, не реагирующими с компонентами изучаемой системы. Достижение указанной цели предполагает выполнение задач:

1). Отработка процедуры исследования: вычисление коэффициентов молярного поглощения изучаемых изохинолизиновых производных кумарина, подтверждение допустимости наличия метанола в экспериментальных пробах.

2). Спектрофотометрический анализ течения пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ в присутствии изохинолизинового производного кумарина.

3). Изучение хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-КЛ пероксидазную реакцию, без активатора и в присутствии изохинолизинового производного кумарина.

4). Выдвижение гипотезы относительно того, как именно изохинолизиновые производные кумарина участвуют в катализируемой ЦитС-КЛ реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реактивы: KH_2PO_4, 20 мМ буферный раствор (pH 7.4); пероксид водорода, 8.6 М водный раствор (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-314, 500 мкМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-334, 1 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-525, 250 мкМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); цитохром *c*, 1 мМ раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипин (ТОКЛ), 6 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США).

Растворы вышеуказанных веществ в более низких концентрациях приготовляли методом последовательных разведений, кратность разбавлений не превышала десяти.

Спектрофотометрический анализ изменения конформации (развертывания) цитохрома *c* в метаноле и в комплексе с кардиолипином. Измерения проводили на спектрофотометре Specord 200 (Analytik Jena, Германия) с использованием кювет из кварцевого стекла с длиной оптического пути 1 см. Спектры регистрировали в пробе объемом 3 мл в диапазоне 650–750 нм, в качестве растворителя использовали 100 мМ фосфатный буфер с pH 7.4. Опытная проба, содержащая 50 мкМ раствор цитохрома *c* и 50% (по объему) метанола, для установления факта обратимости или необратимости действия метанола на структуру цитохрома *c* была разбавлена в пять раз растворителем. В качестве контролей выступали растворы цитохрома *c* с концентрацией 50 и 10 мкМ.

Спектрофотометрические измерения для выведения концентрационной зависимости оптической плотности кумаринов С-314, С-334 и С-525. Из метанольного 1 мМ раствора кумарина С-334, 500 мкМ раствора кумарина С-314 или 250 мкМ раствора кумарина С-525 нами был приготовлен 25 мкМ раствор, который использовали в спектрофотометрических измерениях, проводимых по следующей схеме: после измерения раствора изначальной концентрации методом последовательных разведений готовили растворы меньших концентраций.

Регистрация серии спектров поглощения смеси, в которой протекает липопероксидазная реакция. В кювету спектрофотометра добавляли 300 мкл 100 мкМ раствора цитохрома *c*, 150 мкл 6 мМ раствора ТОКЛ, 75 мкл 1 мМ раствора С-334, или 150 мкл 500 мкМ раствора С-314, или 300 мкл 250 мкМ раствора С-525, а также – 300 мкл 2150 мкМ раствора перекиси водорода (в кон-

трольных измерениях H_2O_2 заменяли фосфатным буфером), общий объем пробы составлял 3 мл, данный объем доводили добавлением необходимого количестваа 20 мМ фосфатного буфера. Перекись водорода добавляли в последнюю очередь. Далее в течение двух часов регистрировали спектры поглощения при следующих параметрах: диапазон измерения 300–600 нм, скорость измерения 5 нм/с, шаг (дискретность) 0.5 нм, ширина щели 5 нм, время регистрации спектра – примерно одна минута.

Объемы растворов и данные концентрации реактивов были подобраны нами по результатам подготовительных экспериментов, а концентрации цитохрома *c* и ТОКЛ взяты с расчетом на оптимальное их соотношение, равное 1:30, как было показано в работе [15].

Регистрация хемилюминесценции во время липопероксидазной реакции. Исследования по измерению хемилюминесценции проводили на хемилюминометре «Lum-5773» (ООО «ДИСофт», Россия), подключенном к компьютеру с программным обеспечением «PowerGraph». Перед началом каждой серии измерений хемилюминометр калибровали по ураниловому стеклу.

Кювету, содержащую: 300 мкл 100 мкМ цитохрома *c*, 150 мкл 6 мМ метанольного раствора ТОКЛ, 75 мкл 1 мМ метанольного раствора С-334, или 300 мкл 250 мкМ метанольного раствора С-525, или 150 мкл 500 мкМ раствора С-314, растворенных в 20 мМ фосфатном буфере объемом 2175 мкл и 2100 мкл соответственно, помещали в кюветное отделение хемилюминометра и запускали регистрацию, через 550 с извлекали кювету и добавляли в нее 300 мкл 2150 мкМ перекиси водорода с дальнейшей регистрацией свечения до выхода его к фоновым значениям.

В итоге система имела следующий количественный состав на момент начала липопероксидазной реакции: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкл ТОКЛ, 215 мкМ H_2O_2.

Вычисление концентраций на основании серий спектров поглощения. Концентрации цитохрома *c* и кумариновых производных, изменяющиеся в процессе течения липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, вычисляли для каждого зарегистрированного спектра. Вычисление проводили на основании закона Бугера–Ламберта–Бера для смеси веществ посредством решения системы уравнений, характеризующих значение оптической плотности смеси на длинах волн, соответствующих пикам поглощения цитохрома *c* и производного кумарина [52], по следующей формуле:

$$\begin{cases} C_C = \dfrac{A_1}{\varepsilon_{1,C} l} - \dfrac{C_P \varepsilon_{1,P}}{\varepsilon_{1,C}} \\ C_P = \dfrac{\dfrac{A_2}{\varepsilon_{2,C} l} - \dfrac{A_1}{\varepsilon_{1,C} l}}{\dfrac{\varepsilon_{2,P}}{\varepsilon_{2,C}} - \dfrac{\varepsilon_{1,P}}{\varepsilon_{1,C}}} \end{cases},$$

где C_C – концентрация производного кумарина, моль/л; A_1 – значение оптической плотности (поглощения) на длине волны, равной 409 нм (полоса Соре – пик поглощения порфириновой группы цитохрома *c*); A_2 – значение оптической плотности (поглощения) на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина (447,5 нм для С-314 и 460 нм для С-334 и С-525); $\varepsilon_{1,P}$ – коэффициент молярного поглощения цитохрома *c* на длине волны 409 нм; $\varepsilon_{2,P}$ – коэффициент молярного поглощения цитохрома *c* на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина; $\varepsilon_{1,C}$ – коэффициент молярного поглощения исследуемого производного кумарина на длине волны 409 нм; $\varepsilon_{2,C}$ – коэффициент молярного поглощения производного кумарина на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина; l – толщина кюветы (длина оптического пути), см, в нашем случае она равнялась 1 см; C_P – концентрация цитохрома *c*, моль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отработка процедуры исследования. *Спектрофотометрический анализ изменения конформации (развертывания) цитохрома c в метаноле и в комплексе с кардиолипином.* При изучении ЦитС-КЛ зачастую используются растворы, растворителем в которых является метанол: это и стоковый раствор кардиолипина, и стоковые растворы исследуемых в настоящей работе активаторы хемилюминесценции – производных кумарина. При этом на определенных этапах эксперимента концентрация спирта в образце может быть весьма существенной. Однако низкомолекулярные спирты вызывают изменение структуры белков, заключающееся в частичном развертывании глобул вследствие дегидратации белков [58], очевидно, что цитохром *c* в вышеупомянутых случаях меняет свою конформацию, что может повлиять на адекватность полученных экспериментальных данных. Поэтому нами была поставлена задача проверить, обратимо ли действие метанола на структуру цитохрома *c*. Для этого в среде 100 мМ фосфатного буфера при pH 7.4 было зарегистрировано значение оптической плотности в пике поглощения в области 700 нм, соответствующем

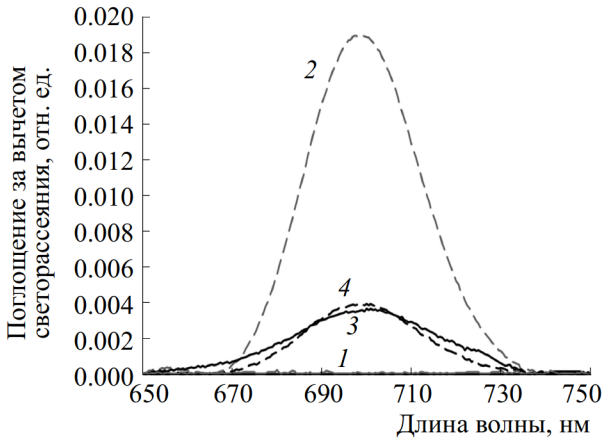


Рис. 2. Обратимость действия метанола на состояние связей Fe–S в молекуле цитохрома *c*. Кривая *1* – 50 мкМ цитохром *c* в 50%-м метаноле, кривая *2* – 50 мкМ цитохром *c*, кривая *3* – 10 мкМ цитохром *c* в 10%-м метаноле (разбавленная в 5 раз предыдущая проба *1*), кривая *4* – 10 мкМ цитохром *c*.

железосерным связям в молекуле цитохрома *c*. В качестве опытной пробы мы использовали 50 мкМ раствор цитохрома *c* в 50% метаноле, далее разбавленный в пять раз, в качестве контролей использовали 50 мкМ и 10 мкМ растворы цитохрома *c*; результаты эксперимента представлены на рис. 2.

По данным из спектров на рис. 2 50% метанол вызывает полное разрушение железо-серных связей в молекуле цитохрома *c* (кривая *1*, контроль без метанола – кривая *2*), однако разбавление этого раствора в пять раз фосфатным буфером приводит к их восстановлению (кривая *3*, контроль без метанола – кривая *4*).

По данным проведенной нами с помощью пакета «MS Excel 2016» обработки, при разбавлении в пять раз раствора цитохрома *c* с объемной долей метанола 50% восстановилось, судя по значению поглощения, $(93.69 \pm 1.04)\%_{n=5;p=0,95}$ железосерных связей в растворе цитохрома *c*, причем необходимо указать, что за 100% нами было взято значение поглощения 10 мкМ раствора цитохрома *c*, в котором полностью отсутствует метанол, а в опытной пробе его объемная концентрация составляет 10%. Вышесказанное указывает на допустимость использования метанольных растворов без риска искажения результатов вследствие нарушения метанолом молекулярной структуры цитохрома *c*.

Спектрофотометрические свойства кумаринов С-314, С-334 и С-525 в среде с 20 мМ фосфатного буфера. При использовании математического выражения закона Бугера–Ламберта–Бера нами были показаны следующие значения коэффициентов молярного поглощения (ε) исследуемых производных кумарина и цитохрома *c* в среде 20 мМ фосфатного буфера (pH 7.4). Пик поглощения С-314 приходится на длину волны 447.5 нм (ε = 32360.4 л/моль·см), С-334 – на 460 нм (ε = 44012.0 л/моль·см), С-525 – на 460 нм (ε = 32703.56 л/моль·см). Значение ε С-314, С-334 и С-525 на длине волны 409 нм составляет 12562.4, 9240.0 и 14987.26 л/моль·см соответственно. Значение ε для цитохрома *c* на длинах волн 409, 447,5 и 460 нм составляет 90740, 13890 и 8620 л/моль·см соответственно.

Также необходимо сказать несколько слов о растворимости изучаемых производных кумарина. С-334 в сравнении с двумя другими кумариновыми красителями показал более высокую растворимость и в метаноле (получалось приготовить даже 4 мМ растворы), и в среде фосфатного буфера (видимых признаков коллоидного раствора не наблюдалось вплоть до концентраций 40 мкМ).

Спектрофотометрический анализ течения пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, в присутствии изохинолизинового производного кумарина. Для оценки участия или неучастия изохинолизиновых производных кумарина в липопероксидазной реакции нами при параллельной регистрации хемилюминесцентного сигнала была зарегистрирована серия спектров поглощения смеси, в которой протекала липопероксидазная реакция, катализируемая комплексом цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином.

Результаты экспериментов по регистрации серии спектров поглощения и общего хемилюминесцентного сигнала показаны на рис. 3–5. На основании значения оптической плотности в пике поглощения изохинолизинового производного кумарина нами была вычислена его концентрация, также мы вычисляли концентрацию цитохрома *c*, вычисление концентраций проводили на основании закона Бугера–Ламберта–Бера [52] с упрощением, заключающемся в том, что изучаемая реакционная смесь в математической модели представлена как смесь не реагирующих друг с другом двух веществ – цитохрома *c* и изохинолизинового производного кумарина (С-314, С-334 или С-525), так как на рассматриваемых длинах волн кардиолипин и перекись водорода имеют низкие значения оптической плотности и практически весь вклад в общее поглощение смеси в диапазоне длин волн 405–465 нм вносят цитохром *c* и изохинолизиновое производное кумарина.

На рис. 3 представлены результаты этого эксперимента с присутствием в реакционной смеси кумарина С-314. Как видно из графиков, в первые 30 мин липопероксидазной реакции происходит резкое уменьшение концентрации изохинолизинового производного кумарина, С-314.

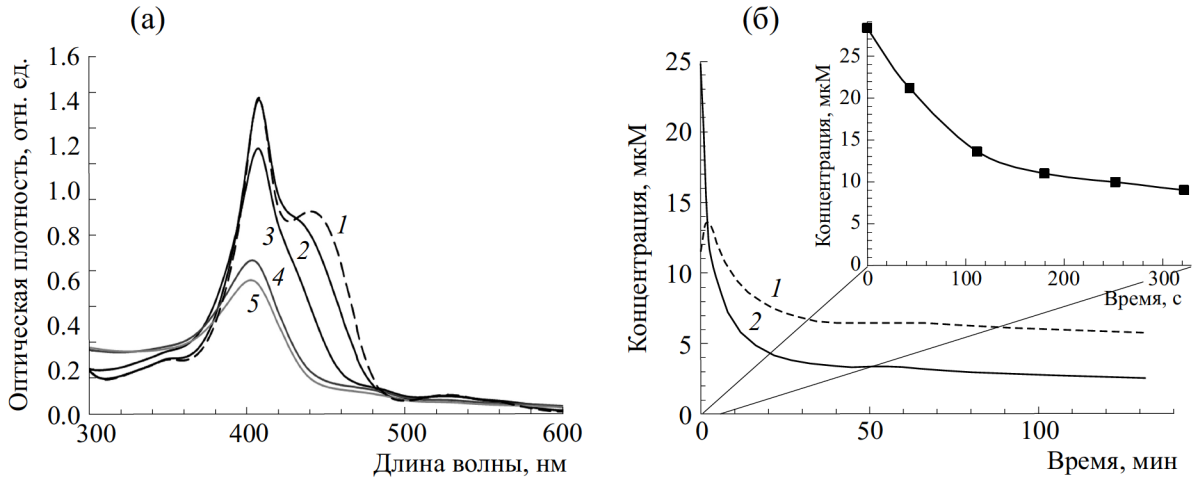


Рис. 3. Пероксидазная реакция в системе начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 25 мкМ С-314, 215 мкМ H_2O_2. (а) – Серия спектров поглощения смеси: *1* – спектр поглощения смеси без H_2O_2, *2* – спектр поглощения через 15 с после начала реакции, *3* – через 5 мин, *4* – через 59 мин, *5* – через 120 мин. (б) – Уменьшение концентрации цитохрома *c* (кривая *1*) и С-314 (кривая *2*) в процессе реакции, на врезке – уменьшение концентрации С-314 в первые минуты реакции.

На рис. 4 представлены результаты аналогичного эксперимента с присутствием в реакционной смеси С-334, он также расходуется в процессе реакции.

Рис. 5 представляет эксперимент с С-525, концентрация которого тоже резко снижается в течение первых 10 мин реакции.

Хемилюминесценция, сопровождающая катализируемую ЦитС-КЛ реакцию. Была проведена регистрация хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-КЛ реакцию при добавлении каждого из изучаемых производных кумарина, а также – без их добавления. В силу того, что хемилюминесценция системы в присутствии различных производных кумарина была примерно одинакова как по кинетике, так и по амплитуде вспышек, но отличалась от таковой для системы без добавления кумариновых красителей, на график мы решили вывести результат измерения только с одним производным кумарина, сравнив его с хемилюминесценцией системы без красителя.

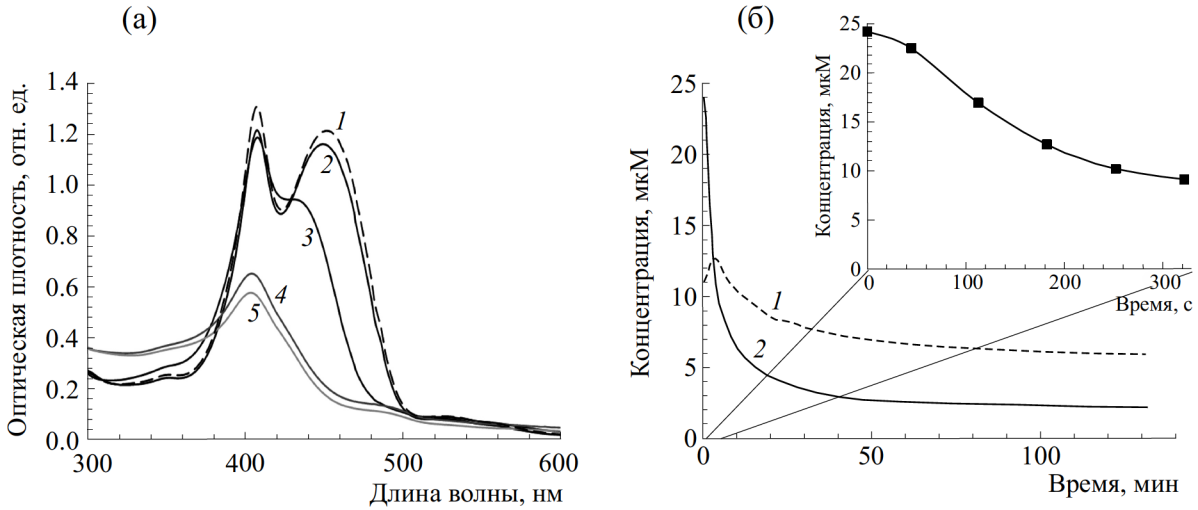


Рис. 4. Пероксидазная реакция в системе начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 25 мкМ С-334, 215 мкМ H_2O_2. (а) – Серия спектров поглощения смеси: *1* – спектр поглощения смеси без H_2O_2, *2* – спектр поглощения через 15 с после начала реакции, *3* – через 5 мин, *4* – через 59 мин, *5* – через 120 мин. (б) – Уменьшение концентрации цитохрома *c* (кривая *1*) и С-334 (кривая *2*) в процессе реакции, на врезке – уменьшение концентрации С-334 в первые минуты реакции.

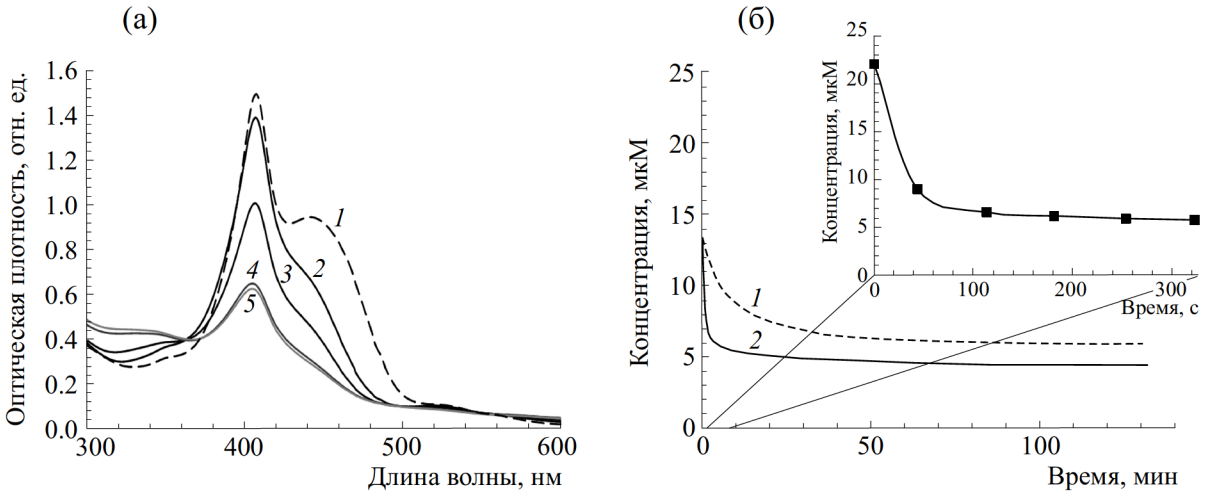


Рис. 5. Пероксидазная реакция в системе начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 25 мкМ С-525, 215 мкМ H_2O_2. (а) – Серия спектров поглощения смеси: *1* – спектр поглощения смеси без H_2O_2, *2* – спектр поглощения через 15 с после начала реакции, *3* – через 5 мин, *4* – через 59 мин, *5* – через 120 мин. (б) – Уменьшение концентрации цитохрома *c* (кривая *1*) и С-525 (кривая *2*) в процессе реакции, на врезке – уменьшение концентрации С-525 в первые минуты реакции.

Как видно из приведенных на рис. 6 хемилюминесцентных кривых, свечение, сопровождающее пероксидазную реакцию, катализируемую ЦитС-КЛ, в присутствии изохинолизинового производного кумарина ниже, чем наблюдаемое в его отсутствие. Этот, на первый взгляд, странный результат объяснен ниже при обсуждении.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из рис. 3–5 следует, что изохинолизиновые производные кумарина, С-314, С-334 и С-525, являются субстратами липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ. График на врезках на рис. 3–5 характеризует снижение концентрации изохинолизиновых производных кумарина в течение первых ≈5.4 мин пероксидазной реакции. В подавляющем количестве работ по измерению хемилюминесценции продолжительность этого измерения не превышает 5 мин. Поэтому для использования изохинолизиновых производных кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции при изучении пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, целесообразно определить степень расхода активаторов за это время. Таким образом, в первые 322 с расходуется 32% С-314, 38% С-334 и 26% С-525. Указанные данные позволяют в будущих работах вычислять поправочные коэффициенты для их использования в интерпретировании данных кумарин-активированной хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-КЛ пероксидазную реакцию.

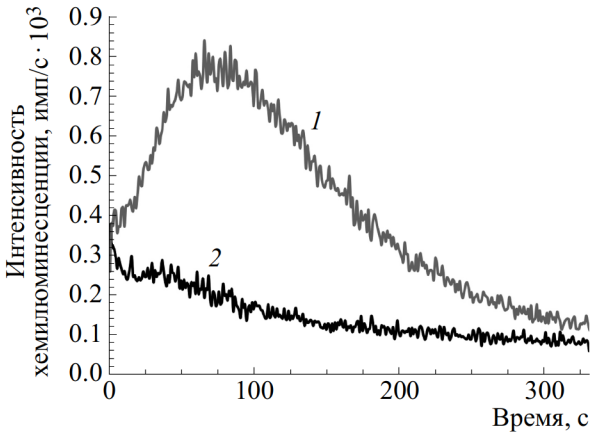


Рис. 6. Суммарная интенсивность хемилюминесценции в диапазоне длин волн 300–650 нм смеси начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 215 мкМ H_2O_2 без добавления производного кумарина (кривая *1*) и в присутствии 25 мкМ С-334 (кривая *2*).

Появляется весьма логичный и закономерный вопрос: как же быть с результатами авторов работ [44–46, 51], показавших изохинолизиновые производные кумарина как физические активаторы хемилюминесценции, не расходующиеся в ходе пероксидазной реакции. Ответ на этот вопрос достаточно прост: в перечисленных исследованиях происходила пероксидазная реакция, катализируемая свободными ионами Fe^{2+} в водной фазе, в случае же пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, взаимодействие с субстратом протекает скорее в липидной фазе, каковой является кардиолипиновая оболочка, образующаяся вокруг молекулы цитохрома *c* [15, 17]. В липидной фазе производные кумарина, в отличие от водной

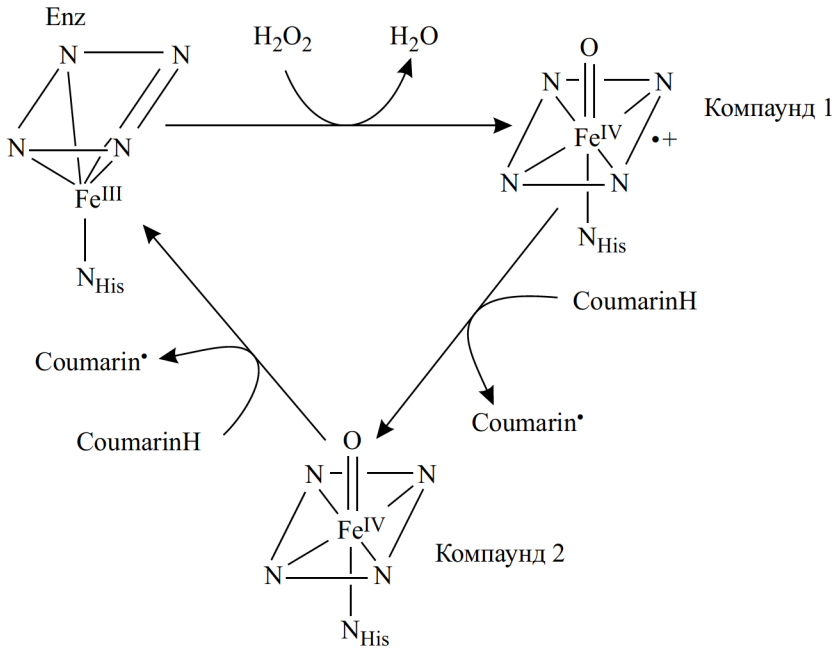


Рис. 7. Предполагаемое участие изохинолизиновых производных кумарина в липопероксидазной реакции. Условные обозначения: Enz – пероксидаза, содержащая трехвалентное железо, компаунд 1 – окисленная пероксидаза, содержащая четырехвалентное железо и радикал), компаунд 2 – пероксидаза, содержащая четырехвалентное железо или радикал), CoumarinH – исходное изохинолизиновое производное кумарина, Coumarin* – радикал изохинолизинового производного кумарина.

фазы, по нашим соображениям, являются непосредственными субстратами липопероксидазной реакции, занимая место липидного субстрата в пероксидазном цикле, подробно описанном в работах [59, 60]. Также необходимо упомянуть, что авторами работы [51] была замечена нестабильность концентрации С-525 в системе, в которой протекала ферментативная липопероксидазная реакция, катализируемая пероксидазой хрена.

Место изохинолизиновых производных кумарина в пероксидазном цикле. Напомним о процессах, являющихся составляющими пероксидазного ферментативного цикла – замкнутой последовательности превращений, происходящих с ферментом-пероксидазой, которым является и цитохром *c* в комплексе с кардиолипином [15]. Так называемый «исходный фермент-пероксидаза» содержит гем с трехвалентным железом. После взаимодействия исходного фермента с H_2O_2 в результате его двуэлектронного окисления образуется так называемый компаунд 1 – это соединение со степенью окисления на 2 большей, чем та, что была у исходного фермента (т.е. исходный фермент с двумя окисленными эквивалентами): соединение, в котором есть два «дополнительных» неспаренных электрона [60], представленное двумя переходящими друг в друга формами, подробно описанными в работе [59] для пероксидазы хрена. В большинстве случаев компаунд 1 берет себе один электрон от субстрата окисления, которым является липид, восстанавливаясь до компаунда 2, который может вернуться к состоянию исходного фермента путем окисления еще одной молекулы липида [60], а образовавшиеся липидные радикалы запускают каскад реакций перекисного окисления липидов [61]. Необходимо также заметить, что авторы работы [60] приводят на схеме пероксидазного цикла способ восстановления компаунда 1, альтернативный радикальному окислению липида: окисление перекиси водорода с образованием супероксидного радикала $^{\cdot}O_2^-$ и его восстановление до молекулярного кислорода компаундом 2.

На основании полученных выводов нами была составлена схема участия изохинолизиновых производных кумарина в пероксидазном цикле, представленная на рис. 7.

В предполагаемом нами механизме изохинолизиновое производное кумарина претерпевает радикальное окисление компаундом 1 при его превращении в компаунд 2 и компаундом 2 при его восстановлении до исходного фермента.

Далее нам необходимо ответить на вопрос, являются ли кумариновые красители химическими активаторами хемилюминесценции, индуцированной пероксидазной реакций. В работе [62] предложен утвердительный ответ на этот вопрос на основании предположения об уменьшении их концентрации на основании снижения оптиче-

ской плотности реакционной смеси (непосредственные значения концентраций в той работе не вычислялись). Однако тот факт, что С-314, С-334 и С-525 – субстраты реакции, еще не говорит о том, что они подобно люминолу являются химическими активаторами хемилюминесценции [63], так как, в отличие от последнего, продукты окисления кумариновых красителей комплексом ЦитС-КЛ не испускают фотонов. Доказательством этого служат хемилюминесцентные кривые на рис. 6. Так как мы использовали ТОКЛ, практически не подвергаемый окислению в ходе пероксидазной реакции, липидные радикалы почти не образовывались, поэтому кумарины не активировали хемилюминесценцию. Однако при этом сами кумариновые красители активно вступали в реакцию (графики снижения концентраций – на рис. 3–5). Следовательно, активно образовывались и их окисленные продукты, но никакого сильного свечения они не давали. Кривая *1* на рис. 6 характеризует хемилюминесценцию от изучаемой системы без кумаринов, собственную хемилюминесценцию, индуцированную данной реакцией.

ВЫВОДЫ

В работе показана допустимость применения метанольных растворов в исследованиях функций цитохрома *c* при условии, что в момент непосредственного исследования объемная доля метанола не превышает 10% и что на предварительных стадиях выполнения метода приготовления экспериментальной пробы она не превышает 50%.

Определены длины волн положения максимумов поглощения изохинолизиновых производных кумарина и соответствующие им значения коэффициентов молярного поглощения в среде 20 мМ фосфатного буфера (pH 7.4): 32360.4 л/моль·см на 447.5 нм для С-314, 44012.0 л/моль·см на 460 нм для С-334 и 32703.6 л/моль·см на 460 нм для С-525. Концентрация изохинолизиновых производных кумарина, равная 25 мкМ, признана нами оптимальной для исследования ферментативных реакций липидной пероксидации в среде фосфатного буфера.

Показано, что изохинолизиновые производные кумарина расходуются в процессе катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином пероксидазной реакции. Методом спектрофотометрии определено, что в первые 322 с этой реакции расходуется примерно: 32% С-314, 38% С-334, 26% С-525. Это время равно продолжительности среднестатистического опыта по измерению хемилюминесценции.

Показано, что хемилюминесценция, индуцированная катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином пероксидазной реакцией, при наличии в смеси кумаринового активатора слабее, чем в его отсутствии. Это объясняется различиями в механизме течения реакции.

Нами была выдвинута гипотеза, согласно которой изохинолизиновые производные кумарина – субстрат катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином пероксидазной реакции, окисляющийся при восстановлении окисленных форм пероксидазы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00491 «Изучение механизма реакций образования свободных радикалов в мембранах клеток и митохондрий, катализируемых комплексом цитохрома *c* с анионными липидами (Cyt-AL)».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы настоящей работы заявляют, что не имеют конфликта интересов касательно материалов, представленных в работе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Nishikido, J. Oyama, A. Shiraki, et al., J. Am. Heart Assoc. **5** (4), e002863 (2016). DOI: 10.1161/JAHA.115.002863
2. G. L. Caldeira, I. L. Ferreira, and A. C. Rego, J. Alzheimers Dis. **34**, 115 (2013). DOI: 10.3233/JAD-121444
3. H. H. Gaballah, S. S. Zakaria, M. M. Elbatsh, and N. M. Tahoon, Chem. Biol. Interact. **251**, 10 (2016). DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.023
4. L. Fan, L. Jiang, and Z. Du, Metab. Brain Dis. **30**, 1269 (2015). DOI: 10.1007/s11011-015-9703-z
5. N. Yalcinkaya, H. Haytural, B. Bilgic, et al., Neurosci. Lett. **615**, 72 (2016). DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.029
6. Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров и А. М. Полимова, в сб. *Материалы 11 Междунар. междисциплин. конгр. «Нейронаука для медицины и психологии»* (Судак, 2015), с. 309.
7. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Е. М. Дёмин и др., Биохимия **74**, 372 (2009).
8. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., Биохимия **71**, 1225 (2006).
9. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., Биохимия **91**, 1215 (2006).
10. А. Н. Осипов, Г. О. Степанов, Ю. А. Владимиров и др., Биохимия **71**, 1392 (2006).

11. Е. М. Дёмин, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, Вестн. МГУ. Сер. 2: Химия **49**, 354 (2008).
12. Ю. А. Владимиров, Е. М. Дёмин, Е. В. Проскурнина и А. Н. Осипов, Биол. мембраны **26**, 493 (2009).
13. Е. М. Дёмин, Д. Ю. Измайлов, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, *Регуляция радикал-зависимой стадии апоптоза с помощью антиоксидантов* (ООО «МАКС Пресс», М., 2012).
14. Ю. А. Владимиров, в сб. *Материалы XXXX Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии»* (Ялта, 2013), с. 174.
15. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина и А. В. Алексеев, Биохимия **78**, 1391 (2013).
16. Е. М. Демин, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, в сб. *Материалы II съезда аналитиков России* (Москва, 2013), с. 275.
17. А. С. Викулина, А. В. Алексеев, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, Биохимия **80**, 1573 (2015).
18. V. E. Kagan, V. A. Tyurin, J. Jiang, et al., Nature Chem. Biol. **1**, 223 (2005).
19. N. A. Belikova, Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, et al., Biochemistry **45**, 4998 (2006).
20. L. Milazzo, L. Tognaccini, B. D. Howes, et al., Biochemistry **56**, 1887 (2017). DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01281
21. Y. A. Vladimirov, C. Sarisozen, G. K. Vladimirov, et al., Pharm. Res. **34**, 1264 (2017). DOI: 10.1007/s11095-017-2143-1
22. D. A. Capdevila, S. Oviedo Rouco, F. Tomasina, et al., Biochemistry **54**, 7491 (2015). DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00922
23. H. Kobayashi, S. Nagao, and S. Hirota, Angew Chem. Int. Ed. Engl. **55**, 14019 (2016). DOI: 10.1002/anie.201607419
24. A. Bhujade, G. Gupta, S. Talmale, et al., Food Funct. **4**, 338 (2013). DOI: 10.1039/c2fo30167a
25. D. A. Vasina, D. D. Zhdanov, E. V. Orlova, et al., Biochemistry (Moscow) **82**, 24 (2017). DOI: 10.1134/S0006297917010035
26. S. Li, T. Wang, L. Zhai, et al., J. Mol. Neurosci. **64**, 144 (2018). DOI: 10.1007/s12031-017-1012-z
27. P. Bemani, M. Mohammadi, and A. Hakakian, Asian Pac. J. Cancer Prev. **19**, 97 (2018). DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.1.97
28. S. A. Susin, E. Daugas, L. Ravagnan, et al., J. Exp. Med. **192**, 571 (2000).
29. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
30. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
31. W. Lepeschkin, Science **76**, 409 (1932). DOI: 10.1126/science.76.1975.409
32. W. W. Lepeschkin, Science **76**, 168 (1932). DOI: 10.1126/science.76.1964.168
33. А. Г. Гурвич, *Митогенетическое излучение* (Госмедиздат, М., 1934).
34. Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев и др. *Свободные радикалы в главных системах. (Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 29)* (ВИНИТИ АН СССР, М., 1991).
35. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина и Д. Ю. Измайлов, Бюл. эксперим. биологии и медицины **144**, 390 (2007).
36. А. И. Журавлёв и С. М. Зубкова, *Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. Второе издание, исправленное и дополненное* (Белые альвы, М., 2014).
37. А. М. Полимова, М. М. Созарукова, Е. В. Проскурнина и Ю.А. Владимиров, в сб. *Материалы II съезда аналитиков России* (Москва, 2013), с. 276.
38. Ю. А. Владимиров и Ф. Ф. Литвин, Биофизика **4**, 601 (1959).
39. Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода и А. И. Журавлёв, Биофизика **6**, 490 (1961).
40. Л. А. Ромодин, Ю. А. Владимиров, Н. П. Лысенко и Е. Н. Зарудная, Изв. междунар. акад. аграрного образования, № 42-1, 112 (2018).
41. П. О. Волкова, А. В. Алексеев, А. А. Джатдоева и др., Вестн. МГУ. Сер. Химия **57**, 34 (2016).
42. Г. К. Владимиров, М. М. Созарукова и Д. Ю. Измайлов, в сб. *Proc. of the int. conf. «Science and practice: new discoveries»*, под ред. И. М. Швеца, Л. А. Исмагиловой, В. А. Гурьевой и В. И. Седенко (Международный центр научно-исследовательских проектов, Киров, 2015), сс. 717–726.
43. Ю. А. Владимиров и А. Я. Потапенко, *Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебное пособие для медицинских и биологических спец. вузов* (Высш. шк., М., 1989).
44. V. S. Sharov, E. S. Dremina, and Yu. A. Vladimirov, Biofizika **40**, 428 (1995).
45. Yu. A. Vladimirov, M. P. Sherstnev, and T. K. Azimbaev, Biofizika **40**, 323 (1995).
46. Y. A. Vladimirov, V. S. Sharov, E. S. Driomina, et al., Free Radic Biol Med. **18**, 739 (1995).
47. *База низкомолекулярных веществ PubChem*: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.
48. J. Jiang, A. Bakan, A. A. Kapralov, et al., Free Radic. Biol. Med. **71**, 221 (2014). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.029
49. А. С. Викулина, А. А. Джатдоева, Е. Н. Лобиченко и др., Журн. аналит. химии **72**, 639 (1987).
50. *Выделение и анализ природных биологически активных веществ* (Изд-во Томского университета, Томск, 2017).
51. V. S. Sharov, K. Briviba, and H. Sies, Free Radic. Biol. Med. **21**, 833 (1996).
52. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Лекции медицинской биофизике: Учебное пособие* (Изд-во МГУ; ИКЦ «Академкнига», М., 2007).
53. O. V. Vasiljeva, O. B. Lyubitsky, G. I. Klebanov, and Yu. A. Vladimirov, Membr. Cell Biol. **12**, 223 (1998).

54. A. Mandal, C. L. Hoop, M. DeLucia, et al., Biophys. J. **109**, 1873 (2015). DOI: 10.1016/j.bpj.2015.09.016
55. V. E. Kagan, A. Bayir, H. Bayir, et al., Mol. Nutr. Food Res. **53**, 104 (2009). DOI: 10.1002/mnfr.200700402
56. V. E. Kagan, G. G. Borisenko, Y. Y. Tyurina, et al., Free Radic. Biol. Med. **37**, 1963 (2004). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.016
57. Л. А. Ромодин, Е. Н. Зарудная и Ю. А. Владимиров, *Комплекс цитохрома с с кардиолипином: биологическая роль и ингибирование антиоксидантами* (Изд-во «Перо», М., 2017).
58. A. Deshpande, S. Nimsadkar, and S. C. Mande, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **61**, 1005 (2005). DOI: 10.1107/S0907444905009364
59. J. N. Rodriguez-Lopez, D. J. Lowe, J. Hernandez-Ruiz, et al., J. Am. Chem. Soc. **123**, 11838 (2001).
60. P. G. Furtmuller, W. Jantschko, M. Zederbauer, et al., Jpn. J. Infect. Dis. **57**, S30 (2004).
61. F. Ito, Y. Sono, and T. Ito, Antioxidants (Basel) **8** (3), 72 (2019). DOI: 10.3390/antiox8030072
62. Л. А. Ромодин, С. В. Шангин, Ю. А. Владимиров и др., Изв. междунар. акад. аграрного образования, № 42-1, 118 (2018).
63. M. J. Cormier and P. M. Prichard, J. Biol. Chem. **243**, 4706 (1968).

Isoquinoline Coumarin Derivatives as Chemiluminescence Activators in Reactions of Lipid Peroxidation

L.A. Romodin*, Yu.A. Vladimirov, ***, ****, *****, S.V. Shangin*, G.K. Vladimirov**, *****, N.P. Lysenko*, and E.I. Demikhov********

**Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, ul. Akademika Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia*

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

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

*****Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

******Shubnikov Institute of Crystallography, Federal Research Center "Crystallography and Photonics" of the Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 59, Moscow, 119333 Russia*

*******Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 53, Moscow, 119991 Russia*

The objective of this study was to focus on participation of isoquinoline derivatives of coumarin in peroxidase reaction catalyzed by the cytochrome c–cardiolipin complex. We have studied coumarin derivatives called coumarin-314 (C-314), coumarin-334 (C-334) and coumarin-525 (C-525). These substances are known as specific physical activators of the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation reaction. The effect of methanol on the structure of cytochrome c has been investigated employing spectrophotometry, phosphate buffer has been used to explore the optical properties of these substances. A spectrophotometric study and the measurements of the chemiluminescence intensity of a mixture in which lipoperoxidase reaction is catalyzed by the complex of cytochrome c with cardiolipin in the presence of isoquinoline derivatives of coumarin have been conducted simultaneously. Our findings show that the effect of methanol on the structure of cytochrome c is reversible indicating possible use of this alcohol in the study of this protein. Positions of absorption maxima and corresponding values of molar absorption coefficients in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) are determined for C-314 (λ_{max} = 447.5 nm, ε = 32360.4 l/mol·cm), C-334 (λ_{max} = 460 nm, ε = 44012 l/mol·cm), and C-525 (λ_{max} = 460 nm, ε = 32703.56 l/mol·cm). We also demonstrated that isoquinoline derivatives of coumarin are substrates of peroxidase reaction catalyzed by the complex of cytochrome c with cardiolipin. Mass flow of these substances during an average statistical experiment in measurement of chemiluminescence (322 s) for C-314, C-334 and C-525 amounted to 32, 38 and 26%, respectively.

Keywords: apoptosis, chemiluminescence, cytochrome c/cardiolipin complex, peroxidase, isoquinoline coumarin, spectrophotometry

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 691–704

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.1

РАДИКАЛЫ В СТРУКТУРАХ КЛЕТКИ

© 2020 г. Ю.А. Шаповалов*, П.П. Гладышев, С.Т. Тулеуханов*, Е.В. Швецова*, Ж.Т. Абдрасулова***

**Казахский национальный университет им. аль-Фараби, 050040, Алматы, просп. аль-Фараби, 71, Республика Казахстан*

***Государственный университет «Дубна», 141982, Дубна Московской области, ул. Университетская, 19*

E-mail: yu.shapovalov@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2019 г.
После доработки 18.02.2020 г.
Принята к публикации 25.05.2020 г.

Рассмотрено участие природных радикалов в одноэлектронных процессах жизнедеятельности клеток. Показано, что коферменты, имея промежуточные свободно-радикальные хиноидные и семихиноидные формы, могут взаимодействовать с каротиноидами, образуя комплексы с переносом заряда с полосой поглощения 1030 нм. При этом комплекс может выполнять активную светособирающую функцию при фотосинтезе вплоть до 1100 нм с передачей энергии от хлорофиллов *a* и *b* на комплекс. Исследования сорбции фермент-кофакторной системы «алкогольдегидрогеназа–никотинамидадениндинуклеотид» на гидрофобном электропроводном носителе показали, что максимальная активность фермент-кофакторной системы проявляется при последовательной сорбции кофермента, а затем апофермента. Важную роль играет ориентация биокаталитической системы на матрице иммобилизации.

Ключевые слова: радикалы, коферменты, каротиноиды, комплекс с переносом заряда, сорбция, иммобилизация.

DOI: 10.31857/S0006302920040092

Известно, что к радикалам относят атомы или молекулы, имеющие неспаренный электрон, который определяет их высокую нестабильность и активность, связанную со стремлением радикалов захватить или отдать лишний электрон. В биологических объектах различают природные и чужеродные радикалы. Известно, что чужеродные радикалы на основе кислорода образуются в результате физического или химического воздействия на клетки живых организмов. Радикалы повреждают аминокислоты и белки, дезорганизуют клеточные структуры и биологические мембраны. Доказана роль чужеродных свободных радикалов в развитии таких болезней, как рак, атеросклероз, инфаркт миокарда, инсульт, ишемия; заболеваний нервной и иммунной систем, легких, печени, почек, крови, кожи; также они вызывают преждевременное старение [1, 2].

Для снижения агрессивного влияния радикалов на организм человека и животных в биологических объектах имеются специализированные ферментные системы, а также природные биоорганические соединения и синтетические соединения антиоксидантной защиты для нейтрализации радикалов. Роль антиоксидантной защиты выполняют биокатализаторы: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионзависимая пероксидаза, трансфераза, которые понижают негативное воздействие радикалов путем удаления перекисных соединений. В настоящее время выделено большое число фенольных соединений, которые обладают антиоксидантными свойствами, например, витамины Е (α-токоферол), K_1 (филлохинон) и K_2 (менахинон), убихиноны, триптофан, фенилаланин, а также значительное количество растительных и животных пигментов: каротиноиды, флавоноиды, фенолкарбоксильные кислоты [3]. Механизм антиоксидантной защиты сводится к их взаимодействию со свободными радикалами и превращению последних в неактивные молекулы, обеспечивая таким образом обрыв цепи свободнорадикального окисления.

В отличие от чужеродных радикалов, в живых системах преобладают природные радикалы [4], которые образуются в результате ферментативных реакций и выполняют ключевую роль в процессах жизнедеятельности клеток: в реакциях биосинтеза, окислительного фосфорилирования, регуляции липидного обмена, процессах митоза,

Сокращения: ADH – алкогольдегидрогеназа, LDH – лактатдегидрогеназа.

метаболизма и др. Ежесуточно каждая клетка генерирует миллионы соединений, обладающих естественной радикальной природой, которые участвуют в жизненно важных одноэлектронных биохимических процессах, связанных с отдачей или приобретением электронов. Существенную роль в радикальных окислительно-восстановительных реакциях клетки выполняют коферменты NAD, NADP, FAD, FMN, CoQ и др., которые являются акцепторами электронов для одной группы ферментов в полиферментном комплексе и донорами для другой. Коферменты способны образовывать промежуточные радикальные структуры и комплексы с переносом заряда в биологических мембранах, обеспечивая перенос энергии и транспорт электронов. При этом восстановление и окисление метаболитов сопровождается циклической ферментативной регенерацией коферментов. Основными из ряда переносчиков redox-эквивалентов (протонов и электронов) в клетках являются коферменты NAD, NADP, FAD, FMN, CoQ. Установлено, что в молекулах NAD и NADP в каталитическом акте участвует никотинамидный нуклеотид. Во многих биохимических redox-реакциях никотинамидный нуклеотид NAD и NADP восстанавливается либо окисляется с присоединением или отдачей электронов и протонов. Реакция протекает через две одноэлектронные стадии, образуя промежуточный свободный радикал NAD·.

Коферменты FAD, FMN, а также их предшественник рибофлавин (витамин B_2) имеют изоаллоксазиновую гетероциклическую систему, участвующую в окислительно-восстановительных ферментативных процессах. Восстановление изоаллоксазинового кольца протекает в две стадии. На первой в результате переноса электрона образуется свободный радикал семихинон, который затем присоединяет второй электрон, переходя в восстановленную форму кофермента.

Отличительным признаком FAD по отношению к FMN является наличие дополнительной гетероциклической системы – аденина, присоединенного к изоаллоксазиновому нуклеотиду гибкой пирофосфатной цепью. Исследования флюоресценции FAD показали, что в водных растворах изоаллоксазиновый и адениновый нуклеотиды кофермента располагаются параллельно друг другу, вследствие чего наблюдается сильное тушение флюоресценции кофермента. Это стало основанием для предположения об образовании комплексов с переносом заряда между адениновым и изоаллоксазиновым нуклеотидами [5]. Существование комплексов с переносом заряда в FAD объясняют гидрофобным взаимодействием нуклеотидов и их параллельным расположением в молекуле.

Важнейшая роль в транспорте окислительно-восстановительных эквивалентов в мембранах митохондрии и хлоропластах отводится мобильному небелковому переносчику – убихинону (коферменту Q_6 и Q_{10}). Убихинон (CoQ) имеет структуру хинона, он широко распространен в митохондриальной мембране. Известно, что железо-серные центры биокатализаторов передают электроны коферменту Q. В процессе восстановления кофермент Q изменяет свою химическую структуру через форму свободного радикала – семихинона [6]. Принимая при этом один электрон, убихинон приобретает радикальную форму коэнзима Q, образуя полувосстановленную форму – убисемихинон-радикал. Второй электрон переводит этот радикал в полностью восстановленный гидрохинон.

На основании вышеизложенного можно заключить, что коферменты в клетках образуют высокоактивные промежуточные свободные радикалы в виде хиноидов и семихинонов, которые участвуют в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях. Приобретая электрон и протон от субстрата, кофермент восстанавливается и, обратно, при отдаче электрона и протона наблюдается его окисление. Перенос энергии и электронов в фермент-кофакторный комплекс возможен через систему образования комплексов с переносом заряда.

В работе рассматриваются вопросы о роли природных радикалов коферментов в окислительно-восстановительных биокаталитических реакциях и в процессах, связанных с переносом энергии и электронов в активный центр окисидоредуктаз с участием липидо-каротиноидной структуры клетки. Приводятся данные по ориентации оксидоредуктаз: алкогольдегидрогеназы (ADH) и лактатдегидрогеназы (LDH) на электропроводном обратнофазовом сорбенте, моделирующим гидрофобный монослой биологической мембраны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментальной работе использовали фермент алкогольдегидрогеназу (КФ 1.1.1.1) из печени лошади, коферменты – динатриевую соль восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH-Na_2) 80%-й чистоты с молекулярной массой 709,43 и окисленный никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) 85%-й чистоты с молекулярной массой 663,45 (Merck, США). Дополнительную очистку ADH и кофермента NAD осуществляли, используя карбоксиметил- и ДЭАЭ-целлюлозу, а также сефадексы G-10 и G-200 (Pharmacia, Швеция). Также в работе использовали β-каротин; кардиолипин и ликопин (Sigma, США). Для получения обратнофазового сорбента применяли линолевую, линоленовую и

олеиновую кислоты, глицерин, трех- и пятихлористый фосфор, хлористый тионил, N,N-диметилформамид, пиридин, одно- и двухзамещенный фосфат натрия, хлорид натрия, этанол, лактальдегид, хлороформ, четыреххлористый углерод, бикарбонат натрия, азотную и серную кислоты, гидрат окиси натрия. Все реактивы – производства компании «Химмед» (Россия), имели квалификацию «х.ч.».

Количество фермента и кофермента определяли на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО», Россия). При препаративной очистке использовали жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity Preparative Scale (Agilent, США). Удельную поверхность сорбентов определяли, используя Surfer Gas Adsorption Porosimeter (Thermo Scientific, Италия). Экспериментальные исследования образования комплекса с переносом заряда между β-каротином и кардиолипином или лецитином осуществляли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Specord 200 Plus (Analytik Jena, Germany), формирование мицелл или липосом проводили с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия). В электрохимических исследованиях использовали потенциостат-гальваностат P-20X («Electrochemical Instruments», Черноголовка Московской области). Буферные растворы и смеси прокачивали через проточные спектрофотометрические и электрохмические ячейки перистальтическими насосами Zalimp-305 и Unipan-304 (Польша). Очистку и выделение ферментов и кофементов проводили на центрифуге K-24 (MLW, Германия).

Получение обратнофазового сорбента. Размельченный спектральный уголь фракционировали, используя лабораторные сита. Фракцию с размерами частиц 0.2–0.3 мм обрабатывали концентрированной азотной кислотой в колбе с обратным холодильником. Окисление проводили при температуре кипения кислоты в течение 6 ч с постоянным перемешиванием. Затем сорбент отделяли от раствора и многократно промывали дистиллированной водой до отсутствия кислой реакции. Отмытый носитель высушивали при 120°C. Полученный карбоксилированный уголь включал поликарбоновые кислоты, в частности меллитовую кислоту, прочно удерживаемую сорбентом в водных растворах при pH 1.0–8.0. Для получения углеродного носителя, не содержащего сорбированных поликарбоновых кислот, обработанный уголь экстрагировали 96%-м этиловым спиртом в аппарате Сокслета. Контроль за степенью отмывки носителя осуществляли спектрофотометрически в интервале длин волн 200–350 нм. Сорбент фильтровали и промывали дистиллированной водой с последующей обработкой 0.1 н раствора гидроокиси натрия при температуре 96°C в течение 1 ч. Полученный носитель тщательно отмывали водой и высушивали. Окисленный уголь активировали треххлористым фосфором при 20°C в течение 5–6 ч при периодическом перемешивании, а затем отмывали обезвоженным четыреххлористым углеродом или хлороформом.

Связывание глицерина осуществляли по следующей методике. К 10 г активированного сорбента приливали смесь обезвоженного глицерина (1 мл), N,N-диметилформамида (2 мл), хлорофома (15 мл) и пиридина (5 мл). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Раствор сливали, а носитель последовательно промывали на фильтре Шотта хлороформом, серным эфиром, 0.5 н серной кислотой, 5%-м раствором бикарбоната натрия и дистиллированной водой, затем высушивали.

Получение хлорангидридов жирных кислот. В трехгорлую колбу емкостью 100 мл с обратным холодильником приливали 10 мл охлажденной смеси олеиновой и линолевой кислот (1 : 1.25). В эту смесь по каплям в течение 3 ч при перемешивании добавляли 22 мл свежеперегнанного тионилхлорида, охлаждая реакционную смесь холодной проточной водой. По завершении реакции избыток тионилхлорида отгоняли при 75–80°C, а продукт очищали перегонкой при 136°C и давлении 1.5–2.0 мм рт. ст.

Связывание хлорангидридов жирных кислот с модифицированными носителями. В круглодонную колбу помещали 5 мл хлорангидридов жирных кислот и 45 мл хлороформа, не содержащего воды, затем добавляли 20 г углеродного сорбента с «пришитым» глицерином, после чего раствор с сорбентом перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Выделяющийся в процессе реакции газообразный хлористый водород удаляли, используя водоструйный насос; растворитель отделяли на фильтре Шотта, а сорбент промывали хлороформом в аппарате Сокслета. Контроль за степенью отмывки обратнофазового сорбента осуществляли спектрофотометрически в интервале длин волн 200–350 нм. Носитель отмывали дистиллированной водой, высушивали и использовали для исследований сорбции кофермента НАД и фермента ADH.

Сорбция кофермента NAD и апофермента алкогольдегидрогеназы. Сорбцию очищенных апофермента и кофермента изучали в термостатируемых ячейках при 25.0 ± 0.2°C при постоянном перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Величина навески носителя (на абсолютно сухой вес) была равна 0.1000 г, пределы исходных концентраций белка и кофермента составили $2.4 \cdot 10^{-6}$–$7.3 \cdot 10^{-6}$ М и $4.5 \cdot 10^{-5}$–$5.6 \cdot 10^{-4}$ М соответственно. Для каждого опыта брали по 5 мл исследуемых растворов, пробы на анализ отбирали в течение 1–2 с, а их объем как правило не пре-

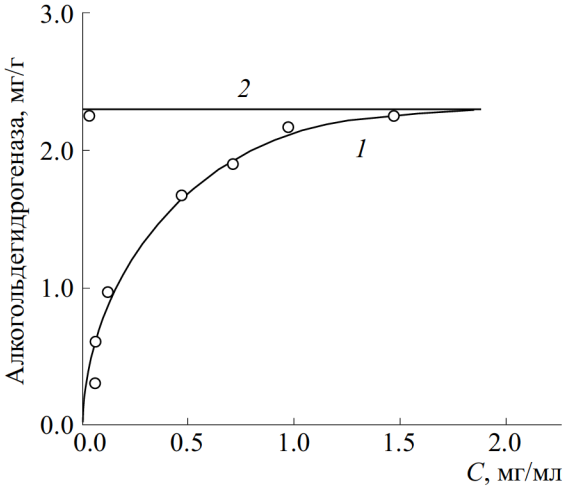


Рис. 1. Изохрона сорбции ADH на гидрофобонизированном угле: *1* – сорбционная ветвь, *2* – десорбционная ветвь. Условия эксперимента: навеска 0.1 г, концентрация буферного раствора 0.015 М, объем 5.1 мл, скорость перемешивания 600 об/мин, температура 25°С.

вышал 10% от начального объема раствора. Концентрацию ADH определяли флуоресцентным методом при $\lambda = 310$ нм, затем пробы возвращали обратно в ячейку. Концентрации окисленной и восстановленной форм NAD определяли при $\lambda = 260$ и 340 нм соответственно. Анализ осуществляли в кварцевой кювете объемом 0.5 мл. До проведения анализа проверяли соблюдение линейной зависимости флуоресценции, а также оптической плотности растворов NAD от концентрации в области рабочих концентраций. Количество сорбированного белка и кофермента определяли по разности исходного и оставшегося к моменту отбора пробы количества сорбата в растворе. Каждая точка на кривой являлась средним результатом трех-четырех экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммобилизация фермент-кофакторного комплекса ADH–NAD на модифицированных электропроводных углеродных носителях. Для иммобилизации фермент-кофакторной системы ADH–NAD был применен метод сорбционного связывания на угле с привитыми углеводородными цепями, моделирующими липидный монослой. Принимая во внимание предложенный метод иммобилизации, который заключался в последовательной сорбции кофермента и апофермента, проводили исследования сорбции каждого компонента ферментативной системы в отдельности. Образование фермент-кофакторного комплекса осуществляли по принципу «самосборки» из отдельных компонентов ферментативной системы. Для проведения исследований сорбционной иммобилизации NAD необходимо было экспериментально изучить кинетику сорбции, обратимость сорбционных процессов и, наконец, определить оптимальные условия осуществления иммобилизации.

Сорбция кофермента NAD на обратнофазовом углеродном сорбенте. Результаты кинетических исследований сорбции окисленной формы NAD^+ на гидрофобонизированном угле при интенсивном перемешивании показали, что сорбция завершается практически в течение 60 мин. Полученные изохроны сорбции свидетельствовали о необратимом характере сорбции NAD^+ на гидрофобонизированном угле. Обратные ветви изохрон указывали на прочную иммобилизацию кофермента и невозможность снятия его с сорбента раствором, в котором осуществляли сорбцию кофермента. Попытки десорбировать иммобилизованный NAD даже 4 М раствором хлористого натрия, а также при изменении pH раствора в диапазоне 5.0–9.0 не приводили к заметной десорбции кофермента, что указывало на гидрофобное взаимодействие кофермента на поверхности углеродного модифицированного носителя. Результаты проведенных исследований показали необратимый характер сорбции NAD на гидрофобном носителе, которую нельзя рассматривать с позиции равновесных представлений.

Сорбция апофермента ADH на обратнофазовом сорбенте. Аналогичные исследования сорбции были проведены для зависимого от кофермента NAD апофермента ADH. Сорбционная иммобилизация ADH на гидрофобной матрице осуществлялась за счет водородного, гидрофобного и электростатического взаимодействия. При этом не исключалась возможность многоточечного ориентированного контакта белковой глобулы с поверхностью матрицы сорбента. Для определения параметров иммобилизации ADH изучали кинетику сорбции фермента. Результаты сорбции фермента на гидрофобонизированном угле показали, что процесс сорбции протекает от одного до двух часов, не достигая равновесия. На неравновесный характер сорбции белка ADH на гидрофобонизированном угле указывало также несовпадение сорбционных и десорбционных ветвей изохроны (рис. 1). Сорбция белков на сорбентах зависит от pH раствора, свойств ионогенных групп ионита, ионной силы используемого фонового раствора. В качестве буферных растворов при изучении влияния pH среды на сорбцию ADH мы использовали 0.015 М фосфатный буферный раствор с pH 6.0–8.4 и 0.015 М карбонатный буфер с pH 8.0–10.0. Выбор диапазона pH фонового раствора при исследовании сорбции AA-изоформы ADH определялся устойчивостью фермента в этой области pH и проявляемой им максимальной ферментативной активности. Из-

вестно [7], что ниже pH 5.9 фермент инактивируется, а наибольшую активность AA-изоформа ADH проявляет при pH 10.0 [8]. Для гидрофобонизированного угля в этом диапазоне pH не отмечалось какого-либо изменения сорбции, что можно объяснить гидрофобной природой связывания фермента с носителем (рис. 2). Другим фактором, подтверждающим наличие многоточечных гидрофобных связей, является то, что при попытке десорбировать иммобилизованную ADH водными растворами сорбированный белок не удалось обнаружить в растворе, тогда как 50%-й раствор этанола легко и практически полностью десорбировал фермент. Сорбцию ADH проводили из 0.015 М фосфатного буферного раствора с pH 7.8 при перемешивании в течение 2 ч при концентрации ADH от $1.35 \cdot 10^{-7}$ до $1.08 \cdot 10^{-6}$ М растворов. Количество сорбированного апофермента находилось в пределах 1.0–3.0 мг/г. Каталитическая активность ферментативной системы оставалась практически неизменной при комнатной температуре в течение 180 ч.

Следует отметить, что при сорбции ADH на углеродных сорбентах, как и в случае кофермента существенную роль играют гидрофобные взаимодействия. Об этом свидетельствует прочное удерживание фермента при высоких концентрациях хлористого натрия (вплоть до 2 М) в фосфатном буферном растворе, а также результаты десорбции фермента спиртом. С увеличением концентрации спирта до 50% десорбция фермента в результате разрушения гидрофобных связей растет. Дальнейшее увеличение концентрации спирта ведет к уменьшению десорбции, что, по-видимому, связано с противодействующим влиянием высаливающего эффекта. Значительная денатурация иммобилизованной ADH наблюдается при концентрации спирта выше 70%.

Формирование биокаталитического комплекса ADH–NAD на углеродном электропроводном носителе. Ввиду необратимости сорбционных процессов, следует ожидать влияния последовательности проведения сорбции компонентов на конечное состояние сорбционного комплекса системы и проявляемую им каталитическую активность. Экспериментально было изучено влияние последовательности сорбции на гидрофобонизированном угле ADH и NAD на активность иммобилизованной фермент-кофакторной системы. Сорбция фермента и кофермента осуществлялась в идентичных условиях при pH 7.8 из 0.015 М фосфатного буфера. Фермент сорбировали из раствора с концентрацией 3 мг/мл, а кофермент NADH – 0.79 мг/мл при соотношении сорбент : раствор, равном 1 : 10. Было установлено, что при «сборке» иммобилизованной фермент-кофакторной системы в последовательности NADH–ADH количество сорбированного кофермента и фермента составляло 1.1 мг/г и 6.42 мг/г (массовое соотношение 1 : 6) соответственно, а удельная активность полученной системы – 0.012 Е/г. Для полученного массового соотношения возникает вопрос о структуре молекулярного комплекса ADH–NAD. Известно, что в комплексе на одну молекулу ADH, содержащую два активных центра, приходится две молекулы кофермента NAD. Из полученных экспериментальных данных можно рассчитать, что количество сорбированного кофермента на порядок больше его количества, необходимого для образования комплекса. При последовательной сорбции NAD, а затем ADH происходит перераспределение кофермента между сорбентом и активными центрами биокатализатора. В связи с последним часть молекул кофермента NAD оказывается в активном центре фермента, тогда как другая была сорбирована носителем. Таким образом, массовое соотношение не имеет прямого отношения к составу комплекса.

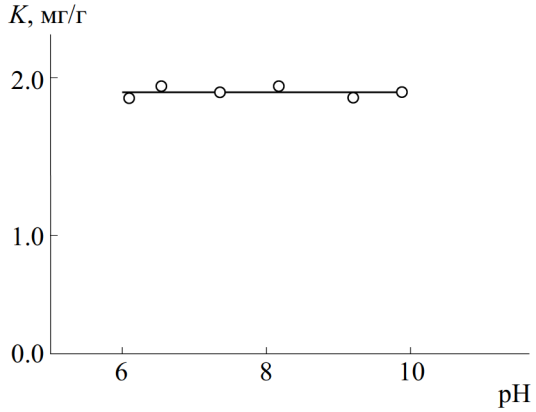


Рис. 2. Зависимость коэффициентов распределения ADH между гидрофобным углем и буферным раствором от pH.

При сорбции фермент-кофакторной системы в последовательности ADH–NAD количество сорбированных кофермента и фермента соответствовало 0.50 и 3.56 мг/г, удельная активность составляла 0.0083 Е/г. Как видно из приведенных данных, активность системы, полученной по первому способу, примерно в полтора раза выше, чем по второму.

Повышенную активность систем, полученных при сорбции в последовательности NAD–ADH, нельзя однозначно объяснить стерическими особенностями иммобилизованного фермент-кофакторного комплекса, так как повышение активности может быть связано с повышением концентрации кофермента и фермента на поверхности носителя. Тем не менее из соображений стерического блокирования NAD в ката-

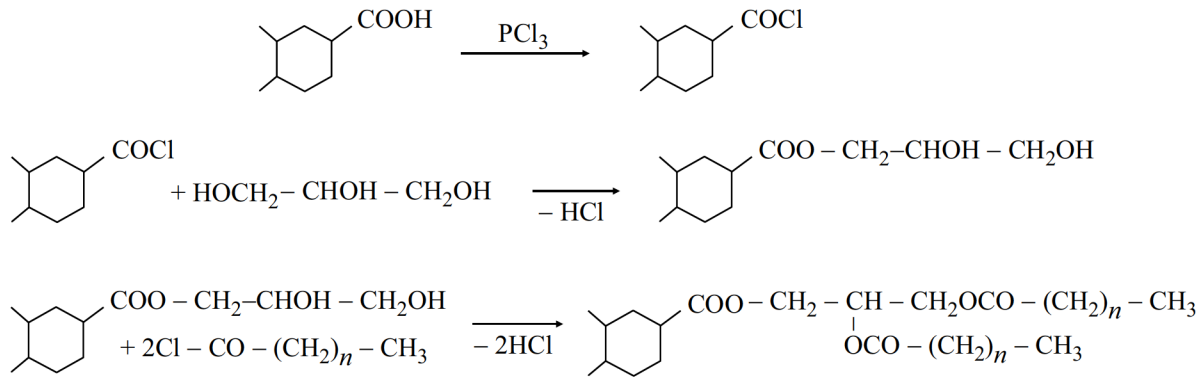


Рис. 3. Схема синтеза обратнофазового сорбента.

литической щели апофермента целесообразно осуществлять сначала сорбцию кофермента, а затем фермента. Различия в количествах сорбированых фермента и кофермента при изменении последовательности сорбции объясняются тем, что при предварительной сорбции NAD происходит существенное изменение свойств поверхности сорбента, в частности, увеличивается ее отрицательный заряд, что при pH 7.8 < pI 8.7 означает усиление электростатического взаимодействия положительно заряженного белка с сорбентом. Подобная модификация сорбента низкомолекулярными органическими соединениями (хотя и не ионного характера) широко используется на практике для ориентированной иммобилизации ферментов, управляемой гидрофобными взаимодействиями. Уменьшение сорбции NADH после сорбции ADH, по-видимому, связано с блокированием белком гидрофобной поверхности сорбента.

Полученные результаты сорбции ADH и NAD на обратнофазовом углеродном носителе указывают на прочную необратимую сорбцию фермент-кофакторного комплекса на матрице сорбента за счет гидрофобного связывания. Каталитическая активность комплекса существенно зависит от последовательности формирования ферментативной системы. Наибольшую активность биокаталитический комплекс проявляет при последовательной сорбции сначала кофермента, а затем апофермента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование ориентации алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы на обратнофазовых сорбентах. Практический интерес представляет ориентация глобулярных белков на обратнофазовых матрицах за счет сил гидрофобного взаимодействия. В качестве носителей могут быть использованы электропроводные углеводородные сорбенты или их модифицированные формы. Получение такого электропроводного гидрофобного сорбента, моделирующего монослой биологических мембран на углеродной матрице, приводится на рис. 3. Оптимальной считается ориентация фермента на гидрофобном сорбенте, когда кофермент блокирован носителем в каталитической щели апофермента, обеспечивая тем самым эффективную регенерацию кофермента и высокую биокаталитическую активность иммобилизованной фермент-кофакторной системы.

На примере ADH нами была рассмотрена полуэмпирическая модель взаимодействия белковой глобулы с электронейтральной гидрофобной поверхностью [9]. Ввиду того, что глобула фермента представляет собой сложную систему, расчет ее сорбционных характеристик с помощью метода атом-атомных потенциалов представляется нецелесообразным. Поэтому энергию взаимодействия (F_{sorb}) ADH с обратнофазовым сорбентом рассчитывали по аддитивной схеме, исходя из экспериментальных данных по взаимодействию аминокислот и пептидов с гидрофобным сорбентом [10], в соответствии с уравнениями 1 и 2:

$$F_{sorb} = \sum_{i=1}^{i} F_{solv,\,i}, \quad (1)$$

$$F_{solv} = F_i \Delta L_i / L_i, \quad (2)$$

где $F_{solv,i}$ - энергия гидрофобного взаимодействия i-го радикала; n – число радикалов; F_i – энергия взаимодействия i-го аминокислотного радикала при его полном погружении в гидрофобный слой сорбента; ΔL_i –длина участка радикала, погруженного в гидрофобный слой при данной ориентации глобулы белка; L_i – длина радикала.

При расчете энергии гидрофобного взаимодействия использовали значения относительных свободных энергий F/RT взаимодействия аминокислотных радикалов с обратнофазовыми сорбентами (таблица).

Значения F/RT для аминокислотных радикалов [10]

Asp 0,173	Glu 0,173	Tyr –0,694	Ser 0,106	Met –0,449	Trp –1,758	Phe –1,085
Val 0,288	Leu –0,485	Ile –0,485	Gly 0,040	Ala –0,097	Pro –0,197	His –0,149
Lys –0,554	Arg –0,197	Gln –0,108	Asn –0,108	Cys 0,090		

Полученные в результате расчета данные представлены в виде перспективной азимутальной ортографической проекции уровней взаимодействия белковой глобулы при различных направлениях касания с гидрофобной плоскостью (рис. 4).

Из приведенных данных видно, что глобула ADH имеет четыре области наиболее вероятной гидрофобной атаки сорбционной плоскости. При этом две из них находятся близко друг от друга на экваторе глобулы ($\Delta\varphi = 18$) и лежат между двумя коферментными щелями фермента. Если гидрофобная поверхность представляет собой не плоскость, а цилиндрическую или сферическую пору с $R \approx 28.0$ нм, то осуществляется одновременная гидрофобная атака по этим двум основным направлениям и их равнодействующая по направлению совпадает с осью «*y*». При этом в силу симметрии молекулы фермента обе коферментные щели расположены строго симметрично относительно направления наиболее вероятной гидрофобной атаки. Доступность же субстратных щелей для этанола максимальна. Важным условием сохранения физиологической активности иммобилизованных биокаталитических систем, включающих кофактор, является его нативное расположение в активном центре апоферментов.

Представлялось интересным рассмотреть, как другие NAD-зависимые дегидрогеназы, обладающие трехмерной гомологией с ADH, будут ориентироваться в липофильном слое биологической мембраны. Для решения поставленной задачи использовали лактатдегидрогеназу акулы, для которой известна пространственная структура [11, 12]. Молекула LDH состоит из четырех симметричных субъединиц, каждая из которых имеет 331 аминокислоту. В работе [12] координаты α-С-атомов аминокислот приводятся для стандартной «красной» субъединицы. Координаты других субъединиц рассчитываются путем вращения «красной» субъединицы вокруг осей *P*, *Q*, *R*. Координаты «голубой» субъединицы получали вращением «красной» субъединицы вокруг оси *P*, «желтой» – вокруг оси *Q* и «зеленой» – вокруг оси *R*. В связи с этим программа расчета энергии взаимодействия белковой глобулы с гидрофоб-

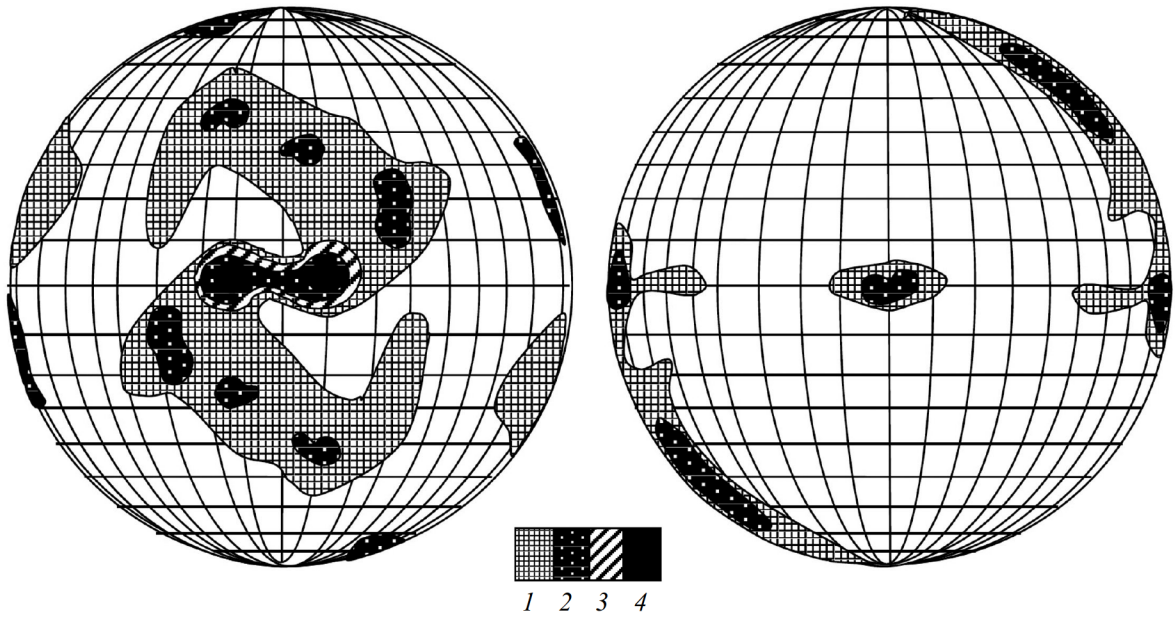


Рис. 4. Перспективная азимутальная ортографическая проекция уровней гидрофобности ADH: *1* – $5 < F/RT < 10$, *2* – $10 < F/RT < 20$, *3* – $20 < F/RT < 30$, *4* – $F/RT > 30$; «меридианы» и «параллели» проведены через 9° [9].

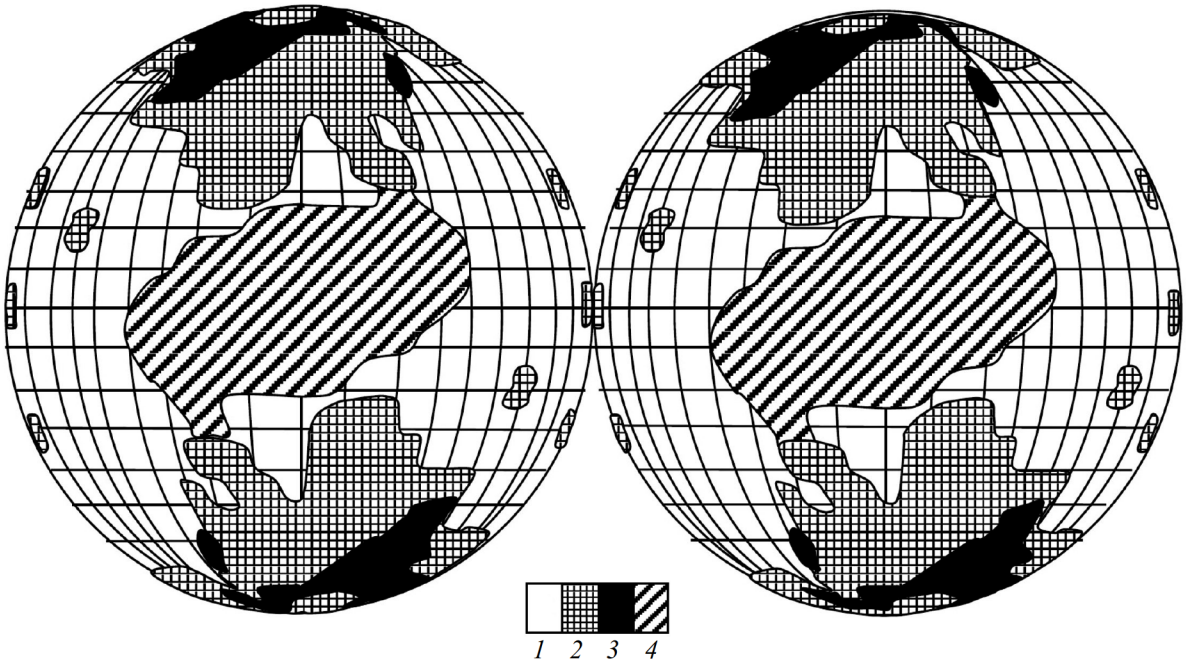


Рис. 5. Перспективная азимутальная ортографическая проекция уровней гидродрофобности поверхности LDH: *1* – $0 < F/RT < 1$; *2* – $1 < F/RT < 2$; *3* – $F/RT > 2$; *4* – гидрофильная область.

ной поверхностью включала преобразование координат с установлением пространственного расположения 1324 α-С-атомов четырех субъединиц LDH. Результаты расчета ориентации LDH на гидрофобной поверхности в виде перспективной азимутальной ортографической проекции приведены на рис. 5. На рис. 6 представлено распределение уровней энергии гидрофобного связывания глобулы LDH на поверхности полусферы, приведенной со стороны одного из полюсов молекулы белка. Из рисунка видно, что LDH на экваторе имеет два участка (полосы), где белковая глобула проявляет гидрофильные свойства при различных направлениях касания с гидрофобной поверхностью. Четыре активных центра биокатализатора находятся на двух противоположных полюсах (по два на каждом) в области максимальной энергии гидрофобного связывания, которые на рис. 5 и 6 обозначены черным цветом. При сорбции LDH на гидрофильных сорбентах молекула апофермента будет сориентирована экватором к поверхности, обеспечивая свободный доступ субстратов и коферментов к четырем активным центрам биокатализатора, расположенным на полюсах молекулы фермента.

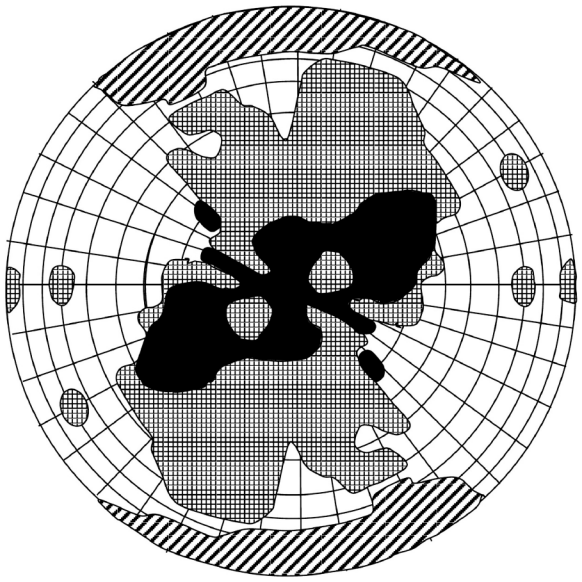


Рис. 6. Распределение уровней энергии гидрофобного связывания LDH на поверхности полусферы.

При сорбции LDH на гидрофобной поверхности будет наблюдаться связывание, при котором один из полюсов с двумя активными центрами будет сориентирован к гидрофобной поверхности, тогда как другой направлен в противоположную от носителя сторону. Такой тип ориентированной посадки молекулы белка в гидрофобном слое мембраны обеспечивает блокирование NAD в активном центре апофермента, сохраняя при этом активность фермент-кофакторной системы. Этот тип ориентации белков на гидрофобных сорбентах в дальнейшем будет использован при иммобилизации фермент-кофакторных систем на гидрофобных электропроводных носителях.

Транспорт электронов и протонов в биологических структурах с участием радикалов. Функционирование коферментов в настоящее время еще полностью не изучено. Восстановление и окисление метаболитов сопровождается циклической ферментативной регенерацией. Общий радикальный механизм биокаталитических процессов, происходящих в полиферментном комплексе биологических мембран клетки и сопровождающихся переносом redox-эквивалентов, можно представить в виде следующей схемы (схема 1). Представленные на этой схеме ферментативные реакции, протекающие в биологических мембранах, возможны благодаря аналогии каталитических щелей апоферментов, а также подобию в фиксации коферментов в активном центре и строгой ориентации фермент-кофакторных комплексов. Наибольшее сходство было обнаружено для NAD-связывающих областей, что подтверждает аналогичность способов фиксации кофактора в коферментсвязывающей щели.

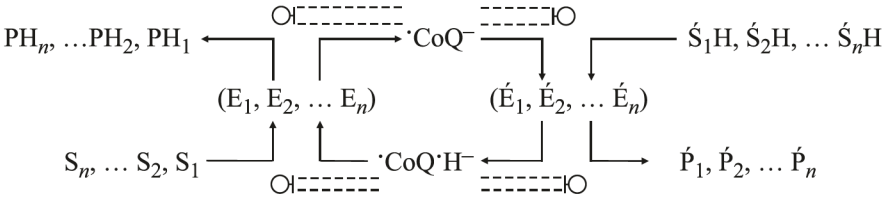


Схема 1. Общий радикальный механизм биокаталитических процессов, происходящих в полиферментном комплексе биологических мембран клетки. E_1, E_2...E_n и $É_1$, $É_2$...$É_n$ - ферменты, участвующие в восстановлении и окислении субстратов S_1,S_2...S_n и $Ś_1H$, $Ś_2H$...$Ś_nH$ соответственно; ·CoQ$^-$ и ·CoQ·H$^-$ – анион-радикал и убисемихинон радикала кофермента Q, соответственно; PH_1, PH_2...PH_n и $Ṕ_1$, $Ṕ_2$...$Ṕ_n$ – продукты ферментативных реакций.

Исследования аминокислотной последовательности и пространственной структуры ферментов: ADH печени человека и лошади, LDH собаки и акулы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы кальмара, свиньи и дрожжей привели к выводу о существовании трехмерной гомологии NAD-зависимых дегидрогеназ [13, 14]. Представленная схема 1 показывает, каким образом в клетке возможен радикальный механизм реализации переноса протонов и электронов через биологические мембраны.

Анион-радикал кофермента Q (·CoQ$^-$), локализованного в жидкокристаллической структуре биомембраны, восстанавливается в результате ферментативной реакции $É_1$ до убисемихинон-радикала (·CoQ·H$^-$), присоединяя протон. Субстрат $S_1'H$ в матриксе митохондрии окисляется при этом до P_1'. Ферментативная регенерация кофермента ·CoQ$^-$ происходит при миграции его к другой биокаталитической системе E_1. При этом субстрат S_1, находящийся в межмембранном пространстве, например, митохондрии, восстанавливается до PH_1.

Трансмембранный перенос протонов, сопровождающийся ферментативной регенерацией кофермента, может быть описан рядом последовательных радикальных реакций (схема 2):

$$Ś\text{H} + \cdot\text{CoQ}^- + É_1 \rightarrow Ś\text{H}\cdot(\cdot\text{CoQ}^-)\cdot É_1 \leftrightarrow Ś\cdot(\cdot\text{CoQ}\cdot\text{H}^-)\cdot É_1,$$
$$Ś\cdot(\cdot\text{CoQ}\cdot\text{H}^-)\cdot É_1 \rightarrow Ṕ + \cdot\text{CoQ}\cdot\text{H}^- + É_1,$$
$$\text{S} + \cdot\text{CoQ}\cdot\text{H}^- + \text{E}_1 \rightarrow \text{S}\cdot(\cdot\text{CoQ}\cdot\text{H}^-)\cdot\text{E}_1 \leftrightarrow \text{SH}\cdot(\cdot\text{CoQ}^-)\cdot\text{E}_1,$$
$$\text{SH}\cdot(\cdot\text{CoQ}^-)\cdot\text{E}_1 \rightarrow \text{PH} + \cdot\text{CoQ}^- + \text{E}_1$$

Схема 2. Последовательные радикальные реакции при трансмембранном переносе протонов.

Как видно из схемы 2, коэнзим Q восстанавливается по одноэлектронному механизму, образуя полувосстановленную форму – убисемихинон-радикал.

К группе переносчиков энергии и электронов, широко распространенных в растительном и живом мире, можно отнести природные органические пигменты – каротиноиды, имеющие сопряженную систему связей. В настоящее время известно более 800 видов структурно различающихся каротиноидов [15, 16]. По химическому строению каротиноиды делят на две группы: каротины (углеводороды) и ксантофиллы (каротиноиды, содержащие кислород). Большинство каротиноидов содержат 40 углеродных атомов, имеют сопряженные двойные связи. Благодаря наличию ненасыщенных сопряженных (конъюгированных) связей каротиноиды имеют вытянутую светочувствительную «проволочную» структуру, благодаря которой способны выполнять функцию переносчиков энергии и электронов. Каротиноиды встречаются как в свободном состоянии, так и в виде гликозидов; они способны нековалентно связываться с белками, кофак-

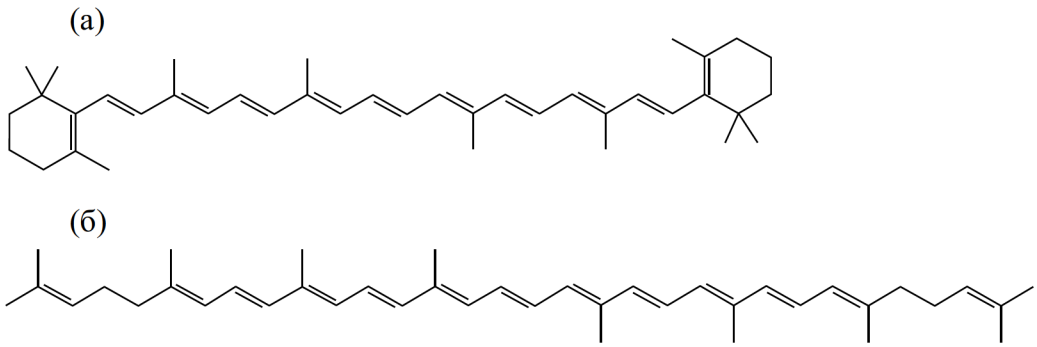


Рис. 7. Химические структуры β-каротина (а) и ликопина (б).

торами и мембранными липидами. Электроны каротиноидов легко переходят в возбужденное состояние при попадании даже небольшого количества квантов света. Ряд каротиноидов способен образовывать комплексные соединения с такими металлами, как Ca^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} и Hg^{2+} [17]. Образование металл-хелатного комплекса не только изменяет спектр поглощения каротиноидов, но и повышает его способность к перехвату свободных радикалов.

Каротиноиды в основном локализуются в липофильной области биологических мембран, образуя стабильные каротинобелковые комплексы, они модулируют физические свойства мембран, расширяя диапазон фазового перехода из состояния геля в жидкокристаллическую структуру. Длинные сопряженные углеводородные цепи каротиноидов заканчиваются кольцевой иононовой структурой (рис. 7а), хотя возможно и отсутствие гетероциклического кольца, как это можно видеть у ликопина (рис. 7б). В связи с тем, что каротиноиды содержат большое количество двойных связей, в клетках животных и человека они выполняют различные защитные функции: связывают синглетный кислород, предупреждая образование чужеродных свободных радикалов; обеспечивают защиту от жесткого электромагнитного излучения. Понижая уровень свободных радикалов, каротиноиды выступают в роли антиоксидантов. Способность к перехвату свободных радикалов в молекуле каротиноидов возрастает с увеличением числа компланарных (т.е. лежащих в одной плоскости) конъюгированных двойных связей. Различают физический и химический механизмы антиоксидантного действия каротиноидов. Физический механизм антиоксидантного действия предполагает «тушение» триплетного хлорофилла (3Chl*) или синглетного кислорода ($^1O_2$) за счет перехода каротиноидов (Car) в триплетное возбужденное состояние (3Car*) и дальнейшего рассеивания энергии в виде тепла (схема 3) [18]:

$$^3Chl^* + Car \rightarrow Chl + {}^3Car^*,$$
$$^1O_2 + Car \rightarrow O_2 + {}^3Car^*,$$
$${}^3Car^* \rightarrow Car + \text{тепло}$$

Схема 3. Физический механизм антиоксидантного действия каротиноидов.

Химический механизм «тушения» предполагает окисление каротиноидов синглетным кислородом с образованием различных альдегидов и эндопероксидов [18, 19]. Образующиеся при этом продукты окисления каротиноидов могут играть важную роль в регуляции развития растений [20].

Взаимодействие каротиноидов со свободными радикалами зависит главным образом от характера свободных радикалов, а не от типа каротиноида [18]. Каротиноиды могут взаимодействовать со свободными радикалами (·R) тремя способами, причем во всех трех случаях образуются радикалы каротиноидов [18]:

1. Взаимодействие с полиеновой структурой каротиноидов – $\cdot R + Car \rightarrow \cdot Car{-}R$.

2. Реакция с отделением атома водорода – $\cdot RH + Car \rightarrow \cdot Car{-}H + R$.

3. Реакции, сопровождающиеся переносом электронов –

$$\cdot R + Car \rightarrow R^- + \cdot Car^+,$$
$$\cdot R + Car \rightarrow R^+ + \cdot Car^-.$$

Имея светочувствительную, электронопроводящую сопряженную структуру связей, каротиноиды выполняют функцию переносчиков энергии и электронов. При этом они могут образовывать комплексы с переносом заряда с биоорганическими соединениями, имеющими свободно-радикальную форму хинона, например, с коферментами FAD, FMN, имеющих в своем составе изоаллоксазиновое кольцо, которое при восстановлении образует радикал семихинона. Так, комплекс кофермента с иононовым кольцом каротиноида образуется при его контакте с изоаллоксазиновым нуклеотидом кофактора. Важную роль в транспорте окислительно-восстановительных эквивалентов в биологической мем-

бране отводится небелковому переносчику электронов и протонов – коферменту Q, который также способен приобретать форму свободного анион-радикала – семихинона ($\cdot CoQH^-$). Ферментативная реакция с участием коферментов NAD, NADP протекает через две одноэлектронные стадии, в результате первой из них образуются промежуточные свободные радикалы коферментов ·NAD или ·NADP, имеющие хиноидную структуру в никотинамидном нуклеотиде.

Одноэлектронный характер взаимодействия каротиноидов и их комплексов с хинонами в полярных средах описан в работах [21, 22]. Образование катион-радикалов каротиноидов в реакции с хинонами показало, что на первой стадии образуется комплекс с переносом заряда, а затем ион-радикальная пара [$\cdot Car^+ + \cdot Q^-$]. Конечными продуктами являются аддукты каротиноида с хиноном (Car–Q) и *цис*-изомеры каротиноида. Образование комплексов с переносом заряда в реакциях β-каротина, кантаксантина и 8′-апо-β-каротин-8′-аля с хинонами были зарегистрированы методом оптической спектроскопии и ЭПР [21, 22].

Было изучено образование комплексов с переносом заряда между β-каротином и липидом кардиолипином. Для кардиолипина в видимой области спектра не были обнаружены полосы поглощения, тогда как β-каротин имеет характерные полосы при 340, 450 и 475 нм. Существенное расширение (до 100 нм) полосы поглощения β-каротина в длинноволновую область наблюдается при образовании комплекса кардиолипина с β-каротином. Незначительное смещение полос поглощения в длинноволновую область до 480 нм было получено для комплекса «β-каротин–лецитин» относительно исходной длины волны 450 нм. Проведенные экспериментальные исследования показали, что система «каротин–липид» способна образовывать комплекс с переносом заряда, посредством которого возможен электронный перенос через липидо-каротиноидную структуру биологических мембран.

Радикальный перенос электронов в биологических мембранах с участием радикалов коферментов (C, CoQ), каротиноидов (Car) и липидов L можно представить в виде цепи последовательных реакций (схема 4).

$$\cdot CH + CoQ^- \leftrightarrow C + \cdot CoQH^-$$
$$\cdot CoQH^- + Car_1 \leftrightarrow \cdot Car_1 + CoQH$$
$$\cdot Car_1 + L_1 \leftrightarrow Car_1 + \cdot L_1$$
$$\cdot L_1 + L_n \leftrightarrow L_1 + \cdot L_n$$
$$\cdot L_n + Car_n \leftrightarrow L_n + \cdot Car_n$$
$$\cdot Car_n + CoQH \leftrightarrow Car_n + \cdot CoQH^-$$
$$\cdot CoQH^- + C \leftrightarrow \cdot CH + CoQ^-$$

Схема 4. Цепь последовательных реакций при радикальном переносе электронов в биологических мембранах.

Эффективность электронного переноса через липидо-каротиноидную структуру существенно возрастет при воздействии на нее квантов света, что можно наблюдать в процессах фотосинтеза, протекающих в тилакоидах хлоропластов. Каротиноиды тилакоидных мембран участвуют в световых реакциях фотосинтеза и обеспечивают структурную стабильность пигмент-белковых комплексов. Как известно, мембраны тилакоидов содержат молекулы хлорофилла и каротиноидов, которые выполняют светособирающую функцию, при этом каждая из этих молекул улавливает из солнечного спектра электромагнитные волны определенной длины волн. Имеющаяся система двойных связей выполняет функцию хромофора и характеризует спектральные свойства конкретных каротиноидов, которые имеют три или два пика (максимума) поглощения света в диапазоне длин волн от 280 до 550 нм.

Сложилось представление, что передача энергии возможна только от каротиноидов на хлорофил, которая происходит резонансным путем по механизму Фёрстера и протекает для одной пары молекул на расстояние 1 нм в течение $10^{-10} - 10^{-12}$ с. Передача энергии сопровождается ее потерей: 10% при передаче от хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* и 60% – от каротиноидов к хлорофиллу [22–25]. При этом передача энергии возможна только от пигмента с максимумом поглощения с меньшей длиной волны к пигменту с большей, причем обратный процесс невозможен. Такое упрощенное понимание процесса передачи энергии и электронов при фотосинтезе не совсем правильное, так как оно не дает ответа на вопрос: каким образом хлорофилл реализует механизм передачи энергии на другие биомолекулы тилакоидов, например, каротиноиды, липиды, кофакторы, ферменты?

В связи с этим следует отметить, что каротиноиды в структурах клетки находятся в динамическом контакте с другими биомолекулами, образуя при этом комплексы с переносом энергии и заряда, следствием чего является существенное расширение полосы поглощения каротиноидов. Комплексы каротиноидов в составе биологических мембран проявляют высокую стабильность. Проведенные спектрофотометрические исследования [21, 22] показали возможность образования комплексов с переносом заряда для смеси β-каротина с хиноном (2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном) и появление интенсивной полосы поглощения β-каротина в области 1030 нм. Таким образом, передача энергии при фотосинтезе может осуществляться от хлорофила к каротиноидам, что совсем не нарушает правила передачи энергии от пигмента с меньшей длиной волны к пигменту с большей длиной волны. Совпадение

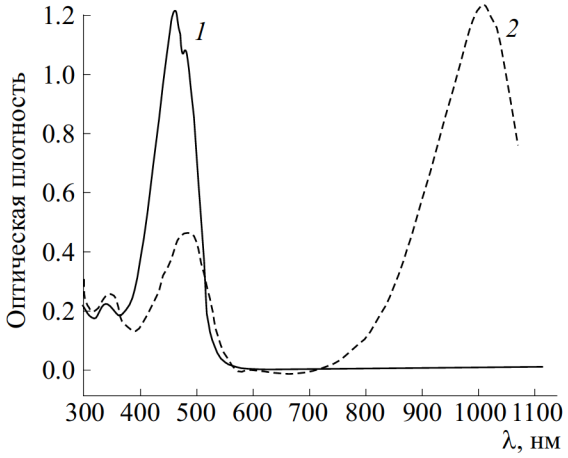


Рис. 8. Спектры поглощения β-каротина (*1*) и комплекса с переносом заряда (*2*), образованного при его смешении с хиноном (2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном) [21].

полос поглощения хлорофилла и каротиноидов в диапазоне длин волн 440–460 нм говорит о том, что передача энергии от хлорофилла на молекулу β-каротина может быть реализована без энергетических затруднений.

Анализ спектра поглощения (рис. 8) указывает на то, что пигменты-каротиноиды могут выполнять активную светособирающую функцию от ультрафиолетовой до видимой области в диапазоне от 350 до 500 нм, а также 770–1100 нм. В диапазоне спектра 440–770 нм светособирающую функцию выполняют хлорофилл *a* и хлорофилл *b*.

В связи с этим можно отметить, что каротиноиды являются обязательными структурными компонентами любых фотосинтетических мембран, в виде комплексов они входят в состав хлорофилл-белковых комплексов, пронизывают мембранный бислой, образуя межмолекулярную связь с молекулами липидов [26]. Имея протяженную сопряженную систему связей с метильными ответвленными группировками, каротиноиды встраиваются в липидную мембрану и стягивают два монослоя за счет сил гидрофобного связывания, формируя высокоорганизованную структуру упакованных молекул пигмента и липидов. При этом углеводородные цепи липидов могут содержать от одной до шести двойных связей. Липиды ряда растений, так же как и каротины, могут иметь конъюгированную систему связей. Это дает основание предполагать, что энергетическая и электронная проводимость биологических мембран существенно зависит от количественного содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидных мембранах и содержания в них каротиноидов.

В ряде работ рассматривается возможность проводимости углеводородных цепей с диеновой конъюгацией [27], когда углеродные атомы разделены этиленовыми группировками или «метиленовыми мостиками» $-CH_2-$. В частности, приводятся данные об электронной проводимости липида – далихола, углеводородная цепь которого имеет спиральное диеновое сопряжение. Уместно отметить, что диеновую конъюгацию имеет кофермент Q, выполняющий функцию переносчика протонов и электронов.

Установлено, что при фотоактивации ферментативной системы EC2 происходит окисление β-каротина, сопровождающееся переносом электрона от молекулы каротина (Car) к первичному донору $P680^+$ и образованием катион-радикала $\cdot Car^+$ [28]. Методом ЭПР было обнаружено образование анион-радикалов хинонов в EC1 и EC2 [29]. Молекулы каротиноидов легко подвергаются окислению и восстановлению, обладают хорошими электронными донорно-акцепторными свойствами по отношению к хлорофиллу, липидам и коферментам. Спектры поглощения каротиноидов изменяются при различных структурных перестройках молекулы пигмента. Образование $\cdot Car^+$ в реакции с хинонами зарегистрировано как в условиях фотолиза, так и в условиях темновой реакции.

ВЫВОДЫ

В работе рассмотрено участие природных радикалов в одноэлектронных процессах жизнедеятельности клеток. Показано, что коферменты имеют промежуточные свободно-радикальные хиноидные и семихиноидные формы, которые участвуют в жизненно важных одноэлектронных биохимических процессах, связанных с отдачей или приобретением электронов. Описывается способ получения гидрофобного электропроводного сорбента, моделирующего монослой биологической мембраны. Разработаны гетерогенные биокаталитические системы в результате сорбции ADH и NAD на обратнофазовом электропроводном углеродном сорбенте. Результаты сорбции ADH и NAD на электропроводном углеродном носителе указывают на прочную необратимую сорбцию фермент-кофакторного комплекса на матрице сорбента за счет гидрофобного связывания. Показано, что каталитическая активность комплекса существенно зависит от последовательности формирования фермент-кофакторной

системы; наибольшую активность биокаталитический комплекс проявляет при последовательной сорбции сначала кофермента, а затем апофермента. Осуществлены численные модельные исследования ориентированной сорбции ADH и лактатдегидрогеназы на гидрофобных матрицах с целью управления биокаталитическими свойствами иммобилизованной фермент-кофакторной системы.

Рассматриваются вопросы радикального трансмембранного переноса протонов и электронов, сопровождающегося ферментативной регенерацией кофермента. Отмечается важная роль радикалов природных пигментов каротиноидов в процессах переноса энергии и электронов в активный центр биокатализаторов, которые могут образовывать комплексы с переносом заряда с липидами и коферментами. Анализ спектра поглощения комплекса β-каротина с хиноном (2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном) показал появление интенсивной полосы поглощения в области 1030 нм [23]. Это указывает на то, что комплекс каротина с коферментами, имеющими фрагменты хиноидной и семихиноидной структур, могут выполнять активную светособирающую функцию при фотосинтезе в области длин волн в диапазоне от 350 до 500 нм, а также 770–1100 нм. При этом перенос энергии от хлорофиллов *a* и *b* на комплекс каротиноида с коферментом не нарушает правило передачи энергии от пигмента с меньшей длиной волны к пигменту с большей длиной волны. В диапазоне спектра 440–770 нм светособирающую функцию выполняют хлорофилл *a* и хлорофилл *b*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина и М. Н. Бизенкова, Успехи соврем. естествознания, № 7, 29 (2006).
2. Ю. А. Владимиров, Сорос. образоват. журн. Биология **6** (12), 14 (2000).
3. Н. Т. Берберова, Сорос. образоват. журн. Химия **6** (5), 39 (2000).
4. А. Соловьев, Фармацевт практик, № 12 (2016). http://fp.com.ua/articles/svobodnyie-radikalyi-razrushiteli-ili-zashhitniki-organizma.
5. www.enzyme.chem.msu.ru/eduproc/prac/task9/part09.doc.
6. Е. В. Петрова, Дис. ... канд. хим. наук (Томский гос. университет, 2015).
7. J. T. McFarland and Yu-H. Chu, Biochemistry **14** (6), 1140 (1975).
8. U. M. Lutstarf, P. M. Shürch, and J. P. Wartburg, Eur. J. Biochem. **17** (3), 497 (1970).
9. П. П. Гладышев, М. И. Горяев и И. Г. Шпильберг, Молекул. биология **16** (5), 943 (1982).
10. E. Lundanes and T. Greibrokk, J. Chromatogr. **149**, 241 (1978).
11. *The Enzymes* (Acad. Press, New York, San Francisco, London, 1975), Vol. 11, p. 191.
12. M. J. Adams, G. C. Ford, A. Liljas, and M. G. Rossman, Biochem. Biophys. Res. Commun. **53** (1), 46 (1973).
13. M. G. Rossmann, D. Moras, and K. W. Olsen, Nature **250** (5463), 194 (1974).
14. I. Ohlsson, B. Nordström, and C.-I. Bränden, J. Mol. Biol. **89** (2), 339 (1974).
15. H. Klaui, in *Chemistry and Biochemistry* (Pergamon Press, Oxford, (1982), pp. 309–317.
16. J. A. Olson and N. I. Krinsky, FASEB J. **9** (15), 1547 (1995).
17. E. Hernández-Marin, A. Barbosa, and A. Martínez, Molecules **17**, 1039 (2012).
18. R. Edge and G. Truscott, in *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties* (Kluwer Acad. Publ., 2010), pp. 283–307.
19. F. Ramel, S. Birtic, and S. Cuine, Plant Physiol. **158**, 1267 (2012).
20. F. Bouvier, J.-C. Isner, O. Dogbo, and B. Camara, Trends Plant Sci. **10** (4), 187 (2005).
21. Н. Э. Поляков и Т. В. Лёшина, Успехи химии **75**, 1175 (2006).
22. N. E. Polyakov, A. L. Focsan, K. Michael, et al., J. Phys. Chem. B **23**, 16968 (2010).
23. H.Volkhard, *Fluorescence Resonance Energy Transfer. Principles of Computational Cell Biology* (Wiley-VCH, Weinheim, 2008).
24. Н. Д. Алехина, Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко и др., *Физиология растений* (Academia, M., 2005).
25. D. C. Harris, in *Applications of Spectrophotometry. Quantitative Chemical Analysis* (W. H. Freeman and Co., New York, 2010).
26. Г. Н. Смоликова и С. С. Медведев, Физиология растений **62** (1), 3-16 (2015).
27. http://fbm.msu.ru/education/lectures/biophys/pdf/05.
28. D. Kuciauskas, P. A. Liddell, A. L. Moore, et al., J. Am. Chem. Soc. **120**, 10880 (1998).
29. A. Sieckmann, W. Lubitz, and D. Stehlic, Chem. Phys. **194**, 349 (1995).

Radicals in the Structures of a Cell

Yu.A. Shapovalov*, P.P. Gladyshev, S.T. Tuleukhanov*, E.V. Schvetsova*, and Zh.T. Abdrasulova***

**Al-Farabi Kazakh National University, prosp. Al-Farabi 71, Almaty, 050040 Republic of Kazakhstan*

***Dubna State University, ul. Universitetskaya 19, Dubna, Moscow Region, 141982 Russia*

The participation of natural radicals in single-electron processes of cell activity is considered. It was shown that coenzymes, having intermediate free radical quinoid and semichinoid forms, can interact with carotenoids, forming complexes with charge transfer with an absorption band of 1030 nm. Moreover, the complex can perform an active light-harvesting function during photosynthesis up to 1100 nm, with the energy transfer from chlorophyll a and chlorophyll b to the complex. Studies of the sorption of the alcoholdehydrogenase–nicotinamide adenine dinucleotide enzyme-cofactor system on a hydrophobic electrically conductive carrier showed that the maximum activity of the enzyme-cofactor system is reached during sequential sorption of the coenzyme, and then the apoenzyme. The orientation of the biocatalytic system on the immobilization matrix is of great importance.

Keywords: radicals, coenzymes, carotenoids, charge-transfer complexes, sorption, immobilization

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 705–712

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.344.2, 577.344.3

ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ РЕЛАКСАЦИИ ВЫСОКОВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

© 2020 г. С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян

Оренбургский государственный университет, 460018, Оренбург, просп. Победы, 13

E-mail: ppsnya@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.
После доработки 08.11.2019 г.
Принята к публикации 22.05.2020 г.

Обсуждается инактивация планктонных бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* ударными акустическими волнами, возникающими при быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в среде, локально нагретой до температуры кипения. Локальный нагрев среды осуществлялся за счет тепла, выделяемого в ходе релаксации высоких электронно-возбужденных состояний экзогенных молекул органических красителей. Красители возбуждались наносекундными импульсами лазерного излучения видимого диапазона. Высокие электронно-возбужденные состояния заселялись в результате ступенчатого поглощения молекулами двух квантов лазерного излучения. Исследована зависимость эффективности инактивации микроорганизмов от концентрации красителей в растворах, плотности мощности возбуждающего излучения и расстояния до источника генерации ударных волн.

Ключевые слова: экзогенные термосенсибилизаторы, ударные акустические волны, инактивация микроорганизмов.

DOI: 10.31857/S0006302920040109

Альтернативные стратегии борьбы с патогенными микроорганизмами становятся все более востребованными в связи с увеличением количества штаммов, резистентных к действию традиционных антимикробных препаратов [1]. Среди перспективных способов немедикаментозного воздействия на бактерии и грибы, к которому микробы не могут выработать иммунитет, выделяют фотодинамическую обработку – совместное деструктивное действие света и фотосенсибилизаторов на клетки. Механизм фотодинамического действия основан на селективном окислении субстрата активным кислородом, генерируемым фотосенсибилизаторами [2–5]. В качестве фотосенсибилизаторов обычно используют молекулы органических красителей с большим квантовым выходом в триплетное состояние [6, 7].

Основные ограничения фотодинамического действия связаны с малой глубиной проникновения фотосенсибилизаторов и света в биологические среды. В некоторых из них, например в биопленках, практически нет кислорода [8, 9], и фотодинамическое действие проявляется только в тонком периферийном слое. Для инактивации бактерий в более глубоких слоях необходимо «включить» другие физические процессы.

В настоящей работе представлены результаты исследования повреждений планктонных бактерий ударными акустическими волнами. Такие волны возникают в среде при быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в локально нагретых областях. Быстрый локальный нагрев среды происходит при безызлучательной релаксации короткоживущих высоковозбужденных электронных состояний (ВВЭС) молекул-сенсибилизаторов.

ВВЭС красителей эффективно заселяются при облучении молекул наносекундными лазерными импульсами плотности мощности $P \geqslant 5$ МВт/см^2 в результате ступенчатого поглощения двух квантов возбуждающего излучения [10, 11]. Релаксация ВВЭС молекул преимущественно безызлучательная, и поглощенная энергия очень быстро трансформируется в тепло. Если термосенсибилизатор локализован непосредственно в клетке или ее мембране, тепловыделение может инициировать ее гибель за счет гипертермии. Когда термосенсибилизатор находится вне клетки, тепло передается растворителю с последующим образо-

Сокращение: ВВЭС – высоковозбужденные электронные состояния.

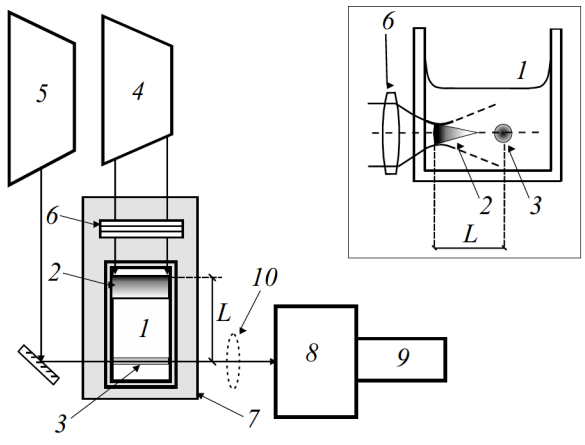


Рис. 1. Экспериментальная установка для инактивации микроорганизмов и изучения ударных волн: *1* – кювета с раствором; *2* – область возбуждения раствора; *3* – область зондирования; *4* – твердотельный лазер, 532 нм; *5* – He-Ne-лазер, 628 нм; *6* – цилиндрическая линза; *7* – подвижная платформа; *8* – монохроматор; *9* – фотоприемник; *10* – фокусирующая линза. Показано расстояние *L* между зонами возбуждения и зондирования. На врезке – конфигурация установки в плоскости, перпендикулярной зондирующему лучу.

ванием и схлопыванием пузырьков пара, в результате чего образуются акустические волны, способные повредить микроорганизм. Заметим, что если в результате каскадной релаксации ВВЭС [12, 13] заселяются нижние триплетные уровни молекул, то они по-прежнему могут выполнять функции фотосенсибилизаторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы суточные агаровые культуры клеток *Escherichia coli* (штамм K12TG1) и *Bacillus subtilis* (штамм 534). Перед облучением бактерии переносили в физиологический раствор. Плотность полученной суспензии стандартизировали фотометрически (длина волны 620 нм, оптическая плотность $D = 0.61 \pm 0.01$. Для оценки выживаемости бактерий после облучения видимым светом в присутствии термосенсибилизатора применяли метод подсчета колониеобразующих единиц, количество которых определялось через 16 ч роста на LB-агаре при температуре 37°C. До облучения и добавления красителя оно составляло $(4.50 \pm 0.44) \cdot 10^7$/мл для *E. coli* и $(32.0 \pm 2.3) \cdot 10^7$/мл для *B. subtilis*.

Термосенсибилизаторами служили анионные ксантеновые красители эритрозин и эозин, а также катионный краситель родамин 6G, которые различаются фотодинамической активностью и по-разному взаимодействуют с клеточными стенками грамположительных и грамотрицательных бактерий. Концентрация красителей в растворах составляла 0.01–0.5 мМ.

Для фотоинактивации микроорганизмов и изучения ударных волн в растворах красителей использовали экспериментальную установку, схема которой показана на рис. 1. Растворы помещали в прямоугольную кварцевую кювету *1* сечением 5 × 10 мм и облучали через ее торцевую стенку. Источником возбуждения служил импульсный YAG:Nd-лазер *4* (вторая гармоника $\lambda = 532$ нм, длительность импульса 15 нс).

Для обеспечения эффективного нагрева среды и формирования пузырьков пара в кювете вблизи границы «стекло–раствор» с помощью собирающей цилиндрической линзы *6* создавали зону возбуждения *2* с поперечным сечением 3.2 × 0.5 мм, в которой плотность мощности максимальна в перетяжке и могла достигать 50 МВт/см^2. Протяженность этой зоны вдоль луча возбуждения уменьшается с ростом концентрации красителя и увеличивается вместе с плотностью мощности. В наших экспериментах излучение накачки полностью поглощалось на пути менее 5 мм.

Вдоль перетяжки линзы *6* (или параллельно ей на расстоянии *L*) пропускали зондирующий луч *3* сечением менее 1 мм от маломощного (менее 1 мВт) He-Ne-лазера *5*. Измеряя интенсивность нерассеянной части этого луча, можно судить о наведенном поглощении в зоне возбуждения или о наличии рассеивающих центров в виде пузырьков пара на его пути, а по рефракции луча – о прохождении ударной волны в растворе. Линза *6* и кювета *1* с раствором располагались на одной платформе *7*, которая могла смещаться перпендикулярно зондирующему лучу *3*. Перемещая платформу, можно, не изменяя геометрии возбуждения, зондировать раствор в кювете на контролируемом расстоянии *L* от перетяжки. При $L = 0$ и выключенном He-Ne-лазере свечение зоны возбуждения *2* могло быть собрано на щели монохроматора *8* (МДР-41, ООО «ОКБ Спектр», Санкт-Петербург) с помощью дополнительной линзы *10*, что позволяло получать информацию о релаксации возбужденных состояний сенсибилизаторов.

Синхронизация запуска лазера и регистрирующей системы, а также сбор, накопление и обработка сигналов производились в автоматизированном режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генерация ударных акустических волн. На рис. 2 представлены кинетические кривые интенсивности зондирующего луча при импульсном возбуждении эритрозина концентрации 0.25 мМ в физиологическом растворе на разных расстояниях от перетяжки возбуждающего пучка: кривая *1* – непосредственно в перетяжке; кривые *2* и *3* –

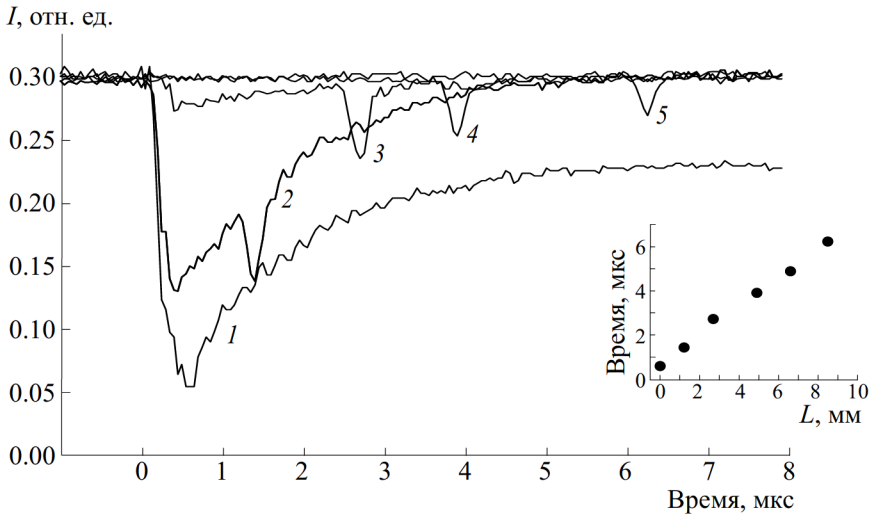


Рис. 2. Временные зависимости интенсивности нерассеянной части зондирующего луча в физиологическом растворе с эритрозином (C = 0.25 мМ) на разных расстояниях L от перетяжки возбуждающего пучка (P = 20 МВт/см^2): *1* – L = 0 мм; *2* – L = 1.2 мм; *3* – L = 2.7 мм; *4* – L = 4.9 мм; *5* – L = 8.5 мм. На врезке – зависимость времени прихода волны от расстояния до перетяжки.

в зоне возбуждения на некотором расстоянии от перетяжки, кривые *4* и *5* – вне зоны возбуждения.

На интенсивность нерассеянной части зондирующего луча оказывают влияние три явления – рассеяние света на долгоживущих пузырьках, наведенное поглощение возбужденными молекулами красителя и пересечение луча ударной волной. Рассеяние на пузырьках проявляется только для луча, зондирующего перетяжку: в этой позиции (кривая *1*, L = 0) ступенчатое изменение интенсивности сохраняется вплоть до нескольких миллисекунд (не показано на рисунке). Вместе с долгоживущим рассеянием на пузырьках в точке L = 0 имеет место короткоживущее наведенное триплет-триплетное поглощение света возбужденными молекулами красителя, которое характерно для кривых *1* и *2* (L = 0, 1.2 мм) и в значительно меньшей степени для кривой *3* (L = 2.7 мм). Отметим, что наличие триплетных состояний красителя в присутствии молекулярного кислорода в этих областях может повлечь генерацию активных форм кислорода. Кривая 3, очевидно, соответствует дальнему краю зоны возбуждения. На расстояниях $L \geqslant 5$ мм триплет-триплетное поглощение уже не проявляется, что видно из кривых *4* и *5* (L = 4.9 и 8.5 мм соответственно).

На всех кривых присутствуют острые провалы, которые, по нашему мнению, соответствуют моментам пересечения зондирующего луча фронтом ударной волны, источником которой являются родившиеся в перетяжке пузырьки. Косвенным доказательством этому является график зависимости времени появления провала от расстояния L от точки зондирования до перетяжки. Обратный наклон этой прямой соответствует скорости звука в среде, которая измерена нами при температурах раствора 0, 26 и 80°C. Полученные значения вместе со справочными данными для дистиллированной воды при атмосферном давлении приведены в таблице.

Таким образом, при указанных выше диапазонах концентраций красителей и плотности мощности возбуждающего излучения в кювете с красителем можно выделить три зоны, в которых возможны различные воздействия на микроорганизмы. В области перетяжки возможна гипертермия бактерий, воздействие на них ударной волной, повреждение активными формами кислоро-

Зависимость скорости волны от температуры раствора

Температура, °C	Скорость волны, м/с	Скорость волны в дистиллированной воде, м/с [21]
0	1410	1402
26	1505	1499
80	1555	1554

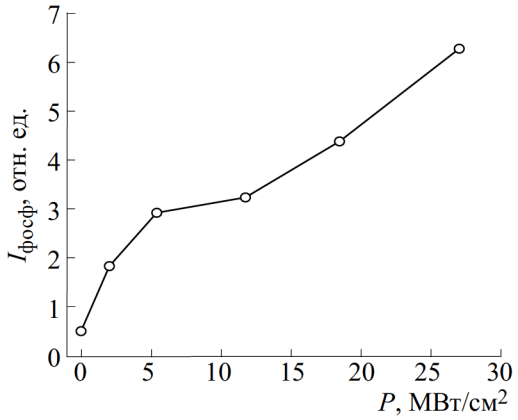


Рис. 3. Зависимость интенсивности фосфоресценции эозина (C = 0.25 мМ) в физиологическом растворе от плотности мощности возбуждающего излучения ($\lambda_{возб}$ = 532 нм).

да и перенос энергии с ВВЭС связанных молекул красителей на мембраны или внутриклеточные структуры. В промежуточной области зоны возбуждения, где присутствуют молекулы сенсибилизаторов в триплетном состоянии, гипертермия и перенос энергии маловероятны, но возможно химическое повреждение бактерий активными формами кислорода и действие ударной волны. Наконец, вне зоны возбуждения единственным потенциально опасным фактором повреждения микроорганизмов выступает ударная волна.

Пузырьки пара возникают из-за локального разогрева среды при безызлучательной релаксации возбужденных состояний молекул красителей. Следует подчеркнуть, что при использованных нами плотностях мощности возбуждения существенный (а в случае родамина 6G – основной) вклад в разогрев растворителя вносит релаксация ВВЭС. Заселение ВВЭС молекул в наших экспериментах подтверждается зависимостью интенсивности фосфоресценции от плотности мощности накачки, измеренная у эозина (рис. 3).

На начальном участке интенсивность свечения очень быстро нарастает, достигая насыщения примерно при 5 МВт/см^2, что связано с выходом на насыщение заселенности S_1-уровней молекул и, как следствие, заселенности нижних триплетных T_1-состояний, образующихся в результате интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$.

При дальнейшем увеличении плотности мощности накачки интенсивность фосфоресценции эозина вновь начинает заметно расти. Это объясняется тем, что при мощном возбуждении молекулы красителей, находящиеся в S_1-состоянии, поглощают второй квант и по схеме $S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$ переходят на более высокие S_n-уровни, эффективность интеркомбинационной конверсии из которых в триплетное состояние выше, чем с S_1-уровня [15–17].

В результате баланс концентраций молекул в синглетной и триплетной подсистемах молекул смещается в сторону увеличения доли триплетов из-за включения последовательности переходов $S_1 \rightarrow S_n \rightarrow T_m$ при большой плотности мощности. В свою очередь, к переходам $S_1 \rightarrow T_1$ добавляются переходы $T_m \rightarrow T_1$, что и приводит к росту концентрации T_1-состояний и увеличению интенсивности фосфоресценции.

При плотности мощности возбуждающего излучения $P < 0.5$ МВт/см^2 ударные волны в растворах с ксантеновыми красителями имеют очень низкую интенсивность, и их экспериментальная регистрация затруднена. Поскольку квантовый выход φ_T интеркомбинационной кон-версии $S_1 \rightarrow T_1$ в триплетное состояние в воде у ксантеновых красителей большой (от 0.71 у эозин-на до 0.98 у эритрозина [18]), то при длительности импульса 15 нс значительная часть молекул успе-вает не только перейти в T_1-состояние, но и многократно совершить безызлучательные переходы $T_1 \leftrightarrow T_m$, каждый из которых дает свой вклад в нагрев среды. Однако при общей малой энергии накачки интенсивность акустических волн невелика.

В растворах с родамином 6G при слабой накачке акустические волны вообще не обнаружены. У родамина 6G квантовый выход φ_T интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$ в триплетное состояние $\varphi T \sim 0.01$, а квантовый выход флуоресценции перехода $S_1 \rightarrow S_0$ $\varphi_{фл} \sim 0.99$ [19], поэтому при релаксации S_1-состояний молекул раствор не нагревается. Только когда плотность мощности накачки P достигает примерно 5 МВт/см^2 и процесс поглощения становится двухквантовым ($S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$), эффективно заселяются высокие S_n-состояния молекул, при релаксации которых возникает локальный нагрев, образуются пузырьки пара и появляется ударная волна.

На рис. 4 показана эволюция сигнала от ударной волны при увеличении плотности мощности накачки родамина 6G в физиологическом растворе. Видно, что амплитуда провала на кривой пропускания становится заметной при $P > 5.7$ МВт/см^2.

Как видно, если P превышает 10 МВт/см^2, акустические волны эффективно формируются и уверенно регистрируются как в растворах с ксантеновыми красителями, так и в растворах с родамином 6G. Заметим, что в отсутствие термосенсибилизатора в растворе даже при плотности мощности возбуждающего света 40 МВт/см^2 ударные волны не обнаружены.

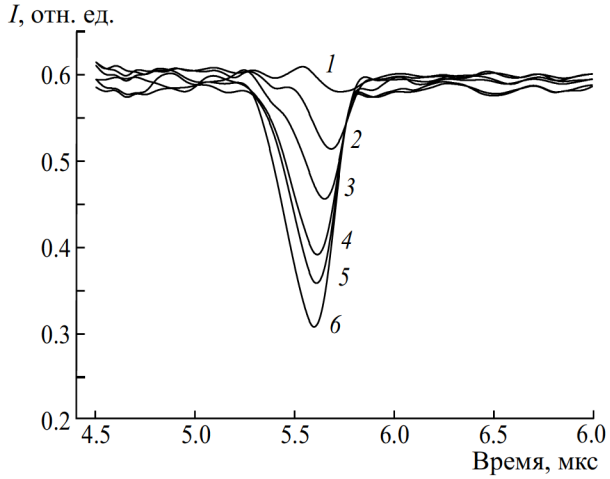


Рис. 4. Эволюция сигнала от ударной волны в растворе родамина 6G (C = 0.25 мМ) с ростом плотности мощности накачки: *1* – 5.7 МВт/см^2, *2* – 11.1 МВт/см^2, *3* – 18.7 МВт/см^2, *4* – 27.0 МВт/см^2, *5* – 35.1 МВт/см^2, *6* – 41.6 МВт/см^2.

Повреждение бактерий ударными волнами. Для оценки повреждения бактерий ударными волнами использовали установку, фрагмент оптической части которой показан на рис. 1. Отбор бактерий для определения количества колониеобразующих единиц до и после возбуждения производили непосредственно в области возбуждения, а также на расстояниях 5 и 10 мм от зоны возбуждения. В контрольных экспериментах исследуемые растворы бактерий с красителями облучали импульсами с P < 0.5 МВт/см^2, а эквивалентность дозы облучения обеспечивалась соответствующим увеличением количества возбуждающих импульсов (времени облучения).

Непосредственно в зоне возбуждения возможно повреждение бактерий в результате фотодинамического действия; гибель клеток за счет гипертермии при безызлучательной релаксации ВВЭС-сенсибилизаторов, связанных со стенками бактерий или находящихся внутри клеток; разрывы химических связей биологически важных макромолекул при безызлучательном переносе энергии с ВВЭС-красителей, а также разрушение клеток ударными волнами. На расстояниях же более 5 мм от зоны возбуждения уже не проявляются тепловые эффекты, нет фотодинамического действия и переноса энергии. Если имеет место повреждение бактерий, то оно происходит исключительно под действием ударных волн, возникающих при быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в зоне облучения.

На рис. 5 показаны зависимости выживаемости клеток *E. coli* и *B. subtilis* в физиологических растворах с ксантеновыми красителями (0.25 мМ) до и после их облучения импульсами различной плотности мощности P при разных расстояниях до зоны возбуждения.

Видно, что непосредственно в перетяжке повреждение бактерий *E. coli* происходит даже при малых плотностях мощности возбуждающего излучения. По-видимому, это обусловлено фотодинамическим действием. Для гипертермии клеток и безызлучательного переноса энергии необходимо взаимодействие красителя со стенками бактерий или его проникновение внутрь клеток. Ксантеновые красители-анионы не взаимо-

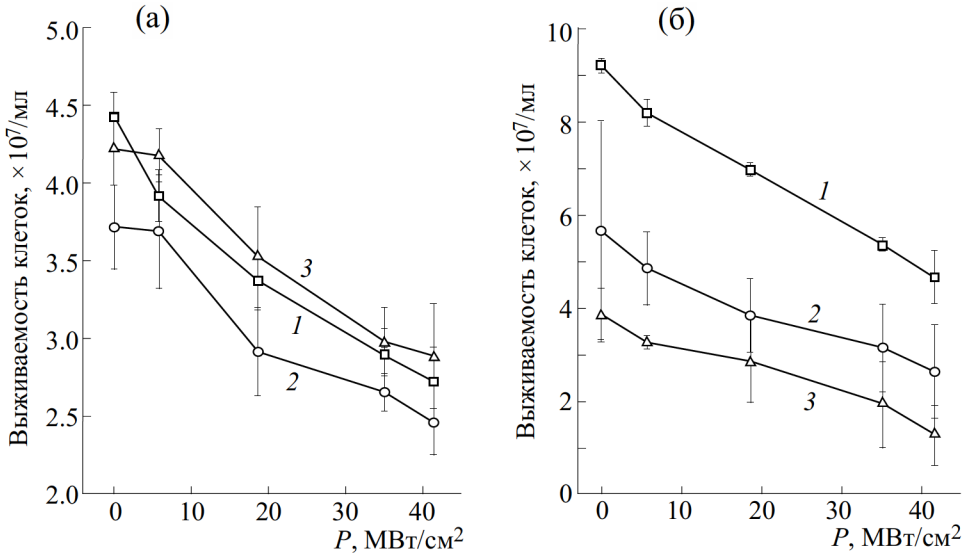


Рис. 5. Зависимости выживаемости клеток *Escherichia coli* в растворе с эритрозином (а) и *Bacillus subtilis* в растворе с эозином (б) от плотности мощности накачки на разном расстоянии от перетяжки при постоянной концентрации красителей (0.25 мМ) в физиологическом растворе: *1* – 0 мм, *2* – 2.5 мм, *3* – 10 мм.

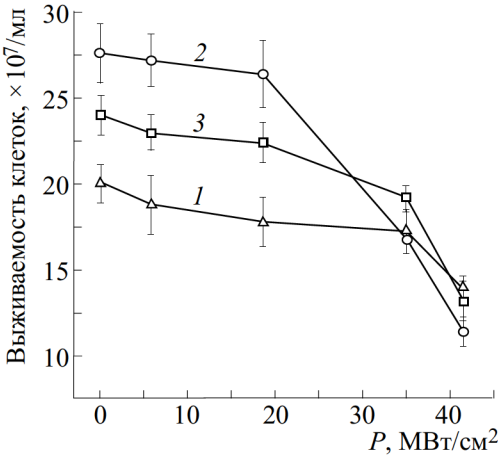


Рис. 6. Зависимости выживаемости клеток *Bacillus subtilis* от плотности мощности накачки на расстоянии 10 мм от перетяжки при различной концентрации родамина 6G в физиологическом растворе: *1* – 0.1 мМ, *2* – 0.25 мМ, *3* – 0.5 мМ.

действуют с клетками *E. coli*, стенки которых имеют отрицательный заряд [20]. На расстояниях 5 и 10 мм от зоны возбуждения повреждения клеток *E. coli* становятся заметными только при $P > 10$ МВт/см^2, когда за счет двухквантового поглощения возрастает эффективность генерации ударных волн.

Клетки *B. subtilis* оказались более чувствительными к воздействию ударных волн. Их чувствительность даже к малым дозам облучения, по-видимому, связана с взаимодействием эозина с бактериями.

Зависимость выживаемости бактерий *B. subtilis* от плотности мощности накачки при разной концентрации родамина 6G в растворе на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения представлена на рис. 6. Видно, что с ростом концентрации термосенсибилизатора эффективность повреждения микроорганизмов возрастает.

Особенно заметными повреждения становятся при $P > 20$ МВт/см^2. С ростом концентрации красителя в растворе увеличивается плотность тепловых источников. Это повышает эффективность генерации ударных волн и, соответственно, увеличивает вероятность повреждения бактерий. Кроме того, при большой концентрации красителей образуются ассоциаты, квантовый выход флуоресценции у которых ниже, чем у мономеров [19]. Ассоциаты красителей могут быть дополнительными источниками тепловыделения в растворах.

Изображения бактерий до и после облучения в присутствие эритрозина, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии, показаны на рис. 7. При исследовании образцов, содержащих бактериальные клетки *E. coli*, до воздействия акустических волн на поверхности подложки обнаружены неоднородные по внешним признакам структуры, среди которых можно выделить продолговатые объекты высотой более 600 нм и объекты разнообразной формы, высотой менее 100 нм (рис. 7а).

Первые объекты были идентифицированы как бактериальные клетки со средними размерами 1.76 мкм в длину, 950 нм в ширину и 680 нм в высоту. Более мелкие структуры, очевидно, являются остатками питательной среды и физиологического раствора, использующегося в качестве буфера.

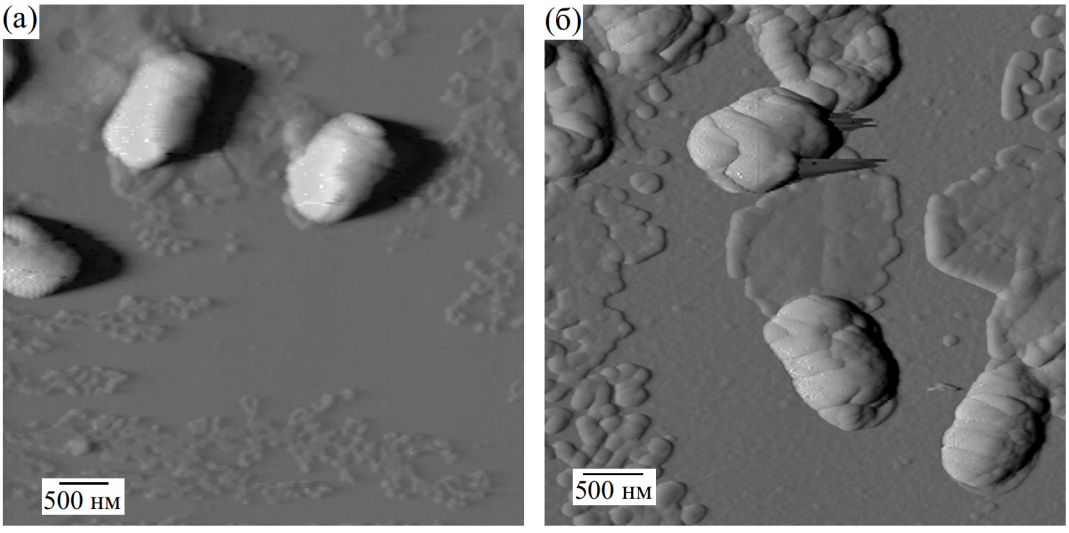


Рис. 7. Изображения бактерий до и после облучения в присутствии эритрозина, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии.

Результаты визуализации клеток *E. coli* после облучения ($\lambda_{возб}$ = 532 нм, P = 35 МВт/см^2) в растворе с эритрозином (0.5 мМ), отобранных на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения, показаны на рис. 7б. Отличительной особенностью представленных изображений является наличие на подложке клеток с нарушенной целостностью клеточной стенки. При этом высота клеток уменьшилась и составила в среднем 580 нм. Для количественного описания изменений клеточной стенки оценена ее шероховатость до и после воздействия. Среднеквадратичная шероховатость увеличилась в среднем на 40%, составляя до и после облучения в среднем 23 и 32 нм соответственно.

Аналогичные изменения наблюдаются в клетках *B. subtilis*: в контрольных образцах, помимо интактных, обнаруживаются также деформированные клетки с разной степенью поражения вплоть до полностью дефрагментированных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ударные волны, возникающие при образовании и схлопывании пузырьков пара в физиологическом растворе, эффективно повреждают бактерии на расстояниях, многократно превышающих радиус фотодинамического действия. Эффективность повреждения микроорганизмов возрастает с увеличением концентрации красителей в растворах и, естественно, зависит от плотности мощности возбуждающего света. Это явление можно использовать для разработки практического способа борьбы с патогенными микроорганизмами в глубоких слоях тканей. Такой способ воздействия на микроорганизмы перспективен в средах, где малоэффективны традиционные способы – антибиотикотерапия или фотодинамическое воздействие на патогены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, проект FSGU-2020-0003.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. O'Neill, *Review on Antimicrobial Resistance. Tackling a Global Health Crisis: Initial Steps* (Wellcome Trust, London, 2015).
2. С. Д. Захаров и А. В. Иванов, Квантовая электроника **29** (3), 192 (1999).
3. А. А. Красновский (мл.), Биофизика **49** (2), 305 (2004).
4. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, et al., J. Photochem. Photobiol. B: Biology **163**, 232 (2016).
5. M. Scholz and R. Dědic, in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, Ed. by S. Nonell and C. Flors (Roy. Soc. of Chemistry, 2016), Vol. 2, Chapt. 28, pp. 63–81.
6. A. A. Krasnovsky Jr., Biochemistry **72** (10), 1065 (2007).
7. M. R. Hamblin, Curr. Opin. Microbiol. **33**, 67 (2016).
8. J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, Science **284**, 1318 (1999).
9. G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, and R. Kolter, Annu. Rev. Microbiol. **54**, 49, (2000).
10. А. П. Ведута, М. Д. Галанин, Б. П. Кирсанов и З. А. Чижикова, Письма в ЖЭТФ **11** (1), 157 (1970).
11. H.-B. Lin and M. R. Topp, Chem. Phys. Lett. **47** (3), 442 (1977).
12. В. Л. Ермолаев и В. А. Любимцев, Оптика и спектроскопия **60** (1), 74 (1986).
13. H. Fukumura, K. Kikuchi, K. Koike, and H. Kokubun, J. Photochem. Photobiol. **42** (2–3), 283 (1988).
14. С. Н. Летута, У. Г. Летута и С. Н. Пашкевич, Биофизика **64** (4), 726 (2019).
15. В. В. Рыльков и Е. А. Чешев, Докл. АН СССР **281** (3), 648 (1985).
16. В. В. Рыльков и Е. А. Чешев, Оптика и спектроскопия **63** (5), 1030 (1987).
17. С. Н. Летута, Вестник ОГУ **5**, 88 (2002).
18. K. K. Rohatgi-Mukherjee and A. K. Mukhopadhyay, Indian J. Pure Appl. Phys. **14** (6), 481 (1976).
19. Л. В. Левшин и А. М. Салецкий, *Люминесценция и ее измерения* (Изд-во МГУ, М., 1989).
20. N. Kashef, Y.-Y. Huang, M. R. Hamblin, Nanophotonics **6** (5), 853 (2017).
21. А. А. Александров, В. А. Белогольский, В. И. Левцов и др., *ГССД 190-2000. Таблицы стандартных справочных данных. Вода. Скорость звука при температурах 0...100 градусов Цельсия и давлениях 0,101325...100 МПа*, (Издательство стандартов, М., 2000).

Photothermic Inactivation of Microorganisms at Relaxation of Highly Excited States of Sensitizers

S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.T. Ishemgulov, and A.N. Nikiyan

Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia

This study demonstrates the susceptibility of planktonic bacteria *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to inactivation by shock acoustic waves arising from the rapid formation and collapse of vapor bubbles in the medium locally heated to boiling point. Local heating of the medium occurred due to heat release through relaxation of highly excited electronic states of exogenous molecules of organic dyes. Dyes molecules were excited by nanosecond laser pulses. Highly excited electronic states were formed as a result of stepwise absorption of two quanta of laser radiation. The dependency of the efficiency of microorganism inactivation on dye concentration, the excitation power density and the distance from the shock wave source was studied.

Keywords: exogenous thermosensitizers, shock acoustic waves, inactivation of microorganisms

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 713–721

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.352.2

СВОЙСТВА ИОННЫХ КАНАЛОВ В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ АРОМАТИЧЕСКИМ АНТИБИОТИКОМ ЛЕВОРИНОМ A_2

© 2020 г. Т.П. Таги-заде, Х.М. Касумов

Отдел медико-биологических наук Азербайджанской государственной академии физической культуры и спорта, AZ107272, Баку, просп. Фатали Хана Хойского, 98, Азербайджан

E-mail: khalil.gasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2019 г.
После доработки 08.04.2020 г.
Принята к публикации 17.04.2020 г.

Показано, что основные компоненты леворина А с ароматической группировкой – A_0, A_1, A_2, A_3 увеличивают проводимость мембран в ряду: $A_3 > A_2 > A_1 > A_0$, когда находятся с одной стороны мембраны. Все компоненты леворина обладают катионной селективностью. Наиболее изученный в работе леворин A_2 создает в мембранах практически идеальную проницаемость для ионов калия. Потенциал на десятикратный градиент изменения концентрации KCl составляет 56 ± 2 мВ. Модификация мембран при одной и той же концентрации леворина A_2 сначала с одной стороны мембраны, а затем, после установления стационарной проводимости, с другой стороны мембраны показывает, что суммарная проводимость мембран при этом удваивается. Это означает, что с каждой стороны мембраны формируются независимые левориновые проводящие полупоры. Установлено, что при одностороннем введении леворина A_2 к мембранам увеличивается проницаемость мембран для моносахаров и других нейтральных молекул. В присутствии леворина A_2 на мембранах из фосфолипидов с холестерином, эргостерином и стигмастерином обнаружены одиночные ионные каналы с проводимостью 0.2–0.5 пСм и изучены их свойства. Левориновые каналы имеют два основных состояния – открытое и закрытое. В растворе KBr-канал большую долю времени находится в открытом состоянии. В растворах разных солей, но одинаковой молярности, величина проводимости левориновых каналов примерно одинакова 0.4–0.5 пСм. Увеличение концентрации диметилсульфоксида в водном растворе способствует переходу молекул полиеновых антибиотиков из дисперсной в мономолекулярную форму. Молекулы полиеновых антибиотиков, находясь в ассоциированной форме, обладают высокой мембранной активностью.

Ключевые слова: макролидные полиеновые антибиотики, леворин A_2, липидные мембраны, проницаемость мембран, ионные каналы, диметилсульфоксид.

DOI: 10.31857/S0006302920040110

Исследование молекулярного механизма избирательной проницаемости клеточных мембран для ионов и органических соединений является одной из ключевых проблем биофизики мембранного транспорта. Прогресс, достигнутый в изучении механизма транспорта ионов через липидные мембраны, связан с веществами антибиотической природы. Чтобы подойти к решению молекулярного механизма переноса ионов через мембраны, необходимо знать структуру молекул, образующих независимые системы проницаемости, а также иметь возможность изучить отдельные функциональные группы, определяющие биологическую активность молекул, с широким варьированием внешних и внутренних параметров. В связи с этим большое внимание уделяется изучению структуры и мембранной активности каналообразующих соединений. В отличие от каналообразующих соединений грамицидина А и аламетицина, полиеновые антибиотики (ПА) являются классическими структурными каналоформерами с известной структурой молекул [1]. ПА представляют собой большую группу природных соединений, продуцируемых микроорганизмами Streptomyces (*Actinomyces*) [2]. Большинство ПА продуцируются грамположительными микроорганизмами [2]. ПА обладают высокой противогрибковой активностью [3, 4]. В основе биологического действия ПА лежит формирование ими в липидных и клеточных мембранах в комплексе

Сокращения: ПА – полиеновые антибиотики БЛМ – бислойные липидные мембраны, ДМСО – диметилсульфоксид.

со стеринами структурных ионных каналов молекулярных размеров с определенной проводимостью [1, 5]. Из всех изученных ПА наибольшей биологической активностью обладают гептаеновые антибиотики амфотерицин В и леворин [1]. Леворин – основной представитель антибиотиков с ароматической группировкой. Леворин продуцируется микроорганизмами *Actinomyces* levoris [6]. В отличие от неароматических антибиотиков амфотерицина В, нистатина и микогептина, антибиотик леворин эффективно действует с одной стороны бислойных липидных мембран (БЛМ) [1]. Несмотря на большое количество публикаций, касающихся механизма взаимодействия ПА с БЛМ, до сих пор остается неясной связь между структурой молекул антибиотиков и свойствами образованных ими каналов. В химической структуре всех ПА имеется макролидное кольцо, содержащее то или иное число сопряженных двойных связей, которые определяют хромофорные свойства данного вещества [6]. Биологическая активность ПА зависит от числа двойных связей в гидрофобной части молекул. Ароматический гептаеновый антибиотик леворин, в отличие от неароматического гептаенового антибиотика амфотерицина В, содержит в своей структуре два атома азота (один входит в состав аминосахара, второй – в состав N-метил-*n*-аминоацетофенона [6]. Наибольший интерес представляет изучение мембранных свойств леворина как катионного каналоформера. Леворин неоднороден по составу и включает два близких, но не идентичных по своим свойствам ароматических гептаена – леворин А и леворин В [7, 8]. Леворин А более активен, чем леворин В [8]. Наиболее изученный из них – леворин А – оказался комплексным, как и многие из известных ПА гептаенового ряда: кандицидин, трихомицин, гамицин и другие [8, 9]. Исходный леворин А представляет собой смесь нескольких компонентов – A_0, A_1, A_2, A_3 [8, 9]. Установлена структура основного компонента антибиотического комплекса – леворина A_2 [10] и частичная структура других компонентов [11]. Структурные отличия между компонентами леворина А показаны на рис. 1. Как видно из рис. 1, компоненты леворина отличаются друг от друга расположением и числом карбонильных и гидроксильных групп в структуре их молекул. В отличие от амфотерицина В ароматический антибиотик леворин А увеличивает проницаемость липидных и клеточных мембран для катионов щелочных металлов, когда находится с одной стороны мембраны [1, 12]. Наличие комплексной природы леворина А и известная структура составляющих его компонентов предопределили необходимость их более глубокого сравнительного изучения. К настоящему времени в литературе отсутствуют данные о механизме одностороннего действия леворина А на БЛМ. С этой целью изучен механизм одностороннего действия компонентов леворина А, изучены свойства ионных каналов при введении леворина A_2 как идеального катионного каналоформера в состав БЛМ с одной стороны мембраны, представлены данные экспериментальных исследований об избирательности при формировании односторонних проводящих каналов и величине проводимости каналов, образуемых леворином A_2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бислойные мембраны получали из общих фосфолипидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга. Общие фосфолипиды очищали от нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили при 0°С в хлороформо-метанольном растворе (2 : 1) в концентрации 20 мг/мл. Затем к этим липидам добавляли необходимое количество перекристаллизованного холестерина в соответствующих концентрациях. Мембраны формировали на отверстии в тефлоновой ячейке диаметром 0.3 мм. В работе были использованы ПА, любезно предоставленные нам проф. В.А. Вайнштейном (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия). Известно, что ПА в воде нерастворимы, лучшим растворителем для них является диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО получают путем окисления диметилсульфида [13], в состав его молекулы входят две метильные группы, соединенные через серу двойной связью с кислородом. Молекуле ДМСО присущи такие свойства как амфифильность, полярность, высокая резорбция и быстрое проникновение в органы и ткани [13]. Мы использовали в работе ДМСО фирмы Sigma-Aldrich (США). Леворин растворяли в ДМСО в концентрации 1–10 мг/мл, полученный раствор затем использовали в качестве маточного и хранили его в течение недели. Из маточного раствора микрошприцом антибиотики вводили в водный раствор, окружающий мембрану. Электрические характеристики БЛМ измеряли с помощью метода фиксации мембранного потенциала и тока, используя электрометрический усилитель постоянного тока Keithley-301 (США) и двухкоординатный самописец Endim (Германия). Число левориновых каналов зависит от концентрации леворина. При образовании БЛМ мембранообразующие растворы готовили из фосфолипидов с холестерином. В работе были использованы перекристаллизованный холестерин, фосфатидилсерин, эргостерин, стигмастерин, мочевина, ацетамид, глицерин, рибоза, арабиноза, глюкоза, сахароза – все от компании Sigma (США). Для стабилизации pH водных растворов использовали буферные системы в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М.

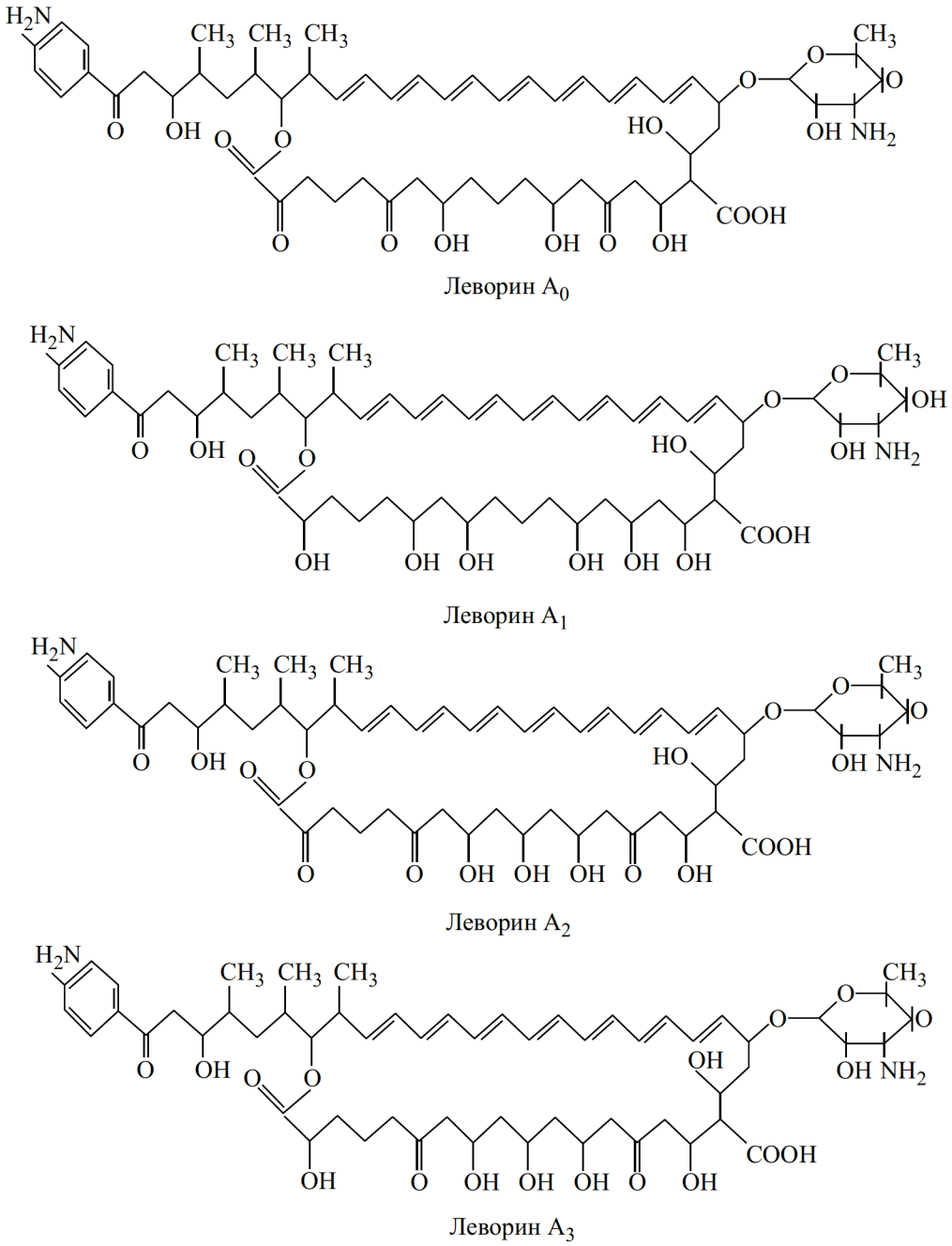


Рис. 1. Химическая структура индивидуальных компонентов леворина А (согласно работе [11]).

Проводимость немодифицированной мембраны составляла 2–3 пС в растворах 0.1 М и 2 М KCl.

Транспорт неэлектролитов определяли осмотическим методом [14]. С наружной стороны мембраны вводили неэлектролит в сравнительно высокой концентрации так, чтобы осмотическое давление (тоничность) раствора возросло по сравнению с осмотическим давлением с противоположной стороны мембраны. Если исследуемый неэлектролит проникает во внутренний отсек, то по мере его перехода осмотическое давление по обе стороны мембраны будет выравниваться. Вода начнет входить во внутренний отсек, выравнивая химические потенциалы воды в разных отделениях системы. По скорости выравнивая химических потенциалов воды в разных отделениях системы можно судить о скорости поступления исследуемого неэлектролита во внутренний отсек мембраны. Коэффициент проницаемости для данного вещества определялся из уравнения $P_d = D/d$, где D – коэффициент диффузии прони-

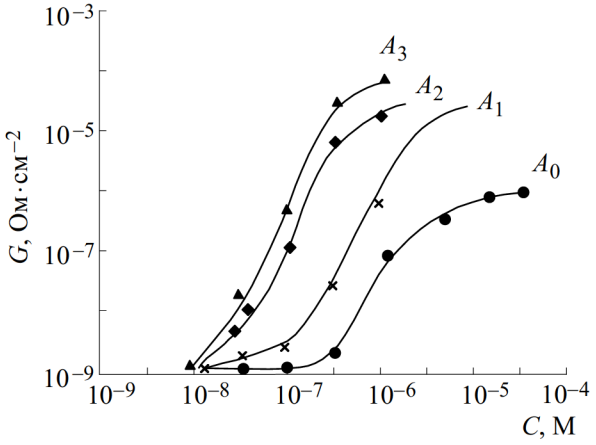


Рис. 2. Зависимости проводимости бимолекулярных мембран от концентрации индивидуальных компонентов леворина А (A_0, A_1, A_2, A_3) с одной стороны мембраны в растворе 2 М KCl, pH 6.5 при t = 25°C. Потенциал на мембране +100 мВ («+» со стороны антибиотиков). Мембраны получали из раствора фосфолипидов бычьего мозга с холестерином в соотношении 2 : 1.

кающего вещества, d – толщина мембраны (~50 Å).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все индивидуальные компоненты леворина А увеличивают ионную проницаемость мембран, содержащих холестерин, для моновалентных катионов. В отличие от неароматических гептаеновых антибиотиков амфотерицина В, нистатина и микогептина компоненты леворина увеличивают проводимость мембран при введении их с одной стороны мембраны. На рис. 2 представлена зависимость проводимости мембран от их концентрации с одной стороны мембраны. Видно, что наибольшей эффективностью обладает леворин A_3, а наименьшей – A_0. По степени изменения проводимости мембран левориновые компоненты располагаются в следующий ряд с возрастающей эффективностью: $A_0 < A_1 < A_2 < A_3$. В аналогичный ряд располагаются антибиотики по мере увеличения их биологический активности [8].

Компоненты леворина А обладают важными свойствами. Влияние антибиотиков на проводимость мембраны зависит не только от их концентрации, но и от величины и направления приложенного к мембране потенциала. Изменение потенциала вдвое (от 100 до 200 мВ) при постоянной концентрации антибиотика приводит к росту проводимости в 2^4 раза. Удвоение же концентрации антибиотика при постоянной величине мембранного потенциала приводит к росту проводимости в четыре раза. Следует обратить внимание на тот факт, что обнаружены два типа сборки проводящих структур при введении антибиотиков с одной стороны мембраны: потенциалзависимый и концентрационный. Первый тип сборки наблюдается при концентрациях компонентов леворина А от 10^{-8} до $5 \cdot 10^{-7}$ М и зависит от величины приложенного к мембране электрического поля. При концентрациях антибиотиков больше $5 \cdot 10^{-7}$ М проявляется второй тип сборки при постоянной величине мембранного потенциала. Этот процесс необратим. Величина мембранного потенциала на десятикратный градиент проникающего иона варьирует в зависимости от числа гидроксильных групп в гидрофильной части молекулы антибиотика. Молекула леворина в отличие от неароматических антибиотиков содержит в своем составе ароматическую группировку, благодаря которой молекула приобретает дополнительный положительный заряд: один расположен у входа в канал, другой – с гидрофобного конца молекулы. Следовало ожидать, что компоненты леворина будут создавать в мембранах анионную избирательность. Однако в экспериментах наблюдается катионная селективность. Этот эффект подтверждает предположение о том, что система селективности локализована на гидрофильной части лактонного кольца молекулы леворина. Отсюда следует, что ионная избирательность мембран в присутствии леворина связана со структурой молекулярных групп, выстилающих внутреннюю полость канала. Изучение механизма избирательной проницаемости мембран для ионов и органических молекул в присутствии леворина является важным аспектом проводимых исследований. Из рис. 1 видно, что индивидуальные компоненты леворина А по структуре одинаковы, но отличаются только числом гидроксильных и карбонильных групп в гидрофильной части молекул.

Исследования проводимости мембран при одностороннем действии левориновых компонентов в растворах различных проникающих катионов показали, что проводимость мембран зависит от степени гидратации проникающих ионов, как и в случае симметричной модификации мембран левориновыми компонентами. Ионы лития, обладая меньшим размером кристаллического радиуса в ряду катионов щелочных металлов, гидратируются в значительно большей степени, чем, например, ионы цезия. Вследствие этого резко уменьшается скорость перемещения ионов Li^+ в канале, и это, в свою очередь, обуславливает меньшую проводимость канала в растворах хлористого лития по сравнению с проводимостью левориновового канала в растворах хлористого цезия. Полученные данные при исследовании одностороннего действия левориновых компонентов показывают, что прохождение ионов Li^+ че-

рез леворивовые каналы более затруднено, чем ионов Cs^+. Это позволяет предположить, что односторонний леворивовый канал представляет собой канал, заполненный водой. Исходя из этого предположения, следовало ожидать, что при одинаковой молярной концентрации проводимость мембран с леворином в растворе NaCl будет примерно равной проводимости мембран в растворе LiCl. Однако проводимость мембран с леворином в растворах NaCl оказалась на порядок выше проводимости мембран в растворе CsCl. По-видимому, здесь имеет место более сложный характер переноса ионов через леворивовые каналы.

Из всех компонентов леворина А только леворин A_2 обладает практически идеальной катионной селективностью. Исходя из этого, наибольший интерес представляет исследование свойств леворина A_2 при взаимодействии с мембранами. Модификация мембран при одной и той же концентрации леворина A_2 сначала с одной стороны мембраны, а затем, после установления стационарной проводимости, с другой стороны мембраны показывает, что суммарная проводимость мембран при этом удваивается. Эти данные показывают, что с каждой стороны мембраны формируются независимые леворивовые проводящие каналы. С другой стороны, известно, что амфотерицин В не действует с одной стороны мембраны даже при очень высоких концентрациях ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Добавление амфотерицина В с другой стороны мембраны в той же концентрации резко усиливает проводимость мембран. В этом случае происходит взаимодействие амфотерицина В, находящигося по разные стороны мембраны, при котором проводимость мембран увеличивается в 2^4 раза [1]. Это доказывает взаимодействие двух амфотерициновых полупор с образованием проводящего канала. При односторонней модификации бислойных мембран леворином A_2 при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М и при мембранном потенциале +100 мВ (плюс – со стороны антибиотика) наблюдается резкий рост проводимости с выходом спустя 15 мин на стационарный уровень. После достижения стационарной проводимости мембран была исследована проницаемость леворивовых каналов для моносахаров и других нейтральных молекул. Объем раствора во внутренней ячейке составлял 0.3 мл, а объем наружного раствора – 1 мл. В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что при модификации мембран леворином A_2 наблюдается увеличение проводимости липидных мембран для моносахаров и других нейтральных молекул. Ниже в скобках указаны значения радиуса молекул (r_i, Å) и коэффициент проницаемости (P_d, см $\cdot$ с$^{-1} \cdot 10^{-4}$) для нейтральных молекул в порядке возрастания гидродинамического радиуса молекул. По степени уменьшения проницаемости молекул они располагаются в следующем ряду: вода ($r_i = 1.4$, $P_d = 16.7 \pm 2.2$) > мочевина ($r_i = 1.8$, $P_d = 11.2 \pm 0.7$) > ацетамид ($r_i = 2.5$, $P_d = 6.64 \pm 1.34$) > > глицерин ($r_i = 3.1$, $P_d = 4.36 \pm 1.03$) > рибоза ($r_i = 3.6$, $P_d = 1.42 \pm 0.12$) > арабиноза ($r_i = 3.8$, $P_d = 1.38 \pm 0.11$) > глюкоза ($r_i = 4.2$, $P_d = 1.23 \pm 0.04$) > > сахароза ($r_i = 5.2$, $P_d = 0.08 \pm 0.02$). Через леворивовые каналы способны проникать нейтральные молекулы вплоть до молекул глюкозы. Эти данные говорят о том, что эффективный диаметр леворинового канала составляет величину ~ 8 Å.

Рис. 3. Дискретные изменения проводимости мембран в присутствии леворина A_2 при потенциале 100 мВ («+» со стороны антибиотика). Концентрация антибиотика с одной стороны мембраны составляла $5 \cdot 10^{-8}$ М. Водные растворы с обеих сторон мембраны содержали 2 М KCl, pH 6.5, $t = 22$°C. Мембраны получали в смеси фосфолипида с эргостерином в соотношении 20 : 1. Стрелкой обозначен уровень проводимости немодифицированной мембраны.

Введение леворина A_2 к липидным мембранам вызывает увеличение проводимости мембран по канальному механизму. Работа одиночных каналов, формируемых леворином A_2, показана на рис. 3, из которого видно, что проводимость канала составляет величину ~ 0.4–0.5 пСм. Мембраны, модифицированные леворином A_2, обладают катионной селективностью. Потенцил на десятикратный градиент проникающего иона 100 мМ : 10 мМ (100 мМ – со стороны антибиотика) составляет величину +56 ± 2 мВ (знак + находится в свободном от антибиотика растворе). Это означает, что мембраны практически идеально проницаемы для катионов.

Проводимость каналов, образуемых леворином A_2, примерно на порядок меньше проводимости амфотерициновых каналов и в 100 раз меньше проводимости грамицидиновых каналов при той же концентрации электролита. Обнаружение одиночных каналов в присутствии леворина A_2 подтвердило предположение о наличии в мембранах комплексов, инициирующих катионную проницаемость. Леворивовые каналы совершают переходы между двумя состояниями: открытым и закрытым. В таблице представлены ве-

Параметры ионного канала в присутствии леворина A_2 в растворах KCl и KBr

	2 M KCl	2 M KBr
$g_м$, Ом$^{-1} \cdot 10^{12}$	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0,1
Леворин A_2, М $\cdot 10^{-9}$	5.0	10.0
$T_о$, с	2.5 ± 0.3	5.2 ± 0.4
$T_з$, с	3.5 ± 0.2	0.86 ± 0.05

Примечание. $g_м$ – Проводимость одиночного канала при мембранном потенциале 200 мВ; леворин A_2 – концентрация, необходимая для получения одиночных каналов (в течение 15 мин); $T_о$ – время жизни канала в открытом состоянии; $T_з$ – время жизни канала в закрытом состоянии. Мембраны формировали из смеси фосфатидилсерина с эргостерином в весовом соотношении 20 : 1.

личина проводимости канала и времена жизни каналов в открытом и закрытом состояниях.

Как видно из таблицы, в растворах разных солей, но одинаковой молярности, величина проводимости каналов примерно одинакова и не зависит от концентрации антибиотика. В разных солях времена жизни канала в открытом и закрытом состояниях отличаются. В растворе KCl левориновый канал большую долю времени проводит в закрытом состоянии, однако в растворе KBr канал большую долю времени находится в открытом состоянии. Отсюда можно сделать вывод, что анионы оказывают влияние на переключающую систему молекулярного канала.

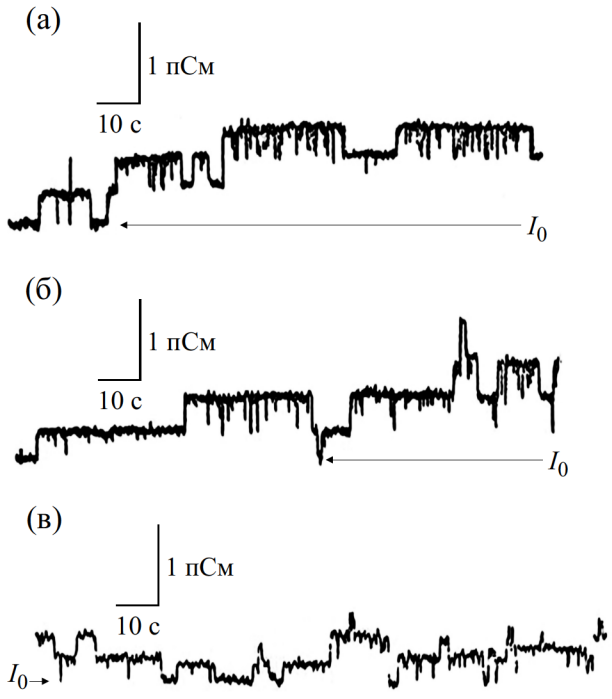


Рис. 4. Дискретные изменения проводимости мембран в присутствии леворина A_2 при потенциале 200 мВ, pH 6.5; $t = 22°C$. (а) – Концентрация антибиотика в растворе 2 M KCl – 5 $\cdot 10^{-9}$ М; мембраны получали из смеси фосфатидилсерина с холестерином в соотношении 2 : 1. (б) – Концентрация антибиотика в растворе 2 M KBr – $5 \cdot 10^{-8}$ М; мембраны получали из смеси фосфатидилсерина с эргостерином в соотношении 20 : 1. (в) – Концентрация антибиотика в растворе 2M KBr – 5 $\cdot 10^{-9}$ М; мембраны получали из смеси фосфатидилсерина со стигмастерином в соотношении 2 : 1.

На рис. 4 показана работа одиночных каналов леворина A_2 на мембранах из фосфатидилсерина с холестерином, эргостерином и стигмастерином. При низких концентрациях антибиотика можно наблюдать работу одиночных ионных каналов. Введение леворина A_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-9}$ М с обеих сторон мембран, приготовленных из фосфатидилсерина с холестерином, приводит к дискретному нарастанию мембранного тока, флуктуирующего относительно среднего значения (см. рис. 4а). Флуктуация тока связана с дискретной работой отдельных проводящих единиц – каналов. Анализ флуктуаций тока показывает, что проводимость каналов лежит в интервале 0.2–0.5 пСм в растворах 2 M KCl при мембранном потенциале 200 мВ. В присутствии леворина A_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-8}$ М с обеих сторон мембран, образованных из раствора фосфатидилсерина с эргостерином, впервые наблюдали дискретные скачки проводимости (рис. 4б). Дискретные изменения проводимости мембран с леворином наблюдаются также на мембранах со стигмастерином (рис. 4в). Как видно на рис. 4, проводимости каналов примерно одинаковы и не зависят от состава электролита. В асимметричных условиях концентрации электролита (2M KCl : 0.2 M KCl) потенциал нулевого тока равен +54 ± 4 мВ на мембранах с большим числом каналов. Знак потенциала говорит об избирательной проницаемости мембран для ионов K^+. Ионная селективность канала не зависит от полиеновой цепи. По всей видимости система, ответственная за селективность ионного канала, локализована на гидрофильной стороне молекулы полиена. Изучая селективные свойства мембраны с большим числом полиеновых каналов, можно однозначно определить избирательность одиночного канала. Такой экспериментальный подход обусловлен тем, что систематическое изучение селективности непосредственно одиночного канала методически достаточно сложно ввиду ее малой проводимости. В растворах KCl частота переходов канала из открытого в закрытое состояние несколько больше, и это связано, по-видимому, со сложным характером взаимодействия иона с полярными группами, выстилающими внутреннюю пору в канале.

Чувствительность мембран к ПА зависит от концентрации ДМСО в водном растворе, окружающем мембрану [15, 16]. При соотношении вода : ДМСО = 20 : 1 проводимость мембран с антибиотиками была высокой и становилась сравнимой с проводимостью самих электродов. При соотношении вода : ДМСО = 10 : 1 проводимость мембран с антибиотиками была также высока. Постепенное увеличение концентрации ДМСО в водном растворе уменьшало чувствительность ПА к мембранам. Проводимость мембран в солевом растворе, содержащем 50% ДМСО и ПА, оказалась очень низкой. Та же картина наблюдалась в растворе с соотношением вода : ДМСО, равным 1 : 10. Приведенные данные показывают, что постепенное увеличение концентрации ДМСО в водном растворе способствует переходу молекул ПА из дисперсной, т.е. ассоциированной формы, в мономолекулярную форму, и в этой форме молекулы ПА оказываются биологически неактивными. Отсюда следует, что молекулы ПА, находясь в ассоциированной форме, обладают очень высокой мембранной активностью, а распад проводящего комплекса в мембране означает переход канала из олигомерной структуры в мономерно-димерную и потере им проводимости. Чувствительность ПА к мембранам означает, что увеличивается число проводящих каналов, а проводимость индивидуальных одиночных каналов не изменяется. Под чувствительностью ПА к мембранам понимается минимальная концентрация антибиотика, под действием которого образуются одиночные каналы в единицу времени. По мере увеличения концентрации ДМСО чувствительность мембран к антибиотикам уменьшается, хотя угол наклона зависимости проводимости мембран от концентрации антибиотиков при этом не меняется.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наибольший интерес представляют сравнительные исследования, связанные с особенностями взаимодействия ПА с БЛМ и клеточными мембранами. На изолированном мышечном волокне травяной лягушки *Rana temporaria* был изучен индуцированный полиенами ионный транспорт. Было показано, что амфотерицин В, метиловый эфир амфотерицина В, нистатин, микогептин и леворин усиливают проводимость мышечного волокна для катионов щелочных металлов [12, 17–19]. Как было показано в нашей работе, леворин также усиливает проводимость бислойных мембран для катионов щелочных металлов. Избирательная проницаемость липидных мембран зависит от структуры гидрофильной цепи полиеновой молекулы. Так, амфотерицин В, нистатин и микогептин эффективно увеличивают проводимость БЛМ для одновалентных анионов только при наличии их с обеих сторон мембраны [1]. Было показано, что указанные выше антибиотики эффективно увеличивают проницаемость мембран эритроцитов, лимфоцитов, тимоцитов и мышечных клеток при наличии их с одной стороны мембраны, при этом на мембранах наблюдается усиление потока не для анионов, а для катионов щелочных металлов [17–20]. Антибиотики с ароматической группировкой, в частности левориновые компоненты, оказались эффективны с одной стороны клеточных мембран и БЛМ. Леворин действует на липидные и клеточные мембраны, создавая избирательную проницаемость для катионов щелочных металлов [12, 21]. В молекуле микогептина на одну карбонильную группу больше, чем в молекулах амфотерицина В и нистатина. Через микогептиновые каналы анионы и катионы проникают примерно одинаково [21]. В молекуле леворина на две карбонильные группы больше, чем в молекулах амфотерицина В и нистатина, и в присутствии леворина уже наблюдается избирательная проницаемость мембран для катионов [21]. Наши исследования показали, что мембраны, модифицированные леворином с одной стороны мембраны, обладают такой же селективностью, как и при двухстороннем введении антибиотика. Проводимость одиночных полупор примерно такая же, как и проводимость канала, возникающая при двухстороннем введении антибиотика. Для расшифровки молекулярной природы катионной селективности левориновых каналов требуется синтез новых молекул с измененной химической структурой молекул. Биологический синтез и химическая трансформация молекул ПА – вот реальный путь получения новых производных ПА с новыми физико-химическими свойствами [22–24]. Наибольший интерес представляет модификация полиеновой молекулы по гидрофильной цепи, изменяющая внутреннюю полость канала, и, как показывают исследования, только эта система в молекулах полиенов отвечает за избирательную проницаемость мембран для ионов и органических соединений. Эксперименты, проведенные с алкильными производными леворина, модифицированными по полярным карбоксильным и аминным группам, показали, что подобная модификация не влияет на избирательную проницаемость мембран, а только определяет время пребывания антибиотика в мембране. Модифицируя мембраны алкильными производными с разной длиной углеводородной цепи ($R\text{-}CH_3$ – метил, $R\text{-}C_2H_5$ – этил, $R\text{-}C_3H_7$ – пропил, $R\text{-}C_4H_9$ – бутил; $R\text{-}C_5H_{11}$ – амил), можно точно контролировать время нахождения антибиотика в мембране [1]. Проведенные эксперименты на липидных мембранах показали, что с увеличением длины алкильной цепи производных леворина время нахождения их в мембране

по сравнению с исходным леворином уменьшается [1]. Время пребывания антибиотика в мембране определялось по постоянной времени релаксации проводимости мембран после отмывки антибиотика из окружающего мембрану раствора.

Биологическая активность ПА зависит не только от структуры молекул полиенов, но и от выбора растворителя. Водорастворимые формы ПА примерно в десять раз менее эффективны, чем при введении в водную фазу антибиотиков в растворах ДМСО [21]. При введении смеси ДМСО с ПА в водную среду происходит формирование самоагрегированных ассоциатов ПА в водных растворах [25–27]. Полиены в комплексе с ДМСО формируют в водных растворах ассоциаты, состоящие из нескольких молекул антибиотиков, и только в такой форме они обладают высокой мембранной активностью [28]. Частота образования и размер агрегированных ассоциатов возрастает с увеличением концентрации ПА [29]. Диаметр левориновой полупоры составляет 8 Å, что согласуется с данными работы [30]. Использование ПА в комплексе с ДМСО усиливает эффективность биологического действия ПА на липидные мембраны [15, 16]. Здесь с большой вероятностью можно говорить о том, что увеличение числа молекул антибиотика, встроенного в мембрану, связано с совершением работы силами поверхностного натяжения. Благодаря тому, что значение диэлектрической проницаемости ДМСО ($\varepsilon = 48.9$) находится между величинами для воды и жиров, происходит уменьшение коэффициента распределения ПА между мембраной и водой. Исходя из изложенных данных, можно высказать предположение о том, что леворин, являясь каналообразующим соединением, может индуцировать в мембранах формирование дополнительных каналов проницаемости и при интенсивной мышечной активности усилить перенос катионов и энергозависимых субстратов в клетки.

ВЫВОДЫ

Изложенные выше результаты проведенных экспериментов позволяют высказать предположение о том, что путем встраивания в мембраны гептаенового антибиотика леворина A_2 с установленной химической структурой молекул можно моделировать процесс формирования каналов в клеточных мембранах и экспериментально осуществить трансмембранный перенос ионов и углеводов в клетки.

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 собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Х. М. Касумов, *Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков* (Наука, М., 2009).
2. S. B. Zotchev, Curr. Med. Chem. **10**, 211 (2003).
3. K. C. Gray, D. S. Palacios, I. Dailey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 2234 (2012).
4. E. Grela, A. Zdybicka-Barabas, B. Pawlikowska-Pawlega, et al., Sci. Rep. **9** (1), 17029 (2019).
5. Y. Nakagawa, Y. Umegawa, T. Takano, et al., Biochemistry **53** (19), 3088 (2014).
6. E. Borowski, Farmaco **55,** 206 (2000).
7. E. Borowski, M. Malyshkina, S. Soloviev, and T. Ziminski, Chemotherapia **10**, 178 (1966).
8. А. И. Филипова и Ю. Д. Шенин, Антибиотики **19** (1), 32 (1974).
9. P. Szczeblewski, T. Laskowski, B. Kubacki, et al., Sci. Rep. **7**, 40158 (2017).
10. J. Zielinski, J. Gumieniak, J. Golik, et al., In *Proc. Int. Symp. on Antibiotics* (Weimar, GDR, 1979), B16.
11. J. Zielinski, H. Borowy-Borowski, J. Golik, et al., Tetrahedron Lett. **20** (20), 1791 (1979).
12. N. Shvinka, Proc. Latv. Acad. Sci. **56**, 57 (2001).
13. Zh.-W. Yu and P. J. Quinn, Biosci. Rep. **14**, 259 (1994).
14. В. В. Зенин, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (РАН, Л., 1979).
15. В. Х. Ибрагимова, Д. И. Алиев и И. Н. Алиева, Биофизика **47** (5), 833 (2002).
16. V. Ibragimova, I. Alieva, Kh. Kasumov, et al., Biochim. Biophys. Acta **1758**, 29 (2006).
17. N. Shvinka and G. Caffner, Biophys. J. **67**, 143 (1994).
18. N. Shvinka and G. Caffner, Eur. Biophys. J. **24**, 23 (1995).
19. Н. Э. Швинка и Г. Кафнер, Биол. мембраны **6**, 1216 (1989).
20. S. C. Hartsel, S. K. Benz, W. Ayenew and J. Bolard, Eur. Biophys. J. **23**, 125 (1994).

21. A. A. Samedova, T. P. Tagi-zade, and Kh. M. Kasumov, Rus. J. Bioorg. Chem. **44** (3), 337 (2018

22. J. F. Aparicio, P. Caffrey, J. A. Gil, and S. B. Zotchev, Appl. Microbiol. Biotechnol. **61**, 179 (2003).

23. M. N. Preobrazhenskaya, E. N. Olsufyeva, S. E. Solovieva, et al., J. Med. Chem. **52**, 189 (2009).

24. D. S. Palacios, L. Dailey, D. M. Siebert, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108** (17), 6733 (2011).

25. W. I. Gruszecki, M . Gagoś, and M Hereć, J. Photochem. Photobiol. **69**, 49 (2003).

26. J. Starzyk, M. Gruszecki, K. Tutaj, et al., J. Phys. Chem. **118** (48), 13821 (2014).

27. W. Grudzinski, J. Sagan, R. Welc, et al., Sci. Rep. **13** (6), 32780 (2016).

28. E. Grela, M. Wieczór, R. Luchowski, et al., Mol. Pharm. **15** (9), 4202 (2018) .

29. J. Mazerski and E. Borowski, Biophys. Chem. **57**, 205 (1996).

30. С. А. Ф. Ел-Суфи, Автореф. канд. ... дис. биол. наук (Ташкент, Ин-т биохимии АН Узбекистана., 1992).

Properties of Ion Channels in Lipid Membranes Modified by Levorin A_2, an Aromatic Antibiotic

T.P. Taghi-zada and Kh.M. Kasumov

Department of Medical and Biological Sciences, Azerbaijan State Academy of Physical Education and Sport, prosp. Fatali Khan Khoyski, 98, Baku, AZ 1072 Azerbaijan

It is shown that the main components of levorin A complex consisting of antibiotics of the aromatic group designated as A_0, A_1, A_2, A_3 increase the permeability of membranes for: $A_3 > A_2 > A_1 > A_0$ when added to one side of the membrane. All components of levorin produce a cation-selective conductance. Levorin A_2, which has been extensively studied in our research, promotes increased permeability of membranes to potassium ions. The membrane potential for a tenfold change in KCI concentration gradient is 56 ± 2 mV. It has been shown that that injection of the same concentration of levorin A_2 to one side and then, after determining typical membrane permeability, to the other side of the membrane generates a two-fold increase in total membrane permeability. This means that independent levorin-induced conductive semi-pores are formed on each side of the membrane. It has been found that injection of levorin A_2 only to one-side of the membranes enhances membrane permeability for monosaccharides and other neutral molecules. In the presence of levorin A_2 on membranes of phospholipids with cholesterol, ergosterol and stigmasterol, the single-channel conductance of typical ion channels was 0.2–0.5 pS and the properties of these channels were studied. Levorin channels exist in two states: open and closed. In KBr solution the channel remains most of the time in the open state. In solutions containing different salts, but with the same molarity, the conductance value of levorin channels is approximately the same (0.4–0.5 pS). Increasing the concentration of dimethyl sulfoxide in aqueous solution facilitates the transition of molecules of polyene antibiotics from dispersed to monomolecular form. The molecules of polyene antibiotics, formed by association, exhibit high membrane activity.

Keywords: polyene macrolide antibiotics, levorin A_2, lipid membrane, membrane permeability, ion channels, dimethyl sulfoxide

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 722–727

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 57.053.2: 612.117.5: 612.117.7

ВЛИЯНИЕ ГАЗОМЕДИАТОРОВ НА Ca^{2+}-ЗАВИСИМУЮ КАЛИЕВУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАНЫ КРАСНЫХ КЛЕТОК КРОВИ

© 2020 г. И.В. Петрова*, Ю.Г. Бирулина*, С.Н. Беляева, О.А. Трубачева*, **, А.В. Сидехменова***, Л.В. Смаглий*, И.В. Ковалев*, С.В. Гусакова***

**Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 634050, Томск, Московский тракт, 2*

***НИИ кардиологии Томского НИМЦ РАН, 634012, Томск, Киевская ул., 111а*

****НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН, 634028, Томск, просп. Ленина, 3*

E-mail: ivpetrova57@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.
После доработки 31.01.2020 г.
Принята к публикации 27.05.2020 г.

Исследовано влияние газовых посредников H_2S и CO на Ca^{2+}-зависимые калиевые каналы и анионный обменник, которые участвуют в формировании гиперполяризации мембраны эритроцитов, а также играют важную роль в регулировании объема и деформируемости эритроцитов. Установлено, что в присутствии доноров H_2S и CO существенно снижается амплитуда редокс-стимулированной гиперполяризации мембраны вследствие снижения активности Ca^{2+}-зависимых калиевых каналов. Также обнаружено, что H_2S и CO устраняют снижение объема эритроцитов, отмечаемое при активации Ca^{2+}-зависимых калиевых каналов или блокировании анионного обменника. Показано, что H_2S достоверно увеличивает деформируемость эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, монооксид углерода, сероводород, Ca^{2+}-зависимые калиевые каналы, анионный обменник, деформируемость.

DOI: 10.31857/S0006302920040122

Реологические свойства крови во многом обусловлены способностью красных кровяных телец деформироваться при прохождении через микроциркуляторное русло и поддерживать свой постоянный объем. Два тесно взаимосвязанных процесса, которые зависят от структурных свойств компонентов цитоскелета, степени взаимодействия цитоскелета и интегральных трансмембранных комплексов, которое достигается анкирином, белками 4.1, 4.2 и белком полосы 3 (известным как анионный обменник (AE1)) [1], а также от активности ион-транспортных систем эритроцитарной мембраны [2].

Установлено, что заметное уменьшение объема эритроцитов опосредовано так называемым Gardos-эффектом, который представляет собой индуцированную ионами Ca^{2+} потерю катионов калия через Ca^{2+}-зависимые K^+-каналы (K_{Ca}-каналы, Gardos-каналы) [3, 4]. Одной из функций K_{Ca}-каналов каналов является их участие в регуляции апоптоза красных клеток крови [5]. Показано, что при различных заболеваниях, в том числе и при сердечно-сосудистой патологии, сокращается продолжительность жизни эритроцитов, снижается их деформируемость, увеличивается внутриклеточная концентрация ионов кальция [1, 6].

В то же время основная функция эритроцитов заключается в транспортировке кислорода в связи с гемоглобином. Сродство кислорода к гемоглобину можно регулировать, изменяя, например, объем клеток (и, следовательно, концентрацию гемоглобина) и уровень pH внутри эритроцитов. Изменения напряжения кислорода, в свою очередь, могут контролировать активность ионных переносчиков [7, 8], которые участвуют в поддержании клеточного объема и pH. Помимо молекулярного кислорода как такового, активные формы кислорода, оксид азота (NO), монооксид углерода (CO), сероводород (H_2S) могут играть роль в регуляции ион-транспортных систем эритроцитов при условии, что они подвержены влиянию напряжения кислорода. Имеющиеся данные о вовлечении эндогенно синтезируемых

Сокращения: K_{Ca}-каналы – Ca^{2+}-зависимые калиевые каналы, ФМС – феназинметасульфат, CORM-2 – бис(дихлорид трикарбонилрутения), ГО – гиперполяризационный ответ.

газовых молекул – H_2S и CO в механизмы внутри- и межклеточной коммуникации дополнительно указывает на значимость данных агентов в регуляции жизнедеятельности клеток, тканей и организма в целом [9–11]. Существенный прогресс в исследованиях реакций, опосредованных газотрансмиттерами, достигнут в связи с открытием способности некоторых химических соединений воспроизводить эффекты данных сигнальных молекул, действуя в качестве их доноров. Однако сведения о действии H_2S и CO на клетки крови весьма немногочисленны и носят скорее констатирующий характер, что оставляет ряд нерешенных вопросов о механизмах воздействия сигнальных молекул на системы ионного переноса.

В связи с вышесказанным целью исследования явилось изучение механизмов регуляции Ca^{2+}-зависимой калиевой гиперполяризации мембраны эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования являлась венозная кровь, которую забирали из локтевой вены доноров утром натощак в пробирки типа BD Vacutainer® с гепарином лития (17 МЕ/мл). В исследование были включены 25 здоровых добровольцев (15 мужчин и 10 женщин) в возрасте от 38 до 62 лет, не имеющих в анамнезе сердечно-сосудистых, эндокринных и генетических заболеваний. Из цельной гепаринизированной крови получали осадок эритроцитов путем центрифугирования (5 мин, 1000 *g*, 4°C), затем удаляли плазму и клетки белой крови, а эритроциты дважды отмывали 150 мМ NaCl, содержащим фосфатно-солевой буфер (5 мМ, pH 7.4), при тех же условиях центрифугирования. Полученный осадок эритроцитов промывали изоосмотической средой (320 мОсм/л), содержащей 150 мМ NaCl, 10 мМ глюкозы, 1 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$. После этого эритроциты переносили на лед и хранили не более 12 ч.

Изучение Ca^{2+}-зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов выполняли потенциометрическим методом путем непрерывной регистрации мембранного потенциала клеток по изменениям pH среды, основанным на том, что в присутствии протонофора (ClCCP, carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone), 20 мкМ) распределение H^+ зависит от мембранного потенциала как $E_m = (pH_i - pH_0)RT/F$, где pH_i и pH_0 – значения pH цитоплазмы и среды инкубации соответственно. Для активации K_{Ca}-каналов использовали искусственную электронно-донорную систему аскорбат (10 мМ) – феназинметасульфат (ФМС, 0,1 мМ) [12]. Доноры H_2S и CO – NaHS и бис(дихлорид трикарбонилрутения) (CORM-2) – добавляли за 5 мин до внесения в суспензию эритроцитов агентов, вызывающих гиперполяризацию мембраны.

Регистрацию изменений объема эритроцитов выполняли спектрофотометрическим методом, согласно которому при изменении объема клеток изменяется светопропускание, значит, и оптическая плотность суспензии эритроцитов [13]. Оптическая плотность вычисляется как десятичный логарифм отношения потока излучения, падающего на объект, к потоку излучения прошедшего через него (отразившегося от него): $D = \lg I_0/I$, где D – оптическая плотность (I_0 и I – интенсивности падающего и ослабленного пучков света). Оптическую плотность определяли при λ = 800 нм (спектрофотометр UNICO-2800, United Products & Instruments, США). Для спектрофотометрических измерений упакованные эритроциты разводили в среде их инкубации в соотношении 1:100. В исследуемой суспензии количество эритроцитов варьировало от $4 \cdot 10^7$ до $5 \cdot 10^7$ кл./мл, объем кварцевой кюветы составлял 3.5 мл.

Исследование деформируемости эритроцитов проведено методом эктацитометрии на анализаторе RheoScan-AnD 300 (Rheo Meditech. Inc., Корея) с помощью набора картриджей RSD-K02 в диапазоне напряжений сдвига 1–20 Па. Для характеристики деформируемости эритроцитов использовали индекс элонгации [14].

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics 22. Достоверность различий определяли непараметрическими критериями: *U*-критерий Манна-Уитни для независимых и *T*-критерий Вилкоксона для зависимых выборок. Данные представлены в виде медианы (*Me*) и межквартильного размаха (Q_1; Q_3).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение влияния газотрансмиттеров на механизмы регуляции Gardos-каналов эритроцитов. Добавление искусственной электронно-донорной системы «аскорбат–ФМС» к суспензии эритроцитов приводит к развитию гиперполяризации мембраны красных клеток крови, изменение амплитуды которой служит интегральной характеристикой Ca^{2+}-управляемой K^+-проницаемости мембраны эритроцитов. Добавление NaHS в концентрациях 5 и 10 мкМ в среду инкубации эритроцитов достоверно снижало амплитуду гиперполяризационного ответа (ГО) на 12% (n = 8, $p < 0.05$) и на 23% (n = 8, $p < 0.05$) по сравнению с контролем соответственно (рис. 1а). В присутствии 5 и 10 мкМ CORM-2 в среде инкубации эритроцитов редокс-индуцированный ГО сни-

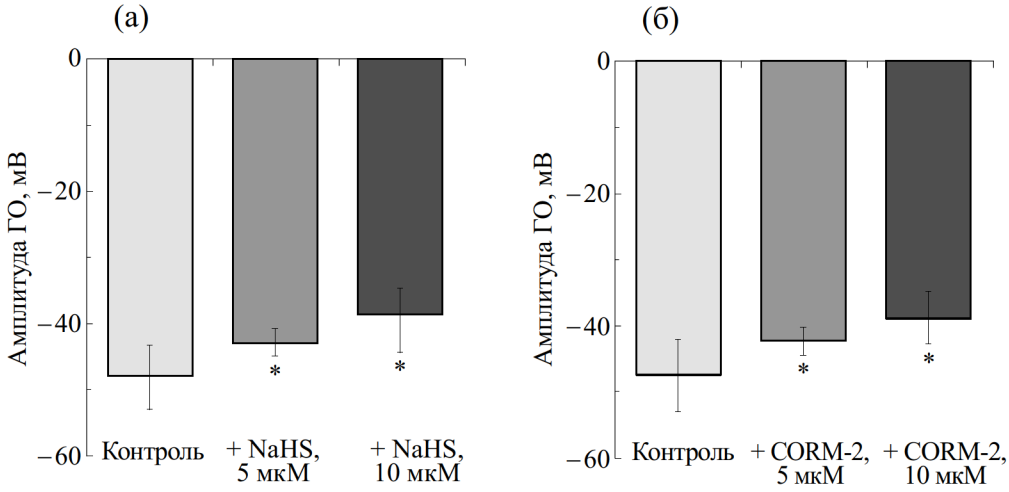


Рис. 1. Влияние NaHS (а) и CORM-2 (б) на гиперполяризацию мембраны эритроцитов; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

зился на 10% ($n = 7$, $p < 0.05$) и 20% ($n = 7$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем соответственно (рис. 1б).

Показано, что определенный вклад в развитие ГО мембраны эритроцитов вносит электронейтральный Cl^-/HCO_3^--обменник [15]. Инкубация эритроцитов в присутствии блокатора анионного обмена SITS (100 мкМ) приводила к увеличению амплитуды редокс-зависимого ГО на 35.2% от контрольного значения ($n = 8$, $p < 0.05$). Инкубация эритроцитов в присутствии SITS и NaHS вызвала снижение исследуемого параметра по сравнению со значениями, полученными в отсутствие NaHS. Так, амплитуда ГО при совместном действии SITS и 5 или 10 мкМ NaHS составила относительно контрольного значения −52.3 (−58.8, −47.1) мВ ($n = 6$, $p < 0.05$) и −25.4 (−35.8, −18.6) мВ ($n = 6$, $p < 0.05$) соответственно. Аналогичные данные были получены и при сочетанном действии SITS и CORM-2: в концентрации 5 мкМ CORM-2 снижал величину ГО до −53.5 (−56.2, −44.2) мВ ($n = 6$, $p < 0.05$), 10 мкМ CORM-2 – до −24.4 (−35.6, −17.7) мВ ($n = 6$, $p < 0.05$) соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют, что доноры H_2S и CO снижают амплитуду редокс-стимулированного ГО, развитие которого обеспечивается Gardos-каналами и транспортом анионов хлора.

Исследование влияния газомедиаторов на изменения объема эритроцитов. С помощью фотометрического метода было показано, что стимуляция Ca^{2+}-зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов с помощью редокс-системы «аскорбат–ФМС» вызывает увеличение оптической плотности суспензии эритроцитов ($p < 0.05$), что может отражать процесс сжатия клеток (таблица). Инкубация эритроцитов с блокатором K_{Ca}-каналов клотримазолом (3 мкМ) устраняла описанный эффект.

Добавление к суспензии эритроцитов NaHS в концентрациях 5 и 10 мкМ на фоне активации Gardos-каналов вызывало уменьшение показателя оптической плотности ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Таким образом, донор H_2S снижал эффект сжатия эритроцитов, возникающий в результате активации K_{Ca}-каналов. Сходное влияние на величину оптической плотности оказывал и донор CO в различных концентрациях, тем самым приводя к увеличению объема красных клеток (таблица).

Блокирование Cl^-/HCO_3^--обменника приводило к статистически значимому увеличению показателя оптической плотности на 15% ($n = 10$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем. Присутствие доноров H_2S или CO в концентрациях 5, 10 мкМ в суспензии эритроцитов совместно с SITS вызывало снижение показателя оптической плотности суспензии эритроцитов, что свидетельствовало о набухании эритроцитов.

Изучение деформируемости эритроцитов при действии сероводорода. Исследование деформируемости эритроцитов эктацитометрическим методом показало, что обработка красных клеток крови донором H_2S в концентрации 10 мкМ вызывала увеличение индекса элонгации при различных величинах напряжения сдвига, что свидетельствовало об увеличении деформируемости красных клеток крови (рис. 2).

Изменение оптической плотности суспензии эритроцитов при действии NaHS и CORM-2

Группа	Оптическая плотность (D)		
	– Аскорбат–ФМС	+ Аскорбат–ФМС	+ Аскорбат–ФМС + SITS, 100 мкМ
Контроль	0.793 (0.784; 0.802)	0.825 (0.818; 0.836)	0.912 (0.905;0.918)
NaHS, 5 мкМ	0.766* (0.757; 0.775)	0.815*# (0.757; 0.775)	0.896*# (0.886; 0.905)
NaHS, 10 мкМ	0.761* (0.756; 0.768)	0.786*# (0.770; 0.798)	0.875*# (0.870; 0.883)
CORM-2, 5 мкМ	0.755* (0.748; 0.760)	0.820*# (0.815; 0.830)	0.882*# (0.905; 0.918)
CORM-2, 10 мкМ	0.746* (0.739; 0.754)	0.788*# (0.774; 0.795)	0.870*# (0.864; 0.879)

Примечание. Данные приведены в виде *Me* (Q_1; Q_3); * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем в каждой группе; # – $p < 0.05$ по сравнению с действием NaHS или CORM-2 в отсутствии редокс-системы «аскорбат–ФМС».

ОБСУЖДЕНИЕ

В течение последних трех десятилетий электрофизиологические исследования показали, что мембрана эритроцитов наделена большим разнообразием ион-транспортных систем, которые участвуют в гомеостазе катионной и, в меньшей степени, анионной проводимости клеток [6, 16]. Известно, что активация K_{Ca}-каналов, способствуя массивной утечке ионов калия наружу из клеток, приводит к их обезвоживанию и сжатию [4, 8].

В настоящем исследовании для стимуляции K_{Ca}-каналов эритроцитов была использована искусственная электронно-донорная система «аскорбат–ФМС». Согласно работе [12], данная система модулирует Ca^{2+}-зависимую калиевую проницаемость мембраны за счет увеличения сродства K_{Ca}-каналов к ионам Ca^{2+}. Однако возможны и другие пути регуляции калиевой проницаемости мембраны эритроцитов, не связанные с ионами кальция. Показано, что добавление аскорбата и ФМС в среду инкубации эритроцитов приводит к образованию редокс-агентов, которые, возможно, оказывают свое влияние на Ca^{2+}-зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов опосредованно через SH-группы [4, 17], которые являются конечным или промежуточным акцептором в электронном транспорте на мембране эритроцитов [18].

Как было установлено в настоящей работе, в присутствии различных концентраций доноров H_2S или CO наблюдается снижение амплитуды ГО мембраны эритроцитов, что свидетельствует о подавлении Ca^{2+}-зависимой калиевой проводимости мембраны и, соответственно, уменьшении потерь ионов калия клеткой. Наиболее вероятными причинами обнаруженного эффекта может быть взаимодействие H_2S или CO с белками канала или его регуляторными белками, в частности протеинкиназами [19]. Отмечено, что для H_2S основными мишенями для передачи сигналов являются окисленное железо, которое в небольшом количестве присутствует в эритроцитах, и тиоловые группы белков. При этом наиболее вероятно образование в клетках производных H_2S персульфида (R-SSH) и полисульфидов (R-SnH) [20, 21], которые оказывают влияние на функциональную активность белков, в том числе и ионных каналов. Также H_2S может вызывать модификацию белков за счет реакций сульфгидрирования, в том числе образования сульфгемоглобина [10]. В то же время, несмотря на высвобождение CO из CORM-2, который связывается с гемоглобином

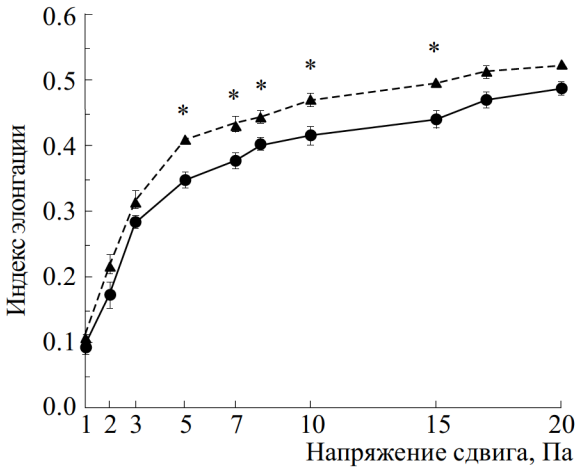


Рис. 2. Влияние NaHS на деформируемость эритроцитов: сплошная линия – изменение индекса элонгации в отсутствие NaHS, пунктирная линия – в присутствии NaHS (10 мкМ); * – $p < 0.05$ по сравнению с показателем в отсутствие донора H2S.

эритроцитов с образованием карбоксигемоглобина (HbCO), отмечается, что содержание HbCO составляет менее 5% [11].

Важно, что стимуляция K_{Ca}-каналов также создает движущую силу для удаления хлора из эритроцитов. В работе [22] было показано, что блокаторы хлорного тока оказывают определенное воздействие на калиевую проницаемость мембраны эритроцитов. В настоящем исследовании блокирование хлорной проводимости мембраны клеток крови с помощью SITS приводило к существенному росту амплитуды гиперполяризационного ответа. Инкубация эритроцитов с донорами H_2S или CO существенно снижала этот эффект. Полученные данные свидетельствуют о влиянии газотрансмиттеров не только на K_{Ca}-каналы, но и на анионный транспорт. Важно отметить, что анион-транспортную функцию осуществляет белок полосы 3 мембраны эритроцитов, который является одним из белков цитоскелета красных клеток крови [15]. Это позволяет предположить, что мишенью для H_2S и CO могут быть и белки цитоскелета эритроцитов, участвующие в регуляции трансмембранного транспорта ионов.

Так же как и в других клетках, в эритроцитах реализуется Ca^{2+}-зависимая передача сигналов не только в обеспечении физиологических параметров, но и для управления биофизическими свойствами, такими как объем клеток и деформируемость [23–25]. В настоящем исследовании спектрофотометрическим методом было показано, что активация K_{Ca}-каналов с помощью искусственной редокс-системы, как и блокирование Cl^-/HCO_3^--обменника, вызывала увеличение показателя оптической плотности суспензии клеток, что может объясняться сжатием эритроцитов. В то же время инкубация эритроцитов с NaHS или CORM-2 нивелировала уменьшение объема клеток, вызванное системой «аскорбат–ФМС» и SITS, что подтверждают данные потенциометрического исследования о роли калиевой и хлорной проводимости в развитии ГО. Также было обнаружено увеличение деформируемости красных клеток крови в присутствии донора H_2S. Учитывая результаты проведенного исследования, можно предположить, что этот эффект связан с влиянием H_2S на ион-транспортные системы клетки, в первую очередь, на K_{Ca}-каналы.

ВЫВОДЫ

Выяснение механизмов воздействия газотрансмиттеров на клетки крови имеет существенное значение не только с позиции получения фундаментального знания о принципах внутри- и межклеточной сигнализации, но и для последующей разработки подходов к управлению газовой коммуникацией.

Полученные данные свидетельствуют, что H_2S и CO оказывают существенное влияние на ион-транспортную функцию мембраны эритроцита. Уменьшение амплитуды редокс-вызванной гиперполяризации мембраны в присутствии газотрансмиттеров имеет важное значение в механизмах регуляции объема и деформируемости эритроцитов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (в рамках научного проекта №19-415-703015) и Совета по грантам Президента Российской Федерации (грант МК-143.2020.4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе соблюдались этические стандарты, разработанные в соответствии с Хельсинкской декларацией (с поправками 2013 г.) и Правилами надлежащей клинической практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г.). Все лица, участвующие в исследовании, дали информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Huisjes, A. Bogdanova, W. W. van Solinge, et al., Front. Physiol. 9, 656 (2018).
2. H. Guizouarn, N. Gabillat, R. Motais, and F. Borgese, J. Physiol. 535 (Pt 2), 497 (2001).
3. A. Bogdanova, A. Makhro, J. Wang, et al., Int. J. Mol. Sci. 14, 9848 (2013).
4. A. D. Maher and P. W. Kuchel, Int. J. Biochem. Cell Biol. 35 (8), 1182 (2003).
5. F. Lang, E. Lang, and M. Föller, Transfus. Med. Hemother. 39 (5), 308 (2012).
6. S. L. Thomas, G. Bouyer, A. Cueff, et al., Blood Cells, Molecules & Diseases 46 (4), 261 (2011).
7. J. S. Gibson, A. R. Cossins, and J. C. Ellory, J. Exp. Biol. 203 (Pt 9), 1395 (2000).
8. A. Bogdanova, M. Berenbrink, and M. Nikinmaa, Acta Physiol. 195, 305 (2009).
9. S. V. Gusakova, I. V. Kovalev, Y. G. Birulina, et al., Biophysics 62 (2), 220 (2017).
10. E. Dongó, G. Beliczai-Marosi, A. S. Dybvig, and L. Kiss, Nitric Oxide 81, 75 (2018).
11. I. Barbagallo, G. Marrazzo, A. Frigiola, et al., Curr. Pharm. Biotechnol. 13 (6), 787 (2012).

12. I. Bernhardt and J. C. Ellory, *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease* (Springer, Berlin, 2013).
13. S. P. Srinivas, J. A. Bonanno, E. Lariviere, et al., Pflugers Arch. 447 (1), 97 (2003).
14. S. Shin, Y. Ku, M. S. Park, and J. S. Suh, *Korea Australia Rheology Journal 16* (2), 85 (2004).
15. A. C. Kalli and R. A. F. Reithmeier, PLOS Comput. Biol. 14 (7), 1 (2018).
16. А. А. Платонова, С. В. Кольцова, Г. В. Максимов и др., Биофизика 58 (3), 501 (2013).
17. А. В. Ситожевский, И. В. Петрова, С. В. Кремено и др., Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова 92 (4), 461 (2006).
18. Y. Yang, X. Jin, and C. Jiang, Antioxid. Redox Signal. 20 (6), 937 (2014).
19. B. Del Carlo, M. Pellegrini, and M. Pellegrino, Biochim. Biophys. Acta 1612 (1): 107 (2003).
20. C. L. Bianco, A. Savitsky, M. Feelisch, and M. M. Cortese-Krott, Biochem. Pharmacol. 149, 163 (2018).
21. M. L. Jennings, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 305, C941 (2013).
22. Y. V. Kucherenko, L. Wagner-Britz, I. Bernhardt, and F. Lang, J. Membr. Biol. 246 (4), 315 (2013).
23. E. Lang, S. M. Qadri, K. Jilani, et al. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 111 (5), 348 (2012).
24. С. Н. Орлов, И. В. Петрова, Н. И. Покудин и др., Биол. мембраны 9 (9), 885 (1992).
25. A. Dyrda, U. Cytlak, A. Ciuraszkiewicz, et al., PLoS One **5** (2), e9447 (2010).

The Effects of Gasomediators on the Ca^{2+}-Dependent Potassium Permeability of the Red Blood Cells Membrane

I.V. Petrova*, Yu.G. Birulina*, S.N. Belyaeva, O.A. Trubacheva*, **, A.V. Sidekhmenova***, L.V. Smagliy*, I.V. Kovalev*, and S.V. Gusakova***

**Siberian State Medical University, Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634050 Russia*

***Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Kievskaya ul. 111a, Tomsk, 634012 Russia*

****Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lenina 3, Tomsk, 634028 Russia*

We investigated the effects of gasomediators H_2S and CO on Ca^{2+}-dependent potassium channels and an anion exchanger, which participate in the induction of a hyperpolarization response of the erythrocyte membrane and also play an important role in regulation. We showed that in the presence of H_2S and CO donors, the amplitude of redox-stimulated membrane hyperpolarization decreases significantly due to a decrease in the activity of Ca^{2+}-dependent potassium channels. In addition, it was found that gasomediators eliminate the compression of red blood cells observed during activation of Ca^{2+}-dependent potassium channels or inhibition of the anion exchanger. It was shown that the H_2S donor significantly increases the deformability of red blood cells.

Keywords: erythrocytes, carbon monoxide, hydrogen sulfide, Ca^{2+}-dependent potassium channels, anion exchanger, deformability

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 728–734

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 612.179.1

ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ НА ГЕНЕРАЦИЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ИМПУЛЬСОВ У КЛЕТОК ВОДИТЕЛЯ РИТМА ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ ДЕСЯТИСУТОЧНОГО КУРИНОГО ЭМБРИОНА

© 2020 г. Е.А. Лебедева, В.А. Головко

Институт физиологии – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Коми научный центр УрО РАН», 167982, Республика Коми, Сыктывкар, ул. Первомайская, 50

E-mail: lebedeva.physiol.komisc@ya.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.
После доработки 29.04.2020 г.
Принята к публикации 05.05.2020 г.

Клеточные механизмы автоматизма и вклад различных ионных каналов сердца эмбрионов мало исследованы. В данной работе представлены результаты изучения эффектов специфических ингибиторов ионных каналов на генерацию потенциалов действия клеток водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона. Выявлено, что исключение ионов кальция из внеклеточного раствора или экспозиция блокатора Ca^{2+}-каналов L-типа нифедипина (10 мкМ) не вызывало ингибирование генерации потенциалов действия и приводило к повышению частоты инициации электрических импульсов на 45%. Рианодин, агонист Ca^{2+}-каналов саркоплазматического ретикулума., также оказывал положительный хронотропный эффект. Аппликация лидокаина приводила к отрицательному хронотропному эффекту и вызывала ингибирование генерации электрических импульсов. Заключили, что роль чувствительных к рианодину Ca^{2+}-каналов саркоплазматического ретикулума и Ca^{2+}-каналов L-типа не является определяющей для поддержания автоматизма клеток правого предсердия десятисуточных куриных эмбрионов, сердце которых уже имеет четыре камеры, но синоатриальный узел не сформирован полностью и морфофункциональное созревание центральной нервной системы еще не завершено. Тот факт, что лидокаин подавлял, а нифедепин не подавлял генерацию потенциалов действия, свидетельствует о существенном вкладе Na^{+}-тока в формирование автоматизма.

Ключевые слова: ионные каналы, автоматизм, рианодин, нифедипин, лидокаин, сердце, эмбрион, курица.

DOI: 10.31857/S0006302920040134

Синоатриальный узел, расположенный в области впадения верхней полой вены в правое предсердие, в норме задает ритм работы сердца. Нарушение функции синоатриального узла сопряжено с риском развития аритмий, сердечной недостаточности, фибрилляции предсердий и угрожающих жизни состояний, в том числе синдрома внезапной смерти [1]. В последнее десятилетие ведутся интенсивные исследования в области клеточной терапии, изучения эмбриональных стволовых клеток или других типов клеток, способных дифференцироваться в кардиомиоциты, которые могут способствовать разработке биологических водителей ритма как альтернативы или дополнения к методу электростимуляции сердца [2]. В связи с этим необходимо глубже понимать процессы функционирования сердца, включая эмбрионов [3]. Изучение механизмов автоматизма эмбрионального сердца может позволить выявить причины врожденных сердечных патологий.

Считают, что высвобождение Ca^{2+} через кальциевые рианодин-чувствительные каналы (RyR-каналы) способствует медленной диастолической деполяризации и имеет решающее значение для генерации автоматизма сердца взрослых животных [4–6]. Данный процесс был назван «Ca^{2+}-часами» (Ca^{2+}-clock). Его пусковым механизмом являются внутриклеточные осцилляции ионов кальция и протекающий по Ca^{2+}-каналам L-типа ионный ток [6–9]. У клеток водителя ритма синоатриального узла кролика выраженность эффектов рианодина (агониста RyR-каналов) и нифедипина (блокатора Ca^{2+}-каналов L-типа) обусловлена снижением частоты генерации по-

Сокращения: RyR–каналы – кальциевые рианодин-чувствительные каналы, ПД – потенциал действия, dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации, МДД – медленная диастолическая деполяризация.

тенциалов действия (ПД) вплоть до полного прекращения электрической активности [5, 6].

Клеточные механизмы, ответственные за спонтанное сокращение и электрическую возбудимость в эмбриональном сердце, изучены недостаточно, и имеющиеся экспериментальные данные во многом противоречивы. Полученные результаты свидетельствуют о роли внутриклеточных колебаний концентрации цитозольного Ca^{2+} и состояния RyR-каналов [9]. Вместе с тем имеются данные об их незначительном вкладе в процесс инициации импульса [10]. Ключевую роль отводят Ca^{2+}-току L-типа и току, активируемому гиперполяризацией (I_f, «funny» ток) [5–8]. Интересно отметить, что в отличие от взрослых, рианодин не оказывал влияния на спонтанную генерацию ПД венозного синуса у молодых лягушек [11]. Все это позволяет предположить, что механизмы инициации электрических импульсов в эмбриональном сердце отличаются от таковых в сердце взрослых животных.

Цель данной работы была изучить эффекты ингибиторов ионных каналов на генерацию пейсмекерных потенциалов действия у клеток правого предсердия 10-суточных эмбрионов кур и рассмотреть вклад RyR- и Ca^{2+}-каналов L-типа в формирование электрических импульсов. Дополнительно мы проанализировали эффекты гипокальциевых растворов.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на спонтанно сокращающихся препаратах правого предсердия 10–суточных куриных эмбрионов (n = 25). На этом сроке эмбрионального развития сердце куриного зародыша уже имеет четыре камеры, но синоатриальный узел не сформирован полностью, а морфофункциональное созревание центральной нервной системы еще не завершено. Поэтому генерация автоматизма регулируется в основном изменениями ионного состава околоклеточной среды.

Сердце извлекали и помещали в аэрированный солевой раствор следующего состава (мМ/л): NaCl – 140, $NaHCO_3$ – 10, KCl – 5.4, $CaCl_2$ – 1.8, $MgSO_4$ – 1, Na_2HPO_4 – 0.33, глюкоза – 10, HEPES – 5, pH 7.4; удаляли желудочки и левое предсердие, правое предсердие вскрывали. Спонтанно сокращающийся препарат правого предсердия размером 3 × 3 мм помещали в проточную, аэрируемую, термостатируемую камеру с солевым раствором (31 ± 1°C). Потенциалы действия регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники со стороны субэндокарда.

В качестве ингибитора каналов Ca^{2+}-тока L-типа использовали нифедипин, для оценки вклада Ca^{2+}-каналов саркоплазматического ретикулума – рианодин. Роль Na^+-каналов была оценена с помощью специфического блокатора лидокаина.

В первой серии экспериментов ($n_{сердец}$ = 6) в контрольном растворе снижали концентрацию внеклеточного кальция на 50%. Через 15 мин добавляли раствор, не содержащий ионов кальция. Эффекты регистрировали в течение 30 мин. Затем препарат промывали нормальным раствором до тех пор, пока частота генерации и конфигурация ПД не восстанавливались до контрольных значений (в течение 20–30 мин). После этого добавляли нифедипин – ингибитор каналов Ca^{2+}-тока L-типа. Препарат экспонировали в растворе с нифедипином в течение 60 мин (n = 5).

Для оценки роли токов каналов саркоплазматического ретикулума добавляли рианодин в концентрации 1 мкМ. В течение 60 мин регистрировали ПД. В данной серии опытов были использованы пять препаратов от пяти эмбрионов.

Вклад Na^+-каналов в генерацию ПД оценивали с помощью специфического блокатора – лидокаина. В перфузирующий раствор сначала добавляли лидокаин в концентрации 20 мкМ и экспонировали около 20 мин. После отмывки и восстановления электрофизиологических параметров до контрольного уровня (30 мин) добавляли блокатор в концентрации 100 мкМ. К свежим полоскам добавляли лидокаин в концентрации 500 мкМ (n = 9).

Все компоненты солевого раствора были производства фирмы ROTH (Германия), блокаторы ионных токов – Sigma-Aldrich (США).

Обработку результатов проводили в программе PowerGraph Professional версии 3.3 (ООО «ДИСофт», Россия) и с помощью оригинальной программы вычисления параметров потенциалов в программной среде Delphy, разработанных д.б.н. Н.В. Артеевой. Данные приведены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Значимость различий определяли по U-критерию Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольном растворе от трабекулы правого предсердия в области синоатриального кольца сердца куриного эмбриона со стороны субэндокарда зарегистрированы ПД с медленной диастолической деполяризацией. Частота генерации спонтанных ПД у препаратов составила 166 ± 15 имп/мин, а скорость фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{max}) варьировала от 44 до 170 В/с и в среднем составила 99 ± 37 В/с (таблица; рисунок, а).

Электрофизиологические параметры ПД в контроле и при действии блокаторов ионных каналов и раствора, не содержащего Ca^{2+}, у клеток, работающих в режиме водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона

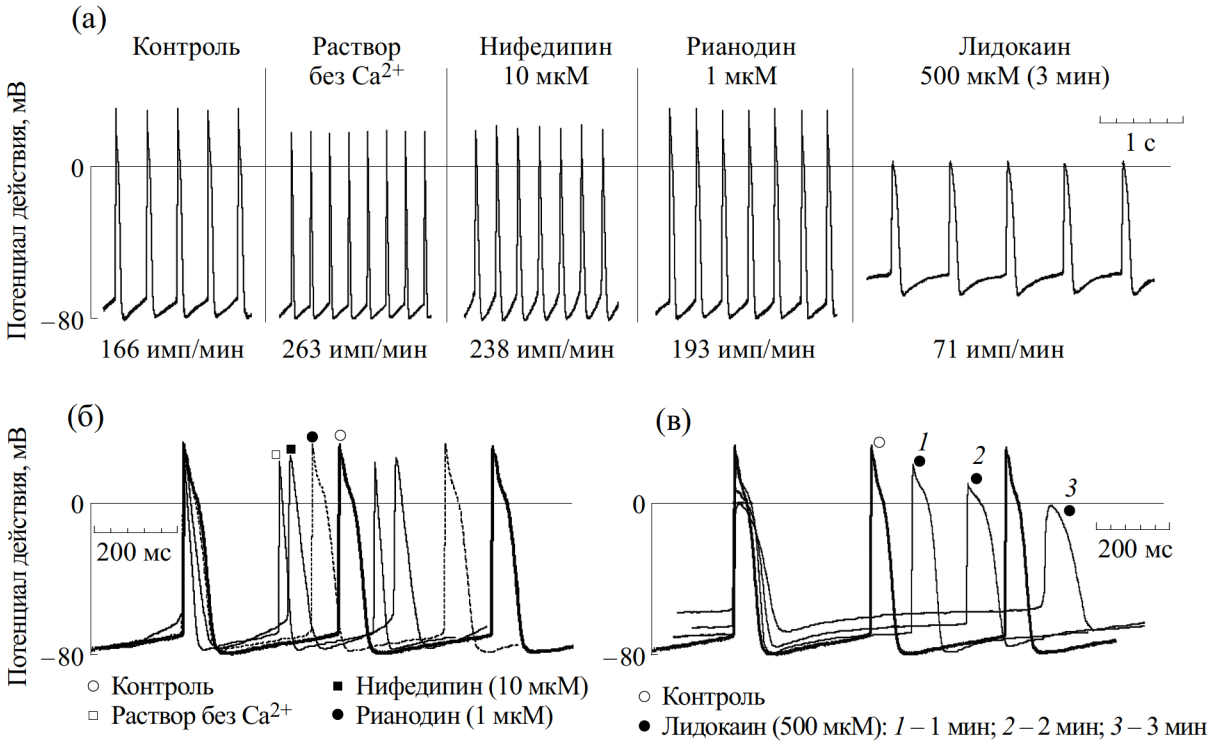
Параметры ПД	Общий контроль, $n = 25$	Нифедипин 10 мкМ, $n = 5$	Раствор без Ca^{2+}, $n = 6$	Рианодин 1 мкМ, $n = 5$	Лидокаин 500 мкМ, $n = 9$
E_{max}, мВ	–75 ± 7	–78 ± 8	–77 ± 8	–77 ± 5	–64 ± 14
АПД, мВ	99 ± 10	95 ± 7	100 ± 10	99 ± 12	69 ± 13*
$ДПД_{20}$, мс	42 ± 19	24 ± 7*	18 ± 2*	30 ± 13	65 ± 14*
$ДПД_{90}$, мс	87 ± 20	67 ± 11*	65 ± 14*	72 ± 13*	124 ± 19*
ЧСС, имп/мин	166 ± 15	235 ± 41*	236 ± 40*	197 ± 16*	88 ± 16*
МДД, мс	249 ± 35	151 ± 39*	184 ± 50*	205 ± 31*	546 ± 146*
dV/dt_{max}, В/с	99 ± 37	76 ± 27	105 ± 37	83 ± 36	16 ± 10*
V_4, мВ/с	43 ± 17	79 ± 31*	38 ± 20	68 ± 19*	37 ± 17

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; *АПД* – амплитуда ПД; $ДПД_{20}$ и $ДПД_{90}$ – длительность потенциала действия на уровне 20 и 90% реполяризации; *ЧСС* – частота генерации ПД; *МДД* – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V_4 – скорость фазы медленной диастолической деполяризации; n – количество препаратов; * –достоверность различий по сравнению с контролем $p < 0.05$.

Эффекты внеклеточной концентрации Ca^{2+}. Снижение $CaCl_2$ в солевом растворе от 1.8 до 0.9 мМ ($n = 6$) приводило к повышению частоты генерации ПД на 20%. Раствор без Ca^{2+} ($n = 6$) повышал частоту генерации ПД на 45% по сравнению с контролем. При этом регистрировали укорочение фазы медленной диастолической деполяризации (МДД) и длительности пика ПД на уровне 90% реполяризации на 25%. Нарушения ритмической активности или прекращения генерации электрической импульсов у препаратов правого предсердия куриного эмбриона при выведении Ca^{2+} из внеклеточного раствора не зарегистрировали (рисунок, а,б; таблица).

Эффекты нифедипина. При экспозиции нифедипина ($n = 6$), блокатора Ca^{2+}-каналов L-типа, регистрировали увеличение частоты генерации ПД на 40% по сравнению с контролем. Эффект был обусловлен укорочением фазы МДД на 40% и длительности пика потенциала действия на уровне 90% реполяризации – на 23%. Амплитудные параметры ПД достоверно не изменялись. Электрическая активность препаратов сохранилась даже при продолжительной экспозиции блокатора (~ 60 мин). Таким образом, нифедипин в концентрации 10 мкМ вместо ожидаемого снижения и ингибирования ПД способствовал значительному повышению частоты генерации ПД (рисунок, а,б; таблица).

Эффекты рианодина. Выявлено, что агонист RyR-каналов рианодин в концентрации 1 мкМ ($n = 10$) на пятой минуте экспозиции приводил к увеличению частоты генерации ПД на 20% за счет укорочения длительности фазы МДД (на 18%) и пика потенциала действия на уровне 90% реполяризации – на 17%. Эффект сохранялся при продолжительной экспозиции рианодина (~ 60 мин). Нарушений ритмической активности или прекращения генерации ПД у препаратов правого предсердия куриного эмбриона не зарегистрировано (рисунок, а,б; таблица).



Эффекты блокаторов ионных каналов и раствора, не содержащего Ca^{2+}, на генерацию электрических импульсов у клеток, работающих в режиме водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона. (а) – Изменение генерации ПД в контроле, при добавлении солевого раствора, не содержащего Ca^{2+}, экспозиции 10 мкМ нифедипина, 1 мкМ рианодина и 500 мкМ лидокаина (3 мин). (б) – Повышение частоты генерации электрических импульсов у клеток куриного эмбриона в растворе без кальция при добавлении нифедипина (10 мкМ) и рианодина (1 мкМ). (в) – Развитие эффектов лидокаина (500 мкМ) на конфигурацию ПД клеток правого предсердия куриного эмбриона.

Эффекты лидокаина. Нами установлено, что пороговая концентрация лидокаина для работающих в режиме водителя ритма клеток куриного эмбриона составляет ~ 20 мкМ. Повышение концентрации лидокаина от 20 до 100 мкМ ($n = 5$) вызывало снижение скорости нарастания переднего фронта ПД dV/dt_{max} на 30% и замедление частоты генерации ПД на 30% за счет увеличения длительности фазы МДД. При добавлении в экспериментальную камеру раствора с лидокаином в концентрации 500 мкМ ($n = 9$) регистрировали монотонное снижение амплитуды ПД примерно на 30% (от 99 ± 10 мВ до 69 ± 13 мВ) и замедление dV/dt_{max} в 6 раз (от 99 ± 37 В/с до 16 ± 10 В/с) по сравнению с контролем. Длительность фазы МДД увеличивалась в два раза, в среднем на 20 мВ смещался потенциал порога (от −64 ± 8 мВ до −44 ± 12 мВ). В результате скорость МДД (фаза V_4) достоверно не изменялась. Длительность пика ПД на уровне 20 и 90% реполяризации увеличивалась на 40–55% (рисунок, а,в; таблица). Частота генерации импульсов снижалась почти в два раза. В 70% случаев экспозиция лидокаина приводила к полному ингибированию генерации электрических импульсов. Эффекты лидокаина обратимы.

Анализ полученных результатов показал, что ингибирование Ca^{2+}-каналов L-типа, RyR-каналов или выведение ионов кальция из омывающего раствора не приводит к нарушению электрической активности или прекращению генерации ПД клеток правого предсердия десятисуточных эмбрионов кур. В то же время блокатор Na^+-каналов лидокаин вызывал замедление частоты генерации спонтанных импульсов и в высоких концентрациях – полное ингибирование генерации ПД.

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе обсуждаются две основные гипотезы механизма медленной диастолической деполяризации: «мембранные» часы, в основе которых лежат протекающие ионные токи через мембрану сарколеммы, в частности активируемый гиперполяризацией ток (I_f) [12, 13]; и механизм «Ca^{2+}-часов», самопроизвольное высвобождение

$[Ca^{2+}]_i$ из саркоплазматического ретикулума через рианодин-чувствительные каналы [13–15].

Роль «Ca^{2+}-часов» в генерации автоматизма клеток сердца куриного эмбриона. Основанием для появления гипотезы «Ca^{2+}-часов» было выявление сходства динамики изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и конфигурации пейсмекерных ПД [4, 6]. Основой этого механизма генерации спонтанных импульсов являются осцилляции ионов кальция из саркоплазматического ретикулума через рианодиновые каналы (RyRs). После начальной деполяризации сарколеммы поступление Ca^{2+} через кальциевые каналы L-типа ($I_{Ca,L}$) индуцирует лавинообразный выброс кальция из депо и, возможно, запускает деполяризующий мембрану Na/Ca-обменный механизм [8, 15]. На основе экспериментальных данных, полученных на синоатриальном узле млекопитающих, были разработаны математические модели, в которых «Ca^{2+}-часы» играют ключевую роль в формировании автоматизма. Эти модели хорошо воспроизводят замедление частоты генерации ПД вплоть до полной остановки при аппликации рианодина или ингибировании Ca^{2+}-тока L-типа, вызывающих нарушение гомеостаза ионов кальция [6–8].

У эмбрионального сердца курицы при ингибировании Ca^{2+}-каналов L-типа нами был зарегистрирован феномен сохранения спонтанной электрической активности предсердия, сопровождающийся повышением частоты генерации ПД. Ранее на желудочке эмбрионов мыши и крысы при добавлении нифедипина 10 и 100 мкМ было зарегистрировано незначительное (на 3–7%) увеличение частоты генерации ПД [16]. Положительный хронотропный эффект нифедипина, рианодина и гипокальциевых растворов на генерацию ПД пейсмекерных клеток эмбрионального сердца противоречит существующей парадигме и не может быть описан имеющимися числовыми моделями.

Наши результаты показывают, что нарушение функционирования RyR-каналов, ингибирование Ca^{2+}-каналов L-типа или выведение ионов кальция из раствора не приводит к аритмиям или прекращению генерации электрических импульсов. Мы полагаем, что RyR-каналы, экспрессируемые на ранних стадиях эмбриогенеза [17], еще не находятся в тесном взаимодействии с Ca^{2+}-каналами L-типа и их вклад в инициацию электрической активности клеток эмбрионального сердца не является принципиальным.

Роль «мембранных часов» в генерации автоматизма. Роль тока, активируемого гиперполяризацией (I_f, «funny» ток), в генерации электрической активности продемонстрирована экспериментально на разных видах взрослых грызунов [18–21]. Разработанная авторами работы [22] математическая модель корректно описала влияние ионов цезия и ивабрадина – ингибиторов активируемого гиперполяризацией тока (I_f), на морфологию ПД клеток синоатриального узла взрослых животных. Ток I_f зарегистрирован на ранних стадиях эмбриогенеза в отдельных клетках желудочка и предсердия эмбрионального сердца мыши [3, 24]. По мнению авторов, данный ток участвует в генерации спонтанной активности клеток желудочка в течение первой недели эмбрионального развития мыши и исчезает незадолго до ее рождения. Попытка зарегистрировать ток I_f у предсердия семисуточного куриного эмбриона была предпринята в работе [23], но по признанию самих авторов она оказалась неудачной. Полагаем, что в клетках предсердия десятисуточного куриного эмбриона ток, активируемый гиперполяризацией, участвует в генерации фазы МДД. Мы провели исследование вклада HCN-каналов, по которым протекает ток I_f, в генерирование электрических импульсов клетками правого предсердия куриного эмбриона [25]. Согласно полученным данным, роль тока I_f в формировании автоматизма сердца десятисуточного эмбриона незначительна. Специфические блокаторы HCN-каналов (ивабрадин и ионы цезия) либо не вызывали достоверного эффекта, либо повышали частоту генерации ПД в среднем на 15% по сравнению с контролем. Следовательно, ток I_f участвует в генерации ПД клеток предсердия, но его вклад в спонтанную электрическую активность не является определяющим. Это следует учитывать при оптимизации математических моделей генерации ПД эмбрионального сердца куры.

Роль Na^+-токов в инициации электрической активности. Полученные нами результаты и литературные данные [16, 25] позволяют заключить, что механизмы «мембранных» и «кальциевых» часов, лежащие в основе автоматизма у взрослых животных, в эмбриональном сердце курицы еще только начинают формироваться. По-видимому, имеет место пространственно-временная разобщенность саркоплазматического ретикулума и базальной мембраны [11]. Поэтому они не вносят значительного вклада в генерацию электрической активности пейсмекерных клеток куриных эмбрионов. Мы выявили, что блокирование тока через Na^+-каналы приводит к прекращению

электрической активности клеток предсердия десятисуточных куриных эмбрионов. Это позволяет предположить, что Na^+-каналы, чувствительные к лидокаину, не только участвуют, но и играют ключевую роль в формировании их автоматизма. В зависимости от концентрации лидокаин вызывал замедление частоты генерации ПД вплоть до полной остановки электрической активности. Это сопровождалось увеличением длительности фазы МДД и монотонным замедлением скорости нарастания переднего фронта ПД (dV/dt_{max}). Следует отметить, что прекращение генерации электрических импульсов в эмбриональном сердце курицы наблюдали при аппликации более низкой концентрации лидокаина (500 мкМ), чем у клеток водителя ритма синоатриальной области у взрослых животных (1000 мкМ) [26].

Вероятно, существуют некие механизмы, компенсирующие ингибирование Ca^{2+}-каналов L-типа. В пользу такого предположения свидетельствует сохранение автоматизма при действии нифедипина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами анализ экспериментальных данных позволяет заключить, что роль RyRs-каналов и Ca^{2+}-каналов L–типа не является определяющей для поддержания автоматизма клеток правого предсердия десятисуточных куриных эмбрионов, сердце которых уже имеет четыре камеры, но синоатриальный узел не сформирован полностью, а морфофункциональное созревание центральной нервной системы еще не завершено. Тот факт, что лидокаин подавлял генерацию ПД, а нифедепин не подавлял электрическую активность, свидетельствует о существенном вкладе натриевого тока в формирование автоматизма.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ мол_а № 18-34-00654, № ГР АААА-А17-117012310152-2 и НИР № ГР АААА-А17-117012310154-6.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальный протокол соответствовал международными правилам «Для использования лабораторных животных» (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8-е издание, опубликованным National Academics Press (США) в 2011 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Glynn, B. Onal, and T. J. Hund, PLoS One **9** (2), 1 (2014).
2. M. R. Rosen, R. B. Robinson, P. Brink, et al., Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol. **280** (2), 1046 (2004).
3. T. Opthof, Med. Biol. Eng. Comput. **45** (2), 119 (2007).
4. K. Y. Bogdanov, V. A. Maltsev, and T. M. Vinogradova, Circ. Res. **99** (9), 979 (2006)
5. T. M. Vinogradova and E. G. Lakatta, J. Mol. Cell. Cardiol. **47** (4), 456 (2009).
6. V. A. Maltsev and E. G. Lakatta, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **296** (3), 594 (2009).
7. А. Д. Хохлова, Р. А. Сюняев, А. М. Рывкин и др., Биофизика **61**, 906 (2016).
8. A. E. Lyashkov, J. Behar, E. G. Lakatta, et al., Biophys. J. **114** (5), 1176 (2018)
9. P. Sasse, J. Zhang, L. Cleemann, et al., J. Gen. Physiol. **130** (2), 133 (2007).
10. F. J. Martinsen, Dev. Dyn. **233**, 1217 (2005).
11. В. А. Головко, Журн. эволюц. биохимии и физиологии **42**, 335 (2006).
12. D. DiFrancesco and D. Noble, Heart Rhythm. **9** (2), 299 (2012).
13. E. G. Lakatta and D. J. DiFrancesco, Mol. Cell. Cardiol. **47**, 157 (2009).
14. T. M. Vinogradova, Y. Y. Zhou, V. Maltsev, et al., Circ. Res. **94** (6), 802 (2004).
15. E. G. Lakatta, V. A. Maltsev, and T. M. Vinogradova, Circ. Res. **106** (4), 659 (2010).
16. M. F. Nilsson, A. C. Sköld, A. C. Ericson, et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. **272** (2), 306 (2013).
17. S. M. Dutro, J. A. Airey, C. F. Beck, et al., Dev. Biol. **155** (2), 431 (1993).
18. K. Ono, S. Shibata, and T. Iijima, J. Smooth Muscle Res. **39**, 195 (2003).
19. M. Baruscotti and D. DiFrancesco, Ann. N. Y. Acad. Sci. **1015**, 111 (2004).
20. A. O. Verkerk, R. Wilders, M. M. van Borren, et al., Eur. Heart J. **28**, 2472 (2007).
21. М. А. Гонотков и В. А. Головко, Бюлл. эксперим. биологии и медицины **152** (8), 128 (2011).
22. S. Severi, M. Fantini, L. A. Charawi, et al., J. Physiol. **590** (18), 4483 (2012).
23. R. M. Brochu, J. R. Clay, and A. Shrier, J. Physiol. **454**, 503 (1992).
24. C. Okubo, H. I. Sano, Y. Naito, et al., J. Physiol. Sci. **63** (5), 355 (2013).
25. Е. А. Лебедева, М. А. Гонотков и В. А. Головко, Междунар. журн. прикл. и фундамент. исследований **1**, 120 (2019).
26. Е. А. Лебедева, Изв. Коми науч. центра УрО РАН **3** (15), 58 (2013).

Effects of Ion Channel Inhibitors on the Generation of Electrical Impulses in Right Atrial Pacemaker Cells of a 10-Day-Old Chicken Embryo

E.A. Lebedeva and V.A. Golovko

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

The mechanisms of pacemaker cells activity and the contribution of various ion channels of the heart of embryos are not yet fully understood. This paper presents the results of the experiment on the study of the effects of specific ion channel inhibitors on the generation of action potentials in pacemaker cells of the chicken embryo right atria. It was found that the exclusion of calcium ions from the extracellular solution or the strip exposure to 10 mM nifedipine (L-type Ca^{2+} channel blocker) did not inhibit the generation of action potentials but led to an increase in the frequency of electrical impulses initiation by 45%. Ryanodine, an agonist of Ca-channels of the sarcoplasmic reticulum, also had a positive chronotropic effect. Application of lidocaine led to a negative chronotropic effect and caused inhibition of the generation of electrical impulses. We concluded that the role of sarcoplasmic reticulum calcium channels which are sensitive to ryanodine (RyR-channels) and L-type Ca^{2+} channels is not crucial for maintaining the pacemaker activity in the right atrial cells of 10-day-old chicken embryos with a four-chambered heart, not fully formed sinoatrial node, and the central nervous system of which not yet attained morphofunctional maturity. Our results show that lidocaine did, but nifedepine did not inhibit action potentials generation, indicating that the sodium current contributes significantly to the pacemaker activity.

Keywords: ion channels, automaticity, ryanodine, nifedipine, lidocaine, heart, embryo, chicken

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 735–740

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

СНИЖЕНИЕ ПРОДУКЦИИ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В НЕЙТРОФИЛАХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ «НУЛЕВОГО» МАГНИТНОГО ПОЛЯ

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

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

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.
После доработки 21.04.2020 г.
Принята к публикации 07.05.2020 г.

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле, создаваемом системой магнитных экранов (остаточное постоянное магнитное поле не более 20 нТл), приводит к существенному снижению интенсивности их люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Добавка в среду для инкубации ингибитора NADPH-оксидазы, дифенилйодония, приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (геомагнитное поле). При этом различия между группами, обусловленные действием «нулевого» поля, проявляются, как при меньших концентрациях дифенилйодония (2.5, 5, 10 мкМ), так и при больших его концентрациях (50, 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. В отличие от этого добавка 2,4-динитрофенола, разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях, начиная с концентрации 5 мкМ и далее вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами, которые проявлялись при более низких концентрациях этого ингибитора и в его отсутствие.

Ключевые слова: нейтрофилы, нулевое магнитное поле, супероксидный-анион радикал, хемилюминесценция, люцигенин, NADPH-оксидаза, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0006302920040146

В литературе сообщается о снижении продукции активных форм кислорода (АФК) в гипомагнитных условиях в различных типах клеток [1–4]. Ранее нами было показано, что экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомагнитных условиях вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидродамина 123 [5–7]. Учитывая то, что этот эффект действия гипомагнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции химическими активаторами респираторного взрыва и, следовательно, не был обусловлен нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы, нами с целью определения возможных молекулярных механизмов действия «нулевого» поля был проведен комплекс специальных исследований на неактивированных нейтрофилах [6]. Было показано, что снижение интенсивности процессов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина в неактивированных нейтрофилах в гипомагнитных условиях не зависит от кальций-опосредованных регуляторных механизмов, о чем свидетельствует отсутствие действия внутриклеточного хелатора ионов кальция (ацетоксиметилового эфира 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N′-тетрауксусной кислоты) на интенсивность этого процесса [6]. Это снижение вряд ли обусловлено влиянием гипомагнитных условий на фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы, так как добавка ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-6233) практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлордигидрофлуоресцеина [6]. Добавка ингибитора фосфолипазы С (U73122) немного и приблизительно одинаково снизила продукцию АФК как в контроле, так и в опыте [6]. О возможном участии электронтранспортной цепи митохондрий в механизме этого эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК при добавке ротенона, значительно более выраженное в

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, МП – магнитное поле, САР – супероксидный анион-радикал.

опытных образцах, подвергшихся действию гипомагнитного поля [6].

Все вышеперечисленные результаты были получены методом флуоресцентной спектроскопии при использовании интенсивно реагирующих, но неселективных к определенным формам АФК флуоресцентных зондов (2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата и дигидродамина 123) [8–10]. В данной работе для оценки радикалпродуцирующей способности нейтрофилов после действия «нулевого» поля мы применили другой метод – метод активированной хемилюминесценции с использованием селективного зонда на супероксид-анион – люцигенина [11, 12]. Также на этой экспериментальной модели с целью определения возможных источников продукции супероксида, реагирующих на действие гипомагнитного поля, мы применили ингибиторный анализ с использованием ингибитора NADPH-оксидазы дифенилйодония [13, 14] и разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях 2,4 динитрофенола [15, 16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей самцов линии CD-1 массой 24–26 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино, Московская область). В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/ мл (Zymozan A из *Saccharomyces carevisiae*, Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, их брюшную полость промывали четырьмя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 *g*. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 4 мл безкальциевого раствора Хенкса и оставляли на 1 ч при 4°C. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%. Для опытов образцы получали, разводя суспензию нейтрофилов стандартной средой Хенкса (138 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ $MgSO_4$, 1 мМ Na_2HPO_4, 5 мМ $NaHCO_3$, 5,5 мМ глюкозы, 1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в «нулевом» и слабом постоянном магнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при 37.0 ± 0.2°C в концентрации 1 млн/мл по 0.25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметром 1.2 см и длиной 5.5 см), в которых затем измеряли хемилюминесценцию. Типичное время инкубации составляло 40 мин. Заданную температуру поддерживали циркуляционным термостатом.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними. Опытные образцы помещали в установку для формирования гипомагнитных условий.

В опытах была использована специальная исследовательская установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления геомагнитного поля – до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 20 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [7, 17]. Она состоит из трех вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм). Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Для формирования экспериментального слабого однородного постоянного магнитного поля (МП) внутри этой установки был установлен специальный индуктор (соленоид), подключенный к источнику постоянного тока – для формирования слабого постоянного МП различной интенсивности (2.5, 7.0, 44 мкТл), используемого в ряде опытов. Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр участка 20 см, длина – 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее шести). Опыты повторяли не менее трех раз.

До начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: ингибитор NADPH-оксидазы хлорид дифенилйодония (Sigma, США) в различных концентрациях (2.5, 5.0, 10, 20, 50 и 100 мкМ), предварительно растворенный в диметилсульфоксиде (Sigma, США); а также разобщитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол (Sigma, США) в различных концентрациях (1.0, 4.0, 5.0, 10, 20, 200 мкМ и 2 мМ), также предварительно растворенный в диметилсульфоксиде. Отдельно проверяли действие самой добавки диметилсульфоксида в конечной концентрации 1 мМ, соответствующей его присутствию в пробе с содержанием 10 мкМ дифенилидония или 20 мкМ 2,4-динитрофенола. В ряде опытов эти ингибиторы вносили в пробы не до начала

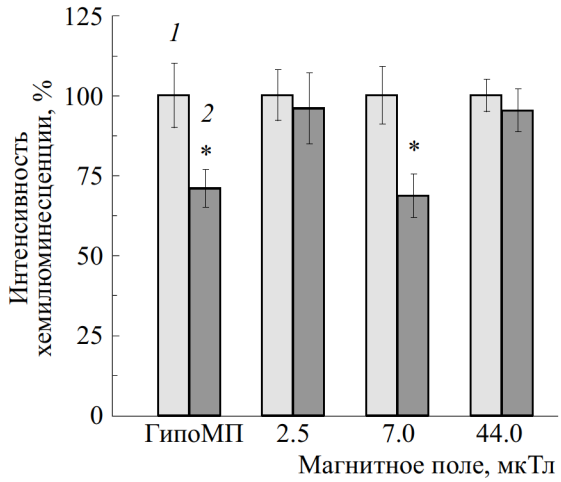


Рис. 1. Влияние постоянного МП на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов. По оси абсцисс – величина постоянного МП в мкТл, по оси ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, n = 8). Гипомагнитное поле (ГипоМП) соответствует постоянному МП не более 0.02 мкТл; *1* – контроль, *2* – опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

инкубации, а сразу после нее, но до введения люцигенина и регистрации хемилюминесценции.

Регистрация хемилюминесценции. После инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0.35 мМ. Для измерений использовали хемилюминометр Lum-1200 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применяли программу PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%. Результаты измерений были статистически обработаны с применением t–критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле приводит к существенному снижению интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции (приблизительно на 30%) (рис. 1 и 2). При увеличении постоянного поля до 2.5 мкТл этот эффект не проявляется, при 7 мкТл снова возникает и исчезает при 44 мкТл (значение соответствует величине постоянного МП в контроле) (рис. 1). Такой мультипиковый (полиэкстримальный) характер зависимости ответа на слабое постоянное МП отмечался нами и ранее в опытах на нейтрофилах при регистрации продукции АФК методом флуоресценции [7], а также на других биологических объектах [18, 19].

Добавка в среду для инкубации дифенилйодония приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (рис. 2 и 3). Эффект действия дифенилйодония приблизительно линейно зависит от его дозы (растет с увеличением концентрации) как в контрольных, так и в опытных случаях (рис. 2). При этом различия между группами, обу-

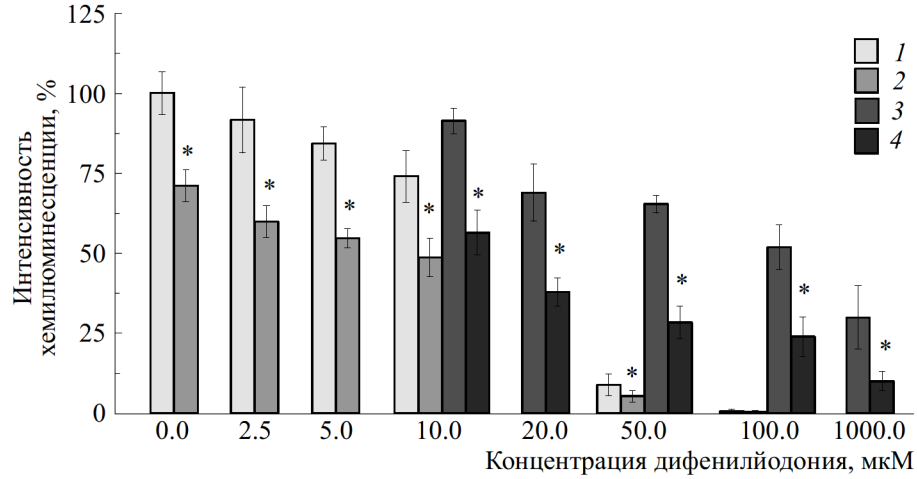


Рис. 2. Влияние дифенилйодония на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП. По оси абсцисс – концентрация дифенилйодония в мкМ, по оси ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, n = 6). *1* – Контроль, добавка дифенилйодония перед инкубацией; *2* – опыт, добавка дифенилйодония перед инкубацией; *3* – контроль, добавка дифенилйодония после инкубацией; *4* – опыт, добавка дифенилйодония после инкубацией. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

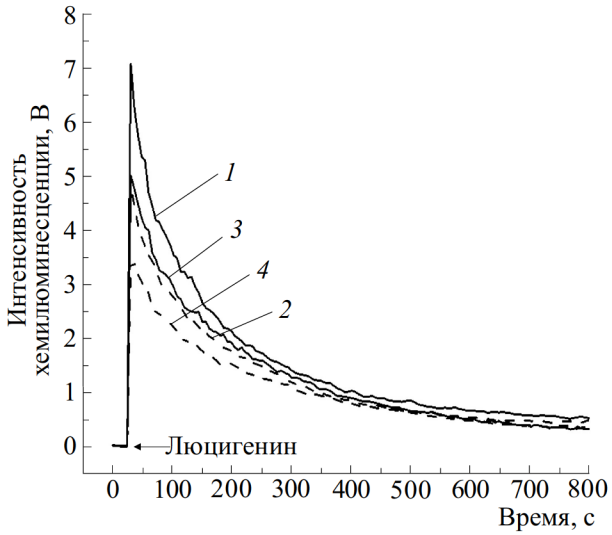


Рис. 3. Кинетика хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП в отсутствие, а также в присутствии дифенилйодония: *1* – контроль; *2* – опыт; *3* – контроль, предварительная добавка 10 мкМ дифенилйодония; *4* – опыт, предварительная добавка 10 мкМ дифенилйодония.

словленные действием «нулевого» поля, проявляются как на меньших концентрациях дифенилйодония (2.5, 5.0, 10 мкМ), так и на больших (50 и 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. Отсутствие значительного действия диметилсульфоксида (различия между пробами с его добавкой в концентрации 1 мМ и соответствующими контрольными образцами не превышают 5%), применяемого в качестве растворителя при приготовлении растворов дифенилйодония, позволяет связать обнаруженные эффекты с действием именно этого ингибитора.

При добавке дифенилйодония минуя стадию инкубации, непосредственно перед измерением хемилюминесценции, характер его влияния на контрольные и опытные образцы сохраняется, но степень выраженности действия в зависимости от дозы снижается (рис. 2).

Качественно иной результат получен нами в опытах с разобщителем окисления и фосфорилирования – 2,4-динитрофенолом. Так, добавка этого ингибитора, начиная с концентрации 5 мкМ и далее, вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами (рис. 4 и 5). При этом интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов в контроле снижалась пропорционально концентрации 2,4-динитрофенола. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что динитрофенол в определенных концентрациях способен полностью отменить эффект действия «нулевого» МП. По-видимому, наиболее вероятной причиной этого эффекта динитрофенола может являться некоторая «идентичность» механизма его действия с эффектом «нулевого» поля. Действительно, в этом случае, конкурируя за субстраты, химический агент мог бы подавить эффект физического фактора. Альтернативной гипотезой для объяснения этого действия динитрофенола является предположение о том, что для реализации эффекта «нулевого» магнитного поля необходимо сопряжение окисления и фосфорилирования

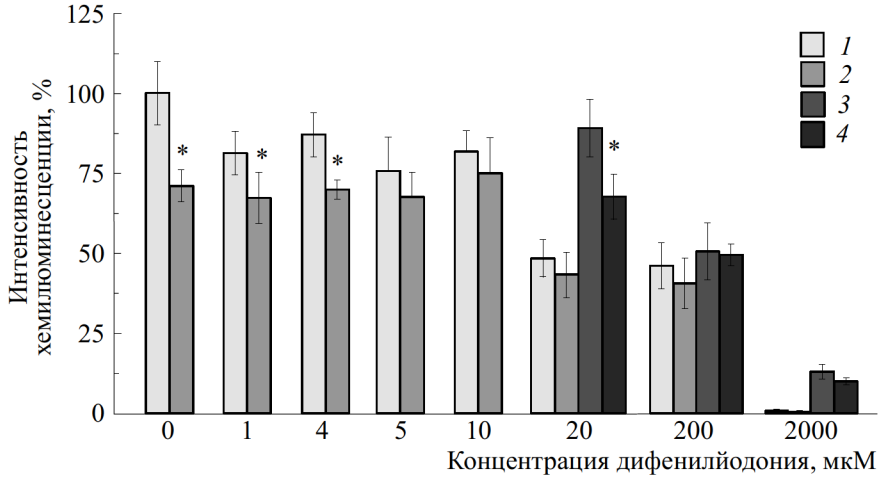


Рис. 4. Влияние динитрофенола на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП. По оси абсцисс – концентрация динитрофенола в мкМ; по оси ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$). *1* – Контроль, добавка динитрофенола перед инкубацией; *2* – опыт, добавка динитрофенола перед инкубацией; *3* – контроль, добавка динитрофенола после инкубацией; *4* – опыт, добавка динитрофенола после инкубацией. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

в митохондриях нейтрофилов, т. е. необходим определенный уровень продукции АТФ. Однако опыты с добавкой динитрофенола не вначале, а после инкубации в «нулевом» поле, показавшие, что и в этом случае результат его действия также проявляется и качественно не меняется (рис. 4), скорее свидетельствуют в пользу первого предположения.

Известно, что механизм действия динитрофенола, который является хорошо охарактеризованным разобщителем митохондриального дыхания, связан с его способностью рассеивать протонный градиент, возникающий благодаря транспорту электронов [15, 16]. Рассеивание этого протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране позволяет дыханию продолжаться, но при этом прекращается синтез АТФ, который обычно черпает энергию в этом протонном градиенте. Это разобщение нарушает мембранный потенциал внутренней митохондриальной мембраны [15].

Ранее было принято считать, что зрелые нейтрофилы имеют мало функциональных митохондрий, если таковые вообще имеются [20]. Это предположение было основано на том факте, что электронная микроскопия в фиксированных клетках обычно не может идентифицировать интактные митохондрии, а те, которые видны, являются небольшими, с плохо выраженными кристами и внутренней митохондриальной мембраной [20]. Кроме того, установлено, что нейтрофилы для производства энергии используют главным образом гликолиз [21], а интенсивность митохондриального дыхания очень низкая. Этот O_2-независимый механизм производства энергии полезен тем, что позволяет нейтрофилам функционировать в очагах воспаления или в местах проникновения инфекции, где парциальное давление O_2 может быть очень низким [22]. При фагоцитозе нейтрофилы используют большие количества молекулярного O_2 не для митохондриального дыхания, а скорее для генерации супероксидного аниона и других АФК посредством дыхательного взрыва, катализируемого NADPH-оксидазой [23]. Из этих морфологических и биохимических особенностей как бы следовало, что нейтрофилы не имеют функционально активных митохондрий и не нуждаются в них.

Однако в настоящее время появляются доказательства того, что функциональные митохондрии могут играть важную роль в контроле апоптоза нейтрофилов [24]. Было показано, с использованием флуоресцентных индикаторов митохондриальной функции в живых клетках, что нейтрофилы обладают развитой митохондриальной сетью [25]. Мембранный потенциал этих митохондрий может быть нарушен химическими разобщителями транспорта электронов. Было показано, что митохондрии нейтрофилов не участвуют в быстром инициировании респираторного взрыва или фагоцитоза, но интенсивность этих процессов снижается у нейтрофилов, предварительно обработанных ингибиторами митохондрий [25]. Все эти данные, наряду с полученными нами экспериментальными результатами, указывают на возможность исследования митохондрий нейтрофилов в качестве потенциальных мишеней действия «нулевого» поля.

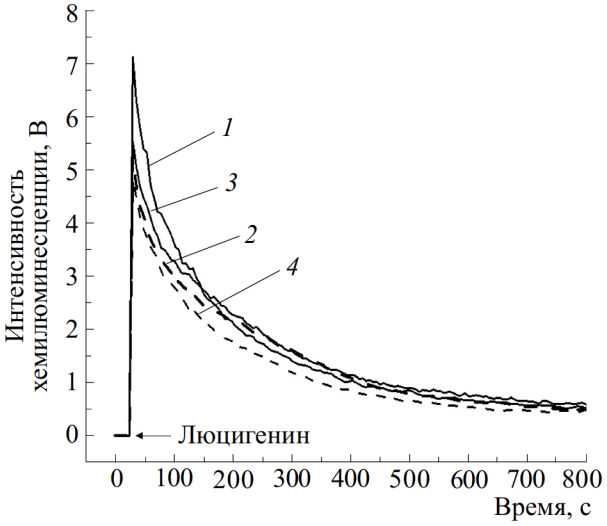


Рис. 5. Кинетика хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП в присутствии динитрофенола: *1* – контроль; *2* – опыт; *3* – контроль, предварительная добавка 10 мкМ динитрофенола; *4* – опыт, предварительная добавка 10 мкМ динитрофенола.

В нейтрофилах имеется несколько основных систем, в которых свободные радикалы образуются в качестве основного или побочного продукта. Прежде всего это NADPH-оксидазы, мембранные ферменты, продуцирующие супероксидный анион-радикал (САР) по реакции одноэлектронного восстановления [26]. Кроме того, важной системой продукции САР могут являться митохондрии. Известно, что на их внутренней мембране утечка САР происходит в одиннадцати местах, главным образом, в комплексах I, II, III, причем САР продуцируется как в матрикс, так и в межмембранное пространство [27].

Люцигенин считается селективным зондом на САР [11], поэтому его активно используют для изучения продукции АФК как NADPH-оксидазой, так и митохондриями [12]. Характер ингибирующего эффекта дифенилйодония (неспецифический ингибитор NADPH-оксидазы), обнаруженный нами в настоящей работе на нейтрофилах, подвергшихся действию «нулевого» поля, делает сомнительным предположение о том, что NADPH-оксидаза является основным источником САР, реагирующим на действие гипомагнитных условий.

Напротив, опыты с динитрофенолом, разобщителем окислительного фосфорилирования, показавшие практически полную отмену эффекта действия «нулевого» магнитного поля в его присутствии, делают обоснованным предположение о том, что именно митохондрии, как продуценты САР, являются основной мишенью действия этого физического фактора. Разумеется, эта гипотеза требует дальнейшего изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Zhang, Z. Zhang, W. Mo, et al., Prot. Cell **8** (7), 527 (2017).
2. C. F. Martino and P. R. Castello, PLoS One **6** (8), e22753 (2011).
3. P. Politanski, E. Rajkowska, M. Brodecki, et al., Bioelectromagnetics **34**, 333 (2013).
4. V. N. Binhi and F. S. Prato, PLoS One **12** (6), e0179340 (2017).
5. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **63** (3), 484 (2018).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, Биофизика **64** (4), 720 (2019).
7. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И.А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (3), 524 (2020).
8. J. P. Crow, Nitric Oxide: Biology and Chemistry **1** (2), 145 (1997).
9. S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, et al., Free Radic. Biol. Med. **27** (1–2), 146 (1999).
10. 10. G. Bartosz, Clin. Chim. Acta **368**, 53 (2006).
11. T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest. **47**, 673 (1987).
12. А. А. Джатдоева, Е. В. Проскурнина, А. М. Нестерова и др., Биол. мембраны **34** (6), 116 (2017).
13. A. R. Cross and O. T. Jones, Biochem. J. **237**, 111 (1986).
14. Y. Li and M. A. Trush, Biochim. Biophys. Acta **253**, 295 (1998).
15. S. Matsuyama, J. L. Lopis, Q. L. Deveraux, et al., Nat. Cell. Biol. **2**, 318 (2000).
16. M. M. El-Guindy, A. C. Neder, and C. B. Gomes, Cell Mol Biol. 1981, 27(5):399–402.
17. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (1), 97 (2020).
18. В. В. Новиков, И. М. Шейман и Е. Е. Фесенко, Биофизика **52** (5), 912 (2007).
19. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, Bioelectromagnetics **29**, 387 (2008).
20. S. W. Edwards, *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil* (Cambridge University Press, N.-Y., 1994).
21. M. L. Karnovsky, Semin. Hematol. **5**, 156 (1968).
22. S. W. Edwards, M. B. Hallett, and A. K. Campbell, Biochem. J. **217**, 851 (1984).
23. A. W. Segal and A. Abo, Trends Biochem. Sci. **18**, 43 (1993).
24. J. G. Pryde, A. Walker, A. G. Rossi, et al., J. Biol. Chem. **275**, 33574 (2000).
25. G. Fossati, D. A. Moulding, D. G. Spiller, et al., J. Immunol. **170**, 1964 (2003).
26. A. Panday, M. K. Sahoo, D. Osorio, and S. Batra, Cell Mol. Immunol., **12**, 5 (2015).
27. V. Kozjak-Pavlovic, Cell Tissue Res. **367** (1), 83 (2017).

Attenuation in Superoxide Anion Radical Production in Neutrophils after Exposure to Near Null Magnetic Field

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

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

Preincubation of neutrophil suspension when exposed to near null magnetic field created by a system of magnetic shields (the residual static magnetic field not greater than 20 nT) is associated with a significant decrease in the intensity of lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils. Addition of the NADPH-oxidase inhibitor diphenyliodonium to the incubation medium caused attenuation in the chemiluminescence activity both in the exposed and control samples (geomagnetic field). Differences induced by near null magnetic field were observed almost to the same extent between exposed and control samples at both lower (2.5, 5, 10 μM), and higher (50, 100 μM) concentrations of diphenyliodonium. In contrast, the presence of 2,4-dinitrophenol, the uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, at concentrations of 5 μM up to 200 μM virtually completely blunted differences which were observed between exposed and control samples at lower concentrations of this inhibitor or in the absence of it.

Keywords: neutrophils, near null magnetic field, superoxide anion radical, chemiluminescence, lucigenin, NADPH-oxidase, mitochondria

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 741–744

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 57.086.866;57.084

СПОСОБ МИНИМИЗАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ МИКРОЭЛЕКТРОДА В НЕЙРОН

© 2020 г. В.И. Орлов*, С.А. Ивлев, Г.Г. Бондарь****

**Академия биологии и биотехнологии Южного Федерального университета, 344091, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1*

***Научно-исследовательский технологический центр нейротехнологий Южного Федерального университета, 344091, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1*

E-mail: ins270386@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.01.2020 г.
После доработки 03.05.2020 г.
Принята к публикации 25.05.2020 г.

Погружение микроэлектрода в сому клетки является одним из самых уязвимых мест в методике регистрации внутриклеточной активности. Показателем повреждения нейрона при прокалывании мембраны может служить посттравматическая активность. В работе представлены результаты апробации разработанного авторами импульсного электромагнитного микроманипулятора, предназначенного для менее травматичного и более контролируемого введения микроэлектрода. Эксперименты с регистрацией внутриклеточной активности проводились на нейронах препарата изолированной центральной нервной системы виноградной улитки (*Helix pomatia*). Результаты, полученные при использовании сконструированного устройства, демонстрируют отсутствие выраженной реакции нейрона на вторжение микроэлектрода, быстрое восстановление стабильного состояния клетки и возможность длительной (многочасовой) регистрации активности нейрона. Все это указывает на целесообразность использования предлагаемого устройства в экспериментах с регистрацией внутриклеточной активности элементов нервной системы и других возбудимых тканей.

Ключевые слова: нейрон, внутриклеточная регистрация активности, импульсный электромагнитный микроманипулятор, потенциал действия, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S0006302920040158

Метод внутриклеточной регистрации биоэлектрической активности в возбудимых тканях живых организмов [1–7], имеющий почти столетнюю историю применения, переживает в настоящее время свое «второе дыхание». Помимо традиционного применения (микроионофорез, поляризация мембран и пр.), его часто используют в комплексных мультидисциплинарных исследованиях в сочетании с новейшими биофизическими, нейрохимическими, оптофизиологическими, ультраструктурными, нейроморфологическими методами [2, 3]. Например, оптическая регистрация активности нейронов может сочетаться с внутриклеточной регистрацией их электрической активности для сопоставления и последующего анализа информации, получаемой с помощью этих методов [2].

Вместе с тем, несмотря на многолетние усилия исследователей по усовершенствованию метода, регистрация внутриклеточной активности по-прежнему сопряжена с рядом технических трудностей, связанных, прежде всего, с риском повреждения клетки. Механические свойства мембраны, в частности ее прочность и эластичность, существенно затрудняют управляемое погружение микроэлектрода вглубь клетки и увеличивают вероятность повреждения нейрона при прокалывании мембраны, либо значительно увеличивают время восстановления его исходного функционального состояния после прокола [4–7].

Обычно для проникновения в клетку используется аккуратное микронажатие (мягкое или, наоборот, резкое) на микроманипулятор. Применяются также электронные методы, заключающиеся в пропускании через микропипетку переменного тока высокой частоты или в прикладывании большого положительного (или отрицательного) потенциала. Тем не менее все эти приемы чреваты повреждением клетки [4, 7].

Стремление усовершенствовать приемы введения микроэлектрода в нейрон привело авторов к идее создания импульсного электромагнитного микроманипулятора (ИЭММ).

Сокращение: ИЭММ – импульсный электромагнитный микроманипулятор.

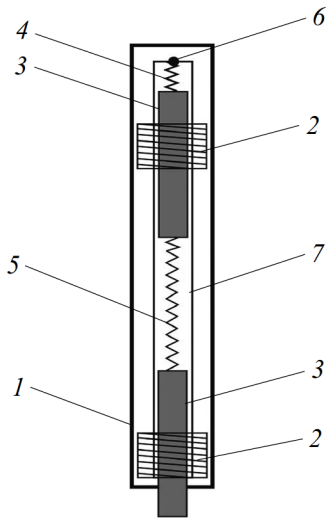


Рис. 1. Схема устройства импульсного электромагнитного микроманипулятора: *1* – внешний экранирующий корпус; *2* – управляющая (нижняя) и компенсирующая (верхняя) электромагнитные катушки; *3* – ударный (нижний) и компенсирующий (верхний) стержни; *4* – пружина подвески стержней; *5* – пружина, связывающая стержни; *6* – точка подвески подвижных элементов устройства; *7* – внутренний корпус устройства.

Оптимальным для обеспечения минимального травмирования представлялся способ, при котором микроэлектроду придается ударное ускорение, обеспечивающее очень короткий, дозированный по амплитуде шаг. При этом было желательно, чтобы ударное воздействие на микроэлектрод не сопровождалось последующими дополнительными вибрациями.

Принципиальная схема разработанного устройства представлена на рис. 1.

Движущимися элементами ИЭММ являются два одинаковых стержня *3*: ударный и компенсирующий. Стержни подвешены к общей точке фиксации *6* с помощью двух пружин *4* и *5*, выполненных из вольфрамовой проволоки диаметром 50 мкм.

Питание электромагнитов *2*, приводящих в движение ударный и компенсирующий стержни, осуществляется короткими (0.5–1.0 мс) прямоугольными импульсами тока, подаваемыми от обычного лабораторного электростимулятора (ЭСЛ-2) на оба электромагнита одновременно. С подачей импульса на электромагниты ударный стержень осуществляет микроудар по торцу микропипетки (калибруется заранее); при этом компенсирующий стержень осуществляет движение в противоположную сторону, демпфируя вибрацию ИЭММ и предохраняя микроэлектрод от колебаний, способных травмировать клетку.

Регулировка демпфирования вибраций в представленном варианте ИЭММ производится за счет смещения электромагнитов относительно ударного и/или компенсирующего стержней (в отличие от предыдущей версии устройства [8]). В результате отпадает необходимость в использовании специальной перемычки между внутренним корпусом устройства и серединой пружины, связывающей стержни, а также винта регулировки натяжения верхней пружины.

Изготовленный экземпляр представляемого здесь устройства имеет вес 20 г, диаметр 6 мм, длину 5 см. Оптимальный режим гашения вибраций подбирался в процессе изготовления (посредством смещения электромагнитов) под контролем фотоэлемента, затененного ИЭММ, по скачку напряжения на осциллографе. Сила тока, обеспечивающая бросок ударного стержня на 200 мкМ, составляла около 300 мА. Внутренний корпус прибора выполнен из тефлоновой трубочки, позволяющей минимизировать трение между внутренним корпусом и подвижными частями устройства.

Устройство предназначено для вертикального погружения микроэлектрода.

Чтобы выяснить, насколько эффективным является применение ИЭММ, были проведены эксперименты в условиях, различающихся лишь способом проникновения микроэлектрода в клетку.

Апробацию устройства проводили на идентифицированных нейронах париетальных ганглиев изолированного подглоточного комплекса виноградной улитки [3].

Для внутриклеточной регистрации нейронной активности использовали стандартные стеклянные микроэлектроды, заполненные раствором 2.5 М KCl; диаметр кончиков микроэлектродов составлял 0.3–0.5 мкМ, сопротивление – 10–15 МОм.

В четырех экспериментах погружение микроэлектрода осуществляли с помощью винта микроподачи механического манипулятора ММ-1, в пяти экспериментах – с помощью ИЭММ.

В экспериментах с применением микровинта механического манипулятора были зарегистрированы мощные и продолжительные реакции нейронов. Сразу после прокола мембраны начиналась высокочастотная генерация травматических разрядов, которая продолжалась от нескольких минут до нескольких часов и сопровождалась выраженной (десятки мВ) деполяризацией мембранного потенциала. На рис. 2 представлена типичная осциллограмма внутриклеточной активности.

Осциллограмма демонстрирует продолжительную генерацию травматических потенциалов действия, сопровождающуюся изменением мембранного потенциала. Такие интенсивные реакции с затяжным периодом перехода к устойчивому уровню потенциала покоя мембраны – обычное явление при удачном проникновении микроэлектрода в клетку [6].

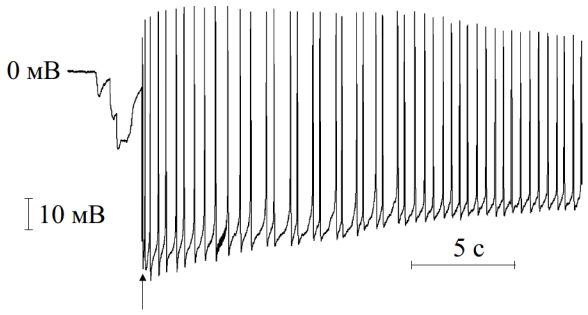


Рис. 2. Активность нейрона виноградной улитки во время погружения микроэлектрода и в первые секунды после прокола мембраны с помощью микровинта механического манипулятора. Момент прокола отмечен стрелкой.

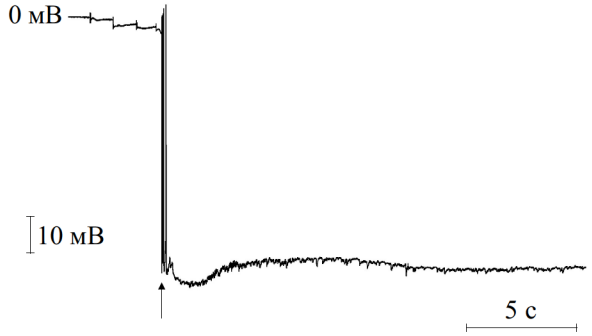


Рис. 3. Активность нейрона виноградной улитки во время погружения микроэлектрода и в первые секунды после прокола мембраны с помощью импульсного электромагнитного микроманипулятора. Момент прокола отмечен стрелкой.

В экспериментах с ИЭММ реакции нейронов разительно отличались от описанных выше.

При проколе мембраны с помощью ИЭММ генерация травматических разрядов была кратковременной (3–5 спайков в течение первых 5–10 мс) во всех экспериментах и не сопровождалась выраженными изменениями мембранного потенциала. Переход к устойчивому уровню потенциала покоя мембраны занимал 12–20 с. На рис. 3 представлена осциллограмма активности одного из зарегистрированных нейронов. Она свидетельствует об отсутствии интенсивной реакции нейрона на вторжение микроэлектрода с помощью ИЭММ и о быстром переходе к спокойному функциональному состоянию. Признаки ухудшения состояния не наблюдались в течение всего эксперимента ни у одной из пяти клеток. (В качестве признаков ухудшения состояния рассматривались резкое изменение амплитуды, формы и длительности спайков и частоты их генерации (по сравнению с наблюдавшимся до прокола характером фоновой активности), а также нестабильность уровня потенциала покоя мембраны.)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительно менее травматичном погружении микроэлектрода при использовании ИЭММ.

В чем же, на наш взгляд, кроются причины столь успешного проникновения в клетку с помощью разработанного устройства?

Обычно прикосновение кончика микроэлектрода к мембране нейрона и последующее его продвижение приводят к прогибу и натяжению эластичной мембраны клетки. В тот момент, когда нарушается целостность мембраны и кончик микроэлектрода проникает внутрь нейрона, происходит резкая механическая отдача, вызывающая вибрации мембраны и электрода, зачастую травмирующие клетку.

При использовании ИЭММ микроэлектрод, получив короткий и резкий (с большим ускорением) микроудар, прокалывает мембрану при меньшем ее натяжении, что уменьшает вибрации мембраны, которые «разбалтывают» отверстие, образующееся при проникновении микроэлектрода (имеющего неодинаковую толщину на разных расстояниях от кончика) в клетку. В результате мембрана быстрее сокращается вокруг микроэлектрода, плотно охватывая и удерживая его, и таким образом препятствуя возникающему после прокола свободному обмену ионами между внутренней средой нейрона и внешним, омывающим нейрон, раствором [3, 6].

Оптимальный подбор силы микроудара, стандартизируя воздействия в степени, невозможной даже при самом аккуратном ручном управлении, ограничивает шаг микроэлектрода и устанавливающуюся в итоге глубину его погружения в сому нейрона. Гашение тремора самого ИЭММ, а следовательно, и частей механического манипулятора, несущих микроэлектрод, защищает нейрон от дополнительных вибраций, представляющих серьезную угрозу для клетки. Миниатюрность ИЭММ позволяет закрепить его на обычном механическом манипуляторе непосредственно над микропипеткой таким образом, чтобы ударный стержень находился на оптимальном расстоянии от торца микроэлектрода.

Полученные результаты подтвердили исходное предположение о существенно более щадящем и контролируемом погружении микроэлектрода в клетку с помощью разработанного устройства. О высокой эффективности ИЭММ свидетельствует отсутствие выраженной реакции нейрона на вторжение микроэлектрода, сравнительно быстрое восстановление и длительное сохранение стабильного состояния клетки. Применение устройства упрощает процедуру погружения микроэлектрода,

требующую от экспериментатора специальных навыков.

Такие преимущества ИЭММ расширяют возможности использования метода внутриклеточной регистрации, особенно в экспериментах, предполагающих регистрацию биоэлектрической активности на протяженных временных интервалах, а также открывают обнадеживающую перспективу применения метода для внутриклеточной регистрации нейронной активности мозга высших позвоночных животных, чьи нейроны значительно мельче, чем у беспозвоночных (имеются предварительные неопубликованные данные).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Ling and R. W. Gerard, J. Cell Comp. Physiol. **34** (3), 383 (1949).
2. Е. С. Никитин, Дисс. ... д-ра биол. наук (ИВНД и НФ РАН, Москва, 2015).
3. В. Орлов, А. Сухов, О. Кит и др., Cardiometry, № 12, 40 (2018).
4. П. Г. Костюк, *Микроэлектродная техника* (Наук. думка, Киев, 1960).
5. Дж. Николлс, А. Р. Мартин, Б. Дж. Валлас и П. А. Фукс, *От нейрона к мозгу* (Едиториал УРСС, М., 2003).
6. Р. Пёрвис, *Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза* (Мир, М., 1983).
7. J. M. Bekkers, R. J. Bookman, M. J. Delay, et al., *The Axon CNS Guide* (Molecular Devices Corp., USA, 2006). http://www.octopus.huji.ac.il/course/Links/Axon_Guide.pdf.
8. С. А. Ивлев, А. Г. Сухов и Г. Г. Бондарь, Биомед. радиоэлектроника, № 4, 35 (2015).

Approach to Minimize Damage Resulting from Microelectrode Insertion into Neuron

V.I. Orlov*, S.A. Ivlev, and G.G. Bondar****

**Academy of Biology and Biotechnology of the Southern Federal University, prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344091 Russia*

***Research Technology Center of Neurotechnology of the Southern Federal University, prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344091 Russia*

Penetration of a microelectrode into the cell soma is one of the essential vulnerable stages of the method intracellular recording. Traumatic neuronal activity after piercing the membrane with a microelectrode can be an indicator of neuronal damage. In this paper we report the results from tests of our pulse electromagnetic micromanipulator. This device is designed to reduce the neuronal damage from the insertion of a microelectrode and more controlled penetration into the cell. Intracellular recordings were employed in experiments carried out on neurons of the isolated central nervous system of the grape snail (*Helix pomatia*). The results obtained by using our micromanipulator show the absence of a pronounced neuronal reaction in response to the invasion of a microelectrode, the cell is able to rapidly return to a stable state, and registration of neuronal activity is possible for a long period of time (many hours). These findings indicate the relevance of using the proposed device in experiments that recording intracellular activity of the cells of the nervous system and other excitable tissues.

Keywords: neuron, intracellular activity recording, pulse electromagnetic micromanipulator, action potential, membrane potential

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 745–752

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 57.052

НОВЫЕ СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ НАНОЧАСТИЦ N-ЗАМЕЩЕННЫХ МОНОАМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C_{60} И ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ИХ ДЕЙСТВИЯ

© 2020 г. В.А. Волков*, О.В. Ямскова, М.В. Воронков*, Д.В. Курилов***, В.С. Романова**, В.М. Мисин*, И.Н. Гагарина****, Н.Е. Павловская****, И.В. Горькова****, А.В. Лушников******

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

***Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28*

****Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47*

*****Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина, 302019, Орёл, ул. Генерала Родина, 69*

E-mail: vl.volkov@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2019 г.
После доработки 12.05.2020 г.
Принята к публикации 08.06.2020 г.

Исследованы ростостимулирующие эффекты водорастворимых наночастиц N-замещенных моноаминокислотных производных фуллерена C_{60} (L- и D- аланина, L- и D-валина, L- и D-аспарагиновой кислоты, β-аланина, а также γ-аминомасляной и ε-аминокапроновой кислот в солевой форме). Обнаружено, что факторами, влияющими на такие физиологические параметры, как всхожесть, энергия прорастания и длина корешка гороха посевного, являются размер наночастиц производных фуллерена и их относительная антирадикальная активность. Установлено, что в выбранной группе соединений относительная антирадикальная активность наночастиц определяется их суммарной площадью поверхности и не зависит от строения аминокислотного заместителя. Продемонстрирована возможность использования аминокислотных производных фуллерена в качестве эффективных ростостимулирующих веществ. Обнаружен эффект, выражающийся в дозозависимом влиянии, оказываемом калиевой солью N-(моногидрофуллеренил)-D-аланина на показатели всхожести и энергии прорастания гороха в диапазоне концентраций 10^{-9}–10^{-11} М.

Ключевые слова: фуллерен, наночастицы, антиоксиданты, стимуляторы роста, горох посевной.

DOI: 10.31857/S000630292004016X

Повышение урожайности сельскохозяйственных культур является одной из ключевых задач современной агрохимии. При этом предпочтение отдается тем средствам, применение которых безопасно для окружающей среды. В настоящее время особый интерес представляет использование наноматериалов, которые благодаря своим размерным характеристикам обладают уникальными свойствами. Среди таких материалов важное место отводится углеродным наноструктурам, в частности фуллерену C_{60}, а также его производным. В этой связи актуальным является изучение механизмов ростостимулирующего действия фуллерена C_{60} и его производных.

В литературных источниках имеются противоречивые данные о физиологическом влиянии, оказываемом фуллереновыми производными на растения. Так, найдено, что функциональные производные фуллерена C_{60}, например, такие как фуллеренолы, оказывают положительный эффект на рост гипокотиля у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) [1]. Как предполагают, положительный эффект при воздействии указанных соединений на растения связан с их антиоксидантной активностью, а именно – со способностью связывать активные формы кислорода (АФК) [2, 3]. В частности, была выявлена способность фуллеренола предотвращать развитие окислительного стресса в корнях и их субапикальное утолщение при ультрафиолетовом средневолновом облучении проростков зерновых культур благодаря снижению содержания АФК.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, АПФ – аминокислотные производные фуллерена, ОАА – относительная антирадикальная активность.

Также есть подтверждения тому, что добавление в питательный раствор водорастворимых производных фуллерена C_{60} с аминокислотами (АПФ), такими как L-лизин, L-треонин L-аргинин, L-гидроксипролин (в виде их калиевых солей), способствовало увеличению сухой массы растения у яровой пшеницы [4]. Однако не все функционализированные фуллерены показывают эффект стимуляции в отношении роста растений. Например, авторы публикации [5] сообщили, что водорастворимое малонатное производное (карбоксифуллерен) $C_{70}[C(COOH)_2]_{4–8}$, добавленное в питательную среду, дозозависимым образом усиливает ингибирование роста корней вплоть до 60%, а также приводит к деформации кончика корней у арабидопсиса (*A. thaliana* L.). Выдвинуто предположение о том, что указанные негативные эффекты могут быть связаны с нарушением транспорта ауксина в корнях, отклонениями в процессах клеточного деления в зоне меристемы корня, а также с уменьшением внутриклеточного количества АФК. В присутствии карбоксифуллерена $C_{70}[C(COOH)_2]_{2–4}$ на клеточной культуре табака сигарного (*Nicotiana tabacum* L.) также были зафиксированы эффекты ингибирования роста, связанные с деформацией клеточной стенки и окислительным стрессом [6]. Сделан вывод о том, что адсорбция карбоксифуллеренов на клеточных стенках приводит к разрушению этих клеточных стенок и мембран, что в итоге ингибирует рост клеток. Кроме того, при действии карбоксифуллеренов наблюдается увеличение количества гликозидных остатков на клеточных стенках (в зависимости от концентрации растворов и времени воздействия), а также аккумуляция АФК, что, как предполагают, представляет собой стратегию защиты растения при воздействии этих производных фуллерена.

В целом взаимосвязи между строением производных фуллерена и их биологической активностью недостаточно изучены.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Фуллерен C_{60} и его N-монозамещенные производные калиевых солей L- и D- аланина, L- и D-валина, L- и D-аспарагиновой кислоты, β-аланина, а также γ-аминомасляной и ε-аминокапроновой кислот, способные к образованию в водном растворе наночастиц, были синтезированы в ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН.

Определение относительной антирадикальной активности аминокислотных производных фуллерена. Определение величины относительной антирадикальной активности (ОАА) было осуществлено по методу ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) в модификации, представленной в работе [7]. В этом методе в качестве источника свободных радикалов используется 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, который склонен к термическому гомолитическому распаду, в результате которого в присутствии кислорода образуются алкоксильные либо алкилпероксидные радикалы, а флуоресцеин играет роль атакуемой радикалами мишени, текущая концентрация которой определяется с высокой чувствительностью.

Растворы флуоресцеина и 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида готовили в фосфатном буфере (75 мМ, pH 7.4), а затем инкубировали в течение 10 мин при 37°C. В кювете флуориметра сначала смешивали растворы флуоресцеина и исследуемого образца; раствор 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида вводили последним и немедленно начинали запись кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции. Конечные концентрации компонентов смеси в кювете составляли: 9.6 мМ 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида, 10^{-8} М флуоресцеина, $2.5 \cdot 10^{-6}$ М исследуемого раствора. Фосфатный буфер (75 мМ) использовали для холостого опыта, тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту) в концентрации $1.2 \cdot 10^{-6}$ М – в качестве препарата сравнения. Значение величины, характеризующей ОАА, рассчитывали как отношение разностей площадей под кривыми тушения флуоресценции соответственно для исследуемого образца ($S_{обр}$) и для тролокса ($S_{Тр}$) с учетом холостого опыта («бланка», т.е. без добавления антиоксидантов, $S_{бл}$), а также концентраций тролокса ($C_{Тр}$) и исследуемых образцов ($C_{обр}$):

$$OAA = ((S_{обр} - S_{бл}) / (S_{Тр} - S_{бл})) \cdot (C_{Тр} / C_{обр}). \quad (1)$$

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции с течением времени регистрировали на спектрофлуориметре FluoroLog 3.21 (Horiba Scientific Ltd., Франция) при температуре 37 ± 0.2°C (при термостатировании в кюветном отделении). Наблюдаемую флуоресценцию детектировали при длине волны λ = 515 нм под прямым углом относительно пучка возбуждения в стандартной (1 см) кварцевой кювете при длине волны возбуждающего света λ = 491 нм. Интенсивности флуоресценции были скорректированы по отношению к чувствительности измеряющего фотоэлектронного умножителя. Температуру образца поддерживали при помощи термостата модели 12108-15 (Cole-Parmer, США) (6 л, вода, нагрев/охлаждение, цифровой контроллер). Компоненты образца (за исключением инициатора) предварительно термостатировали в течение 10 мин перед смешиванием. Температуру в кювете уточняли при помощи ртутного термометра с шагом деления шкалы 0.1°C.

Влияние на показатели физиологических параметров (энергии прорастания, всхожести и длины корешка гороха), оказываемое фуллереном C_{60} и АПФ, а также найденные соответствующие этим соединениям значения величин ОАА и среднего размера частиц

Тестируемое соединение, 10^{-9} М	ОАА, отн. ед.	Размер частиц, нм	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина корешка, см
H-C_{60}-L-Ala-OK (1)	0.16 ± 0.02	94 ± 13	98	98	4.36 ± 1.42
H-C_{60}-D-Ala-OK (2)	0.63 ± 0.10	42 ± 6	98	98	3.76 ± 1.34
H-C_{60}-L-Val-OK (3)	0.27 ± 0.04	90 ± 15	89	97.3	5.10 ± 1.28
H-C_{60}-D-Val-OK (4)	0.04 ± 0.01	107 ± 18	87.3	91.7	5.78 ± 2.14
H-C_{60}-L-Asp-$(OK)_2$ (5)	–*	108 ± 30	86	88.3	3.62 ± 0.89
H-C_{60}-D-Asp-$(OK)_2$ (6)	0.010 ± 0.002	110 ± 20	79.7	82.3	3.78 ± 1.09
H-C_{60}-NH-$(CH_2)_2$-COOK (7)	0.08 ± 0.01	–**	97.7	98	4.16 ± 1.32
H-C_{60}-NH-$(CH_2)_3$-COOK (8)	0.35 ± 0.05	–**	91.7	92.3	5.12 ± 1.12
H-C_{60}-NH-$(CH_2)_5$-COOK (9)	–*	–**	85.3	87.7	2.86 ± 1.79
C_{60} (10)	–*	78 ± 6	100	100	3.80 ± 1.24
Вода (контроль)	–	–	88	90.3	3.30 ± 0.67

Примечание. * – Значение величины (при заданных условиях эксперимента) находится ниже предела детектирования; для этих соединений значения ОАА; ** – вследствие полидисперсности наночастиц в растворе оценку их усредненного размера нельзя считать корректной.

Определение размеров наночастиц. Для определения гидродинамического радиуса частиц АПФ, диспергированных в водном растворе, использовали метод лазерного динамического рассеяния света (фотонной корреляционной спектроскопии). Измерения проводили на анализаторе «Photocor Compact-Z» (ООО «Фотокор», Москва), оснащенном термостабилизированным диодным AlGaInP-лазером с длиной волны $\lambda = 637.4$ нм (мощностью 30 мВт) и многоканальным коррелятором «Photocor-FC». Распределения по гидродинамическому радиусу получали из измеренных корреляционных функций интенсивности рассеянного света при помощи программного обеспечения DynaLS фирмы «Alango Ltd» (Израиль) методом кумулянтов [8], а также ALV-5000/E фирмы «ALV-GmbH» (Германия) методом CONTIN [9]. Измерения проводили при величине угла рассеивания 90° и температуре 25°C. Были использованы цилиндрические кюветы диаметром 8 мм и объемом 1 мл. Концентрации образцов составляли 10^{-6} М.

Контролируемые параметры проращивания. Исследование проводили на семенах гороха сорта «Фараон», которые предварительно замачивали в растворе исследуемых веществ в течение двух часов, после чего переносили на фильтровальную бумагу в чашки Петри для проращивания на свету в течение восьми суток при температуре 23°C. Представленные значения величин физиологических параметров рассчитаны как среднее арифметическое из трех повторностей. В каждой из повторностей проводили проращивание 100 семян. В качестве изучаемых физиологических параметров при проращивании семян выступали всхожесть, энергия прорастания и длина корешка. Длину корешка и всхожесть (количество нормально проросших семян) определяли на восьмые сутки проращивания как величину, выраженную в процентах по отношению к параметрам биоматериала, взятого для анализа. Энергию прорастания (как процент проросших семян) определяли на четвертые сутки. Важно отметить, что физиологический параметр энергии прорастания характеризует способность семян давать в полевых условиях дружные и ровные всходы, а значит, – хорошую выровненность и выживаемость растений. Измерение показателей всхожести и энергии прорастания осуществляли в соответствии с методикой, описанной в ГОСТ 12038-84 [10].

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили при помощи

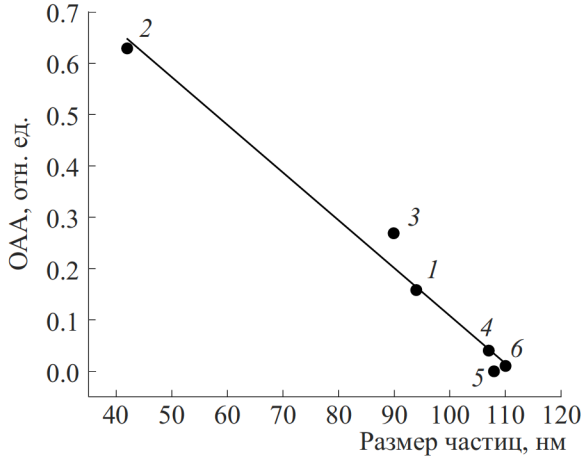


Рис. 1. Диаграмма корреляционной зависимости между величиной относительной антиоксидантной активности и усредненным размером наночастиц аминокислотных производных фуллерена.

программ Microsoft Excel 2010, Origin Pro 8.0 и Past 3.25.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как следует из полученных экспериментальных данных (см. таблицу), фуллерен C_{60} и большинство АПФ (в виде соответствующих калиевых солей) в концентрации 10^{-9} М способствуют увеличению показателей всхожести, энергии прорастания и длины корешка. Наибольшее положительное влияние на всхожесть и энергию прорастания оказывал незамещенный фуллерен C_{60}. АПФ преимущественно также способствовали увеличению значений указанных параметров. Однако, например, в присутствии некоторых из числа испытанных АПФ – производных L- и D-аспарагиновой, а также ε-аминокапроновой кислот – несколько снижались показатели как всхожести, так и энергии прорастания. Введение аминокислотного остатка в молекулу фуллерена C_{60} способствовало увеличению ростостимулирующего эффекта в отношении длины корешка гороха. Важно также отметить, что наибольшие значения величины ОАА и при этом наименьшие размеры наночастиц, образуемые в водном растворе, продемонстрированы в случае фуллеренового производного D-аланина.

Выявлена тесная отрицательная корреляционная связь линейного типа (со значением коэффициента корреляции Пирсона $r_{yx} = -0.9885$ и значением коэффициента детерминации $R^2 = 0.977$) между величиной относительной антиоксидантной активности и размером наночастиц АПФ, образующихся в водном растворе (рис. 1).

Осуществлена оценка статистической значимости полученного значения линейного коэффициента корреляции Пирсона r_{yx} на основании t-критерия Стьюдента. Указанный критерий подчиняется закону распределения Стьюдента с числом степеней свободы $v = n - 2$. Фактически наблюдаемое значение t-статистики ($t_{набл}$) для совокупности малого объема вычислено в соответствии с формулой:

$$t_{набл} = |r_{yx}| \, [(n - 2) / (1 - r^2_{yx})]^{1/2},$$

где n – объем совокупности ($n = 6$); число степеней свободы $v = n - 2 = 4$; $|r_{yx}|$ – абсолютное значение величины линейного коэффициента корреляции Пирсона; $t_{набл}$ – наблюдаемое (рассчитанное) значение t-статистики.

Найдено, что значение $t_{набл} = 13.052$. Для уровня значимости $\alpha = 0.05$ (5%-й вероятности ошибки первого рода) и числа степеней свободы $v = 4$ квантиль распределения Стьюдента (табличное критическое значение величины t-статистики, $t_{кр}$) составляет $t_{кр} = 2.776$. Поскольку $t_{набл} > t_{кр}$, то полученная оценка позволяет отклонить нулевую гипотезу H_0 о статистической незначимости коэффициента корреляции (о случайном характере связи) и принять альтернативную гипотезу H_1 о статистической значимости коэффициента корреляции (о наличии статистически значимой связи, имеющей неслучайный характер).

Рассчитаны параметры аналитического представления корреляционной зависимости в виде гипотетического уравнения линейного типа $\hat{y}_x = a_0 + a_1 x$ (где коэффициенты $a_1 = -0.00937$ и $a_0 = 1.04412$) и, таким образом, построена регрессионная модель, характеризующая связь между факторным (x, размером частиц АПФ в растворе) и результативным ($\hat{y}_x$, теоретической величиной ОАА) признаками.

Выявленная корреляционная зависимость между величиной относительной антирадикальной активности и размером наночастиц АПФ, по-видимому, обусловлена стерическим фактором: при увеличении размеров наночастиц уменьшается величина отношения площади поверхности наночастицы к ее объему:

$$S_{нч} / V_{нч} = 4\pi r^2 / 1.33\pi r^3 = 3/r, \qquad (2)$$

где $S_{нч}$ – площадь поверхности наночастицы, $V_{нч}$ – объем наночастицы, r – радиус наночастицы.

Молекулы, заключенные внутри указанного объема наночастицы, оказываются труднодоступными для взаимодействия со свободными радикалами, и соответствующее АПФ показывает меньшие значения величины ОАА.

Для нахождения зависимости между свойствами АПФ и тестируемыми физиологическими па-

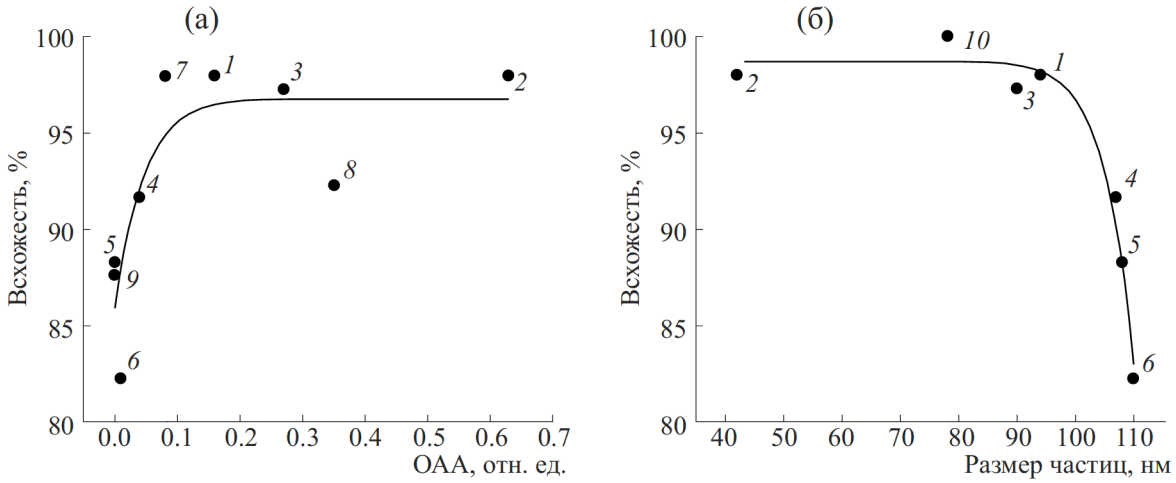


Рис. 2. Диаграммы корреляционной зависимости влияния величины относительной антиоксидантной активности (а) и размеров наночастиц аминокислотных производных фуллерена в растворе (б) на всхожесть гороха сорта «Фараон».

раметрами был осуществлен корреляционный анализ. Параметры всхожести и энергии прорастания показали положительную нелинейную корреляционную связь с величиной ОАА, переходя в область насыщения при определенном уровне значений соответствующего параметра, причем с величиной размеров наночастиц прослеживается отрицательная нелинейная корреляционная связь параметра всхожести (рис. 2).

Посредством компьютерного моделирования установлено, что в аналитическом виде изменение показателя всхожести (y, результативного признака), представленное на рис. 2, хорошо аппроксимируется уравнением роста Берталанфи (L. von Bertalanffy), которое имеет общий вид $\hat{y}_x = a[1 - b\exp(-cx)]$, где в качестве независимой переменной (x, факторного признака) фигурируют соответственно величины ОАА и размер частиц, коэффициент a – предельное (асимптотическое) значение тестируемого физиологического показателя (результативного признака), коэффициент c – интенсивность (градиент) изменения тестируемого физиологического показателя (результативного признака).

Для зависимостей на рис. 2 найдены следующие соответствующие параметры гипотетического уравнения: $a = 96.797$, $b = 0.11246$, $c = 21.334$ и $a = 98.662$, $b = 8.6938\cdot10^{-12}$, $c = -0.2148$ (для зависимостей (а) и (б) соответственно).

Продемонстрирована весьма тесная положительная корреляционная зависимость (коэффициент корреляции Пирсона $r_{yx} = 0.91$) длины корешков от значений величин ОАА АПФ (рис. 3). Необходимо отметить, что при расчете данного коэффициента не учитывались экспериментальные данные, полученные для фуллереновых производных D-аланина (таблица, соединение 2) и D-валина (таблица, соединение 4): они рассматривались как «статистический выброс», связанный, возможно, с изменением размеров агрегатов (наночастиц) этих соединений.

Для корреляционной зависимости, представленной на рис. 3, найден аналитический вид аппроксимирующей функции линейного типа $\hat{y}_x = a_0 + a_1x$, где коэффициенты $a_1 = 5.0434$ и $a_0 = 3.5515$.

Эксперимент по оценке зависимости величин всхожести и энергии прорастания от концентрации АПФ в растворе (в области низких концентраций при значениях, ниже наномолярных, 10^{-10} и 10^{-11} М) на примере фуллеренового про-

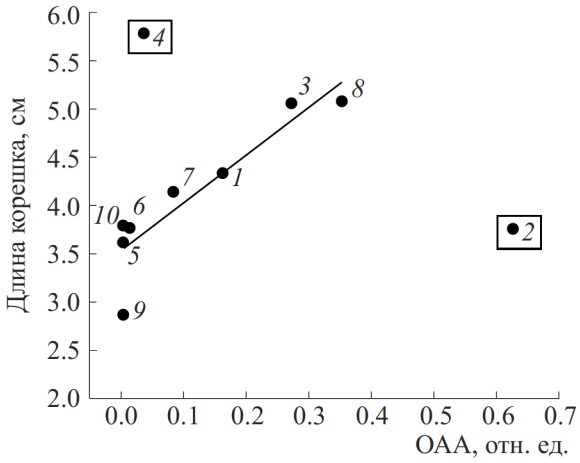


Рис. 3. Диаграмма корреляционной зависимости между величинами относительной антиоксидантной активности и длиной корешка гороха посевного.

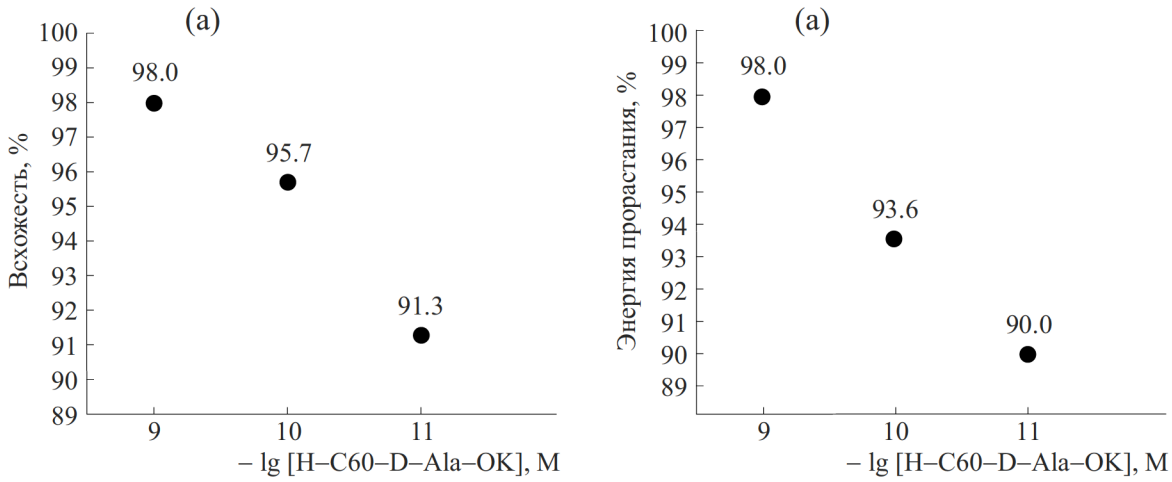


Рис. 4. Зависимость показателей всхожести (а) и энергии прорастания (б) семян гороха сорта «Фараон» от концентрации N-(моногидрофуллеренил)-D-аланина в растворе для проращивания.

изводного калиевой соли D-аланина, как это видно из диаграммы, представленной на рис. 4, в обоих случаях показал тенденцию к уменьшению показателей упомянутых физиологических параметров при снижении концентрации АПФ.

Важно отметить, что в процессе прорастания семени наблюдается усиление интенсивности клеточного дыхания, для осуществления которого требуется кислород, и при этом происходит образование активных форм кислорода. В литературных источниках имеются данные, указывающие на то, что АФК могут стимулировать рост растения, а также активировать экспрессию эндогенных факторов антиоксидантной защиты, что в конечном итоге приводит к повышению антиоксидантного статуса организма. В клетках животных обнаружена и активно изучается редокс-чувствительная система Nrf2/ Keap1/ ARE, которая контролирует экспрессию от 1 до 10% генов [11]. Nrf2/ARE-регулируемые гены кодируют ферменты, различные регуляторные и структурные белки, в число которых входят ферменты, контролирующие редокс-статус клетки – обладающие непосредственной антиоксидантной активностью или синтезирующие эндогенные восстановители (в первую очередь, глутатион) [12]. Возможно, подобная система регуляции действует и в растительной клетке. При проращивании семян ячменя, обработанных водным раствором, содержащим нанопузырьки различных газов, которые при схлопывании являются источниками гидроксильного радикала $OH^{\bullet}$, наблюдалось усиление экспрессии генов, отвечающих за синтез белков, влияющих на разрыхление клеточной стенки, включая экспансины, ксилоглюкан эндотрансглюкозилазы/гидразы, пероксидазы и белков переноса липидов, что способствует процессу удлинения проростка [13]. Однако также известно, что накопление АФК в клетках инициирует перекисное окисление липидов и других биомакромолекул. Изменение и нарушение структуры белков и ДНК приводит, в свою очередь, к нарушению процессов транскрипции и репликации [14, 15]. При недостатке антиоксидантов подобные процессы свободнорадикального окисления приводят к нарушению целостности клетки и ее гибели, что в свою очередь приводит к некрозам тканей листьев, молодых побегов и других органов растений. Было показано, что внесение в качестве удобрения биочара (угля, полученного при сгорании растительного материала в условиях ограниченного доступа кислорода), являющегося источником свободных радикалов, в количестве 0.5 и 1.0 г на чашку Петри диаметром 90 мм оказывает ростостимулирующий эффект (связанный, возможно, с активацией малыми дозами АФК синтеза эндогенных антиоксидантов), однако при повышении количества вносимого удобрения длина корней оказывалась значительно ниже контрольных значений [16]. Подобный эффект наблюдался и при проращивании семян ячменя, обработанных раствором полигидроксифуллерена, в стрессовых условиях. В малых концентрациях (7, 14, 75 мг/л) наблюдался стойкий ростостимулирующий эффект, однако при концентрации 1100 мг/л ростовые характеристики оказывались ниже контрольных. Такой эффект авторы объясняют наличием у полигидроксифул-

лерена прооксидантных свойств в высоких концентрациях, в результате чего в клетках ростовой зоны корня происходит накопление АФК, что, в свою очередь, приводит к образованию окислительных поперечных связей между полимерами клеточной стенки и преждевременной остановке роста [17, 18].

Имеются данные, доказывающие, что активные формы кислорода являются универсальными химическими агентами, посредством которых реализуется неблагоприятное воздействие различных видов стресса (температурный, осмотический, кислотно-основный, избыточное освещение, ультрафиолетовое излучение). Так, в ходе исследования стресс-индуцированной транскрипции генома цианобактерий *Synechocystis sp.* было обнаружено, что большая часть генов, кодирующих различные факторы защиты, экспрессируется не только в ответ на соответствующий неблагоприятный фактор внешней среды, но и в ответ на экзогенное введение пероксида водорода [19]. Это еще раз подтверждает нашу гипотезу, что антиоксидантные свойства исследованных производных фуллерена C_{60}, по-видимому, являются ключевым фактором их ростостимулирующего и протекторного воздействия при проращивании семян гороха.

На основании проведенного экспериментального исследования возможно сделать заключение о том, что изученные аминокислотные производные фуллерена C_{60} могут представлять интерес в качестве препаратов для обработки семенного материала и/или вегетативных органов растений с целью увеличения урожайности сельскохозяйственных культур, улучшения адаптационных характеристик растений к погодным, климатическим условиям и защиты от стрессовых факторов среды.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Gao, Y. H. Wang, K. M. Folta, et al., PloS One **6** (5), 8 (2011).
2. N. Charbi, M. Pressac, M. Hadchouel, et al., Biomaterials **30** (4), 611 (2009).
3. Г. Г. Панова, Е. В. Канаш, К. Н. Семёнов и др., С.-х. биология **53** (1), 38 (2018).
4. Q. Liu, Y. Zhao, Y. Wan, et al., ACS Nano **4** (10), 5743 (2010). DOI: 10.1021/nn101430g
5. Q. L. Liu, X. J. Zhang, Y. Y. Zhao, et al., Environ. Sci. Technol. **47** (13), 7490 (2013)
6. B. Ou, M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior, J. Agric. Food Chem. **49** (10), 4619 (2001) DOI: 10.1021/jf010586o
7. P. Stepanek, in *Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications*, Ed. by W. Brown (Clarendron Press, Oxford, 1993), p. 177.
8. S. W. Provencher, Comput. Phys. Commun. **27** (3), 229 (1982). DOI: 10.1016/0010-4655(82)90174-6
9. ГОСТ 12038-84, *Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести*.
10. Н. К. Зенков, П. М. Кожин, А. В. Чечушков и др., Биохимия **82** (5), 749 (2017).
11. В. О. Ткачев, Е. Б. Меньщикова и Н. К. Зенков, Биохимия **76** (4), 502 (2011).
12. A. K. A. Ahmed, X. Shi, L. Hua, et al., J. Agricult. Food Chem. **66** (20), 5117 (2018). DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00333
13. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
14. Е. Б. Бурлакова, А. В. Алесенко, Е. М. Молочкина и др., *Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте* (Наука, М., 1975)
15. S. Liao, B. Pan, H. Li, et al., Environ. Sci. Technol. **48** (15), 8581 (2014). DOI: 10.1021/es404250a
16. D. J. Cosgrove, Plant Cell **9** (7), 1031 (1997)
17. T. De Cnodder, K. Vissenberg, D. Van Der Straeten, and J.-P. Verbelen, New Phytol. **168**, 541 (2005)
18. K. S. Mironov, M. A. Sinetova, M. Shumskaya, and D. A. Los, Life 9 (3), **67** 2019 DOI: 10.3390/life9030067

New Plant Growth Stimulants Based on Water-Soluble Nanoparticles of N-Substituted Monoamino Acid Derivatives of Fullerene C_{60} and the Study of Their Mechanisms of Action

V.A. Volkov*, O.V. Yamskova, M.V. Voronkov*, D.V. Kurilov***, V.S. Romanova**, V.M. Misin*, I.N. Gagarina****, N.E. Pavlovskaya****, I.V. Gorkova****, and A.V. Lushnikov******

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

***Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia*

****Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 47, Moscow, 119991 Russia*

*****Parakhin Orel State Agrarian University, ul. Generala Rodina 69, Orel, 302019 Russia*

Growth-stimulating effects of water-soluble nanoparticles of N-substituted monoamino acid derivatives of fullerene C_{60} (L- and D-alanine, L- and D-valine, L- and D-aspartic acid, β-alanine, and γ-aminobutyric and ε-aminocaproic acids in potassium salt form) were investigated. It was found that the nanoparticle size and relative antiradical activity of fullerene derivatives influence physiological factors affecting seed germination, germination energy and root growth capacity of field peas. It was shown that relative antiradical activity of nanoparticles in the selected group of compounds is evaluated by total surface area of nanoparticles regardless of the structure of the amino acid substituent. The possibility of using monoamino acid derivatives as effective growth stimulating substances is demonstrated. A dose-dependent effect of N-(monohydrofullerenyl)-D-alanine potassium salt on seed germination and germination energy of field peas in a concentration range of 10^{-9}–10^{-11} M is demonstrated.

Keywords: fullerene, nanoparticles, antioxidants, growth stimulants, field peas

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 753–759

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 581:41:58.03

ИЗМЕНЕНИЯ АРХИТЕКТУРЫ КРОНЫ ДЕРЕВЬЕВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ ПРИ НАРУШЕНИИ ГОМЕОСТАЗА

© 2020 г. Е.В. Бажина

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

E-mail: genetics@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.
После доработки 08.04.2020 г.
Принята к публикации 17.04.2020 г.

Крона пихты сибирской (*Abies sibirica*) характеризуется специфической организацией: узкопирамидальная форма, апикальная доминантность, ярусность по типам сексуализации, мутовчатое ветвление. На всех уровнях организации кроны: в архитектуре (диагеотропизм ветвей), морфоструктуре (дорзовентральность тканей и органов побегов, локализация репродуктивных органов в кроне дерева и на побеге), физиологических процессах, четко проявляется гравитационный вектор. Показано, что в гравиперцепции определяющим является внутреннее состояние организма. При ослаблении деревьев утрачивается диагеотропизм ветвей, что может служить универсальным биомаркером нарушения гомеостаза пихты сибирской.

Ключевые слова: пихта сибирская, архитектура кроны, гравитационный вектор, усыхание, диагеотропизм ветвей, корреляции морфологических признаков.

DOI: 10.31857/S0006302920040171

Габитус растения формируется в результате реализации его морфогенетический программы в конкретных условиях среды [1]. В силу прикрепленного образа жизни, растения оказываются крайне чувствительны к действию гравитации, как наиболее поляризованному фактору, определяющему физиологию и развитие [2, 3]. Приспособления к гравитационному вектору у них происходили в направлении развития укрепления опорной конструкции для лучшего сопротивления и наиболее выгодного положения [4]. У лесных древесных видов выработались компенсаторные поддерживающие структуры, обеспечивающие вертикальное направление главной оси (отрицательный геотропизм) и полярность признаков – асимметричность роста тканей древесины веток и листового аппарата [5, 6]. Опыты с геоиндукцией, в том числе и у представителей сем. *Pinaceae* показали различия интенсивности реакции не только у разных видов, но и у особей одного вида что позволило предположить, определяющую роль внутреннего состояния организма в реакции на геотропическое раздражение [7, 8].

Пихта сибирская характеризуется специфической организацией кроны – узкопирамидальной формой, мутовчатым ветвлением, ярусностью по типам сексуализации, выраженной апикальной доминантностью (преимущественное развитие верхушечного побега) [9, 10]. Полярные морфологические признаки, характеризующие чувствительность данного вида к гравитации – дорзовентральная асимметрия тканей и хвои, проявляющаяся в различиях морфологических и анатомических признаков на верхней (вентральной) и нижней (дорзальной, обращенной к земле) сторонах побегов, диагеотропизм ветвей (угол отхождения от оси ствола составляет 90º), сохраняются на протяжении всей жизни дерева [7, 9].

В последние десятилетия в горных экосистемах Южной Сибири (Хамар-Дабан, Кузнецкий Алатау, Западный Саян) наблюдается нарушение гомеостаза и усыхание деревьев пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.), не связанное с процессами их естественного старения [10–14]. В различных условиях произрастания в насаждениях может усыхать от 10 до 90% деревьев, причины данного феномена в настоящее время не установлены. Усыхание деревьев пихты сибирской проходит по специфическому, характерному для данного вида «подверхушечному» типу: усыхают хвоя и ветви под вершиной дерева, где локализуется мужской генеративный ярус, вершина (женский генеративный ярус), как и нижняя часть кроны (вегетативный ярус) функционируют в течение десятков лет после начала усыхания [10]. У усыхающих де-

Таблица 1. Характеристика исследованных древостоев пихты сибирской

Место произрастания	Высота над уровнем моря, м	Группы типов леса	Категория жизненного состояния (индекс)
низкогорные	450–520	разнотравные	здоровые (90.5–95.3)
среднегорные	640–830	разно- и крупнотравные	усыхающие (36.4–85.3)
высокогорные	1000–2000	крупнотравные и зеленомошные	здоровые и усыхающие (64.1–98.2)

ревьев наблюдаются нарушения процессов развития и снижение продуктивности побегов в усохшей части кроны и ниже по стволу, изменение габитуса – форма кроны из узкопирамидальной, характерной для данного вида, становится плакучей. Аналогичные реакции наблюдались в условиях стресса и у других видов хвойных [7].

Цель настоящих исследований – анализ архитектуры кроны пихты сибирской и характера изменений диагеотропизма побегов при нарушении гомеостаза деревьев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в течение ряда лет (1991–2018 гг.) в лесных биоценозах гор Южной Сибири (хр. Хамар-Дабан, Западный и Восточный Саян, Кузнецкий Алатау, северо-восточный Алтай) различного жизненного состояния [10, 12–15]. Район исследований расположен на стыке геоструктур и тектонических элементов Алтае-Саянской орогенетической зоны и Сибирской платформы, рельеф в основном горный, с абсолютными высотами от 200 до 2000 м над уровнем моря [16]. Климат меняется с запада на восток от континентального до резко континентального, максимум осадков (до 2000 мм) выпадает на наветренных склонах, в подветренных частях гор и котловинах – лишь около 200 мм. Почвенный покров территории исследований достаточно мозаичен вследствие разного возраста и состава подстилающих геологических пород, а также неоднородности характера рельефа. В горно-таежной высотной зоне западных областей Южной Сибири формируются главным образом горно-подзолистые и дерново-подзолистые почвы; на востоке, где широко распространена вечная мерзлота, преобладают различные варианты кислых мерзлотно-таежных и длительно сезонно-мерзлотных горно-таежных слабооподзоленных почв, а в высокогорном поясе – перегнойно-подзолистые почвы. Пробные площади были заложены на склонах различных экспозиций в низкогорных (долины рек и ручьев, 270–480 м над уровнем моря), среднегорных (550–830 м над уровнем моря) и высокогорных (1100–2000 м над уровнем моря) частях горных хребтов (табл. 1).

Исследования проводились на разновозрастных (60–280 лет) модельных деревьях различных категорий состояния [17]. У деревьев измеряли следующие морфологические признаки: высоту, возраст, диаметр на высоте груди, проекцию кроны, протяженность кроны, угол отхождения от ствола скелетных ветвей, расстояние между мутовками, число и длину веток в мутовке, число и длину межмутовочных ветвей, локализацию и протяженность генеративных ярусов и усохшей части по оси ствола. Статистическую обработку материала проводили в программах Statistica 10 и Excel 2013, оценку полученных моделей проводили по ошибкам показателей, графикам остатков и коэффициентам детерминации и аппроксимации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования показали, что во всех горных системах, независимо от высоты произрастания, у деревьев четко проявляются такие специфические видовые признаки, как узкопирамидальная форма кроны, апикальная доминантность и ярусность кроны по типам сексуализации. Женские генеративные органы расположены на верхней стороне побегов верхней части кроны и занимают от 0.4 до 2.3 м (у единичных деревьев, с учетом следов от шишек – до 6.2 м), что составляет не более 6.9–17.9% от общей протяженности кроны. Ниже по стволу расположен мужской генеративный ярус (микростробилы локализуются на нижней стороне побегов), протяженность которого может составлять значительную часть, от 0.2 до 11.0 м (23.6–48.5%) от общей протяженности кроны. Переходный ярус, где на верхней стороне побега развиваются женские, а на нижней – мужские генеративные органы, у деревьев пихты, как правило, отсутствует или ничтожно мал – не более одной-двух мутовок (0.2–0.5 м). Вегетативный ярус занимает нижнюю часть кроны (4.3–22.8 м) и составляет у разных деревьев 44.5–80.8% ее общей протяженности. Полярность в расположении репродуктивных органов в кроне (продольный градиент) и на побеге свидетельствует о резком градиенте фитогормонов в пределах кроны дерева. Протяженность мужского ге-

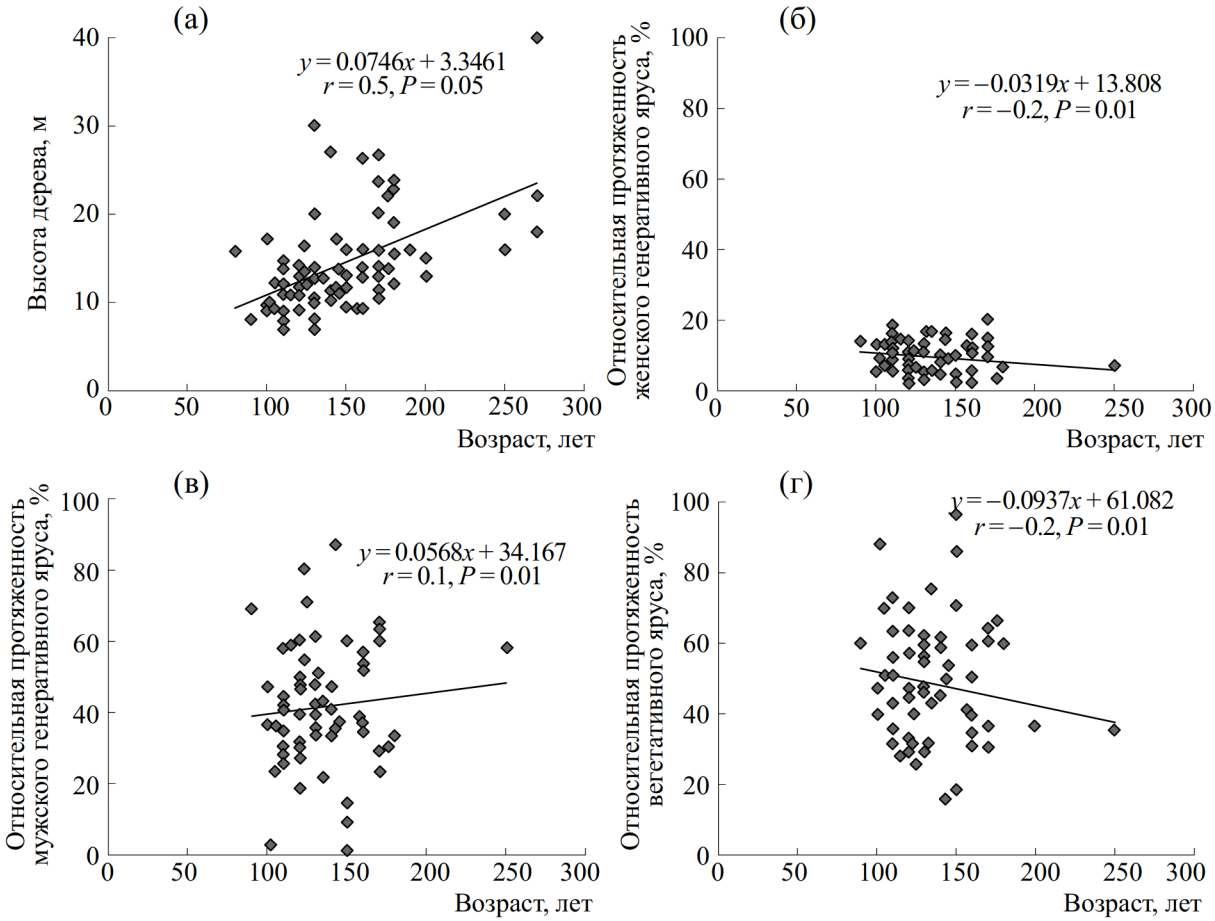


Рис. 1. Регрессия морфологических показателей крон деревьев пихты сибирской в зависимости от возраста деревьев: (а) – высота дерева, м; (б) – относительная протяженность женского генеративного яруса, %; (в) – относительная протяженность мужского генеративного яруса, %; (г) – относительная протяженность вегетативного яруса, %. P – уровень значимости, r – коэффициент корреляции.

нерaтивного яруса по оси ствола увеличивается с возрастом деревьев, женского генеративного и вегетативного ярусов, напротив, уменьшается (рис. 1б–г). Однако зависимости относительной протяженности ярусов от возраста деревьев слабые (коэффициент корреляции r = 0.1–0.2). Оценка качества моделей показала, что они практически идеально описывают ряды данных (коэффициент достоверности аппроксимации $R^2 = 1$). Очевидно, низкие значения коэффициента корреляции обусловлены значительным размахом варьирования морфологических признаков вследствие генетических особенностей отдельных деревьев, вариациями локальных лесорастительных условий и широкой нормой реакции на изменение действующих факторов (амплитуды температуры, количество осадков, мозаичность почвенных условий и пр.).

Морфологические показатели крон модельных деревьев (возраст, высота, диаметр, общая протяженность кроны и отдельных половых ярусов) имеют разнонаправленные и, как правило, слабые корреляции, что свидетельствует о значительном влиянии на них случайных факторов (табл. 2). Очевидно, этот факт, как и варьирование протяженности генеративных ярусов у разных деревьев, объясняется их генотипическими и физиологическими различиями. Заметные функциональные положительные связи выявлены только для возраста и высоты деревьев (рис. 1а), а также высоты, диаметра и протяженности кроны. Отрицательные корреляции между возрастом и относительной протяженностью вегетативного и женского генеративного ярусов вполне закономерны, так как по мере старения у деревьев наблюдается сдвиг сексуализации (увеличивается протяженность мужского генеративного яруса) [10]. С увеличением возраста дерева снижается также ежегодный линейный прирост и число межмутовочных ветвей (r = –(0.1–0.4), P = 0.05).

Угол отхождения ветвей от ствола в верхней части кроны, как правило, острый (варьирует от 43 до 90° у разных деревьев), в средней и нижней

Таблица 2. Корреляции морфологических показателей кроны деревьев пихты сибирской

Показатель		Высота, м	Диаметр на 1.3 м, см	Протяженность кроны, м	Относительная протяженность ярусов, %			
					женского	мужского	обоеполого	вегетативного
Возраст, лет		**0.4**	0.2	**0.4**	**–0.2**	**0.1**	0.2	**–0.2**
Высота, м		1	**0.6**	**0.9**	–0.04	0.2	**0.3**	0.04
Диаметр, см			1	**0.5**	0.1	0.1	0.2	–0.01
Протяженность кроны, м				1	0.1	0.1	**0.3**	0.1
Относительная протяженность ярусов, %	женского				1	0.1	**0.4**	**–0.3**
	мужского					1	0.2	**–0.9**
	обоеполого яруса						1	0.03

Примечание. Жирным шрифтом выделены коэффициенты, достоверные при $p < 0.05$.

частях крон – не превышает 90°, и лишь у отдельных ветвей нижних мутовок увеличивается до 95°, диагеотропизм у здоровых деревьев пихты сохраняется на протяжении всей жизни во всех условиях произрастания. Такое постоянство признака свидетельствует о его крайней стабильности и независимости от внешних условий. Очевидно, диагеотропизм ветвей является у пихты сибирской жестко генетически закрепленным признаком.

В горных экосистемах Сибири наблюдается усыхание деревьев пихты сибирской по характерному для данного вида «подверхушечному» типу – зона с сухими и усыхающими ветвями, либо вообще без них локализуется под вершиной дерева (табл. 3). Все категории деревьев (от здоровых до сильно усыхающих) встречаются в пределах одного насаждения. Усыханию подвержены деревья старше 90 лет (возраст начала мужской сексуализации). Исключение составили деревья, растущие в горных экосистемах северо-восточного Алтая, зона подверхушечного усыхания здесь четко выделяется только у отдельных деревьев старше 115 лет, тогда как у большей части наблюдается усыхание отдельных ветвей по всей кроне [11]. В низкогорных экосистемах преобладают, как правило, здоровые деревья, в средне- и высокогорных экосистемах (680–1450 м над уровнем моря) – средней и сильной категорий усыхания [12, 13, 17, 19]. Регрессионный анализ показал, что степень усыхания дерева слабо положительно коррелирует с возрастом (рис. 2а).

Характерными морфологическими признаками нарушения гомеостаза деревьев пихты сибирской являются появление усохшей зоны под вершиной дерева (мужской генеративный ярус) и утрата диагеотропизма ветвей. У усыхающих деревьев в верхней части крон углы отхождения ветвей от оси ствола остаются острыми (43–90°), в

Таблица 3. Характеристика модельных деревьев пихты сибирской

Место произрастания	Расстояние от вершины до усохшей части, м	Протяженность усохшей части, м	Угол отхождения ветвей, °	
			до усохшей части	после усохшей части
Хр. Западный Саян	0.5 – 1.2 0.6 ± 0.19	1.2 – 7.4 3.4 ± 0.76	53 – 67 62 ± 1.7	91 – 122 108 ± 4.7
Хр. Восточный Саян	0.5 – 2.5 1.1 ± 0.9	0.7 – 3.0 1.7 ± 0.33	67 – 86 77 ± 3.0	107 – 116 112 ± 9.4
Хр. Хамар-Дабан	0.3 – 2.0 1.0 ± 0.07	0.3 – 7.3 1.7 ± 0.17	43 – 90 70 ± 1.4	84 – 144 108 ± 1.2
Хр. Кузнецкий Алатау	0.6 – 1.5 1.0 ± 0.48	3.5 – 12.4 2.4 ± 0.52	56 – 65 63 ± 3.8	113 – 128 114 ± 6.4
Северо-восточный Алтай	0.6 – 1.6 1.1 ± 0.51	2.29 – 4.25 3.3 ± 0.98	51 – 53 52 ± 5.01	108 – 116 113 ± 2.7

Примечание. В числителе – крайние значения признаков, в знаменателе – средние значения.

усохшей части и ниже по стволу варьируют у разных деревьев от 84 до 144°, независимо от степени усыхания (табл. 3). В средней части кроны (мужской генеративный ярус) показатель увеличивается до 100–112°, в нижней (вегетативный ярус) – до 110–160°, при этом он крайне слабо зависит (r^2 = –0.01–0.09) от возраста дерева и протяженности усохшей части (рис. 2б,в).

Необходимо отметить, что утрата геотропической реакции ветвей в нижней половине кроны отмечена не только у усыхающих деревьев в нарушенных горных, но также и в неподверженных усыханию равнинных и низкогорных экосистемах, у деревьев, в значительной степени пораженных ржавчинным раком (*Melampsorella cerastii* Wint.), а также деревьев старше 260–280 лет [18, 19]. Известно, что предельный возраст пихты составляет около 300 лет, однако в условиях влажного климата гор Южной Сибири она редко доживает до 220–260 лет [20]. Очевидно, при старении и ослаблении болезнями деревья утрачивают способность к сопротивлению гравитации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процессы роста и дифференцировки растений определяются их физиологией, состоянием, питательным статусом и в значительной степени регулируются фитогормонами, перемещение которых в растении характеризуется четко выраженной полярностью, определяемой такими факторами, как освещение и гравитация [1]. Гравитация как постоянный и наиболее выраженный поляризованный фактор определяет физиологические процессы роста и развития растений, что показано в экспериментах на орбитальных станциях [6, 21]. Пихта сибирская оказалась крайне чувствительной к ее действию, гравитационный вектор проявляется на всех уровнях организации дерева: в архитектуре кроны (диагеотропизм скелетных ветвей), морфоструктуре (дорзовентральность тканей и органов побегов, распределении в них фитогормонов, локализация репродуктивных органов в кроне дерева и на побеге), потоках веществ [7, 19]. Очевидно, такое строение кроны пихты обеспечивает максимальное использование фотосинтезирующей поверхности хвои и оптимальные условия для реализации репродуктивного потенциала. Так, например, локализация шишек в верхней части кроны и на верхней стороне ветвей повышает вероятность перекрестного опыления (пыльца, поднятая ветром, под действием силы тяжести падает сверху на поверхность семенных чешуй шишек) и, следовательно, успешного оплодотворения семяпочек. При этом морфологические признаки кроны значительно варьируют у разных деревьев и довольно слабо скоррелированы между собой, что может быть обусловлено их высокой индивидуальной изменчивостью и широкой нормой реакции, обусловленными конкретным генотипом дерева [1, 2, 7].

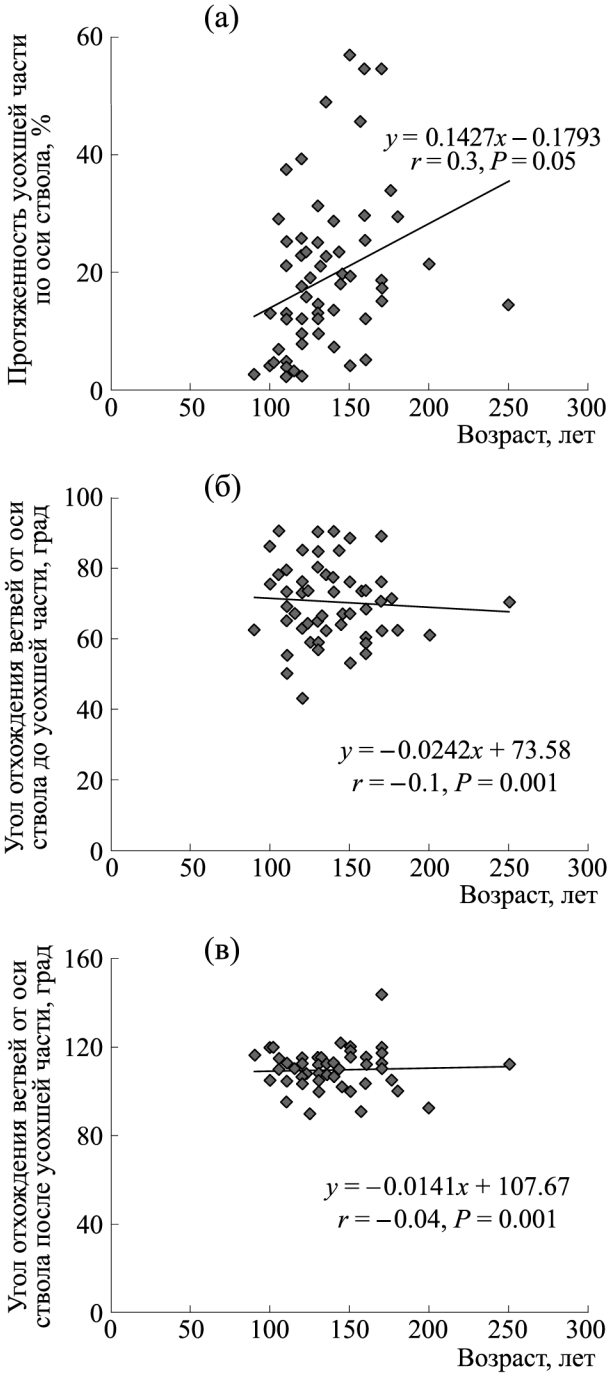


Рис. 2. Регрессия в зависимости от возраста усыхающих деревьев протяженности усохшей части по оси ствола в % (а) и угла отхождения ветвей от оси ствола в градусах до (б) и после (в) усохшей части. Обозначения, как на рис. 1.

Величина силы тяжести может изменяться в зависимости от географической широты и высоты (относительно уровня моря), рельефа окружа-

ющей местности, характера плотностных неоднородностей в верхних слоях Земли под точкой наблюдения и др. [22]. Гравитационное поле, создаваемое силой притяжения массы Земли и центробежной силой, возникающей вследствие вращения Земли вокруг своей оси, определяет нормальное изменение поля силы тяжести по широте, при этом даже в пределах расчлененного горного рельефа оно может быть достаточно гладкое. Согласно гравитационной карте [23] описываемая территория достаточно однородна. Очевидно, изменения геотропической реакции скелетных ветвей деревьев определяются индивидуальными различиями деревьев в гравичувствительности.

Растения сформировали тонкие механизмы, контроля и коррекции положения тела относительно вектора силы тяжести, при этом ответные реакции на раздражение на клеточном уровне крайне чувствительны [3, 6, 24]. Высказано мнение, что избирательное движение молекул вдоль гравитационного поля обусловливает объединение их в чувствительные к гравитации комплексы [25]. Некоторые физические характеристики клеточных компонентов (вязкость, плотность, размеры), а также транспортные процессы (диффузия и конвекция) определяются действием гравитации [26]. В частности, показано, что механизмы гравиперцепции у растений определяются физическими процессами – электрокинетическими явлениями в клетке, переносом ионов кальция и протонов, а также седиментацией амилопластов в чувствительных клетках (статоцистах) [27, 28]. Как центр, чувствительный к гравитации, может функционировать и эндоплазматический ретикулум [6]. Благодаря этим механизмам гравитация влияет на кинетику ферментов, мембранный потенциал клеток, а также на потоки фитогормонов и экспрессию генов. Роль гравитации в экспрессии генов, вовлеченных в производство и реконструкцию клеточных стенок, показана в последние годы на примере выращиваемых в космосе растений [29].

Морфогенетические процессы растений определяются генотипом во взаимодействии с условиями развития и физиологическим состоянием в онтогенезе [1, 30]. Особенности развития дерева отражаются в геометрической и топологической организации отдельных его компонентов – архитектуре кроны, локализации и потоках веществ, в том числе и гормонов, регулирующих гравиморфизм побегов [31–33]. Показано, что в условиях стресса у растений происходят изменения содержания и нарушения градиентов кальция, играющего важную роль в гравиперцепции [6, 19, 27]. Нарушения физиологических и морфогенетических процессов приводят к отказу системы надежности организмов, что наблюдаются и у деревьев пихты сибирской при усыхании [10–13, 34]. Утрата диагеотропизма скелетных ветвей отмечена не только в нарушенных лесных экосистемах, но и у больных и старовозрастных деревьев. Можно предположить, что нарушение гомеостаза, независимо от триггерных факторов, изменяет физиологические процессы и физические свойства тканей и клеток, что ослабляет способность деревьев сопротивляться действию силы тяжести и приводит к изменению ориентации скелетных ветвей. Однако для определения механизмов, ответственных за гравиориентацию побегов у пихты сибирской, необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. Влияние гравитации проявляется на всех уровнях организации архитектуры крон деревьев пихты сибирской: диагеотропизм ветвей, полярность расположения репродуктивных органов, ассимитричность роста хвои и ветвей.

2. При нарушении гомеостаза, независимо от триггерных факторов (старение, усыхание, биотические), у деревьев пихты сибирской, прежде всего, теряется способность к сопротивлению гравитации, что проявляется в нарушениях гравиориентации скелетных ветвей и приводит к изменениям архитектуры крон. Утрата геотропической реакции является универсальным биомаркером нарушения гомеостаза деревьев пихты сибирской.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ф. Уоринг, И. Филлипс, *Рост и дифференцировка растений* (Мир, М., 1984).
2. Э. Синнот, *Морфогенез растений* (Наука, М., 1963).
3. А. И. Меркис, *Сила тяжести в процессах роста растений. Серия «Проблемы космической биологии»* (Наука, М., 1990), т. 68.
4. В. Ф. Раздорский, *Анатомия растений* (М., 1949).
5. P. Larsen, in *Physiology of movements. HandBuch der Pflanzenphysiologie*, ed. by L. Aletsee et al. (Springer, Berlin, 1962), vol. 17 (2), pp. 34–73.
6. *Plant gravitational and Space research*, Ed. by Th. W. Halsted and T. K. Scott (Waverly Press, Baltimore, Marylend, 1984).

7. Е. Г. Минина и И. Н. Третьякова, *Геотропизм и пол у хвойных*.(Наука, Новосибирск, 1983).
8. H. R. Bode, Planta **54,** 15 (1959).
9. О. Г. Каппер, *Хвойные породы* (Лесн. промышленность, М.-Л., 1954).
10. И. Н. Третьякова и Е. В. Бажина, Известия РАН. Сер. биол. **121** (6), 685 (1995).
11. Е. В. Бажина, В. П. Сторожев и И. Н. Третьякова, Лесоведение **2**, 15 (2013).
12. Ф. Н. Кудашова, в кн. *Классификация и динамика лесов Дальнего Востока*.(Владивосток, 2001), сс. 157–158.
13. Е. В. Бажина, Региональная экология **2** (48), 18 (2017).
14. Е. В. Бажина, Региональная экология **2** (52), 7 (2018).
15. В. А. Алексеев, Лесоведение **4**, 51 (1989).
16. Н. П. Поликарпов, Н. М. Чебакова и Д. И. Назимова, *Климат и горные леса Южной Сибири* (Наука, Новосибирск, 1986).
17. I. N. Tretyakova and E. V. Bazhina, Ecology (Bratislava) **19** (3), 280 (2000).
18. Е. В. Бажина, Ботан. журн. **90** (5), 696 (2005).
19. Е. В. Бажина, Nature Conservation Research. Заповедная наука **3** (2), 40 (2018).
20. Э. Н. Фалалеев, *Пихта* (Лесн. промышленность, М, 1982).
21. М. Г. Таирбеков, *Гравитационная биология клетки (теория и эксперимент)* (М., 1997).
22. D. Adam, Nature **416** (6876), 10 (2002).
23. B. G. Levi, Physycs Today **56** (2), 1 (2003).
24. A. Bérut, H. Chauvet, V. Legué, et al., in Proc. Natl. Acad. Sci. USA **115** (20), 5123 (2018).
25. H. Mel, Chem. Engeen. Sos. **19**, 847 (1954).
26. J. Kessler and M. Bier, Progr. Astronaut. Aeronaut. **52** (1), 125 (1977).
27. D. Slocum and S. J. Roux, Planta **157** (6), 481 (1983).
28. A. Sievers and W. Hensel, *Gravireception in plants* (Pitman, London, 1985).
29. A. Krishnamurthy, R. J. Ferl, and A.-L. Paul, Appl. Plant Sci. **6** (11), 1197 (2018).
30. E. Gottardini, F. Cristofolini, A. Cristofori, et al., Ecol. Indicator **60**, 1041 (2016).
31. D. W. Gilmore and R. S. Seymour, Tree Physiol. **17**, 71 (1997).
32. C. Y. A. Little and M. B. Lavigne, Tree Physiol. **22**, 311 (2002).
33. F. Buissart, Y. Caraglio, Ph. Borianne, et al., Trees **29,** 1827 (2015).
34. Д. М. Гродзинский *Надежность растительных систем* (Киев, Наук. думка, 1983).

Changes in *Abies sibirica* Crown Architecture when Homeostatic Balance is Disrupted

E.V. Bazhina

Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia

The crown of *Abies sibirica* has some distinctive features: tight pyramidal, apical dominance, branch position by male and female investment, whorl branching. The development of the tree crown has distinct dependency on gravity through all stages of the growth cycle: the architectural unit stage (branches are diageotropic), morphological structure (dorsoventrality of shoot tissues and organs, localization of reproductive organs in the tree crown and on the shoot); physiological processes. It is shown that the inner condition for a tree has a central role during growth oriented against gravity. When trees are in poor condition, they exhibit no diageotropism that could be considered to be a bioindicator of the effect of a disruption of homeostasis.

Keywords: *Abies sibirica*, architecture of crown, gravitropism, drying, diageotropism of branch setting, correlations between morphological traits

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 760–768

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 663.951.542.943-032.1

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ И МОЗГА МЫШЕЙ

© 2020 г. Н.Н. Сажина, М.Г. Семенова, А.С. Антипова, Е.И. Мартиросова, Н.П. Пальмина

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

E-mail: natnik48s@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.
После доработки 31.03.2020 г.
Принята к публикации 02.04.2020 г.

В настоящее время большое внимание уделяется разработке и созданию эффективных систем доставки незаменимых омега-3-полиненасыщенных жирных кислот и других нутрицевтиков в организм человека через пищевые системы. Одними из таких систем доставки являются нанокомплексы на основе липосом соевого фосфатидилхолина с включенными нутрицевтиками, длительное потребление которых может оказать влияние на антиокислительный статус различных органов и тканей. В работе методом термоинициированной хемилюминесценции проведено исследование изменения антиокислительной активности плазмы крови, липидов печени и мозга шести групп мышей в зависимости от состава липосомных нанокомплексов, введенных в напитки, заменяющие воду, в их длительную (трехмесячную) диету. Компонентами шести видов липосомных нанокомплексов, кроме фосфатидилхолина, в разном сочетании служили: эфирное масло гвоздики, рыбий жир и казеинат натрия. Показано, что нанокомплексы, содержащие липосомы из фосфатидилхолина с добавлением в них рыбьего жира, эфирного масла гвоздики и инкапсулированных молочным белком казеинатом натрия, оказались самыми эффективными в отношении увеличения антиокислительной активности плазмы крови и липидов мозга мышей по сравнению с контролем.

Ключевые слова: функциональные нутрицевтики, липосомы, эфирное масло гвоздики, рыбий жир, казеинат натрия, антиоксидант, антиокислительная активность, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302920040183

Известно, что суммарная антиокислительная активность (АОА) различных органов и тканей является важным показателем для оценки состояния организма и его устойчивости к повреждающим воздействиям и развитию многих заболеваний [1–7]. К изменению этой величины могут приводить как различные физические факторы, так и введение в организм веществ как искусственного, так и природного происхождения, их смесей, растительных экстрактов и масел [1–10]. Степень влияния всех перечисленных воздействий на АОА зависит от антирадикальной и антиокислительной активности вводимых веществ, их взаимодействия друг с другом и теми антиоксидантами, которые содержатся в органах и тканях экспериментальных животных [1, 8, 9].

В настоящее время широкое распространение получила идея введения в рацион питания дополнительного количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Данное предложение связано с тем, что, с одной стороны, ПНЖК играют важную роль в поддержании ряда физиологических функций организма животных и человека (рецепторных, противовоспалительных, регуляторных) [11–15], а с другой – они не синтезируются в организме млекопитающих и потребляются с пищей. Наиболее оптимальным для усвоения *in vivo* является соотношение ПНЖК (омега-6 : омега-3 = 1:1 – 4:1) [15]. Однако создание таких продуктов, обогащенных ПНЖК, сопряжено с определенными трудностями, обусловленными тем, что высокое содержание ненасыщенных углерод-углеродных связей в их молекулах способствует их окисляемости и деградации с образованием токсичных продуктов: гид-

Сокращения: АОА – антиокислительная активность, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ФХ – фосфатидилхолин, ЭМГ – эфирное масло гвоздики, Каз-Na – казеинат натрия, РЖ – рыбий жир, ACW – суммарная антиокислительная емкость водорастворимых соединений плазмы крови, ACL – антиокислительная емкость жирорастворимых соединений в липидах, ХЛ – хемилюминесценция.

роперекисей, кетонов и альдегидов. Кроме того, липофильная природа ПНЖК затрудняет их введение в низкожирные или имеющие 0% жирности продукты питания.

В работах [16, 17] был выполнен цикл исследований, посвященных созданию и всестороннему изучению физико-химических свойств нанокомплексов пищевых биополимеров с липосомами соевого фосфатидилхолина (ФХ), обогащенных незаменимой растительной омега-3 ПНЖК в отсутствие и в присутствии растительного антиоксиданта – эфирного масла гвоздики (ЭМГ). Однако оставался открытым вопрос о биодоступности и степени биоусвоения омега-3 ПНЖК и ЭМГ из биополимерных наноконтейнеров в живом организме при их пероральном употреблении. В частности, длительный прием липосомальных комплексов может существенно изменить не только уровень ПНЖК в липидах, но и оказать влияние на такой показатель, как суммарную антиокислительную активность различных органов и тканей.

В литературе представлены работы, связанные с оценкой влияния приема растительных и эфирных масел, антиоксидантов и других биологически активных добавок на состав липидов органов мышей, их общеклинические показатели, активность некоторых антиоксидантных ферментов и уровень АОА [10, 18–22]. Например, в работе [10] методом фотохемилюминесценции исследовали АОА шести разных растительных масел и влияние их пятнадцатисуточного приема на АОА липидов сыворотки крови крыс. Установлено значительное различие (в два-четыре раза) суммарной АОА масел между собой, а также высокая корреляция (~0.95) между АОА масел и АОА липидов сыворотки крови. Работы по изучению влияния на антиокислительный статус организма *in vivo* состава водорастворимых липосомных нанокомплексов, включающих различные нутрицевтики и длительно принимаемых перорально, в литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы – изучить *in vivo* влияние состава водорастворимых липосомных нанокомплексов, принимаемых перорально, на антиокислительную активность плазмы крови, а также липидов печени и мозга у экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фосфатидилхолин фирмы Lipoid GmbH (Германия) следующего химического состава по данным фирмы: фосфолипиды – 94% фосфатидилхолина, 0.6% фосфатидилэтаноламина, 3% лизофосфатидилхолина, 0.1% фосфатидилинозита; триглицериды – 2%; свободные жирные кислоты – 0.5%; α-токоферол – 0.15%. Использовали также казеинат натрия (Каз-Na) фирмы Sigma (Новая Зеландия); органические растворители фирмы Merk (Германия); эфирное масло гвоздики фирмы Plant Lipids Ltd (Индия); рыбий жир (концентрат омега-3 «Омега-3 дети», ООО «РУСКАПС», Москва); аскорбиновая кислота (Sigma, США); тролокс™ (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) фирмы Aldrich (США). В китах ARA-W (для определения антирадикальной активности водорастворимых соединений) и ARA-L (для определения антирадикальной активности жирорастворимых соединений) фирмы Oxidaq UG Ltd. (Германия) содержатся соответственно 2,2′-азо-бис(2-метил-пропионамидин)дигидрохлорид и 2,2'- азо-бис(2,4-диметил-валеронитрил) фирмы Wako-chemicals (Япония).

Приготовление растворов липосомных нанокомплексов. В экспериментах были использованы водные растворы шести видов липосомных нанокомплексов в качестве напитков, заменяющих воду в диете экспериментальных животных:

Диета 1. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 2.50 мг/мл).

Диета 2. Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ) (с концентрацией в растворе [ФХ] = 2.50 мг/мл). Весовое отношение компонентов липосомного нанокомплекса: ФХ : ЭМГ = = 1 : 0.02.

Диета 3. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл), инкапсулированные казеинатом натрия (Каз-Na) (с концентрацией в растворе [Каз – Na] = 16.6 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном нанокомплексе: ФХ : Каз-Na = 1 : 10.

Диета 4. Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ) ([ФХ] = 2,50 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз–Na] = 25,0 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном нанокомплексе ФХ : ЭМГ : Каз-Na = 1 : 0,02 : 10.

Диета 5. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира (РЖ) (с концентрацией в растворе [РЖ] = = 1.66 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз–Na] = 33.3 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном нанокомплексе ФХ : РЖ : Каз-Na = 1 : 1 : 20.

Диета 6. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира (с концентрацией в растворе [РЖ] = 1.66 мг/мл) и ЭМГ (2% от веса ФХ + РЖ), инкап-

сулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз–Na] = 33.3 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном нанокомплексе: ФХ : РЖ : ЭМГ : Каз-Na = 1 : 1 : 0.02 : 20.

Приготовление липосом. Липосомы ФХ с добавлением ЭМГ и/или РЖ готовили по следующей методике: в стерилизованные при 110°C (30 мин) стеклянные стаканчики взвешивали необходимые навески ФХ/ЭМГ/РЖ. Добавляли в них расчетное количество свежекипяченой бидистиллированной воды, диспергировали ФХ/ЭМГ/РЖ в воде при помощи трехкратной механической гомогенизации, используя гомогенизатор (Heidolph, Германия), в течение 2 мин при 20000 об/мин. Полученную водную дисперсию ФХ/ЭМГ/РЖ дополнительно обрабатывали ультразвуком для получения наноразмерных липосомных комплексов, используя при этом ультразвуковой гомогенизатор VCX-130 (Sonics & Materials, США) в подобранном предварительно режиме: озвучивание в течение 5 мин при 40% мощности сигнала (отношение времени озвучивания к времени без озвучивания 30 с : 30 с). При озвучивании образец охлаждали во льду. Для получения наноразмерных липосомных комплексов такой режим озвучивания повторяли семикратно. После этого проводили центрифугирование полученных водных растворов липосомных комплексов ФХ/ЭМГ/РЖ в стерилизованных (при 110°C, 30 мин) центрифужных пробирках в течение 30 мин при 4000 об/мин (1800 *g*) для удаления металлической стружки от ультразвукового зонда. Инкапсулирование белком (Каз-Na) приготовленных липосом (ФХ/ЭМГ/РЖ) проводили смешением их растворов в стерилизованных (при 110°C, 30 мин) бутылочках для кормления с последующим их встряхиванием (165 об/мин) в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) при 40°C в течение 1 ч. После этого повышали температуру в шейкер-инкубаторе до 63°C и пастеризовали все приготовленные растворы в течение 30 мин при их продолжающемся встряхивании (165 об/мин).

Все приготовленные растворы липосомных нанокомплексов готовили на двое суток из расчета их потребления одной мышью в объеме 7 мл ежедневно.

Животные и дизайн эксперимента. 50 мышей линии F1(C57blxDBA2\6) массой 18–20 г из вивария «Столбовая» (Московская область) были разделены на восемь групп по шесть-семь мышей в каждой группе. Мышей содержали на диете в течение 92 суток.

I группа животных (семь особей) получала общевиварный рацион и была забита методом декапитации в первый день эксперимента. II группа (шесть особей) получала диету 1; III группа (шесть особей) – диету 2; IV группа (шесть особей) – диету 3, V группа (шесть особей) – диету 4; VI группа (шесть особей) – диету 5; VII группа (шесть особей) – диету 6; VIII группа (семь особей) содержалась на общевиварном рационе все 92 суток эксперимента и была забита в конце опыта. Через 92 суток после начала приема различных диет мыши были забиты методом декапитации, а плазма крови, ткани печени и головного мозга животных были взяты для исследования их антиокислительной активности. Кровь собирали в пробирки с 5%-м раствором цитрата натрия, центрифугировали при 1300 *g* и комнатной температуре 10 мин, отделяли плазму крови.

Выделение липидов из плазмы крови, печени и мозга. Экстракцию липидов из плазмы крови проводили по методу Блайя и Дайера [23]; из тканей печени и головного мозга – по методу Фолча в модификации Кейтса [24].

Определение антиокислительной активности плазмы крови, липидов печени и головного мозга мышей. Измерения антиокислительных параметров проводили на хемилюминометре Minilum® L-100 компании Oxidaq UG Ltd. (Германия) с проточной, термостатированной при 37 ± 0.02°C кюветой [25], методом термоинициированной хемилюминесценции с использованием китов ARA-W и ARA-L [26]. Определяли ACW (суммарную антиокислительную емкость водорастворимых соединений плазмы крови) и ACL (антиокислительную емкость жирорастворимых соединений в липидах). Принцип термоинициированной хемилюминесценции основан на регистрации хемилюминесценции (ХЛ), сопровождающей взаимодействие с люминолом свободных радикалов, возникающих при термоинициированном распаде водорастворимого азосоединения 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорида для ACW или жирорастворимого 2,2'-азо-бис(2,4-диметил-валеронитрила) для ACL в соответствии со схемой (рис. 1) [27–29]. С потенциальными антиоксидантами могут реагировать радикалы $R^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$, $L^{\bullet-}$, $O_2^{\bullet-}$, формирующиеся в реакциях, протекающих в процессе окисления.

При определении ACW плазмы крови мышей в реакционную кювету добавляли 50 мкл раствора 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорида, 50 мкл раствора люминола (кит ARA-W). Объем вводимой плазмы крови мышей составил 5–10 мкл, фосфатный буферный раствор

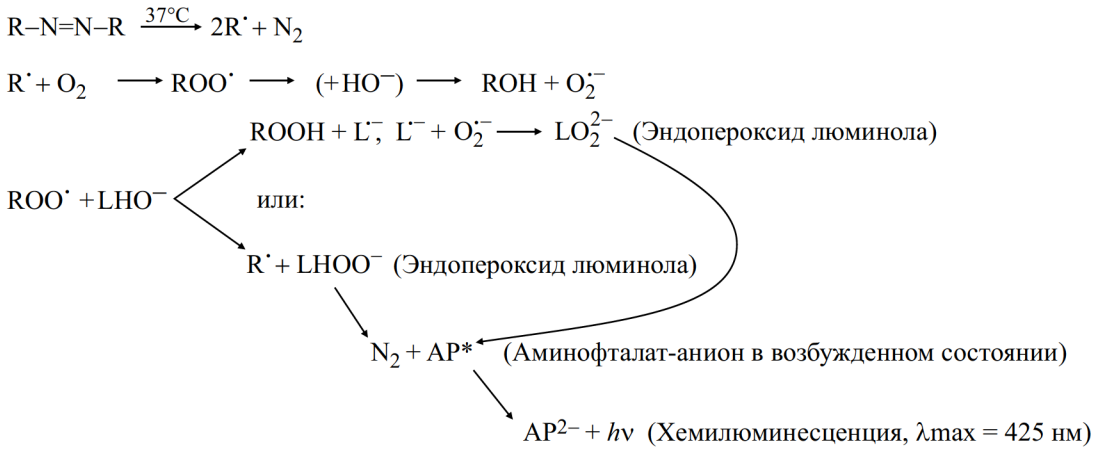


Рис. 1. Схема предполагаемых реакций в модели термоинициированной хемилюминесценции [27–29].

(pH 7.2) добавляли до конечного объема реакционной смеси (1.5 мл) [26]. Для каждой группы мышей проводили пять-шесть повторных регистраций. Измеряемым параметром являлся период индукции τ, который определяли как время от момента инициирования окисления до точки пересечения с осью времени касательной, приложенной к ХЛ кривой в точке ее перегиба (рис. 2). Для калибровки в качестве эталона использовали аскорбиновую кислоту, ACW выражали в эквивалентном содержании аскорбиновой кислоты в 1 мл плазмы крови (нмоль аскорбиновой кислоты/мл плазмы). На рис. 2 приведены характерные ХЛ-кривые для определения ACW плазмы крови мышей.

Надо отметить, что в отличие от ХЛ-кривой для аскорбиновой кислоты (рис. 2, кривая *1*), для всех ХЛ-кривых плазмы крови характерно увеличение интенсивности ХЛ после периода индукции выше холостой пробы (кривая *0*). Подобную картину для термоинициированной ХЛ плазмы и сыворотки крови наблюдали также и в других работах (например, [30, 31]). Это может быть связано с образованием в процессе окисления люминола промежуточных радикальных интермедиатов, меняющих кинетику окисления. Глутатион, а также некоторые другие тиильные соединения в белках плазмы крови, например цистеин, могут восстанавливать образующиеся при окислении гидропероксиды, и это восстановление может проходить через радикальные стадии (тиильные

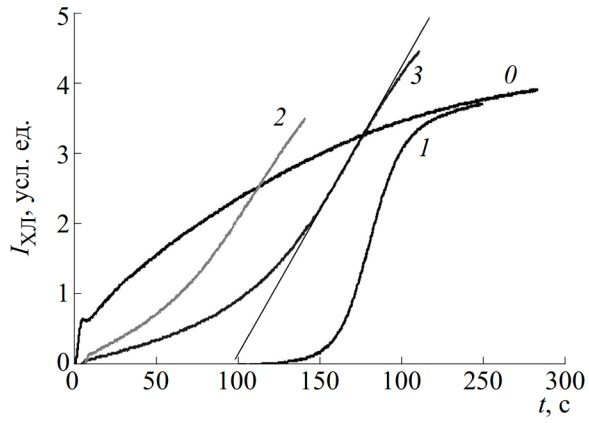


Рис. 2. Примеры характерных кинетических кривых интенсивности ХЛ (I) при измерении ACW плазмы крови мышей: кривая *0* – холостая проба (без плазмы), *1* – аскорбиновая кислота, кривые *2* и *3* – плазма крови мышей (VIII и I гр.), прямая линия – касательная к кривой *3* в точке ее перегиба.

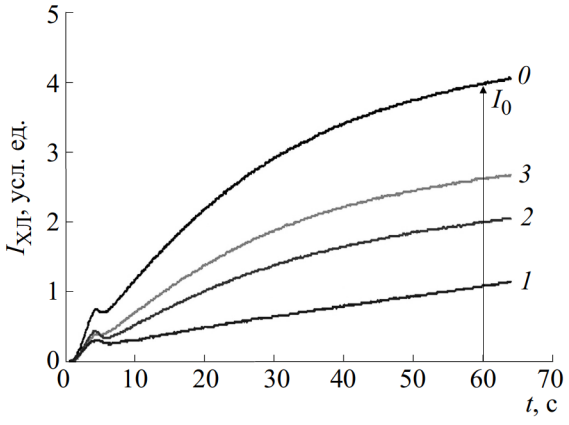


Рис. 3. Примеры характерных кинетически кривых ХЛ для определения ACL: *0* – холостая проба (бланк); кривые *1–3* – соответственно липиды плазмы крови, печени и мозга; I_0 – интенсивность ХЛ на кривой (*0*) при $t = 60$ с.

Суммарная антиокислительная активность водорастворимых компонентов плазмы крови

ACW, нмолей аскорбиновой кислоты/мл плазмы							
I[#]	II	III[#]	IV	V	VI	VII	VIII
69.9 ± 3.8	27.8 ± 1.1	49.2 ± 5.5	22.0 ± 5.0*	23.8 ± 4.4*	24.2 ± 3.7*	36.6 ± 6.5	31.0 ± 5.2

Примечание. [#] – Плазма крови с гемолизатом; * – $p < 0.05$ по отношению к контрольной группе VIII.

соединения + гидропероксиды → $TS^{\bullet}$ + $LO^{\bullet}$ + H_2O), образуя дополнительный источник радикалов [32, 33]. Возможно, некоторые интермедиаты плазмы крови выступают как активаторы люминесценции. Остатки гемоглобина эритроцитов в плазме крови могут проявлять радикалпродуцирующую активность по отношению к липидным и другим органическим гидропероксидам, присутствующим в плазме, инициируя образование липидных пероксильных радикалов [30].

Для определения АОА жирорастворимых соединений в липидах плазмы крови, печени и мозга (ACL) измеряли степень уменьшения (I/I_0) амплитуды ХЛ (I) в момент времени $t = 60$ с от начала окисления по сравнению с амплитудой ХЛ для холостой пробы I_0 (рис. 3). Объем реакционной смеси в кювете составил 1.5 мл, включая объем добавляемых липидов (50–100 мкл), 25 мкл раствора 2,2'- азо-бис(2,4-диметил-валеронитрила) и 125 мкл раствора люминола (киты ARA-L), остальное – метанол [26]. Число повторов равнялось четырем-пяти. Калибровку для ACL проводили по тролоксу и выражали в эквивалентном содержании тролокса в мг липидов (нмоль тролокса/мг липидов).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с использованием компьютерных программ Origin Pro 8.1 и Microsoft® Office Excel. Результаты исследования представлены как средняя измеряемая величина ± стандартная ошибка средней. Для сравнения данных использовались методы непараметрической статистики с критерием Манна–Уитни. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как указывалось выше, устойчивость организма к повреждающим воздействиям и развитию патологий многие авторы связывают с уровнем суммарной антиоксидантной активности их органов [1–7, 30, 34, 35]. При этом делаются попытки использовать метод хемилюминесценции в клинике для целей диагностики и контроля над терапией заболеваний [29, 30], причем в одних работах предпочтение отдается водорастворимым антиоксидантам [29-31], а в других – жирорастворимым [1, 2]. Мы использовали в наших экспериментах киты ARA-W и ARA-L, позволяющие оценить АОА и водо- и жирорастворимых веществ в плазме крови экспериментальных животных.

В таблице представлены результаты измерения суммарной АОА водорастворимых компонентов плазмы крови (ACW) для восьми групп исследованных животных, выраженные в единицах, эквивалентных количеству аскорбиновой кислоты.

Как видно из таблицы, уровень АОА плазмы крови мышей групп I и III значительно выше остальных. Следует отметить, что в этих образцах визуально был заметен гемолизат эритроцитов. В процессе гемолиза в плазму крови попадают элементы эритроцитов: метгемоглобинредуктаза, супероксиддисмутаза и ферменты глутатионового цикла [36], которые, как было показано в работах [36, 37], эффективно увеличивают период индукции на кривых хемилюминесценции. Поэтому высокий уровень ACW в плазме крови мышей I и III групп можно объяснить именно гемолизом. К сожалению, наличие гемолиза не позволяет провести сравнение уровней ACW в плазме крови исходных контрольных животных и мышей группы VIII (контроль через 92 суток после начала эксперимента). Рассматривая результаты, полученные для ACW остальных групп животных, можно сказать, что по сравнению с группой VIII, являющейся контролем, наблюдается статистически достоверное снижение ACW плазмы у мышей групп IV, V и VI, которые принимали липосомы, изготовленные из ФХ + Каз-Na, ФХ + ЭМГ + + Каз-Na и ФХ + РЖ + Каз-Na соответственно. Значение ACW плазмы крови у мышей группы VII находится на уровне контроля, но статистиче-

ски достоверно превышает ACW плазмы крови мышей групп II, IV, V и VI.

Таким образом, можно сделать вывод, что применение всех используемых диет или не влияло на уровень АОА водорастворимых антиоксидантов плазмы крови (группа VII), или даже снижало его (группы IV и VI).

Рассмотрим теперь, какие изменения под влиянием различных диет произошли в АОА жирорастворимых антиоксидантов (ACL) плазмы крови мышей. Эти результаты приведены на рис. 4а.

Видно, что у контрольных мышей, содержащихся на общевиварном рационе, ACL плазмы крови уменьшилась за три месяца проведения эксперимента более чем в шесть раз (группы I и VIII). Это объясняется старением животных и снижением уровня ACL [38, 39]. Все используемые водорастворимые нанокомплексы увеличивали ACL липидов плазмы крови мышей по сравнению с соответствующим контролем (группа VIII). Это связано, как и предполагалось, с наличием в нанокомплексах жирорастворимых антиоксидантов, накапливающихся при постоянном приеме в липидах плазмы крови. Наибольший эффект наблюдался у животных группы II, для которых уровень ACL статистически достоверно не отличался от уровня у контрольных молодых мышей. Вероятно, это связано с накоплением в липидах плазмы крови альфа-токоферола, небольшое количество которого содержалось в ФХ, использованном для приготовления исходных липосом. Не исключено, что усвоение альфа-токоферола из плазмы крови органами животных группы II идет медленнее, чем у мышей, принимающих более сложные нанокомплексы, созданные на основе того же ФХ. Сравнивая между собой эффективность других нанокомплексов, можно отметить, что на фоне всех остальных выделяются по степени увеличения (в полтора-два раза) ACL группы V (ФХ:ЭМГ:Каз-Na=1:0,02:10) и группы VII (ФХ:РЖ:ЭМГ:Каз-Na = 1:1:0,02:20) с диетой, содержащей ЭМГ и Каз-Na. ACL плазмы крови мышей группы VII, отличавшейся от группы V дополнительным приемом рыбьего жира, была выше, что, вероятно, объясняется наличием в рыбьем жире некоторых жирорастворимых антиоксидантов. Сопоставляя влияние используемых диет на АОА водо- и жирорастворимых антиоксидантов плазмы крови, можно сделать заключение о их противоположном действии: эффективность водорастворимых антиоксидантов снижается или не изменяется, в то время как АОА липидной компоненты возрастает.

Изменения ACL липидов печени мышей, приведенные на рис. 4б, свидетельствуют о тенден-

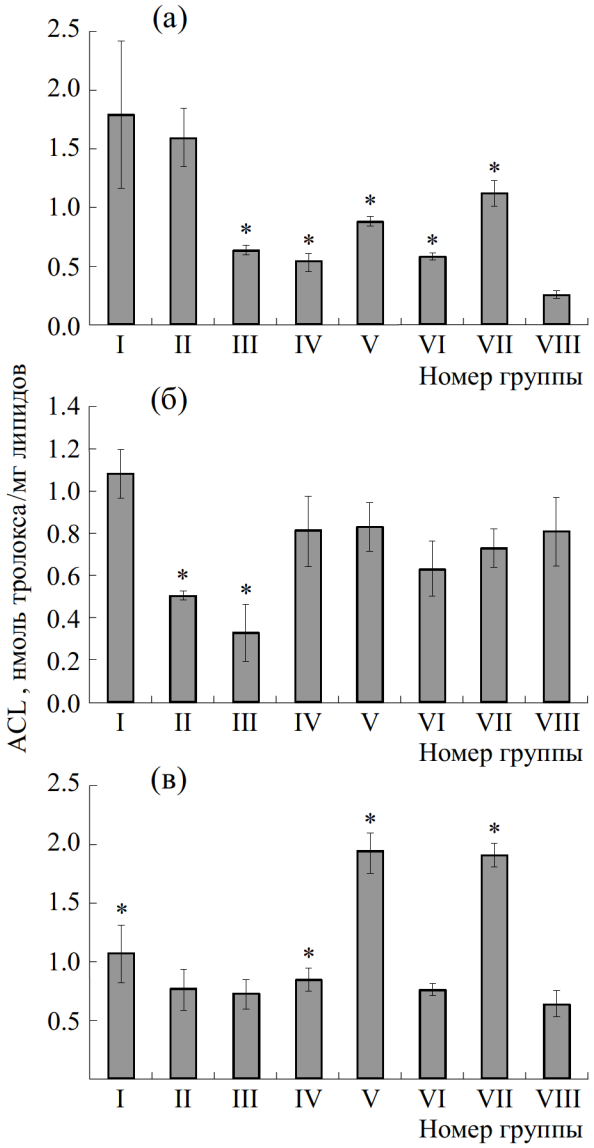


Рис. 4. Сравнительные диаграммы суммарной АОА жирорастворимых компонентов (ACL) плазмы крови (а), печени (б) и мозга (в); * – $p < 0.05$ по отношению к контрольной группе VIII.

ции к снижению ACL у возрастных животных (группа VIII), достоверном уменьшении ACL в группах II (ФХ) и III (ФХ:ЭМГ = 1:0,02) и сохранении того же уровня ACL, что и в контроле (группа VIII), в группах с IV по VII. По-видимому, уменьшение уровня АОА липидов в группах II и III можно связать с конкурентными взаимодействиями введенных с диетой экзогенных антиоксидантов и эндогенных антиоксидантов, содержание которых в печени достаточно высокое [1, 2, 38, 39]. Ранее нами было установлено, что хроническое введение антиоксидантов иногда может приводить к снижению АОА именно в печени [1, 2, 40]. Эвгенол, входящий в состав ЭМГ, в высо-

ких концентрациях также может выступать как прооксидант и инициатор перекисного окисления липидов [41, 42].

Для липидов мозга видно (рис. 4в), что, как и в плазме крови, ACL у контрольных мышей группы VIII достоверно снижена по сравнению с группой I, хотя и не столь значительно (примерно в полтора раза), что также можно объяснить возрастными изменениями [38, 39]. Действие всех нанокомплексов приводило к увеличению ACL по отношению к контролю (группа VIII). Если для групп II (ФХ), III (ФХ+ЭМГ) и VI (ФХ+РЖ+Каз-Na) это было только тенденцией, то в группах IV (ФХ+Каз-Na), V (ФХ:ЭМГ:Каз-Na=1:0,02:10) и VII (ФХ:РЖ:ЭМГ:Каз-Na = 1:1:0,02:20) наблюдалось статистически достоверное увеличение данного параметра; при этом значения ACL у мышей групп V и VII в два-три раза превышали уровень ACL в остальных группах животных.

Сопоставляя влияние различных липосомных нанокомплексов на АОА липидов различных органов экспериментальных животных (плазма крови, печень и головной мозг), можно отметить следующие закономерности: в течение 92 суток проведения эксперимента АОА липидов всех исследуемых органов животных, содержащихся на общевиварном рационе (группы I и VIII), уменьшалась, хотя и в различной степени, а наибольшие изменения происходили в липидах плазмы крови. Это уменьшение можно объяснить возрастными изменениями [38, 39]. Использование в диетах мышей липосомных комплексов приводило к увеличению АОА липидов плазмы крови и головного мозга, приближая эту величину к уровню, характерному для молодых особей (группа I), или даже превышая его (головной мозг мышей групп V и VII). Это, безусловно, является положительным моментом, так как связано с повышением устойчивости данного органа к повреждающим воздействиям. Следует отметить, что ранее аналогичные качественные данные были получены в работе [19] при шестимесячном введении мышам ЭМГ в виде водной взвеси. Однако в наших экспериментах получился больший эффект, особенно при использовании диет, в которых наряду с антиоксидантами (α-токоферолом и ЭМГ) содержался Каз-Na (группы IV, V и VII). В случае же групп V и VII можно предположить, что это увеличение объясняется накоплением как в мозге, так и в плазме крови мышей жирорастворимого антиоксиданта, коим является эвгенол из гвоздичного масла [41–43]. В липосомной диете, содержащей рыбий жир, из него, кроме омега-3 и других жирных кислот, в клетки мозга попадает еще один антиоксидант, а именно жирорастворимый витамин А. Омега-3 в сочетании с α-токоферолом могут «включать» также клеточные сигнальные пути, ведущие к увеличению активности антиоксидантных ферментов [44]. Использование в диете водорастворимых липосомных нанокомплексов, состоящих из липосом ФХ с ЭМГ, покрытых белковой оболочкой, способствует, по-видимому, лучшей доставке антиоксидантов из липосом в клетки мозга и препятствует их расходованию в процессах перекисного окисления липидов. При использовании липосом, состоящих из одного ФХ (группа II), мы наблюдали значительное увеличение АОА плазмы крови при отсутствии изменений в головном мозге. Данное различие можно объяснить незначительным включением этих липосом в липиды мозга, но заметным накоплением в плазме крови. Переход к более сложным диетам, содержащим, наряду с ФХ, ЭМГ и Каз-Na (группы V и VII), приводит к увеличению и АОА липидов плазмы крови, и АОА головного мозга. Это хорошо коррелирует с нашими данными, полученными при окислении этих липосом *in vitro*: именно сочетание ЭМГ и Каз-Na вызывало синергетическое увеличение периода индукции на кривых окисления [43]. Возможно, что в головном мозге мышей групп V и VII работают оба фактора – облегчение транспорта липосом с антиоксидантами и синергизм в действии ЭМГ и Каз-Na.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе методом термоинициированной хемилюминесценции было проведено исследование изменения антиокислительной активности водорастворимых и липидных компонентов плазмы крови мышей, а также АОА липидов их печени и мозга в зависимости от состава водорастворимых липосомных нанокомплексов, включенных в комплексную диету мышей на протяжении 92 суток.

По результатам можно сделать вывод, что диета мышей с водорастворимой добавкой инкапсулированных Каз-Na липосом из соевого ФХ с добавлением в них рыбьего жира и включением ЭМГ оказалась самой эффективной в отношении ACL плазмы крови, а также значительно увеличивала АОА липидов мозга мышей по сравнению с контролем. Это дает основание рекомендовать такие липосомные нанокомплексы в качестве функциональных добавок для практического использования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят д-ра И.Н. Попова (НИИ антиокислительной терапии, Берлин, Германия) за научно-техническую поддержку этой работы, выполненной в рамках договора о сотрудничестве между ИБХФ РАН и НИИ АТ, и критическое прочтение рукописи. Мы благодарим также компанию Oxidaq UG Ltd (Берлин, Германия) за

предоставление нам прибора Minilum® и необходимых реактивов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

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. Е. Б. Бурлакова, А. В. Алесенко, Е. М. Молочкина и др., *Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте* (Наука, М., 1975).
2. Е. Б. Бурлакова и Н. П. Пальмина, Вопр. онкологии **36** (10), 1155 (1990).
3. Е. Б. Бурлакова, Успехи химии **44** (10), 1871 (1975).
4. Е. Б. Бурлакова, Г. Ф. Иваненко и Л. Н. Шишкина, Изв. АН СССР. Сер. биол., № 4, 588 (1985).
5. I. Popov, G. Lewin, G. Matthes, et al., Z. Klin. Med. **43**, 1663 (1988).
6. I. Popov, M. Popov, and G. Lewin, in *Free Radicals and Oxidative Stress: Chemistry, biochemistry and pathophysiological implications*, Ed. by D. Galaris (Medimond, Ioannina, 2003), pp. 219–223.
7. И. Н. Попов и Г. Левин, Биофизика **58** (5), 848 (2013).
8. Е. Б. Бурлакова и Н. Г. Храпова, Успехи химии **54** (9), 907 (1985).
9. Е. Б. Бурлакова, С. А. Крашаков и Н. Г. Храпова, Биол. мембраны **15** (2), 161 (1998).
10. S. Dhavamani, Y. P. C. Rao, and B. R. Lokesh, Food Chem. **164**, 551 (2014).
11. R. K. Saini and Y.-S. Keum, Life Sci. **203**, 255 (2018).
12. N. R. Fuentesa, E. Kima, Y.-Y. Fana, and R. S. Chapkina, Mol. Aspects of Medicine **64**, 79 (2018).
13. R. J. T. Mocking, J. Assies, H. G. Ruhé, and A. H. Schene, J. Inherited Metab. Dis. **41**, 597 (2018).
14. M. Simonetto, M. Infante, R. L. Sacco, et al., Nutrients **11**, 2279 (2019).
15. G. C. Candela, L. L. M.Bermejo, and K. V. Loria, Nutric. Hospital **26** (2), 323 (2011).
16. М. Г. Семёнова, А. С. Антипова, Н. П. Пальмина и др., Хим. физика **38** (12), 38 (2019)
17. M. G. Semenova, A. S. Antipova, D. V. Zelikina, et al., Food Res. Intern. **88**, 70 (2016).
18. R. S. Jope, D. J. Jenden, C. S. Subramanian, et al., Biochem. Pharmocol. **33** (5), 793 (1984).
19. T. A. Misharina, L. D. Fatkullina, E. S. Alinkina, et al., Prikl. Biokhim. Mikrobiol. **50** (1), 101 (2014).
20. K. J. Valentini, C. A. Pickens, J. A. Wiesinger, and J. I. Fenton, Int. J. Food Sci. Nutrition **69** (6), 705 (2018).
21. A. Balcerezyk, A. Gajewska, E. Macierzynska-Piotrowska, et al., Molecules **19**, 14794 (2014).
22. S. S. Teh, S. H. Mah, S. W. Gouk, et al., J. Food Nutr. Res. **6** (1), 39 (2018).
23. T. G. Blaigh and W. J. Dyer, Can. J. Biochem. Physiol. **37**, 911 (1959).
24. М. Кейтс, *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов* (Мир, М., 1975).
25. http://www.minilum.de.
26. I. Popov and G. Lewin, LABO **11,** 8 (1997).
27. I. Popov and G. Lewin, Luminescence **20,** 321 (2005).
28. I. Popov and G. Lewin, in *Handbook of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment,* Ed. by I. Popov and G. Lewin (Transworld Research Network, Kerala, 2008), pp. 361–391.
29. Н. Н. Сажина, И. Н. Попов и В. Н. Титов, Клин. лабор. диагн. **63** (1), 16 (2018).
30. М. М. Созарукова, А. М. Полимова, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, Биофизика **61** (2), 337 (2016).
31. Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова и А. Н. Осипов, Биофизика **64** (5), 883 (2019).
32. M. L. Sagristá, A. E. García, M. A. De Madariaga, and M. Mora, Free Radic. Res. **36** (3), 329 (2002).
33. Е. А. Менгеле, Д. А. Круговов и О. Т. Касаикина, Изв. РАН. Сер. хим. **4** (1), 1 (2015).
34. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
35. Ю. А. Владимиров, Соросовский образоват. журн. **7** (1), 16 (2001).
36. R. B. Hebbel and J. Lab. Clin. Med. **107**, 401 (1986).
37. G. Lewin and I. Popov, Med. Hypoth. **42**, 269 (1994).
38. Е. Б. Бурлакова, Е. М. Молочкина, Н. П. Пальмина и Л. В. Слепухина, Вопр. мед. химии **22** (4), 541 (1976).
39. Н. П. Пальмина, Л. К. Обухова и Т. В. Бунто, Изв. АН СССР. Сер. биол. **2**, 290 (1979).
40. Е. Б. Бурлакова, Н. М. Дзюба и Н. П. Пальмина, Биофизика **1** (5), 766 (1965).
41. T. Atsumi, S. Fujisawa, and K. Tonosaki, Toxicol. In Vitro **19**,1025 (2005).
42. D. P. Bezerra, G. C. G. Militão, M. Castro de Morais and D. Pergentino de Sousa, Nutrients **9**, 1367 (2017).
43. N. N. Sazhina, A. S. Antipova, M. G. Semenova, and N. P. Palmina, Russ. J. Bioorgan. Chem. **45** (1), 34 (2019).
44. R. Rodrigo, J. C. Prieto, and R. Castillo, Clin. Sci. **124**, 1 (2013).

The Influence of Liposomal Nanocomplex Composition on Antioxidant Activity of Mice Blood Plasma, Liver and Brain Lipids

N.N. Sazhina, M.G. Semenova, A.S. Antipova, E.I. Martirosova, and N.P. Palmina

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

Much attention is currently given to research and development of the efficient systems for the delivery of essential omega-3-polyunsaturated fatty acids and other nutraceuticals to the human body through food. Nanocomplexes, which are based on soybean phosphatidylcholine liposomes with nutraceuticals included are amongst the efficient delivery systems. The prolonged use of these nanocomplexes may affect the antioxidant status in various organs and tissues. In this work, a thermo-initiated chemiluminescence method was used to study changes in the antioxidant activity of blood plasma, liver and brain lipids in mice divided into six groups depending on the composition of liposomal nanocomplexes introduced into drinks substituted for water in a long-term (3 months) diet. The components of six types of liposomal nanocomplexes, except for phosphatidylcholine, in different combinations were: clove essential oil, fish oil and sodium caseinate. The results of the study showed that nanocomplexes containing liposomes from phosphatidylcholine with the addition of fish oil, clove essential oil and treated with milk protein (sodium caseinate) for food encapsulation purposes proved to be the most effective in increasing the antioxidant activity in blood plasma and brain lipids in mice as compared to control.

Keywords: functional nutraceuticals, liposomes, clove essential oil, fish oil, sodium caseinate, antioxidant, antioxidant activity, chemiluminescence

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 769–772

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

ОЦЕНКА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ МАГНИТОЛИПОСОМ В ОПУХОЛИ И ОРГАНАХ МЫШЕЙ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

© 2020 г. Н.А. Марнаутов*, В.А. Сереженков, Л.Х. Комиссарова*, Н.А. Ткачев**, А.С. Татиколов*, А.Н. Голощапов*, А.Ф. Ванин****

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119134, Москва, ул. Косыгина, 4*

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

E-mail: serezhenkov@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.04.2020 г.
После доработки 07.04.2020 г.
Принята к публикации 17.04.2020 г.

Методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса впервые изучено биораспределение магнитолипосом, полученных на основе наночастиц магнетита (Fe_3O_4), в опухоли и органах мышей с карциномой Льюис в отсутствие и в присутствии магнитного поля. Животных в опытной группе после внутривенного введения магнитолипосом в дозе 7.56 мг Fe/кг в зоне опухоли подвергали воздействию внешнего магнитного поля (0.6 Тл). На основании анализа спектров электронного парамагнитного резонанса образцов органов и тканей мышей обнаружено, что воздействие магнитного поля приводит к двукратному возрастанию концентрации наночастиц магнетита в опухоли ($p < 0.05$) по сравнению с контролем, что дает основание рекомендовать полученные магнитолипосомы для использования в качестве магнитоуправляемого носителя для адресной доставки противоопухолевых средств. Высокая концентрация суперапарамагнитных наночастиц магнетита обнаружена в печени в отсутствие и в присутствии внешнего магнитного поля. Отличия в накоплении Fe_3O_4 в легких и печени в присутствии магнитного поля статистически незначимы.

Ключевые слова: ЭПР, наночастицы магнетита, SPIONs, МЛП, магнитное поле, биораспределение, карцинома Льюис.

DOI: 10.31857/S0006302920040195

С развитием нанотехнологий возрастает интерес к наноразмерным материалам. Особое внимание уделяется применению суперапарамагнитных наночастиц магнетита (SPIONs) на основе оксидов железа для биомедицины: магнитного концентрирования и сепарации клеток, иммунологического анализа, сверхвысокочастотной гипертермии опухолей [1, 2]. Представляет интерес использование SPIONs в качестве контрастирующих агентов в магниторезонансной томографии для визуализации опухолей и в качестве магнитоуправляемых носителей [3, 4] для адресной доставки лекарственных средств. Целевая доставка лекарственных средств позволяет создать депо препарата в клетках опухоли и существенно понизить негативное влияние на организм за счет уменьшения вводимой дозы. Возможность применения SPIONs в клинике обусловлена их низкой токсичностью, более того, SPIONs на основе наночастиц магнетита (Fe_3O_4) являются единственными магнитными наночастицами, разрешенными для клинического применения [5]. Инкапсулирование наночастиц Fe_3O_4 в липосомы — эффективное средство предотвращения их агрегации, способствует доставке лекарственных средств в клетки-мишени. Имеется и другой немаловажный аспект: в составе магнитолипосом (МЛП) наночастицы Fe_3O_4 сохраняют свои магнитные свойства. Работ по изучению биораспределения МЛП на основе наночастиц магнетита у животных-опухоленосителей методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) практически нет. Из исследований в этом направлении представляет интерес работа [6], в которой методом ЭПР обнаружено увеличение накопления наночастиц магнетита в глиобластоме у мышей после воздействия на опухоль внешнего магнитного поля (МП) индукцией 0.4 Тл, а также работа [7], в которой под действием внешнего магнитного по-

Сокращения: SPIONs – суперапарамагнитные наночастицы магнетита, МЛП – магнитолипосомы, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, МП – магнитное поле.

ля обнаружено повышение концентрации магнитолипосомального доксорубицина в остеосаркоме у хомячков.

Целью данной работы является исследование количественного биораспределения МЛП, полученных на основе наночастиц магнетита, в опухоли и органах мышей с карциномой Льюис методом ЭПР в присутствии и в отсутствие воздействия на опухоль внешнего магнитного поля для оценки возможности их использования в качестве магнитоуправляемых переносчиков для адресной доставки противоопухолевых средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез наночастиц магнетита. Наночастицы Fe_3O_4 синтезировали высокотемпературным разложением ацетилацетоната железа (III) $Fe(AcAc)_3$ в триэтиленгликоле [8]. Размер частиц в зависимости от условий синтеза находится в диапазоне от 3 до 9 нм.

Синтез магнитолипосом на основе наночастиц магнетита. МЛП получали модификацией метода регидратации тонких фосфолипидных пленок [9], состоящего в проведении трехкратной процедуры оттаивания–озвучивания–замораживания, с включением наночастиц Fe_3O_4 во внутренний объем МЛП. Очистку МЛП от липосом, не содержащих наночастицы, осуществляли с помощью магнитной сепарации на постоянном магните с индукцией 0.6 Тл, (t = 4 ч, T = 4°C). Невключенные наночастицы Fe_3O_4 удаляли центрифугированием (1500 g, t = 15 мин, T = 4°C). Концентрацию железа в образце определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после растворения аликвоты анализируемого образца в концентрированной соляной кислоте (37%). Эффективность инкапсуляции наночастиц Fe_3O_4 в МЛП составила 24.2 ± 2.8%. Размер МЛП составил 158.7 ± 24.9 нм.

Трансплантация карциномы. Трансплантацию карциномы Льюис осуществляли путем внутримышечной инокуляции опухолевых клеток в бедро правой лапы, каждой мыши вводили по 0.2 мл 20%-й взвеси опухолевых клеток в среде 199.

ЭПР-спектры. Для определения концентрации МЛП в образцах биологических тканей предварительно строили калибровочную прямую зависимости интегральной интенсивности сигнала ЭПР при g = 2.21 от концентрации МЛП в пересчете на железо. Концентрацию суперапарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 в тканях рассчитывали по калибровочной прямой, используя метод двойного интегрирования спектров ЭПР. Сигналы ЭПР образцов регистрировали на спектрометре ECS-106 (Brucker, Германия) при 77 K [10]. Условия регистрации ЭПР спектров: усиление $5 \cdot 10^2$–$5 \cdot 10^4$, центр поля 3300 Гс, развертка поля 6500 Гс, амплитуда модуляции 11.4 Гс.

Опыты на мышах-опухоленосителях. Магнитолипосомальную композицию вводили половозрелым мышам самцам линии C57Bl/6 массой 20–22 г с внутримышечно привитой карциномой Льюис в хвостовую вену в дозе 7.56 мг Fe/кг спустя 10 суток после трансплантации опухоли. Через 60 мин после введения животных декапитировали; образцы легких, печени и опухолевой ткани замораживали и хранили в жидком азоте. Полученные образцы органов и тканей мышей анализировали методом ЭПР.

Опухоли мышей в первой группе с магнитолипосомальной композицией не подвергали воздействию магнитного поля (контроль), во второй группе мышей (опыт) сразу после введения препарата область локализации опухоли подвергали воздействию магнитного поля с использованием постоянного магнита индукцией 0.6 Тл в течение 60 мин.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Open Office, SciDaVis, R и Statistica. Опыты проводили с трехкратным повтором, в каждой группе было три-пять мышей. Для оценки различий между группами использовали U-тест Манна–Уитни–Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1а представлена электронная микрофотография наночастиц Fe_3O_4, на врезках приведены электронная дифрактограмма и размерное распределение наночастиц, полученное методом динамического светорассеяния; на рис. 1б представлено размерное распределение МЛП на основе Fe_3O_4, на врезке – электронная микрофотография МЛП на их основе.

Полученные наночастицы имеют форму, близкую к сферической, с диаметром частиц 7.26 ± 1.17 нм. Средний размер наночастиц, измеренный методом динамического светорассеяния, составил 14.5 ± 2.9 нм (рис. 1а). Размер МЛП на их основе, определенный методом динамического светорассеяния, составил 158.7 ± 24.9 нм (рис. 1б).

Для оценки биораспределения МЛП в опухоли и органах мышей-опухоленосителей использовали спектры ЭПР образцов биологических тканей. На рис. 2 представлены примеры ЭПР-спектров

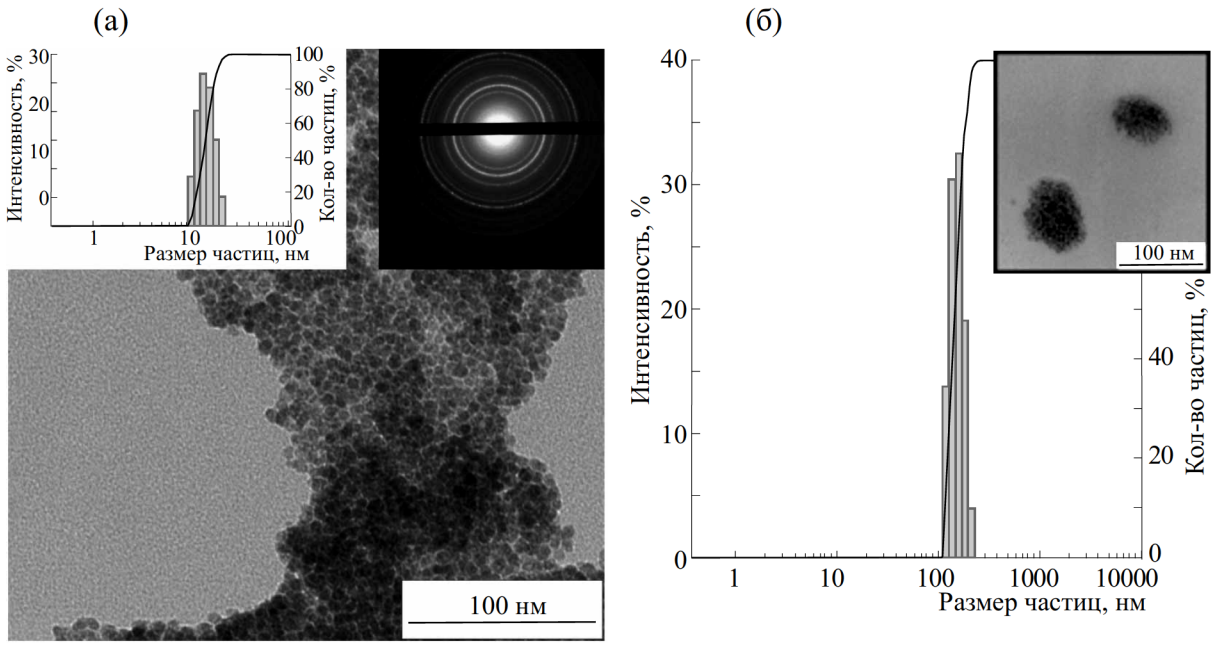


Рис. 1. (а) – Микрофотография наночастиц Fe_3O_4 ($d = 7.26 \pm 1.17$ нм) и их размерное распределение; (б) – размерное распределение и микрофотографии магнитолипосом, синтезированных на основе наночастиц Fe_3O_4.

печени и опухолевой ткани после внутривенного введения МЛП.

На основании полученных ЭПР-спектров опухолевой ткани и печени (рис. 2), а также других органов были рассчитаны концентрации МЛП (в пересчете на железо) в опухоли и органах (таблица).

Максимальная концентрация Fe_3O_4 после внутривенного введения МЛП обнаружена в печени как в отсутствие, так и в присутствии внешнего магнитного поля (таблица). Накопление МЛП в печени характерно для наноразмерных липосомальных структур [11]. После воздействия

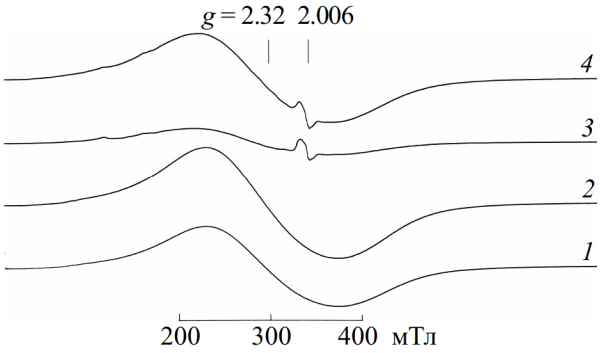


Рис. 2. ЭПР-спектры (T = 77 K) печени (*1* и *2*) и опухолевой ткани (*3* и *4*) через 60 мин после внутривенного введения магнитолипосом: *1* – печень без магнита, *2* – печень с магнитом, *3* – опухоль без магнита, *4* – опухоль с магнитом.

МП концентрация Fe_3O_4 в опухоли возрастает не менее чем в два раза по сравнению с концентрацией в отсутствие поля ($p < 0.05$). Отличия в накоплении Fe_3O_4 в легких и печени в присутствии МП статистически незначимы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе методом ЭПР впервые изучено количественное биораспределение МЛП на основе суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4, в опухоли и органах мышей с карциномой Льюис после внутривенного введения. Показано, что воздействие внешнего магнитного поля (0.6 Тл) на зону опухоли приводит к двукратному возрастанию концентрации наночастиц Fe_3O_4 МЛП в опухоли ($p < 0.05$), что дает основание рекомендовать полученные МЛП в качестве магнитоуправляемых переносчиков для адресной доставки противоопухолевых средств.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Государственного задания № 44.2 (№ гос. регистрации 001201253311).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов при написании данной статьи.

Концентрации МЛП (в пересчете на железо) в печени, опухоли и легких мышей с карциномой Льюис через 60 мин после внутривенного введения МЛП

	Концентрация МЛП, мкМ (среднее ± ст. откл.)		
	печень	опухоль	легкие
Внутривенное введение	1891 ± 300	66 ± 12	57 ± 9
Внутривенное введение + внешнее МП (0.6 Тл)	2121 ± 393	140 ± 22	66 ± 8

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными осуществляли в строгом соответствии с Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1997).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Gao, H. Gu, and B. Xu, Accounts Chem. Res. **42** (8), 1097 (2009). DOI: 10.1021/ar9000026
2. L. Mohammed, H. Gomaa, D. Ragab, et al., Particuology **30**, 1 (2017). DOI: 10.1016/j.partic.2016.06.001
3. K. Ulbrich, K. Holá, V. Šubr, et al., Chem. Rev. **116** (9), 5338 (2016). DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00589
4. J. Estelrich, M. J. Sánchez-Martín, and M. A. Busquets, Int. J. Nanomed. **10**, 1727 (2015). DOI:10.2147/ijn.s76501
5. A. C. Anselmo and S. Mitragotri, AAPS J. **17** (5), 1041 (2015). DOI: 10.1208/s12248-015-9780-2
6. H. Marie, L. Lemaire, F. Franconi, et al., Adv. Function. Mat. **25** (8), 1258 (2015). DOI:10.1002/adfm.201402289
7. H. Nobuto, T. Sugita, T. Kubo, et al., Int. J. Cancer **109** (4), 627 (2004). DOI:10.1002/ijc.20035
8. Л. Х. Комиссарова, Н. А. Марнаутов, А. С. Татиколов и др., Технологии живых систем **14** (4), 51 (2017).
9. C. Kirby and G. Gregoriadis, Nat. Biotechnol. **2** (11), 979 (1984). DOI: 10.1038/nbt1184-979
10. T. S. Kavetskyy, V. A. Serezhenkov, et al., in *Advanced Nanotechnologies for Detection and Defence against CBRN Agents* (Springer, Dordrecht, 2018), pp. 487–492.
11. M. J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, et al., J. Controlled Release **172** (3), 782 (2013). DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.09.013

Evaluation of the Biodistrubution of Magnetoliposomes in Murine Tumor and Mice Organs Using Electron Spin Resonance

N.A. Marnautov*, V.A. Serezhenkov, L.Kh. Komissarova*, N.A. Tkachev**, A.S. Tatikolov*, A.N. Goloshchapov*, and A.F. Vanin****

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

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

Electron spin resonance spectroscopy has been applied for the first time to study the biodistribution of magnetoliposomes, formed with the use of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4), in a murine tumor and the organs of Lewis carcinoma-bearing mice in the absence and presence of an external magnetic field. Animals from the experimental group after intravenous injection of 7.56 mg/kg of magnetoliposomes the tumor area were subjected to an external magnetic field with a flux density of 0.6 T. Electron spin resonance spectra analysis of mice organs and tissues samples has shown that exposure to a magnetic field results in a two-fold increase in Fe_3O_4 accumulation within the tumor ($p < 0.05$) as compared to control. These findings suggest that magnetoliposomes can be used as a magnetic-targeted carriers for antitumor drug delivery. SPIONs a high concentration was found in the liver in the absence and presence of the external magnetic field. Differences in the accumulation of Fe_3O in the lung and liver tissues in the presence of a magnetic field are not statistically significant.

Keywords: ESR, magnetite nanoparticles, SPIONs, MLP, magnetic field, biodistribution, Lewis carcinoma

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 773–779

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 570.45: 570.49

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ И ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ

© 2020 г. И.И. Полетаева*, О.В. Перепелкина*, Г.М. Николаев*, И.Б. Федотова*, М.Г. Плескачева*, И.В. Кошлань, ***, Ю.В. Богданова**, Н.А. Кошлань**, Г.В. Павлова****, А.В. Ревищин******

**Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Ленинские горы, 1/12*

***Объединенный институт ядерных исследований, 141980, Дубна Московской области, ул. Жолио Кюри, 6*

****Государственный университет Дубны, 141982, Дубна Московской области, ул. Университетская, 19*

*****Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5*

E-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.
После доработки 20.11.2019 г.
Принята к публикации 15.01.2020 г.

Оценивали последствия тотального гамма-облучения (4 Гр с мощностью дозы 0.6 Гр/мин) и облучения головы животного пучком протонов (с энергией 150 мэВ в дозе 4 Гр и мощностью 0.8 Гр/мин) на интенсивность и временные параметры развития судорожных припадков аудиогенной эпилепсии у крыс селектированной инбредной линии Крушинского–Молодкиной. В серии с гамма-облучением было тестировано поведение в тестах «открытого поля», приподнятого крестообразного лабиринта и водного лабиринта Морриса. После гамма-облучения не было выявлено изменений показателей аудиогенных судорожных тонических припадков (имеющих локализацию в стволе мозга) при первой экспозиции действию звука после облучения. После облучения протонами отмечено несколько более медленное начало припадков и больший латентный период развития тонической фазы припадков при серийном ежедневном повторении звуковой экспозиции. Отмечена меньшая длительность аудиогенных миоклонических судорог, которые развиваются в ходе ежедневных звуковых экспозиций (и имеют переднемозговую локализацию), хотя интенсивность этих судорог у всех групп была максимальной. В тестах на поведение отмечено некоторое усиление тревожности животных, получивших облучение.

Ключевые слова: гамма-излучение, протоны, аудиогенная эпилепсия, локомоция, реакция замирания, крысы линии Крушинского–Молодкиной.

DOI: 10.31857/S0006302920040201

Проблема подготовки полетов человека в дальний космос требует исследовать эффекты облучения (протоны и др.) на реакцию мозга, которые могут быть иными, чем таковые при околоземных экспедициях. Протоны, например, составляют значимую часть космического излучения, и их влияние на организм необходимо исследовать, используя разные биологические модели [1]. Информацию о влиянии ионизирующих излучений разного типа на организм в целом и на мозг, в частности, получают при анализе последствий лучевой терапии [2–5], изучая последствия катастроф [6], а также путем проведения специальных экспериментов на лабораторных животных ([5–10] и др.). Для оценки функции центральной нервной системы млекопитающих после воздействия облучения необходимо оценить изменение судорожной готовности мозга, что важно также и потому, что соответствующие экспериментальные данные достаточно противоречивы [2, 11, 12]. Одной из перспективных генетических моделей для такого исследования является аудиогенная эпилепсия (АЭ) крыс [13]. Помимо высокой воспроизводимости эпилептиформных судорожных припадков, у животных, селектированных на предрасположенность к АЭ, можно оценивать развитие эпилептиформных явлений, имеющих разную мозговую локализацию (ствол или передний мозг, [14]). Установлено, что аудиогенный эпилептиформный припа-

Сокращение: АЭ – аудиогенная эпилепсия.

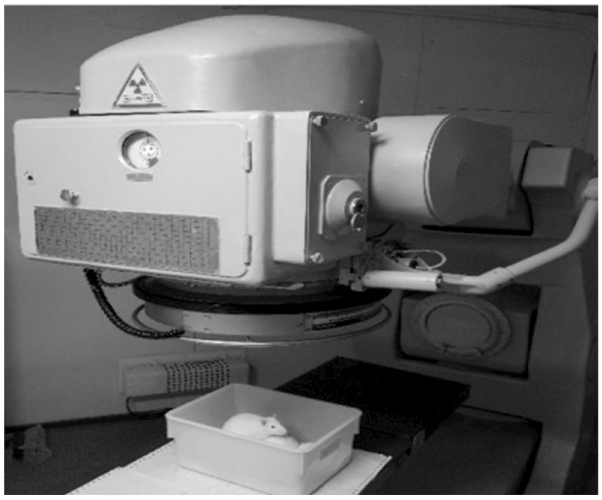


Рис. 1. γ-облучение крыс на установке Рокус-М.

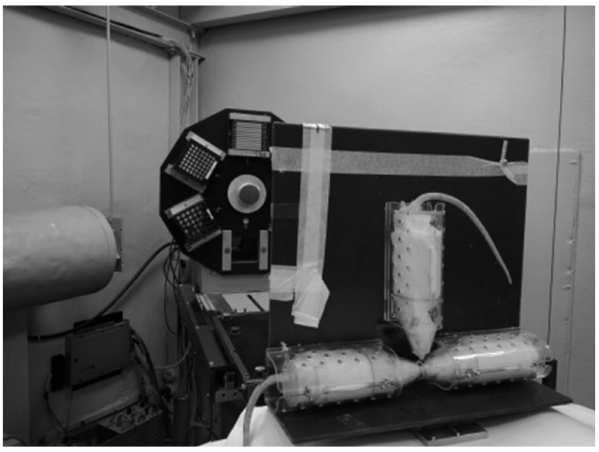


Рис. 2. Общий вид расположения животных для облучения головы пучком

док связан с развитием патологического возбуждения, которое начинается в слуховых ядрах продолговатого мозга и поступает в средний мозг (захватывая четверохолмие). Ключевой структурой для преобразования такого возбуждения в судороги, т.е. для активации эфферентных нейронов ствола, является нижнее двухолмие [15]. Припадок АЭ начинается со стадии двигательного возбуждения (или «клонического бега»), которая переходит сначала в клонические, а затем в тонические судороги всех мышц (захватывающие туловище и конечности). У грызунов линий, предрасположенных к АЭ, наряду со «стволовыми» судорожными припадками обнаруживаются и судороги другого типа (так называемые миоклонические судороги – короткие подергивания мышц морды и головы, иногда затрагивающие и мышцы конечностей). Они формируются в результате повторных ежедневных экспозиций действию звука (10–18 суток). В отличие от припадка с последовательным развитием его фаз, заканчивающихся тонической фазой, миоклонические судороги, которые носят также название «киндлинг» (kindling, раскачка), развиваются в переднем мозге (лимбической системе, неокортексе) [14, 16].

Задачей настоящей работы было оценить влияние ионизирующей радиации (облучение пучком протонов в пике Брэгга и гамма-облучение) на показатели АЭ у крыс линии Крушинского–Молодкиной, предрасположенной к АЭ [13, 16], а также на показатели их поведения в ряде тестов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. В работе были использованы крысы инбредной селектированной линии Крушинского–Молодкиной с высокой предрасположенностью к АЭ. Средний возраст особей составлял пять-шесть месяцев, средняя масса – 280 г.

Облучение проводили на установках Лаборатории ядерных проблем им. В.П. Джелепова (ОИЯИ, Дубна Московской области). Были проведены три серии облучений. В одной из них животных подвергали тотальному гамма-облучению (суммарно в опыте с гамма-облучением использованы 20 животных). В двух других экспериментах подвергали облучению протонами область головы крыс (суммарно в экспериментах с облучением протонами были использованы 17 и 18 крыс соответственно).

Тотальное облучение крыс (n = 7) проводили γ-квантами ^{60}Co на установке для дистанционной лучевой терапии «Рокус-М» (АО «Равенство», Санкт-Петербург) (рис. 1) в дозе 4 Гр с мощностью дозы 0.6 Гр/мин. С экспериментальными животными провели следующие тесты: определение интенсивности судорог АЭ, тест «открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт и водный лабиринт Морриса.

Облучение головы крыс протонами с энергией 150 мэВ в дозе 4 Гр и мощностью 0.8 Гр/мин (по пять и шесть животных в первой и второй сериях соответственно) проводили на терапевтическом протонном пучке Медико-технического комплекса, используемого для проведения лучевой терапии онкологических больных на фазотроне Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ. Животных облучали партиями по три особи за один сеанс с предварительной фиксацией (рис. 2).

В первом опыте с облучением протонами были проведены тестирование АЭ и выработка аудиогенных миоклонических судорог; во втором эксперименте оценивали интенсивность АЭ в разные сроки после воздействия.

В каждом эксперименте использовали по две группы контрольных крыс. Животных группы «контроль–Дубна» перевозили из Москвы в Дубну и обратно вместе с группой, получавшей облучение (n = 7, при облучении γ-квантами; n = 5, при первом облучении протонами; n = 6, при втором облучении протонами). Они подвергались фиксации в специальных контейнерах для облучения, но не облучались. Эта группа служила контролем для оценки возможного эффекта развития страха и стресса от перевозки и фиксации. Группа «контроль» (Москва) оставалась в Москве (суммарно n = 20).

Тестирование аудиогенной эпилепсии проводили в прозрачной звукоприглушающей камере. Звук (аудиторный звонок, 120 дБ) включали после помещения крысы в камеру и выключали при развитии тонической фазы припадка. Интенсивность припадка оценивали в условных баллах. Они были следующими: «0» – отсутствие реакции, «1» – клонический бег (который в некоторых случаях прерывался на несколько секунд «тормозной паузой»), «2» – клонические судороги в позе на животе, «3» – судороги с падением на бок и началом экстензии задних конечностей, «4» – тонические судороги с полной экстензией передних и задних конечностей. Регистрировали (вручную) время (латентный период) начала фазы «1» и фазы «4». Для выработки миоклонических судорог крыс подвергали действию звука ежедневно в течение 15 суток. Отмечали день первого появления миоклонических судорог, их интенсивность («1» – вздрагивание ушей, «2» – судороги мышц лицевой части черепа и шеи, «3» – миоклонические судороги конечностей), а также их длительность.

Тест «открытое поле». Арена установки (диаметр 1.5 м) была расчерчена на квадраты со стороной 20 см. Длительность теста – 3 мин. В полуавтоматическом режиме регистрировали число пересеченных квадратов на периферии (как показатель уровня локомоторной активности) и в центре арены (как показатель исследовательской реакции и низкой тревожности), число стоек, эпизодов замирания и эпизодов груминга, а также уровень дефекации.

Тест приподнятого крестообразного лабиринта. Тестирование поведения крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта [17] осуществляли в течение 3 мин (см. работу [18]). Лабиринт был выполнен из черного пластика, приподнят над уровнем пола на 73 см, размер рукавов – 50 × 10 см, центральной площадки – 10 × 10 см, высота стенок закрытых рукавов – 38 см. Вручную отмечали число выходов крысы в открытые рукава, время пребывания в светлых частях приподнятого крестообразного лабиринта, число стоек в закрытых рукавах. Длительность теста – 3 мин.

Тест водного лабиринта Морриса. Эксперименты проводили в заполненном замутненной водой (26–27°C) бассейне (диаметром 150 см) [19]. В бассейне размещали невидимую платформу (14 × 14 см, 3 см ниже уровня воды), крысу выпускали в воду каждый раз из новой точки периметра (выбранной в случайном порядке) и фиксировали время отыскания платформы, длину пути, скорость, а также время, проведенное животными в каждом из четырех квадрантов арены. В течение первых трех суток эксперимента крысы должны были отыскать платформу, которая находилась в одном и том же месте (пять попыток в день). На четвертые сутки тем животным, которые научились находить скрытую платформу, убирали ее и регистрировали передвижение крысы в течение 60 с. Это позволяет выявить, используют ли животные при поиске платформы дистантные зрительные ориентиры (пространственная стратегия). В этот же день через 30 мин проводили дополнительный контрольный эксперимент, в котором положение платформы обозначали «сигналом» – флажком, расположенным выше уровня воды. Регистрацию траектории животного осуществляли с помощью видеокамеры Computar (Япония) и компьютера с платой видеоввода изображения Picolo. Программа EthoVision ver. 3.0 (Noldus, Нидерланды) позволяла сохранять, а затем анализировать траекторию перемещения животного в виде координат, регистрируемых с частотой 12.5 кадров/с.

Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного анализа ANOVA с *post hoc* тестом LSD (по Фишеру) и критерия Манна–Уитни; при уровне значимости $p < 0.05$ различия считались достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех экспериментах облучение не вызывало ухудшения общего состояния животных, изменений в потреблении пищи, в состоянии кожных покровов и веса тела в период вплоть до 6 мес. после воздействий.

Гамма-облучение, аудиогенные судороги. Экспозиция крыс трех групп («облучение», «контроль–Дубна» и «контроль–Москва», число животных – 7, 4 и 6 соответственно) действию звука не выявила влияния облучения ни на интенсивность судорог, ни на время развития припадка.

Гамма-облучение, тест «открытое поле». В этом тесте (через месяц после воздействия) у группы «контроль–Дубна» была обнаружена более высокая двигательная активность в центре арены (достоверно, $p < 0.05$), а также повышенное число вертикальных стоек в этом тесте; число квадра-

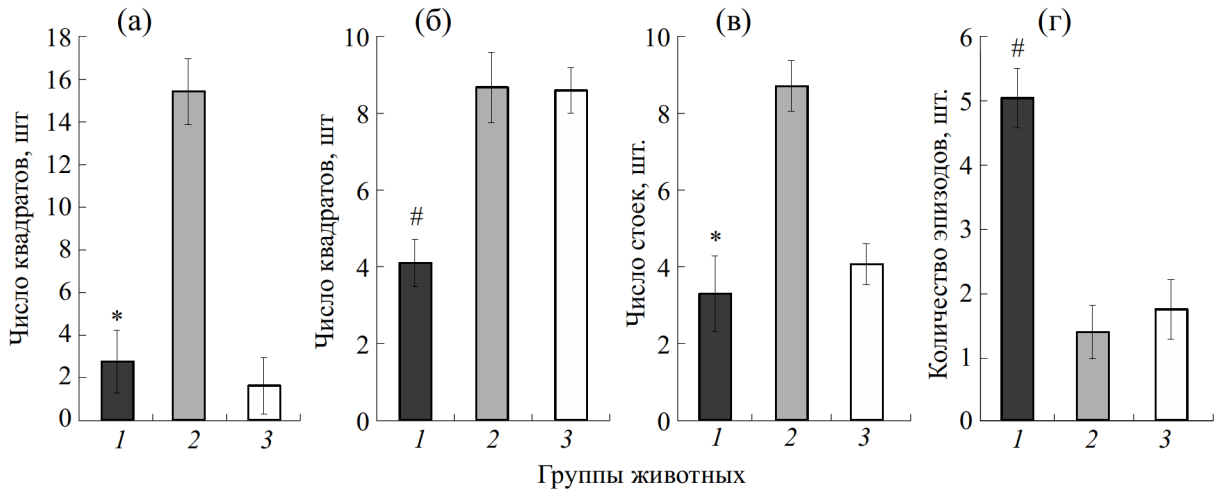


Рис. 3. Показатели теста «открытое поле» у крыс трех групп за 3 мин теста суммарно: *1* – облученные крысы (темные столбцы), *2* – группа «контроль–Дубна» (серые столбцы), *3* – группа «контроль–Москва» (белые столбцы). Виды показателей: (а) – число квадратов, пересеченных в центре арены; (б) – число квадратов, пересеченных на периферии арены; (в) – число вертикальных стоек; (г) – количество эпизодов замирания. * – Достоверное отличие ($p < 0.05$) от показателя группы «контроль–Дубна», # – достоверное отличие ($p < 0.05$) от показателей обеих контрольных групп (критерий Манна–Уитни).

тов, пересеченных на периферии арены, также было выше у крыс этой группы, но недостоверно. Можно предположить, что перевозка животных в Дубну и обратно в Москву, а также пребывание в фиксированном состоянии в установке для облучения изменило их поведение (усилив, по всей видимости, их arousal-реакцию, т.е. неспецифическую реакцию активации). В то же время в группе облученных животных этой активации не было (возможно, в связи с собственно эффектом гамма-облучения). Число квадратов, пересеченных в центре арены, было на уровне малоактивных крыс группы «контроль–Москва». К такому же эффекту следует отнести и достоверно меньший уровень локомоции на периферии арены, а также повышенное число эпизодов замирания у облученной группы (в этом случае – по сравнению с обеими контрольными группами, см. рис. 3). Реакция замирания у крыс облученной группы была выражена очень четко, длилась по несколько секунд (данные не представлены) и напоминала состояние каталепсии, хотя показатель постиктальной каталепсии (см. работу [20]) при тестировании аудиогенной эпилепсии у крыс облученной группы не отличался от контроля.

В целом поведение крыс облученной группы можно охарактеризовать как несколько более тревожное, чем таковое животных контрольных групп.

Гамма облучение, тест приподнятого крестообразного лабиринта. Время, проведенное в открытых рукавах лабиринта (показатель боязни освещенного открытого пространства, т.е. тревожности) у облученных крыс было заметно (но недостоверно) короче, чем у контроля: у облученных – 63.3 ± 12.3 с, у контроля (суммарно) – 90.4 ± 18.4 с. По другим показателям отличий между группами выявлено не было. Иными словами, «знак» изменений поведения у крыс облученной группы был таким же, как в тесте «открытое поле».

Гамма облучение, тест водного лабиринта Морриса. В этом опыте проводили сравнение поведения облученной группы и группы «контроль–Дубна». Средняя скорость плавания в этом тесте и средняя дистанция, покрытая до достижения платформы или до истечения срока теста, были сходными по величине у групп облученных и контрольных крыс. Число случаев отыскания невидимой платформы было одинаковым у крыс обеих групп, а среднее время отыскания платформы во вторые и третьи сутки этого эксперимента было несколько дольше у облученных крыс. В то же время в последний день теста, когда меняли положение платформы, облученные крысы платформу не находили. Малое число животных в группе не позволяет оценить достоверность различий – выявлена лишь тенденция. Иными словами, нельзя исключить некоторого снижения способности к пространственной ориентации у крыс данной облученной группы. Это можно, однако, отнести за счет несколько повышенного уровня тревожности животных этой группы (по данным теста «открытое поле»).

Облучение протонами, первый эксперимент. У этих животных анализировали параметры аудиогенного эпилептиформного судорожного при-

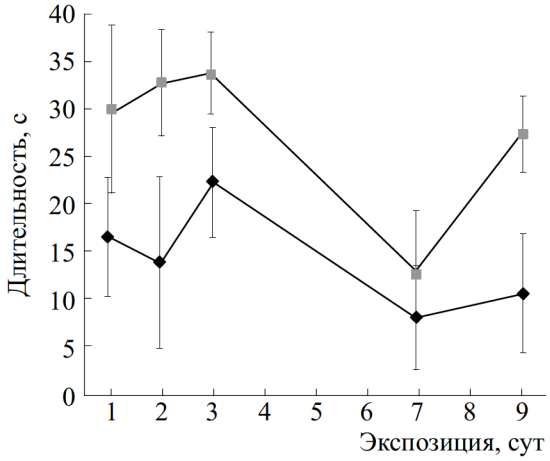


Рис. 4. Длительность (ось ординат, с) миоклонических судорог в последовательные дни экспозиции животных действию звука. Облученные крысы – черные символы, группа «контроль–Дубна» – серые символы.

падка при первом применении звука, а также при выработке миоклонических судорог.

Максимальная интенсивность припадка у облученной группы (через три недели после облучения) и группы «контроль–Дубна» была несколько (но недостоверно) снижена по сравнению с данными теста, проведенного за полтора месяца до эксперимента, когда она была максимальной (условный балл – «4»). Таким образом, облучение протонами не изменило интенсивность аудиогенного припадка при первой экспозиции животных действию звука.

Латентные периоды начала фазы «клонического бега» (2.1 ± 0.5 с – облученные крысы, 1.75 ± 0.8 с – «контроль–Дубна», 3.42 ± 0.3 с – «контроль–Москва») и тонических судорог (11.5 ± 0.8 с, 12.0 ± 1.2 с, 10.0 ± 1.1 с соответственно) также достоверно не различались.

В процессе выработки миоклонических судорог (15 ежедневных звуковых экспозиций) погибли две крысы из группы после облучения и две крысы из группы «контроль–Дубна». Гибель этих животных, по всей видимости, была связана с перевозкой животных и с манипуляциями подготовки к облучению. Более подробный анализ результатов по выработке миоклонических судорог был проведен с суммированием данных по контрольным крысам групп «контроль–Дубна» и «контроль–Москва» (между которыми различие отсутствовало) ввиду малого числа животных в этих группах.

Интенсивность миоклонических судорог, проявившихся у животных всех групп на девятые-одиннадцатые сутки последовательных ежедневных звуковых экспозиций, была максимальной (за исключением одной крысы из группы облучения и одной крысы из группы «контроль–Москва»). Латентные периоды начала аудиогенного приступа (фазы «клонического бега») и начала тонических судорог регистрировали в ходе «выработки» миоклонических судорог – во всех случаях они были больше у облученных крыс (рис. 4).

Длительность миоклонических судорог у контрольных крыс при последовательных экспозициях действию звука была во многих случаях больше (но недостоверно), чем у крыс облученной группы.

Второй эксперимент по облучению протонами крыс линии Крушинского–Молодкиной (октябрь

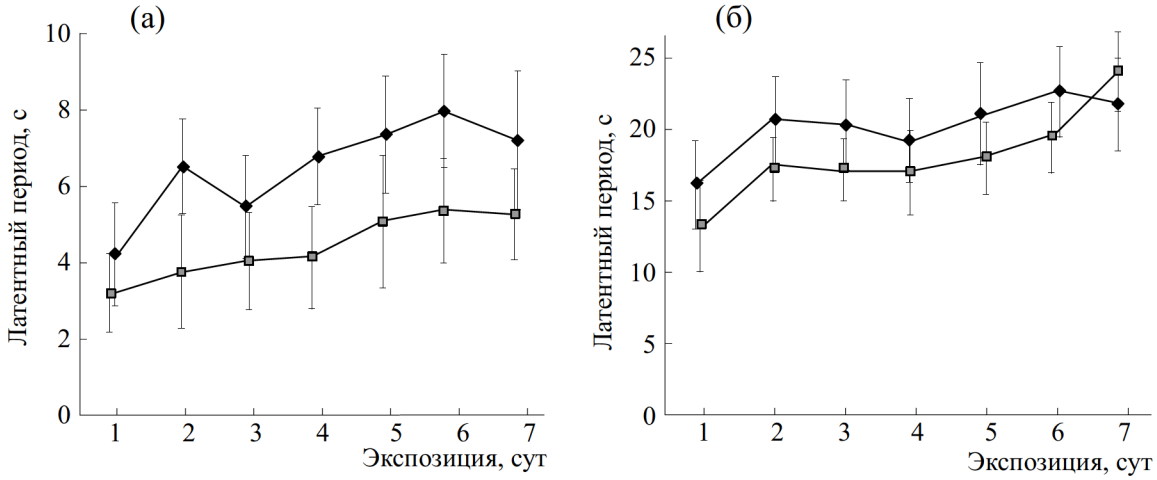


Рис. 5. Латентные периоды (ось ординат, с) проявления фаз аудиогенного припадка в серии ежедневных экспозиций действию звука (до появления миоклонических судорог). (а) – Латентный период начала аудиогенного приступа (фазы «клонического бега»), (б) – латентный период развития тонических судорог Черные ромбы – группа крыс, облученных пучком протонов, серые квадраты – объединенная группа контрольных животных.

2018 г). Эффект облучения протонами на общую интенсивность аудиогенного припадка не был выявлен даже через шесть месяцев после облучения (данные не представлены).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Облучение крыс, проведенное в трех экспериментах (гамма-излучение, облучение головы пучком протонов в пике Брегга), не вызвало достоверных изменений в показателях аудиогенного эпилептиформного судорожного припадка у крыс линии Крушинского–Молодкиной. Данная линия крыс обладает высокой предрасположенностью к судорогам, вызванным сильным звуком [16], и обнаруживает (как и другие линии, селектированные по этому признаку [14, 21]) два типа судорожных припадков. Первый – это генерализованный судорожный припадок с четко выраженным «тоническим» компонентом, а второй – миоклонические судороги (при серийной экспозиции действию звука в течение ряда дней). Развитие тонических судорог связано с патологической активацией структур ствола мозга (продолговатый мозг, четверохолмие, черная субстанция, ретикулярные ядра среднего мозга) [15], откуда судорожная активность распространяется в спинной мозг (и в стриатум [22]). В то же время миоклонические судороги связаны с развитием эпилептиформной активности в структурах переднего мозга (новая кора, гиппокамп, миндалина) [12]. По данным, полученным в настоящей работе, показатели тонических аудиогенных припадков после воздействия ионизирующей радиации практически не изменились, тогда как в выраженности миоклонических судорог были обнаружены небольшие, но устойчивые по знаку особенности – несколько меньшая длительность миоклонических судорог и больший латентный период начала судорожного припадка у крыс группы после облучения. Эти особенности эпилептогенеза, связанного с вовлечением в патологическое возбуждение передних отделов мозга, можно сопоставить с выявленной в наших опытах с гамма-облучением повышенной тревожностью крыс облученной группы, а также со знаками ухудшения пространственной ориентации в тесте Морриса. Поскольку и проявления тревожности, и пространственное поведение животных связаны с функцией структур переднего мозга (миндалина и гиппокамп, соответственно), можно предположить, что облучение в использованных дозах вызвало нарушения функции именно переднемозговых структур, что находит подтверждение в литературе [23].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-29-01001-ОФИ и № 18-015-00173) и Государственной программы NAAA-A16-116021660005-1.

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. А. И. Григорьев, Е. А. Красавин и М. А. Островский, Вестн. РАН **87**, 65 (2017).
2. Y. Mori, D. Kondziolka, J. Balzer, et al., Neurosurgery **46** (1), 157 (2000).
3. M. J. Pecau, P. Haerich, C. N. Zuccarelli, et al., Cogn. Affect. Behav, Neurosci. **2** (4), 329 (2002).
4. M. Y. Mizumoto, Y. Oshiro, D. Takizawa, et al., Pediatr. Int. **57** (4), 567 (2015). DOI: 10.1111/ped.12624
5. S. Adeberg, D. Bernhardt, S. B. Harrabi, et al., Radiother. Oncol. **125** (2), 266 (2017). DOI: 10.1016/j.radonc.2017.09.040
6. D. Hladik and S. Tapio, Mutat. Res. **770** (B), 219 (2016) DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.08.003
7. E. R. Heikkinen, B. Konnov, L. Melnikov, et al., Stereotact. Funct. Neurosurg. **53** (3), 157 (1989)
8. S. Bálentová, P. Hnilicová, D. Kalenská, et al., Brain Res. **1708**, 146 (2019). DOI: 10.1016/j.brainres.2018.12.022.
9. R. Wang and P. Chen, Z. Front. Aging Neurosci. **22** (11), 217 (2019). DOI: 10.3389/fnagi.2019.00217
10. V. S. Kokhan, M. I. Matveeva, A. S. Bazyan, et al., Behav. Brain Res. **320**, 473 (2017). DOI: 10.1016/j.bbr.2016.10.032
11. K. A. Jenrow, A. E. Ratkewicz, and K. V. Elisevich. Exp. Neurol. **169** (1), 96 **(**2001).
12. Z. Setkowicz, K. Gzieło-Jurek, Ł. Uram, et al., Epilepsy Res. **108** (1), 66 (2014). DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2013.10.010
13. I. I. Poletaeva, N. M. Surina, Z. A. Kostina, et al., Epilepsy Behav. **71** (Pt B), 130 (2017). DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.04.072
14. N. Garcia-Cairasco, Hear. Res. **168**, 208 (2002).
15. C. L. Faingold, Adv. Neurol. **79**, 311 (1999).

16. И. И. Полетаева, З. А. Костына, Н. М. Сурина и др., Вавил. журн. генет. сел. **21** (4), 427 (2017) DOI 10.18699/VJ17.261

17. S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, et al., J. Neurosci. Methods **14**, 149 (1985).

18. Н. М. Сурина, Т. С. Калинина, А. В. Волкова и др., Бюлл. эксп. биол. мед. **151** (1), 47 2011

19. D. P. Wolfer, M. Stagljar-Bozicevic, M. L. Errington, et al., News Physiol. Sci. **13**, 118 (1998).

20. И. Б. Федотова, Н. М. Сурина, Л. А. Маликова и др., Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **58**, 620 (2008).

21. P. Consroe and A. Picchioni, L. Chin. Fed Proc. **38** (10), 2411 (1979).

22. Н. А. Дорофеева, М. В. Глазова, К. А. Худик и др., Журн. эволюц. биохимии и физиологии **51** (3), 204 (2015).

23. F. Kiffer, K. Alexis, A. K. Howe, et al., Life Sci. Space Res. **17**, 51 (2018).

Influence of Ionizing Radiation on Audiogenic Seizure Pronones and Behavior in Krushinsky–Molodkina Rats

I.I. Poletaeva*, O.V. Perepelkina*, G.M. Nikolaev*, N.A. Ogienko*, I.B. Fedotova*, M.G. Pleskacheva*, I.V. Koshlan, ***, Yu.V. Bogdanova**, N.A. Koshlan**, G.V. Pavlova****, and A.V. Revishchin******

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

***Joint Institute of Nuclear Research, ul. Jolio Curie 6, Dubna, Moscow Region, 141982 Russia*

****Dubna State University, Universitetskaya ul. 19, Dubna, Moscow Region, 141982 Russia*

*****Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119334 Russia*

We have studied the effects of whole body gamma-radiation (4 Gy, dose rate 0.6 Gy/min) and proton beam head irradiation (with an energy of 150 MeV, 4 Gy, dose rate 0.8 Gy/min) on the intensity and timing of audiogenic seizures in rats of Krushinsky–Molodkina selected strain. In experiments using gamma rays the rat behavior had been tested in the open field, elevated plus maze and Morris water maze. No changes in audiogenic tonic-clonic seizures (originating in the brain stem) were found during the first exposure to sound after gamma-irradiation. The slower development of seizures and larger latency of tonic seizure phase have been found following serial daily exposure to sound in rats after proton irradiation. It was also noted that audiogenic myoclonic seizures (which developed in the forebrain) in irradiated rats exposed daily to sound had shorter duration, while the intensity of these seizures was maximal in all groups. The behavioral tests reveal the moderate increase of the animal anxiety after radiation exposure.

Keywords: gamma irradiation, proton beam irradiation, audiogenic epilepsy, locomotion, freezing reaction, Krushinsky-Molodkina rat strain

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 780–791

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

ОЦЕНКА СОХРАННОСТИ МИОКАРДА КРЫСЫ И ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА БАРАНА ПОСЛЕ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ 24-ЧАСОВОЙ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ПОД ДАВЛЕНИЕМ ГАЗОВОЙ СМЕСИ НА ОСНОВЕ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА

© 2020 г. Е.Е. Фесенко (мл.)*, Е.Л. Гагаринский*, А.С. Аверин*, Н.В. Грудинин, А.Е. Гурин*, Н.В. Шишова*, Н.Э. Швирст*, М.В. Гольтяев*, А.Л. Ковтун*****

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

E-mail: eugeny.ef@gmail.com

***НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова Минздрава РФ, 123182, Москва, Щукинская ул., 1*

****Фонд перспективных исследований, 121059, Москва, Бережковская наб., 22/3*

Поступила в редакцию 08.05.2020 г.
После доработки 08.05.2020 г.
Принята к публикации 15.05.2020 г.

Подтверждены высокие органопротективные свойства газовой смеси на основе монооксида углерода CO и кислорода при пролонгированной 24-часовой гипотермической консервации сердца при 4°C. Показано, что консервация под давлением 6 атм смеси CO и O_2 обеспечивает эффективное восстановление сократительной активности изолированного сердца крысы после 24-часового хранения. Продолжительность работы сердца на стенде после реперфузии не отличалась от интактного контроля, зоны поврежденного миокарда при окрашивании трифенилтетразолием хлоридом отсутствовали. Исследование сократительной активности папиллярных мышц сердца в ответ на электрическую стимуляцию показало высокую функциональную сохранность ткани. В опытной группе зависимость «частота–сила», выраженность эффекта потенциации паузой и ответ на стимуляцию изопротеренолом в целом соответствовали нормальному миокарду крысы. Впервые газовая консервация успешно использована для сердца барана, по размерам и массе сравнимому с сердцем человека. Во всех экспериментах в опытной группе сокращения сердца самопроизвольно восстановились после начала перфузии. Результаты гистологического анализа не показали значительных различий в сердцах барана контрольной и опытной групп. Миокард опытной группы сохранял нормальную структуру ткани. Достигнутый срок консервации 24 ч в четыре раза превышает максимально разрешенные сроки стандартной холодовой консервации в консервирующих растворах. Полученные результаты на модели сердца крупного лабораторного животного подтверждают перспективность предлагаемого подхода для пролонгации хранения сердца человека.

Ключевые слова: монооксид углерода, кислород, газ, орган, трансплантация, хранение, сердце, крыса, баран, консервация, гипотермия.

DOI: 10.31857/S0006302920040213

Несмотря на достижения в области фармакотерапии различных заболеваний, трансплантация органа (почка, печень, сердце, легкие, поджелудочная железа) остается для ряда больных единственным методом лечения, существенно улучшающим качество и продолжительность жизни. Ежегодно в мире выполняется около 140000 трансплантаций [1], из них в России – порядка 2200 трансплантаций [2]. При этом количество пациентов, ожидающих операции, как в России, так и в мире в четыре-пять раз превышает количество проводимых операций. Ограничения на число трансплантаций накладывают как общая нехватка органов из-за отсутствия доноров, так и малая длительность хранения трансплантатов, ограничивающая их транспортировку. Используемый в клинической практике метод сохранения донорских органов, предназначенных для трансплантации человеку – статическая холодовая консервация [3], которая не позволяет обеспечить их жизнеспособность и нормальную, прогнозируемую начальную функцию трансплантата при сроках консервации более 24 ч для почки, 12 ч – для печени и 6 ч – для сердца [4]. При таких

сроках хранения, особенно в отношении сердца, крайне затруднена логистика, в результате чего становится невозможным осуществлять забор органа в городах, удаленных от медицинских клиник, в которой осуществляется трансплантация. По этой причине значительная часть и так ограниченного донорского ресурса просто теряется.

В рамках работы по поиску новых научных подходов к длительному хранению органов наше внимание привлекли тканевые газовые мессенджеры, такие как оксид азота (NO), сероводород (H_2S) и монооксид углерода (CO). Данные молекулы обладают высокой реакционной способностью, играют важную роль в регуляции различных физиологических и патологических реакций и способны влиять на метаболизм как при физиологической температуре, так и при гипотермии. Кроме того, они легко проникают через клеточные мембраны и обладают высокой скоростью диффузии в тканях, а значит, будут легко проникать в ткани трансплантата и легко удаляться из них без специальных процедур.

Среди газовых мессенджеров наиболее перспективным представляется монооксид углерода (CO). В литературе имеются данные об органопротекторных свойствах этого газа при тепловой и холодовой ишемии и об уменьшении негативных последствий ишемии/реперфузии [5–9]. В отдельных работах приводятся данные о двух-трехкратном улучшении физиологических показателей сердечного и почечного трансплантата, подвергшихся обработки монооксидом углерода по сравнению с контролем [10, 11]. В то же время информация о влиянии этого газа достаточно противоречива, что объясняется большими вариациями условий экспериментов. Так, в разных исследованиях используются концентрации CO от десятков миллионных долей до повышенных значений, обеспечиваемых давлением в 3–4 атм, различаются стадии воздействия (непосредственно перед извлечением органа, во время отключения кровотока или на стадии реперфузии *in vivo* или *ex vivo*), также варьирует форма введения CO (ингаляция, насыщение перфузионного раствора газом, помещение органа в атмосферу газа, введение в раствор хранения либо в кровоток препаратов-доноров CO). В серии недавних работ [12, 13] показана высокая сохранность трансплантатов сердца и задней конечности крысы при (24+)-часовой холодовой консервации под давлением смеси монооксида углерода и кислорода.

Нами ранее была произведена оценка оптимальной формы воздействия монооксидом углерода на ткани сердца при гипотермической консервации, а также исследованы возможные варианты конструкции аппаратной базы, необходимой для внедрения данного подхода в биомедицинскую практику [14]. Целями настоящей работы стало подтверждение высоких органопротективных свойств газовой смеси на основе монооксида углерода при гипотермической консервации на простых биологических моделях папиллярной мышцы и изолированного сердца крысы, а также исследование возможности масштабирования подхода газовой консервации с переходом от миокарда крысы массой 1.0–1.5 г к сердцу крупных лабораторных животных, сопоставимому по размеру и массе с сердцем человека (220–300 г).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследование выполнено на самцах крыс линии Wistar массой 250 ± 20 г (n = 40) и самцах баранов романовской породы массой 33 ± 4 кг (n = 9), полученных из вивария ИБК РАН.

Исследование папиллярной мышцы сердца крысы. В исследование были включены две группы животных. В контрольной группе «К» (n = 5) крыс наркотизировали, выделяли сердце, выделяли папиллярную мышцу и помещали ее в установку для изучения сократительной активности в ответ на электростимуляцию. В опытной группе (группа «CO», n = 5) крыс наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли консервацию и хранение сердца под давлением CO при 4°C в течение 24 ч, выделяли папиллярную мышцу и помещали ее в установку для изучения сократительной активности в ответ на электростимуляцию.

Оценка сохранности изолированного сердца крысы.

Оценка максимальной продолжительности работы сердца крысы на перфузионном стенде. В исследование были включены три группы животных. В контрольной группе «К» (n = 5) крыс наркотизировали, выделяли сердце, помещали сердце на стенд и реперфузировали оксигенированным раствором Тироде, содержащим антиоксидант пероксиредоксин-6 (далее раствором Тироде), при 37°C до полной остановки сокращений с целью фиксировать максимальное время работы. В опытной группе «КСЛ» (n = 5) крыс наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли статическую холодовую консервацию в растворе препарата «Кустодиол» (Др. Франц Кёлер Хеми ГмбХ, Германия) и хранение сердца при 4°C в течение 24 ч, помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде при 37°C в течение 3+ ч. В опытной группе «CO» (n = 5) крыс наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли консервацию и хранение сердца под давлением газовой смеси при 4°C в течение 24 ч, помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде при 37°C до полной остановки сокращений. Стадию помещения на стенд и перфузии сердца для

всех трех групп проводили одновременно в параллельных экспериментах.

Оценка инфарктной зоны. В исследование были включены три группы животных: «К» (n = 5), «КСЛ» (n = 5) и «СО» (n = 5). Эксперименты проводили, как описано в предыдущем разделе, за исключением того, что через 15 мин после начала перфузии раствором Тироде сердца снимали со стендов, готовили срезы и проводили их окрашивание на наличие инфарктных зон.

Оценка сохранности изолированного сердца барана. В исследование были включены две группы животных. В контрольной группе «К» (n = 4) баранов наркотизировали, выделяли сердце, помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде, через 5–15 мин работы на стенде ретроградной перфузии сердце снимали и разрезали на сегменты, часть препаратов фиксировали в 10%-м формалине для последующего гистологического анализа, часть препаратов окрашивали на инфарктные зоны. В опытной группе СО (n = 5) баранов наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли консервацию и хранение сердца под давлением газовой смеси при 4°С в течение 24 ч, затем помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде. Далее проводили забор материала как для контрольной группы «К».

Исследование электрической сократимости папиллярной мышцы сердца крысы. После выделения сердца (группа «К») либо после гипотермического хранения (группа «СО») без предварительного отогрева хирургически выделяли папиллярную мышцу с сухожилием и прилегающим фрагментом стенки желудочка. Мышцу за сухожильную часть прикрепляли к механотрону 6Х-2М (Россия), исследование проводили с помощью автоматизированной установки на основе персонального компьютера и плат АЦП–ЦАП собственного производства. Препарат перфузировали раствором Тироде (36°С) с помощью перистальтического насоса со скоростью 2 мл/мин. Раствор Тироде оксигенировали смесью O_2 (95%) и CO_2 (5%). Стационарную зависимость «частота–сила» изучали в интервале частот от 0.003 до 3 Гц. Эффект потенциации паузой исследовали на фоне частоты стимуляции 1 Гц. Для анализа функционального ответа папиллярной мышцы на адренергическую стимуляцию вводили препарат изопротеренол в концентрации 1 мкМ. Исследование проводили в течение 3+ часов.

Наркотизация животных, выделение сердца и подготовка к консервации. Наркотизацию крысы осуществляли смесью, состоящей из 20 мкл препарата «Золетил 100» и 80 мкл препарата «Ксила». После достижения наркоза проводили продольную срединную лапаротомию, далее в нижнюю полую вену вводили раствор гепарина объемом 1 мл из расчета 50 МЕ/мл. Спустя 5 мин проводили продольную срединную стернотомию, осторожно разводили ребра и вырезали сердце с частью аорты длиной не менее 1 см. Сердце помещали в охлажденный до 4°С раствор Тироде, вводили в аорту канюлю и фиксировали ее лигатурой.

Далее промывали сердце раствором Тироде (36°С) на модифицированной двухконтурной установке перфузии по Лангендорфу с двумя подключенными термостатами MiniStat 230 (Huber, Германия) и двумя перистальтическими насосами LongerPump BT100-2J (Китай). После отмывки сердца от крови проводили переключение перфузии с теплового контура на холодовой, подводили термостатирующую рубашку и в течение 5 мин перфузировали сердце консервирующим раствором «Евро-Коллинз» (4°С) с добавлением антибиотика цефтриаксона (0.1 мг/мл). По достижении состояния кардиоплегии сердце снимали вместе с канюлей с установки и помещали в охлажденную до 4°С камеру.

Наркотизацию баранов проводили в два этапа. Внутримышечно вводили препарат «Ксила» из расчета 0.015 мл на 1 кг массы. Спустя 10 мин после наступления выраженного седативного эффекта внутримышечно вводили препарат «Золетил 100» из расчета 15 мг на 1 кг массы (во время операции могли дополнительно вводить препарат «Золетил» для поддержания анестезии). Наркотизированное животное фиксировали на операционном столе в положении на спине. Проводили интубацию трахеи с последующим подключением животного к аппарату искусственной вентиляции легких. Проводили полную продольную срединную стернотомию. Выделяли основные сосуды сердца (верхнюю и нижнюю полые вены, аорту и легочный ствол). Под полые вены подводили нить (шовный материал 3/0, 2/0) через магистральную силиконовую трубку, концы нити выводили из грудной полости. На нижнюю полую вену накладывали Z-образный шов и вводили гепарин из расчета 300 МЕ на кг массы тела. После удаления иглы шов затягивали. В аорту вводили кардиоплегическую канюлю, дистальнее сердца накладывали сосудистый зажим на аорту. Затягивали лигатуры на полых венах и подавали холодный (4°С) раствор «Евро-Коллинз» с добавлением антибиотика цефтриаксона (0.1 мг/мл) до полной остановки сердечных сокращений (300–400 мл/мин), сердце дополнительно обкладывали льдом. После остановки сердца накладывали сосудистый зажим на нижнюю полую вену дистальнее лигатуры, сердце деликатными ножницами выделяли из грудной полости, пересекали полые вены, аорту, легочный ствол и легочные вены. Сердце помещали в чашу с холодным раствором «Евро-Коллинз». В аорту вводили канюлю и накладывали кисет (шовный материал 4/0), далее

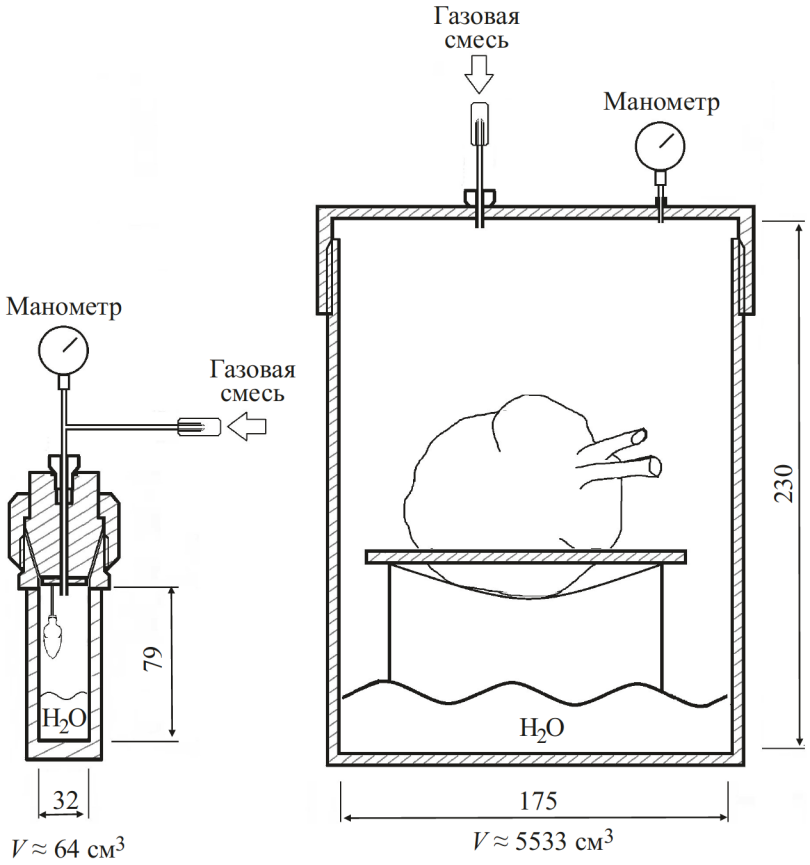


Рис. 1. Схематичное изображение камер для гипотермического хранения сердца крыс и баранов.

орган помещали на марлевый столик в охлажденную до 4°С камеру.

В дальнейшем после выделения сердца (см. раздел «Результаты») в аорту и легочный ствол дополнительно вводили стенты для фиксации клапанов в открытом состоянии, из полостей сердца сливали раствор хранения для лучшего насыщения газовой смесью. Затем в аорту вводили канюлю и накладывали кисет, далее орган помещали на марлевый столик в охлажденную до 4°С камеру.

Консервация сердца. Камеры – малую для сердца крысы на основе химического реактора Vivor (Premex, Швейцария) (материал – сталь) или большую для сердца барана собственного изготовления (материал – пластик) (рис. 1) – предварительно охлаждали до температуры 4°С. С целью поддержания влажности в камере во время консервации на дно наливали дистиллированную воду до уровня в 1 см. После выделения сердца и помещения его в камеру (сердце крысы подвешивали в камере за канюлю вставленную в аорту; сердце барана помещали на марлевый столик) проводили продувку газовой рабочей смесью, с целью вытеснения воздуха из камеры. Все работы с газом выполняли под тягой. Далее плотно завинчивали крышку и нагнетали газовую смесь, состоящую из монооксида углерода и кислорода в соотношении 4 : 3 при итоговом давлении в камере 6 атм (избыточное давление) (см. рис. 1). Далее камеру помещали на хранение в емкость, наполненную водой, охлажденной до 4°С для стабилизации температуры, и помещали в холодильник с температурой 4°С. После 24 ч камеру извлекали из холодильника и проводили дегазацию, плавно в ручном режиме сбрасывая давление в течение 15 мин до атмосферного.

Реперфузия сердца лабораторных животных. Сердце крысы после гипотермического хранения подключали к установке ретроградной перфузии по Лангендорфу. Затем промывали препаратом «Кустодиол» в течение 5 мин при 4°С со скоростью 6–8 мл/мин, далее переключали перфузию на тепловой контур с раствором Тироде (37°С) с пероксиредоксином-6 в концентрации 0.1 мг/мл. Перфузию проводили со скоростью 8 ± 2 мл/мин. Раствор Тироде оксигенировали смесью O_2 (95%) и CO_2 (5%).

Реперфузию сердца баранов осуществляли на марлевом столике путем подключения к аорте сердечно-легочного насоса от аппарата искусственного кровообращения Stockert (Германия).

Вначале сердце промывали 800 мл раствора «Кустодиола» при 4°С со скоростью 200 мл/мин. Далее сердце перфузировали в течение 5–15 мин раствором Тироде (37°С) со скоростью 300–400 мл/мин с добавлением в первые минуты пероксиредоксина-6 (0.1 мг/мл). Раствор Тироде оксигенировали смесью O_2 (95%) и CO_2 (5%).

Анализ инфарктной зоны сердца. После реперфузии в течение 5–15 мин сердца разрезали с получением срезов толщиной 2 мм. Полученные срезы выдерживали в 1%-м растворе хлорида трифенилтетразолия в фосфатном буфере при 37°С в течение 20 мин. Размер инфаркта измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ и выражали в процентах от общей площади исследуемого образца.

Гистологический анализ. Сердце барана фиксировали в растворе 10%-го формалина в течение 24 ч. Далее проводили стандартную проводку материала с последующим заключением в парафиновые блоки. Полученные на микротоме срезы окрашивали гематоксилином и эозином и трихромом по Массону. Далее проводили микроскопическое исследование полученных препаратов при увеличении ×400.

Статистическая обработка. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение. Значимость различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Значения с $p < 0.05$ считались статистически значимыми. Обработку результатов производили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сократимость папиллярной мышцы сердца крысы после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода. Общее время работы с периодом адаптации папиллярной мышцы в контроле и в опыте не отличалось, составив 3.5 ± 0.3 ч. Уровень сократимости в контрольной и опытной группах укладывался в нормальное распределение силы сокращения у экспериментальных животных (1.0–3.0 мН). В опытной группе «СО» в интервале от низких до средних частот зависимость «частота–сила» сохраняла отрицательную направленность, что характерно для нормального миокарда крысы (рис. 2). Также в опыте отмечали наличие выраженного эффекта потенциации паузой (рис. 2г), соответствующее контролю. В области высоких частот (1–3 Гц) регистрировали менее выраженный либо вовсе отсутствующий по сравнению с контролем прирост силы сокращения. При стимуляции изопротеренолом в группе «СО» отмечали положительный инотропный эффект на введение препарата (рис. 3). Не отмечено значимого различия показателей прироста силы сокращения между группами «К» (1.8 ± 0.3 отн. ед.) и «СО» (1.4 ± 0.2 отн. ед.) в ответ на введение бета-миметика.

Оценка сохранности изолированного сердца крысы после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода. Был проведен анализ трех экспериментальных групп (рис. 4а) – группы «К» с нулевым временем хранения, группы «КСЛ» с временем хранения 24 ч при температуре 4°С в стандартном для трансплантологической практики консервирующем растворе «Кустодиол» и группы «СО» с временем хранения 24 ч при температуре 4°С под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода. Общее время работы сердца после помещения на стенд и проведения ретроградной перфузии оксигенированным раствором Тироде в группах «К» и «СО» значимо не различалось, составив 195.3 ± 7.9 мин и 177.0 ± 14.8 мин соответственно (рис. 4в). В обеих группах функциональная активность изолированного сердца постепенно и практически синхронно снижалась во времени: после одного часа работы наступала остановка желудочков, после трех часов – предсердий. В группе «КСЛ» не удалось зарегистрировать возникновение функциональной активности после разогрева на этапе помещения на перфузионный стенд после гипотермической консервации. Ткань сердца визуально была более темной по сравнению с контролем. Анализ инфарктных зон миокарда с помощью окрашивания трифенилтетразолием хлоридом (рис. 4б) через 15 мин после реперфузии в группах «К» и «СО» практически не выявил пораженных участков. Кроме того, не было отмечено значимой разницы между обеими группами (группа «К» – 3.0 ± 1.3%, группа «СО» – 3.8 ± 1.5%). Напротив, в группе «КСЛ» регистрировали обширные инфарктные зоны, составившие 76.8 ± 8.3% от площади окрашивания.

Оценка сохранности изолированного сердца барана после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода. Предварительная оценка продолжительности работы контрольного изолированного сердца барана на перфузионном стенде выявила, что используемые условия (в отсутствие возможности адекватной перфузии донорской кровью) не позволяют обеспечить длительную и стабильную работу сердца. Продолжительность сокращений контрольных сердец составила от 10 мин до получаса. В этой связи в качестве основного метода оценки сохранности изолированного сердца барана после гипотермической консервации под давлением газовой смеси был выбран гистологический анализ с взятием образцов через 5–15 мин после возобновления сокращений на этапе реперфузии после консервации. Возобновление сокращений сердца в группе СО реги-

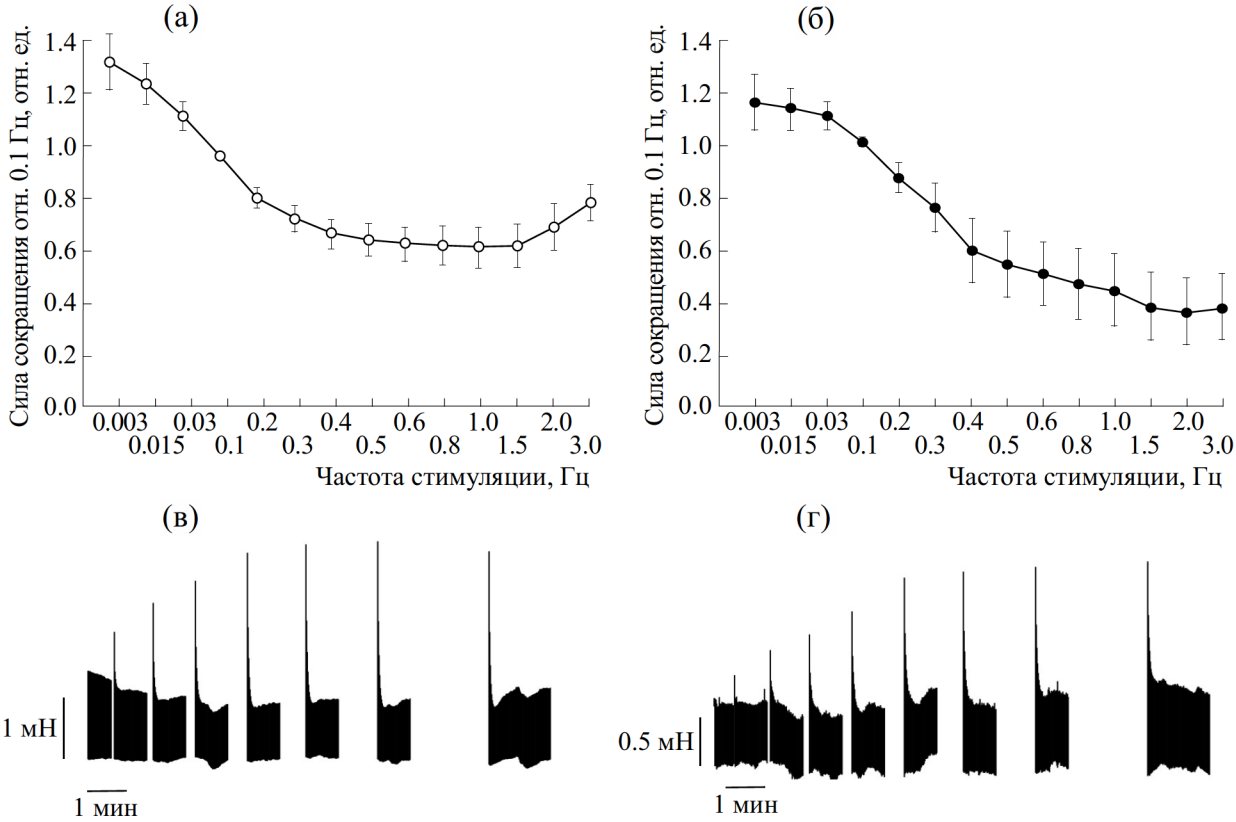


Рис. 2. (а) и (б) –Зависимости силы сокращения от частоты стимуляции в папиллярных мышцах сердца крысы соответственно в контрольной и опытной (после 24-часовой консервации при температуре 4°С под давлением газовой смеси с монооксидом углерода, n = 5) группах; по оси абсцисс – частота стимуляции, по оси ординат – сила стационарного изометрического сокращения в отн.ед. по отношению к силе сокращения на частоте стимуляции 0.1 Гц, принимаемой за единицу; данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. (в) и (г) – Репрезентативные записи сокращения папиллярных мышц соответственно в контроле и опыте при частоте стимуляции 1 Гц, демонстрирующие наличие выраженного эффекта потенциации паузой в обеих группах.

стрировали во всех пяти опытных экспериментах. В первом эксперименте в группе СО на секции было визуально выявлено затемнение миокарда в области межжелудочковой перегородки. Оценка инфарктной зоны срезов миокарда методом окрашивания трифенилтетразолием хлоридом выявила обширные инфарктные зоны (рис. 5д) в области межжелудочковой перегородки по сравнению с наружными участками ткани. В этой связи методика консервации была модифицирована с введением в полость сердца стентов, препятствующих смыканию створок аортального и легочного клапанов для облегчения доступа газовой смеси в полость сердца. После модификации методики консервации инфарктные зоны в области межжелудочковой перегородки практически не выявлялись (рис. 5е).

Анализ с помощью световой микроскопии показал, что миокард как контрольной, так и опытной групп сохранял нормальную структуру ткани, было достаточно трудно найти различия между ними (рис. 5а–г). Наиболее выраженной патологией в группе «СО» являлись умеренный очаговый отек интерстиция и, в меньшей степени, периваскулярный отек (рис. 5в,г). Среди других нарушений были отмечены легкая степень склероза эпикарда, белковая дистрофия кардиомиоцитов от легкой до умеренной степени выраженности, под эндокардом и в глубине миокарда – отдельные группы кардиомиоцитов в состоянии баллонной дистрофии. В целом состояние миокарда опытной группы характеризовалось как «умеренные ишемически-реперфузионные повреждения трансплантата сердца без каких-либо необратимых нарушений».

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании для подтверждения высоких органопротективных свойств газовой смеси монооксида углерода и кислорода мы исследовали особенности зависимости силы сокращения от частоты стимуляции папиллярной мышцы сердца крысы. Сохранение сократимости на низких частотах и наличие выраженного эффекта потенциации паузой (резкий начальный

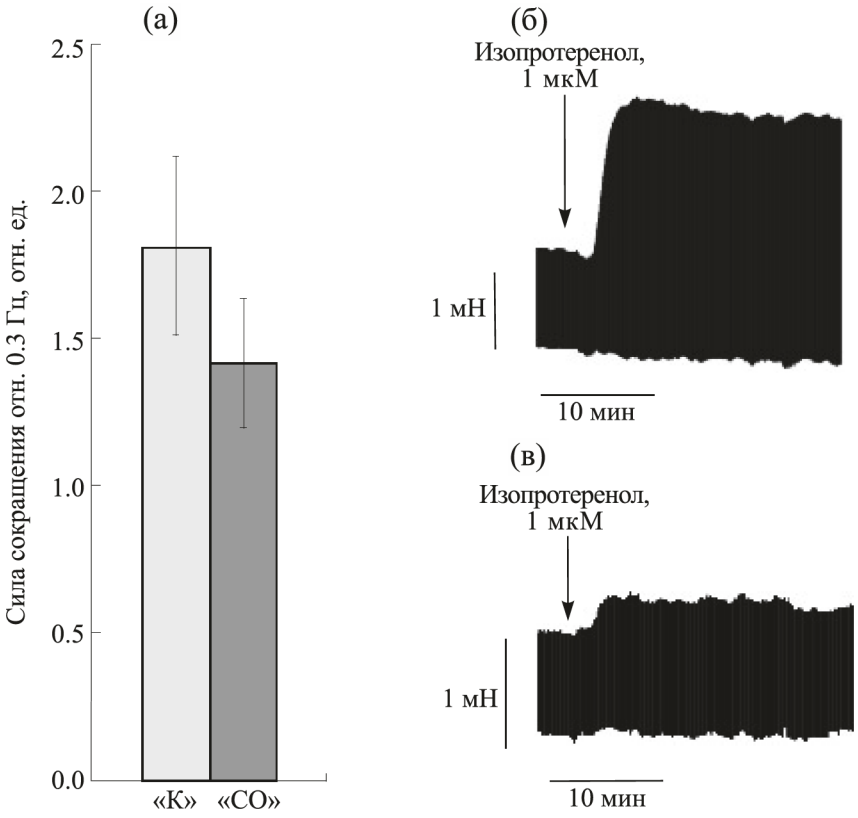


Рис. 3. Сравнительный анализ функционального ответа папиллярной мышцы сердца крысы на адренергическую стимуляцию изопротеренолом в контроле (v = 5) и после 24-часовой консервации при температуре 4°C под давлением газовой смеси с монооксидом углерода (*n* = 5). (а) – Гистограмма прироста силы сокращения в контрольной и опытной группах; по оси ординат – сила стационарного изометрического сокращения в отн.ед. по отношению к силе сокращения на частоте стимуляции 0.3 Гц, принимаемой за единицу; данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. (б) и (в) – Репрезентативные записи прироста силы сокращения папиллярных мышц соответственно в контроле и опыте.

всплеск уровня сокращения после пауз в электрической стимуляции) в опыте соответствовали контролю, что свидетельствует о сохранении кальцийаккумулирующей способности саркоплазматического ретикулума. Выраженный положительный инотропный эффект, наблюдавшийся в ответ на введение бета-миметика изопротеренола, свидетельствует о сохранении нормальной адренергической регуляции миокарда. В области высоких частот (1–3 Гц) в опыте отсутствовала положительная ветвь зависимости «частота–сила», что может говорить о блокировании частотно-зависимой активации кальциевого тока L-типа. Однако окончательно вывод о данном нарушении можно будет сделать только при увеличении выборки. В целом продолжительность работы мышцы, характер зависимости «частота–сила», близкий к показателям интактного миокарда? и сохранение способности к ответу на стимуляцию изопротеренолом свидетельствуют о высокой функциональной сохранности миокарда после пролонгированной консервации под давлением газовой смеси.

Биологическая модель папиллярной мышцы может быть использована для исследования механизма органопротективного действия высоких (до 0.1 мл газа на 1 мл воды при используемом давлении) концентраций монооксида углерода, который в настоящее время остается неясным. В качестве отправной гипотезы мы предполагаем, что CO связывается с гемсодержащими белками митохондрий, блокируя энергетическую систему кардиомиоцитов и, таким образом, останавливая метаболизм в клетках.

Сравнительный анализ продолжительности сократительной работы нативного изолированного сердца крысы, сердца после 24-часового хранения в консервирующем растворе «Кустодиола» и сердца после 24-часового хранения в газовой смеси наглядно (во всех пяти экспериментах реперфузия образцов из трех групп проводилась одновременно) продемонстрировал практически идентичную функциональную состоятельность сердец из групп интактного контроля и «CO». С нашей точки зрения это говорит об исключительном уровне сохранности ткани

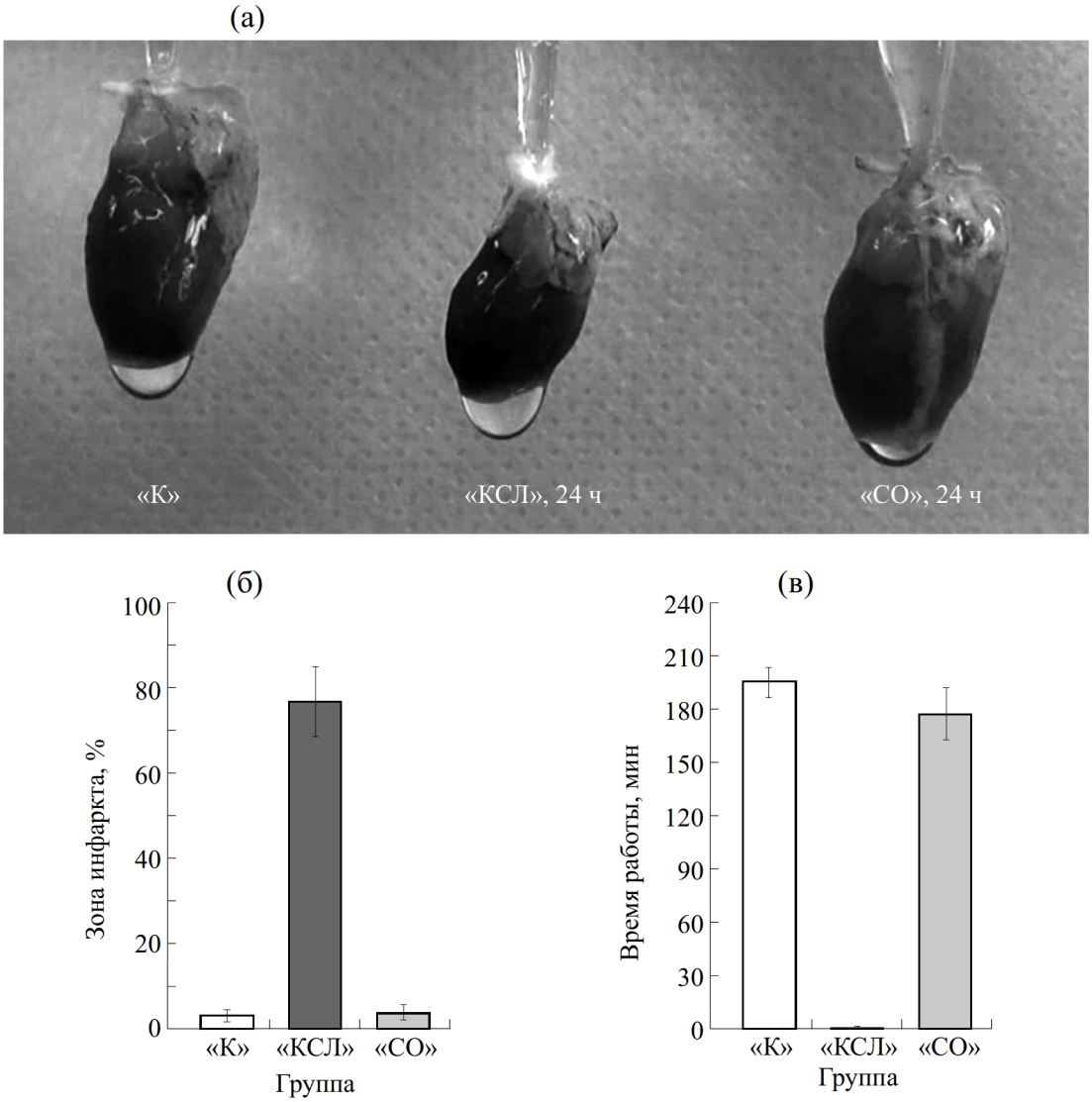


Рис. 4. Функциональная оценка изолированного сердца крысы после 24-часовой гипотермической консервации в консервирующем растворе «Кустодиола» и под давлением газовой смеси с монооксидом углерода по сравнению с интактным контролем. (а) – Репрезентативная обработанная фотография эксперимента; (б) – оценка инфарктной зоны срезов миокарда после 15 мин ретроградной перфузии методом окрашивания трифенилтетразолием хлоридом ($n = 5$); (в) – общая продолжительность работы сердца от момента реперфузии до остановки сокращения предсердий ($n = 5$). Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение.

сердца в группе «СО», несмотря на в три-четыре раза более высокую длительность хранения по сравнению со стандартно используемыми в трансплантологической практике консервирующими растворами.

Следует также отметить, что длительная – до трех и более часов – продолжительность работы сердца на стенде как в контрольной, так и в опытных группах была связана в том числе с использованием в перфузионном растворе природного антиоксиданта пероксиредоксина-6, обеспечивающего снижение ишемически-реперфузионных повреждений [15]. Ни одно сердце после 24-часового хранения в консервирующем растворе «Кустодиола» восстановить не удалось. По данным регистровых исследований и отчетов национальных служб донорства и трансплантации органов на сегодняшний день раствор гистидина-триптофана-кетоглутарата (HTK, «Кустодиол», Германия) наряду с раствором Университета Висконсина (США) являются двумя главными растворами (> 90% всех случаев трансплантаций органов), используемыми в мире для статической холодовой консервации. Сравнение результатов трансплантаций, выполненных с использованием этих консервирующих растворов, в течение многих лет является темой научных исследований и публикаций. При этом достоверных

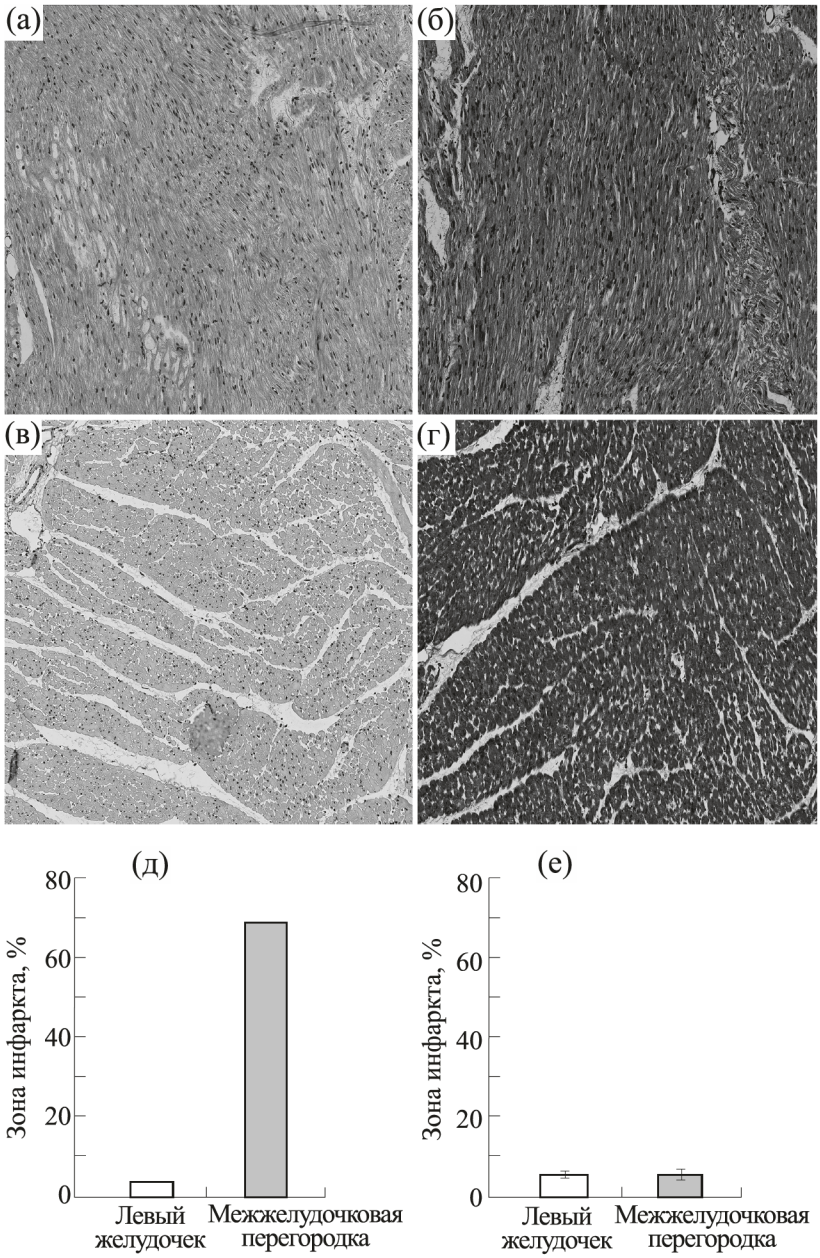


Рис. 5. (а)–(г) – Световая микроскопия срезов сердца барана после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси с монооксидом углерода: окрашивание гематоксилином и эозином сердца в контрольной (а) и опытной (в) группах, окрашивание трихромом по Массону в контрольной (б) и опытной (г) группах, размер каждого снимка составляет 750 мкм в ширину; (д) – оценка инфарктной зоны срезов миокарда левого желудочка и межжелудочковой перегородки в группе «CO» в эксперименте № 1; (е) – оценка инфарктной зоны срезов миокарда левого желудочка и межжелудочковой перегородки в группе «CO» в экспериментах № 2–5 (n = 4); данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение.

и клинически значимых преимуществ какого-либо одного консервирующего раствора на сегодняшний день не выявлено [16–18].

В России для гипотермического хранения органов преимущественно используется «Кустодиол». Нулевые результаты, полученные при его использовании в условиях 24-часовой консервации, были ожидаемы с учетом того, что данный срок в разы превышает допустимые для «Кустодиола» сроки холодовой ишемии сердца (4–6 ч). В то же время эти результаты подчеркивают преимущество газовой консервации.

Одной из главных целей исследования являлось изучение возможности масштабирования подхода газовой консервации с переходом от миокарда крысы массой 1.0–1.5 г к сердцу круп-

ных лабораторных животных, сопоставимому по размеру и массе с сердцем человека (220–300 г) для того чтобы оценить перспективы использования CO в клинической практике. Было неочевидным, окажется ли достаточно используемых режимов газовой консервации для адекватного насыщения и защиты тканей миокарда при резком, на два порядка, увеличении массо-объемных характеристик органа.

В качестве тест-объекта было выбрано сердце барана (вес животных 30–40 кг), имеющее массу 140–160 г, что сопоставимо с массой сердца человека. Первый эксперимент выявил недостаточность насыщения газом внутренних областей сердца, что было подтверждено анализом инфарктных зон срезов межжелудочковой перегородки методом окрашивания трифенилтетразолием хлоридом. Однако путем изменения условий консервации с раскрытием просветов аортального и легочного клапанов эту проблему удалось решить, и в последующих экспериментах инфарктные зоны во внутренних отделах сердца барана не выявлялись. Во всех пяти экспериментах в опытной группе сокращения сердца самопроизвольно восстанавливались после начала перфузии. Результаты гистологического анализа не показали значительных различий в сердцах барана контрольной и опытной групп. Миокард обеих групп сохранял нормальную структуру ткани и характеризовался как умеренные ишемически-реперфузионные повреждения трансплантата сердца.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования газовой консервации с монооксидом углерода для консервации сердца крупных животных, а в дальнейшем и человека. Насколько нам известно, настоящее исследование является первым, подтверждающим данный факт на модели сердца лабораторного животного, чьи размеры и масса сопоставимы с таковыми у человека.

Рассматривая возможности использования газовых смесей на основе CO для консервации органов, необходимо затронуть вопросы безопасности их применения. CO – газ без цвета и запаха, который проявляет токсичность, связываясь с гемоглобином крови с образованием карбоксигемоглобина и предотвращая доставку кислорода в ткани. Он является одним из ключевых поражающих факторов при пожарах. В наших экспериментах пересаживаемый орган предварительно отмывали от крови консервирующими растворами, поэтому такой путь реализации токсического эффекта не затрагивался. Вместе с тем в дальнейшем необходимо будет подтвердить на модели крупных лабораторных животных, что после дегазации системы в тканях не остается остаточных количеств газа, которые могли бы вызвать токсические эффекты после реперфузии.

В работе [12] был исследован уровень карбоксигемоглобина в крови крыс, которым была осуществлена гетеротопическая пересадка сердца, подвергнутого гипотермическому хранению под давлением CO; было показано отсутствие значимых различий в уровне карбоксигемоглобина в опытной и контрольной группах. В наших экспериментах для контроля возможных утечек газа использовали бытовые датчики CO. Анализ возможных сценариев разгерметизации камеры показывает, что с учетом используемых объемов газовой смеси такая разгерметизация не приведет к повышению уровня CO свыше предельно допустимой концентрации в рабочих помещениях площадью более 5 м^2.

Как показано в нашем исследовании, результаты консервации сердца под давлением газовой смеси, содержащей монооксид углерода, существенно превосходят по максимальному времени консервации наиболее распространенный способ хранения в консервирующих растворах при температуре 4°C. Сегодня в мире активно разрабатывается еще один подход к хранению донорских органов, основанный на нормотермической перфузии оксигенированной донорской кровью, а также использовании систем активного поддержания температуры и мониторинга физиологического состояния органа. Многие из предложенных сегодня перфузионных комплексов представляют собой модернизированные аппараты экстракорпоральной мембранной оксигенации или искусственного кровообращения. Ряд экспериментальных и клинических исследований показал улучшение функции органов и исходов трансплантации при использовании таких машин.

Среди продуктов, которые находятся на завершающих стадиях клинических исследований, можно отметить систему Organox Metra (Organox, Великобритания) для консервации печени [19] и комплексы OCS Heart [20], OCS Liver [21], OCS Lung [22] для консервации сердца, печени и легких соответственно (Transmedics, США). Описанные эффекты включают в себя продление времени консервации до 30% без увеличения частоты плохой начальной функции трансплантата. Так, средняя продолжительность перфузии 75 из 93 пересаженных сердец при исследовании комплекса OCS Heart составила 6.35 ч [20]. Общими недостатками комплексных перфузионных систем являются сложная конструкция, большие габариты, низкая энергетическая автономность, высокая стоимость как основного аппарата (~15 млн руб. [23]), так и расходных материалов (~2,5 млн руб. на одну операцию), что ограничивает использование данных устройств. Развитие

подхода газовой консервации может предоставить новый метод хранения и транспортировки донорского органа, сопоставимый по стоимости с классической статической холодовой консервацией, но при этом существенно более эффективный.

В нашем исследовании мы использовали газовую смесь, в которую помимо монооксида углерода входит кислород. Общее давление газовой смеси составляло 6 атм при соотношении CO : O_2, равном 4 : 3. Использование кислорода как фактора, снижающего ишемически-реперфузионные повреждения сердца, имеет длительную историю. Так, с начала 1960-х гг. разрабатывается метод консервации донорского сердца *ex vivo*, заключающийся в нагнетании в коронарное русло увлажненного газообразного кислорода (персуфляция кислородом) [24]. Обоснование метода персуфляции состоит в обеспечении адекватной доставки кислорода в миокард во время транспортировки для снижения гипоксии. Показано, что антеградная кислородная персуфляция донорского сердца свиньи обеспечивает лучшее функциональное восстановление после орто- и гетеротопической трансплантации, чем холодовая консервация [25]. Поскольку использование каждого газа в отдельности не приводило к восстановлению сократимости сердца крысы после 24-часовой консервации (данные не приведены), мы подтвердили более ранние гипотезы о том, что оба газа необходимы для снижения патологических процессов в миокарде. Оптимизация состава смеси, соотношения используемых газов, давления, а также разработка автоматизированного комплекса хранения являются предметом наших дальнейших исследований. Для окончательного подтверждения эффективности и безопасности газовой консервации для хранения органов необходимы исследования с использованием биологических моделей орто- и гетеротопической пересадки на крупных лабораторных животных (бараны, свиньи и др.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность В.К. Богданову за оказанную помощь при проведении хирургических операций на крупных животных, Н.П. Можейко за оказанную помощь при расшифровке гистологических препаратов, а также Сектору оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ (тема «Разработка новых подходов к криоконсервации биологических объектов», рег. номер АААА-А17-117032050021-0).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 2010/63/EU. Экспериментальный протокол был одобрен этическим комитетом ИБК РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Global Observatory on Donation and Transplantation*. URL: http://www.transplant-observatory.org.
2. С. В. Готье и С. М. Хомяков, Вестн. трансплантологии и искусственных органов **21** (3), 7 (2019).
3. R. S. Mangus, et al., Transplantation **86**, 298 (2008).
4. В. И. Шумаков, *Трансплантация сердца: руководство для врачей* (Медицинское Информационное Агентство, М., 2006).
5. M. C. Ott, J. R. Scott, A. Bihari, et al., FASEB J. **19** (1), 106 (2005).
6. J. S. Neto, A. Nakao, K. Kimizuka, et al., Am. J. Physiol. Renal. Physiol. **287** (5), 979 (2004).
7. A. Nakao, A. M. Choi, and N. Murase, J. Cell. Mol. Med. **10** (3), 650 (2006).
8. M. D. Musameh, C. J. Green, B. E. Mann, et al., J. Heart Lung Transplant. **26** (11), 1192 (2007).
9. L. E. Otterbein, R. Foresti, and R. Motterlini, Circ. Res. **118** (12), 1940 (2016).
10. A. Nakao, J. S. Neto, S. Kanno, et al., Am. J. Transplant. **5** (2), 282 (2005).
11. A. Nakao, G. Faleo, H. Shimizu, et al., Kidney Int. **74** (8), 1009 (2008).
12. N. Hatayama, M. Inubushi, M. Naito, et al., Sci. Rep. **6**, 1 (2016).
13. N. Hatayama, S. Hirai, M. Naito, et al., Sci. Rep. **8** (1), 1 (2018).
14. Е. Е. Фесенко, Н. Э. Швирст, Е. Л. Гагаринский и др. Патент RU 2707532 (2019).
15. Н. В. Грудинин, В. К. Богданов, М. Г. Шарапов и др., Вестн. трансплантологии и искусственных органов **22** (2), 20 (2020).
16. Á. L. Szilágyi, P. Mátrai, P. Hegyi, et al., World J. Gastroenterol. **24** (16), 1812 (2018).
17. Y. Li, S. Guo, G. Liu, et al., Artif. Organs **40** (5), 489 (2016).
18. J. M. O'Callaghan, S. R. Knight, R. D. Morgan, and P. J. Morris, Am. J. Transplant. **12** (4), 896 (2012).
19. . M. Manzia, L. Toti, C. Quaranta, et al., Int. J. Surg. Rep. **57**, 163 (2019).
20. J. N. Schroder, D. D'Alessandro, F. Esmailian, et al., J. Heart Lung Transplant. **38** (4), S42 (2019).
21. H. Mergental and G. R. Roll, Clin. Liver Dis. **10** (4), 97 (2017).

22. G. Loor, G. Warnecke, M. Villavicencio, et al., J. Heart Lung Transplant. **37** (Suppl. 4), S147 (2018).
23. *OCS Heart system for heart transplant, Medtech innovation briefing* (2016). URL: https://www.nice.org.uk/advice/mib86/chapter/The-technology.
24. T. M. Suszynski, M. D. Rizzari, W. E. Scott, et al., J. Cardiothorac. Surg. **8**, 105 (2013).
25. С. М. Минасян, М. М. Галагудза, Ю. В. Дмитриев и др., Регионарное кровообращение и микроциркуляция **13** (3), 4 (2014).

Evaluation of Preservation of Rat Myocardium and Isolated Sheep Heart Following Prolonged (24 Hour) Hypothermic Preservation after Exposure to a Gaseous Mixture Composed of Carbon Monoxide and Oxygen

E.E. Fesenko (Jr.)*, E.L. Gagarinsky*, A.S. Averin*, N.V. Grudinin, A.E. Gurin*, N.V. Shishova*, N.E. Shvirst*, M.V. Goltyaev*, and A.L. Kovtun*****

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

***Shumakov Federal Scientific Center of Transplantology and Artificial Organs, Shukinskaya ul. 1, Moscow, 123182 Russia*

****Foundation for Advanced Research, Berezhkovskaya nab. 22/3, Moscow, 121059 Russia*

High organoprotective properties of a gaseous mixture of carbon monoxide (CO) and oxygen (O_2) were proven after prolonged (24 hour) hypothermic preservation of papillary muscle and isolated rat heart at 4°C. It was shown that hypothermic preservation in a high-pressure gaseous mixture of CO and O_2 (6 atm.) is effective in restoring the contractile activity of the rat heart after 24 hours of storage at 4°C. The isolated, retrograde perfused Langendorff heart perfomed physically relevant mechanical work, the duration of which was similar to that of the intact control. When heart was stained with triphenyltetrazolium chloride, no infarcted regions of the myocardium were detected. We found that tissue is able to sustain function at a high level after preservation in response to electrically stimulated contractile activity of the papillary muscles of the heart. In the test group, the relationship between frequency/intensity – the degree of potentiation effect induced by a pause – a response to stimulation with isoproterenol corresponds to that of normal rat myocardium, on the whole. For the first time, preservation of the sheep heart comparable in size and weight to a human heart has been successfully applied using a gaseous mixture composed of carbon monoxide and oxygen. In all experiments in the test group, a normal heartbeat spontaneously restored after the start of perfusion. There were no significant histological differences between sheep hearts from the test and control groups. The myocardium in the test group maintained a normal tissue structure. We have expanded a CO preservation approach to sheep heart, its 24-hour preservation time is 4 times longer than the maximum preservation time of standard static cold storage. The results obtained on the large laboratory animal heart model show that the proposed hypothermic preservation appears helpful for prolonged storage of the human heart.

Keywords: carbon monoxide, oxygen, gas, organ, transplantation, storage, heart, rat, sheep, preservation, hypothermia

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 792–797

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 616.419

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНОГО МИЕЛОФИБРОЗА И ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОГО КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА МЕГАКАРИОЦИТАРНОГО РОСТКА МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ

© 2020 г. З.П. Асауленко*, Л.Б. Полушкина, А.И. Лепский***, Ю.А. Криволапов***

**Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова МЗ РФ, 191015, Санкт-Петербург, Кирочная ул., 41*

***Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА РФ, 191024, Санкт-Петербург, 2-я Советская ул., 16*

****Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7/9*

E-mail: Zakhariy@list.ru

Поступила в редакцию 22.11.2019 г.
После доработки 27.01.2020 г.
Принята к публикации 03.02.2020 г.

Изучены особенности гистотопографических характеристик мегакариоцитарного ростка в биопсиях костного мозга больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом в префибротической стадии с мутацией JAK2 или CALR с помощью частного метода машинного обучения без учителя – алгоритма кластеризации DBSCAN. Исследовали 95 биопсий костного мозга больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом. Оценивали следующие характеристики гистотопографии мегакариоцитов: среднее количество мегакариоцитов в одном кластере, среднее количество кластеров и мегакариоцитов на 1 мм^2 среза. Получена статистически значимая модель логистической регрессии ($\chi^2 = 14.703$, $p = 0.023$, Nagelkerke $R^2 = 19.6\%$). Анализ гистотопографических характеристик мегакариоцитов позволил правильно дифференцировать эссенциальную тромбоцитемию и первичный миелофиброз в 71.6% случаев. Различия гистотопографических характеристик мегакариоцитов в биоптатах костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом с мутацией JAK2 или CALR, выявленные помощью алгоритма кластеризации DBSCAN, позволяют связать нозологическую форму заболевания и особенности строения мегакариоцитарного ростка, а также создать модель логистической регрессии, способную дифференцировать эти болезни.

Ключевые слова: эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз, гистотопография мегакариоцитов, кластерный анализ.

DOI: 10.31857/S0006302920030225

Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ) относятся к группе «Ph-негативных» хронических миелопролиферативных новообразований (МПН). Гистологическое исследование биопсий костного мозга относится к большим диагностическим критериям МПН [1]. Чувствительность этого метода исследования в диагностике МПН варьирует от 32,5 до 75%, специфичность – 92–98% в зависимости от заболевания (считается, что тест имеет достаточную диагностическую точность, если его чувствительность и специфичность превышают 80%) [2].

Гистотопографические и морфологические аномалии мегакариоцитов важны для дифференциальной диагностики ЭТ и ПМФ. При ПМФ различимы компактные группы и скопления мегакариоцитов в виде тесно сомкнутых клеток (плотные кластеры), которые могут содержать более десяти мегакариоцитов. Характерно расположение мегакариоцитов и их скоплений вокруг расширенных кровеносных синусоидов и возле поверхности костных балок. Ядра мегакариоцитов часто имеют гиполобулярное строение (обла-

Сокращения: ЭТ – эссенциальная тромбоцитемияю, ПМФ – первичный миелофиброз, МПН – миелопролиферативные новообразования, префибрПМФ – первичный миелофиброз в префибротической стадии.

ковидные ядра) . При ЭТ скопления мегакариоцитов более разреженные, клетки не соприкасаются друг с другом (рыхлые кластеры), мегакариоциты распределены в костном мозге более однородно, их тропность к поверхностям костных балок и кровеносным синусам выражена слабее (рис. 1). Ядра при ЭТ гиперплоидные, дольчатые, напоминают венок или, как их называют в англоязычных руководствах, – «staghorn»-like («ядра типа оленьих рогов»).

Несмотря на возросшую роль гистологического исследования биопсий костного мозга в постановке диагноза МПН, данные о воспроизводимости этого критерия диагностики противоречивы. В ряде публикаций представлены данные о совпадении диагнозов МПН в 76–88% случаев [3–6]. Другие работы свидетельствуют о более низкой воспроизводимости результатов гистологического исследования костного мозга – совпадение диагнозов в 62–70% случаев. Наибольшую трудность представляет дифференциальная диагностика между ЭТ и ПМФ в префибротической стадии (префибрПМФ) – совпадение морфологических диагнозов наблюдается лишь у 53% больных [7–10]. Авторы работы [11] показали, что при гистологическом исследовании биопсий костного мозга больных МПН мнение трех из четырех врачей-патологоанатомов о формировании плотных кластеров мегакариоцитов совпало в 88% случаев, согласованность мнения трех специалистов из четырех о наличии рыхлых кластеров мегакариоцитов или их отсутствии наблюдалось в 71 и 73% случаев соответственно. Оценка плотности кластеризации мегакариоцитов субъективна и варьирует даже у врачей, специализирующихся в гематопатологии: каппа Коэна = 0.21 (граница между плохой и удовлетворительной степенью согласованности) [2].

Метаанализ, проведенный авторами работы [12], продемонстрировал, что у больных ЭТ частота обнаружения мутаций JAK2 и CALR составляет 31.3–72.1% и 12.6–50% соответственно, у пациентов с ПМФ мутацию JAK2 можно обнаружить в 25.0–85.7% случаев, мутацию CALR – у 10–100% больных. Доказана роль драйверных мутаций JAK2 и CALR как прогностических и предиктивных биомаркеров у больных ЭТ и ПМФ, но влияние мутационного статуса на пространственные характеристики мегакариоцитарного ростка в костном мозге изучено мало [13].

Для улучшения качества диагностики ЭТ и префибрПМФ при гистологическом исследовании биопсий костного мозга и изучении связи мутационного профиля с особенностями строения мегакариоцитарного ростка может быть полезно внедрение алгоритмов машинного обучения, способных распознавать морфологические и

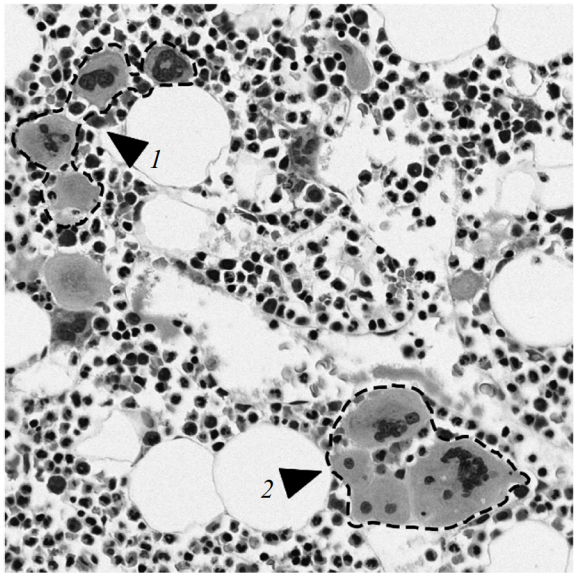


Рис. 1. Эссенциальная тромбоцитемия. Стрелками отмечены рыхлый (*1*) и плотный (*2*) кластеры мегакариоцитов.

гистотопографические признаки, недоступные человеческому глазу.

Цель исследования – найти отличия гистотопографических характеристик мегакариоцитарного ростка в биопсиях костного мозга больных ЭТ и ПМФ в префибротической стадии с мутацией JAK2 или CALR с помощью частного метода машинного обучения без учителя – алгоритма кластеризации DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В патологоанатомическом отделении клинической молекулярной морфологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ в период 2012–2018 гг. были отобраны для исследования 95 биопсий костного мозга больных «Ph-» МПН с выявленной мутацией JAK2 или CALR. Распределение по группам было следующим: ЭТ с мутацией JAK2 – 30 больных, ЭТ с мутацией CALR – 30 больных, префибрПМФ с мутацией JAK2 – 25 больных и префибрПМФ с мутацией CALR – 10 больных. У всех пациентов определяли JAK2V617F-статус с помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Наличие мутации гена CALR проводили методом прямого секвенирования по Сенгеру на автоматической капиллярной системе MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences, Великобритания). Все молекулярно-генетические исследования были выполнены в лаборатории молекулярной генетики РосНИИГТ ФМБА России.

Таблица 1. Гистотопографические характеристики мегакариоцитов у больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом в префибротической стадии с мутациями JAK2 или CALR

Параметр	ЭТ JAK2	ЭТ CALR	ПМФ JAK2	ПМФ CALR
Количество мегакариоцитов в кластере	5.9 ± 2.4	7.2 ± 2.9	8.0 ± 4.3	7.4 ± 1.5
Мегакариоциты, мм^2	21.7 ± 12.7	20.2 ± 9.8	25.6 ± 16.0	17.9 ± 6.7
Кластеры, мм^2	2.66 ± 1.02	2.09 ± 0.96	2.34 ± 1.09	1.87 ± 0.72

Таблица 2. Переменные, включенные в модель логистической регрессии

Предиктор	*B*	Стандартная ошибка	Вальд	*p*	Exp (*B*) (95% ДИ)
Количество мегакариоцитов в кластере	0.350	0.212	2.723	0.099	1.420 (0.936–2.152)
Мегакариоциты, мм^2	–0.091	0.113	0.658	0.417	0.913 (0.732–1.138)
Кластеры, мм^2	0.365	1.056	0.120	0.729	1.44 (0.18–11.40)
Мутация	–1.588	0.583	7.420	0.006	0.204 (0.065–0.640)

Гистологические срезы костного мозга, окрашенные гематоксилином и эозином или азуром и эозином, с помощью сканера Pannoramic 250 Flash III (3DHISTECH, Венгрия) переводили в цифровой формат. В программе Pannoramic Viewer определяли координаты каждого мегакариоцита. Координаты всех мегакариоцитов каждого среза экспортировали в MS Excel и конвертировали в txt-формат. Обработка координат с целью анализа особенностей расположения мегакариоцитов в костном мозге была выполнена на языке программирования Python с помощью алгоритма кластеризации DBSCAN [15]. В биопсиях костного мозга оценивали следующие характеристики: среднее количество мегакариоцитов в одном кластере, среднее количество мегакариоцитарных кластеров и мегакариоцитов на 1 мм^2 среза. Для анализа использовали следующие параметры алгоритма: минимальное количество соседних мегакариоцитов, необходимых для образования кластера – 3, максимальное расстояние между ними – 100 мкм, расстояние между мегакариоцитами – евклидово. Для описания связи гистотопографических характеристик мегакариоцитов и наличия мутации JAK2 или CALR с диагнозом использовали многофакторный дисперсионный анализ и логистический регрессионный анализ. Проведение многофакторного дисперсионного анализа, построение логистической регрессии и кривой ошибок были выполнены с использованием пакета R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрические характеристики гистотопографии мегакариоцитов в биопсиях костного мозга у больных ЭТ и префибрПМФ с мутациями JAK2 или CALR представлены в табл. 1.

Выявлена статистически значимая связь между заболеванием, мутацией и гистотопографическими характеристиками мегакариоцитов, $F = 3{,}185$, $p = 0.001$; Wilks' $\Lambda = 0.739$.

Модель логистической регрессии на основе кластеризации и мутационного статуса была статистически значима ($\chi^2 = 14{,}703$, $p = 0.023$, Nagelkerke $R^2 = 19{,}6\%$). Коэффициент при свободном члене равнялся –2,19 (1,19). Включенные переменные представлены в табл. 2.

Качество дифференциальной диагностики ЭТ и префибрПМФ с использованием логистической регрессии отражено в табл. 3.

Как видно из табл. 3, процент корректных предсказаний диагноза ЭТ значительно выше, чем процент корректных предсказаний префибрПМФ. Вероятность правильного диагноза составляет 71,6%. Обоснованность модели проверена на тестовой и контрольной выборке путем построения модели логистической регрессии на 75 и 25% исходных данных.

Для демонстрации зависимости количества верно классифицированных диагнозов одного заболевания от количества неверно классифициро-

Таблица 3. Процент корректных предсказаний диагноза заболевания на основе переменных, включенных в модель логистической регрессии

Фактическое заболевание	Процент корректных предсказаний		Процент корректных предсказаний
	ЭТ	ПМФ	
ЭТ	54	6	90.0
ПМФ	21	14	40.0
Общий процент			71.6

ванных диагнозов другого заболевания построена кривая ошибок (операционная характеристика приемника). Площадь под кривой ошибок = 72,5 (95% ДИ 61,8–83,1) свидетельствует о хорошем качестве модели (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают различия в расположении мегакариоцитов у пациентов с ЭТ и префибрПМФ с мутациями JAK2 или CALR, которые не воспринимаются глазом при микроскопическом исследовании и могут быть обнаружены лишь с применением алгоритмов машинного обучения. Выявленная статистически значимая связь между заболеванием, мутационным статусом и гистотопографическими характеристиками мегакариоцитов (табл. 1) демонстрирует влияние мутаций JAK2 или CALR на пространственные характеристики мегакариоцитарного ростка в костном мозге. Результаты логистической регрессии свидетельствуют о большей связи мутационного статуса и пространственных особенностей расположения мегакариоцитов у больных ЭТ, чем у пациентов с префибрПМФ (табл. 3). Использование алгоритма кластеризации DBSCAN для оценки гистотопографии мегакариоцитов позволяет оценить плотность кластеризации, размеры кластеров мегакариоцитов и выраженность гиперплазии мегакариоцитарного ростка. Методика кластеризации заключается в группировке объектов, расположенных близко друг к другу, и определении областей с малой плотностью расположения точечных объектов как шум. В методике DBSCAN используются следующие понятия [14, 15]:

ε – окрестность объекта x;

V – множество всех наблюдений;

$U(x,\varepsilon) = \{y \in V: p(x,y) \leq \varepsilon\}$.

Корневой объект степени M (для заданного ε) – объект, ε-окрестность которого содержит не менее M других объектов. При заданном значении M объект y плотно-достижим из объекта x, если $y \in U(x,\varepsilon)$ и объект x является корневым.

Объект y плотно-достижим из объекта x, если существуют такие объекты $x_1, ..., x_n$, где $x_1 = x$, $x_n = y$, что при всех $i = 1, ..., n-1$ объект x_{i+1} непосредственно плотно-достижим из x_i.

«Шум» – объекты, не достижимые ни из одного другого объекта.

Число кластеров K алгоритм DBSCAN определяет в процессе работы.

Принцип работы алгоритма DBSCAN:

1. Задаются значения параметров ε и M.

2. Если все объекты $x \in V$ уже просмотрены, завершить выполнение алгоритма. В противном случае выбирается любой из них и отмечается как просмотренный.

3. Если x – корневой объект, создается новый кластер ($K := K + 1$), следует переход к пункту 4; в противном случае точка x помечается как «шум», следует переход к шагу 1.

4. В созданный кластер включаются все объекты, которые являются плотно-достижимыми из (корневого) объекта x, следует переход к шагу 2.

В этой работе точечные объекты представляют собой экспортированные координаты мегакариоцитов, определенные при исследовании от-

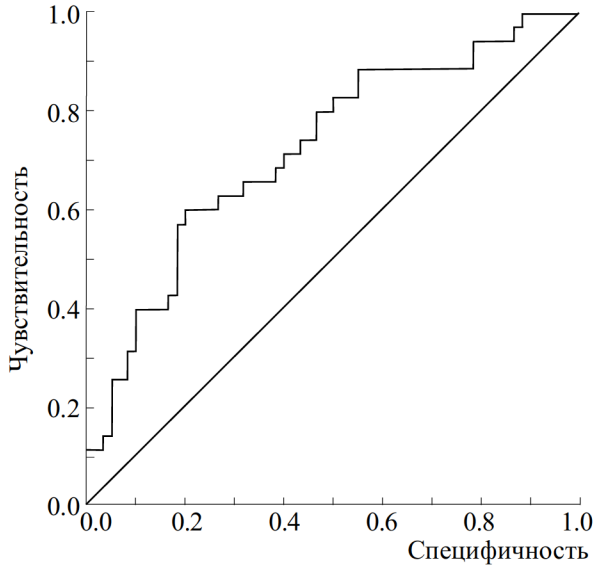


Рис. 2. Кривая ошибок (операционная характеристика приемника).

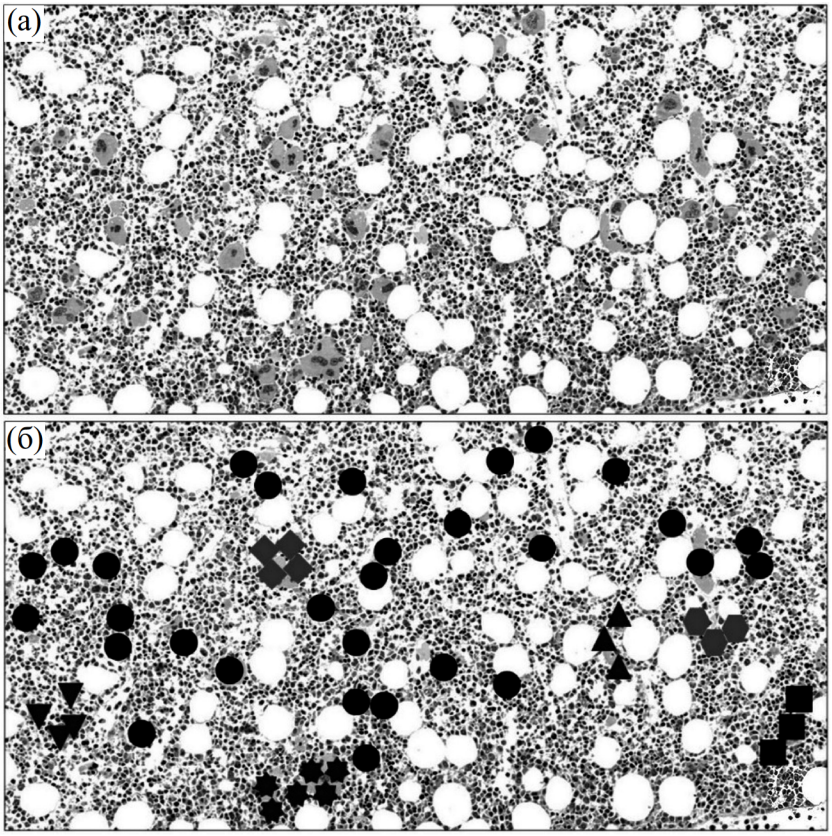


Рис. 3. Анализ кластеризации мегакариоцитов в биопсиях костного мозга. (а) – Фрагмент отсканированного гистологического препарата костного мозга больного эссенциальной тромбоцитемией. (б) – Мегакариоциты формируют отдельные кластеры, отмеченные разными геометрическими фигурами. Мегакариоциты, классифицированные как «шум», отмечены круглыми аннотациями.

сканированных гистологических препаратов костного мозга (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пространственные отличия мегакариоцитарного ростка в биопсиях костного мозга больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом в префибротической стадии с подтвержденной мутацией JAK2 или CALR, установленные с помощью частного метода машинного обучения без учителя – алгоритма кластеризации DBSCAN, показывают целесообразность применения элементов искусственного интеллекта в научной и практической деятельности патолого-анатомических отделений медицинских организаций.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования – З.П.А. и Ю.А.К.; сбор и обработка материала – З.П.А., Л.Б.П. и А.И.Л.; написание текста – З.П.А. и Ю.А.К., редактирование – Ю.А.К.

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. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, et al., Blood **127** (20), 2391 (2016). DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544
2. A. Alvarez-Larrán, A. Ancochea, M. García, et al., Brit. J. Haematol. **166** (6), 911 (2014). DOI: 10.1111/bjh.12990
3. U. Gianelli, A. Bossi, I. Cortinovis, et al., Modern Pathol. **27**, 814 (2014). DOI: 10.1038/modpathol.2013.196

4. T. Barbui, J. Thiele, F. Passamonti, et al., J. Clin. Oncol. **29**, 3179 (2011). DOI: 10.1200/JCO.2010.34.5298
5. J. Thiele, H. M. Kvasnicka, L. Müllauer, et al., Blood **117**, 5710 (2011). DOI: 10.1182/blood-2010-07-293761
6. A. B. Madelung, H. Bondo, I. Stamp, et al., Am. J. Hematol. **88**, 1012 (2013). DOI: 10.1002/ajh.23554
7. B. S. Wilkins, W. N. Erber, D. Bareford, et al., Blood **111**, 60 (2008). DOI: 10.1182/blood-2007-05-091850
8. M. Brousseau, E. Parot-Schinkel, M. P. Moles, et al., Histopathology **56**, 758 (2010). DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03545.x
9. T. Buhr, K. Hebeda, V. Kaloutsi, et al., Haematologica **97**, 360 (2012). DOI: 10.3324/haematol.2011.047811
10. B. S. Wilkins, W. N. Erber, D. Bareford, et al., Blood **111** (1), 60 (2007). DOI: 10.1182/blood-2007-05-091850
11. S. M. Koopmans, F. J. Bot, K. H. Lam, et al., Am. J. Clin. Pathol. **136** (4), 618 (2011). DOI: 10.1309/ajcp2ug9sggwahua
12. M. Mejía-Ochoa, P. A. Acevedo Toro, and J. A. Cardona-Arias, BMC Cancer **19** (1), 590 (2019). DOI: 10.1186/s12885-019-5764-4
13. T. R. Merlinsky, R. L. Levine, and E. Pronier, Clin. Cancer Res. **25** (10), 2956 (2019). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3777
14. J. Sander, M. Ester, H. P. Kriegel, and X. Xu, Data Mining Knowledge Discov. **2**, 169 (1998). DOI: 10.1023/A:1009745219419
15. I. V. Konnov, O. A. Kashina, and E. I. Gilmanova, Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Fiziko-Matematicheskie Nauki, **161** (3), 423 (2019). DOI: 10.26907/2541-7746.2019.3.423-437 (In Russian)

Morphological Differential Diagnosis of Primary Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia with Computer Cluster Analysis of Megakaryocytic Lineage in Myeloid Tissue

Z.P. Asaulenko*, L.B. Polushkina, A.I. Lepsky***, and Yu.A. Krivolapov***

**North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Kirochnaya ul. 41, St. Petersburg, 191015 Russia*

***Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, 2-ya Sovetskaya ul. 16, St. Petersburg, 191024 Russia*

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

DBSCAN clustering algorithm – unsupervised machine learning algorithm was used to explore particularities of the histotopographic features of the megakaryocytic lineage in the bone marrow biopsies of patients with JAK2+ or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis in prefibrotic stage. We examined 95 bone marrow biopsies of patients with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. We evaluated the following histotopographical features of megakaryocytes: the mean quantity of megakaryocytes in one cluster, the mean number of clusters and megakaryocytes per 1 mm2 area in section. The logistic regression model was statistically significant, ($\chi 2 = 14.703$, $p = 0.023$, Nagelkerke $R2 = 19.6\%$). Analysis of histotopographical features of megakaryocytes helped to differentiate correctly between essential thrombocythemia and primary myelofibrosis in 71.6% cases. The differences revealed by DBSCAN clustering algorithm in histotopographical features of megakaryocytes in biopsies of the bone marrow derived from patients with JAK2+ or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis suggest the relationship between the nozologic form of the disease and particularities of the development of megakaryocytic lineage and are also useful to create a logistic regression model for differentiating these diseases.

Keywords: essential thrombocythemia, primary myelofibrosis, histotopography of megakaryocytes, cluster analysis

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 798–803

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 57.042: 57.017: 573.7

КОНТРАСТНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ

© 2020 г. И.И. Шошина*, **, И.С. Соснина*, К.А. Зеленский***, В.Ю. Карпинская****, В.А. Ляховецкий*, С.В. Пронин***

**Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6*

***Санкт-Петербургский государственный университет, 190121, Санкт-Петербург, ул. Галерная, 58-60*

****Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а*

*****Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 190121, Санкт-Петербург, ул. Союза Печатников, 16*

E-mail: shoshinaii@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.
После доработки 19.02.2020 г.
Принята к публикации 04.06.2020 г.

Проведена оценка контрастной чувствительности зрительной системы в различных диапазонах пространственных частот в условиях «сухой» иммерсии, используемой для моделирования физиологических эффектов микрогравитации. Контрастная чувствительность в диапазоне низких и высоких пространственных частот позволяет судить о функциональном состоянии магно- и парвоцеллюлярной нейронных систем, формирующих дорзальный и вентральный потоки информации из затылочных во фронтальные отделы коры головного мозга. В исследовании приняли участие десять добровольцев, время пребывания которых в условиях «сухой» иммерсии составило 21 сутки. Контрастную чувствительность регистрировали в динамике с помощью метода визоконтрастометрии. В качестве стимулов использовали элементы Габора. Установлено повышение контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот, к восприятию которых специфична магноцеллюлярная система, на третий день нахождения в условиях иммерсии и через день после окончания эксперимента, по сравнению с фоновыми значениями. Контрастная чувствительность в диапазоне высоких пространственных частот, к которым специфична парвоцеллюлярная система, в эксперименте не изменялась. Таким образом, получены данные о включенности магноцеллюлярной нейронной системы в процессы адаптации к экстремальным условиям среды.

Ключевые слова: контрастная чувствительность, нейронные сети, магноцеллюлярная и парвоцеллюлярная система, пространственно-частотная фильтрация, иммерсия, микрогравитация, адаптация.

DOI: 10.31857/S0006302920040237

Зрительное восприятие играет ведущую роль в обеспечении головного мозга информацией, необходимой ему для принятия решения, построения внутренней картины внешнего мира, адаптации к меняющимся условиям среды.

С позиций теории пространственно-частотной фильтрации зрительное восприятие обеспечивается в результате различения пространственно-частотных характеристик зрительных стимулов множеством относительно «узких» фильтров (каналов) – нейронных комплексов, настроенных на восприятие разных пространственных частот [1, 2]. Каналов много, однако условно можно выделить основные из них – крупноклеточные магноцеллюлярные и мелкоклеточные парвоцеллюлярные каналы, наличие которых было показано еще нобелевскими лауреатами Д. Хьюбелом и Т. Визелом [3, 4]. Работа магно- и парвоцеллюлярной систем рассматривается как частный случай работы механизмов глобального и локального анализа, в которой могут быть задействованы и другие пути.

Магноцеллюлярная система представлена большими ганглиозными клетками с большими рецептивными полями [5], с проекциями к магноцеллюлярным слоям латерального коленчатого тела и затем к слою 4Cα первичной зрительной коры. Нейроны этой системы более чувствительны к низким пространственным и высоким временным частотам [6, 7], обеспечивая тем самым быстрое проведение информации к нейронам преимущественно дорзального пути головного мозга [8, 9]. Эти свойства определяют ведущую роль магноцеллюлярных каналов в обработке информации о глобальной организации стимула

[10, 11], в процессах «предвнимания» [10–13] и анализе движения [14].

Парвоцеллюлярная система представлена мелкими ганглиозными клетками с маленькими рецептивными полями [12], с проекциями к парвоцеллюлярным слоям латерального коленчатого тела и затем к слою 4Cβ первичной зрительной коры, а также слоям IVA и VIA. Нейроны этой системы более чувствительны к высоким пространственным и низким временным частотам [12, 13, 15–18]. Они обеспечивают медленное по сравнению с магноцеллюлярными нейронами проведение информации преимущественно к нейронам вентрального пути, пролегающего через нижневисочную зону коры головного мозга [8]. Эти свойства определяют ведущую роль парвоцеллюлярных каналов в процессах выделения отдельных объектов и деталей объектов, т.е. локального анализа зрительного поля [11]. Нейроны магноцеллюлярных каналов активируются на низких уровнях контраста (до 16%), отвечают за периферическое зрение, парвоцеллюлярные нейроны активируются при достижении контраста порядка 10% и продолжают отвечать вплоть до полного насыщения и обеспечивают центральное зрение [18–20].

Результаты исследований функционального состояния и характера взаимодействия магно- и парвоцеллюлярной систем на разных уровнях обработки информации в условиях хронического стресса и психопатологии свидетельствуют о значимости согласованной работы этих систем для формирования целостного представления об окружающей среде и адаптивного поведения. Рассогласование взаимодействия магно- и парвоцеллюлярной нейронных систем, соответственно механизмов глобального и локального анализа изображений, приводит к стойким сенсорным нарушениям, наблюдающимся, в частности, при шизофрении [21–27]. В ходе изучения функционального состояния этих систем в условиях хронического стресса показано повышение контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот и, соответственно, активности магноцеллюлярной системы [28], обеспечивающей глобальный механизм анализа зрительной информации. Еще более выраженное повышение активности магноцеллюлярной системы по сравнению с состоянием хронического стресса характерно для больных шизофренией с первым психотическим эпизодом [21, 24]. Обращает внимание тот факт, что при переходе в состояние ремиссии эти пациенты демонстрируют такую же контрастную чувствительность в диапазоне низких пространственных частот, как и психически здоровые испытуемые. С позиций теории адаптации переход от здоровья к болезни представляет собой процесс постепенного снижения степени адаптации организма к окружающим условиям, т.е. болезнь является результатом недостаточности адаптационных механизмов, их истощения и срыва [29, 30]. В связи с этим пограничные состояния и собственно психоз также рассматриваются как состояние дезадаптации.

Данные, полученные ранее на модели профессионального выгорания [28] и модели шизофрении [21–24], позволили предположить, что функциональное состояние магноцеллюлярной системы, которое может быть зафиксировано путем оценки контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот, отражает процессы адаптации системы зрительного восприятия в ответ на воздействие экстремальных факторов. Изменение чувствительности любой из оппонентных магноцеллюлярной или парвоцеллюлярной нейронных систем приводит к рассогласованию в их работе, а степень рассогласования, можно сказать, определяет функциональное состояние субъекта.

В ходе исследований с регистрацией электроэнцефалограммы у космонавтов при решении ими задачи навигации показано, что микрогравитация приводит к функциональной реорганизации дорзального пути [31]. Дорзальный путь, как было указано выше, формируется отростками нейронов магноцеллюлярной системы.

С целью получить свидетельства того, что процесс адаптации организма к экстремальным воздействиям сопровождается изменением чувствительности магноцеллюлярной системы, было предпринято исследование по оценке контрастной чувствительности в условиях «сухой» иммерсии, используемой в гравитационной физиологии для моделирования физиологических эффектов невесомости [32].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

К участию в исследовании врачебно-экспертной комиссией были допущены десять добровольцев-испытателей (средний возраст 29.8 ± ± 1.2 года). Все исследования были неинвазивными. Оборудование соответствовало нормам безопасности. Все испытатели находились в условиях 21-суточной «сухой» иммерсии: были погружены в ванну размером 200 × 100 × 100 см (рис. 1), наполненную водой, температуру которой поддерживали на уровне 33.0 ± 0.5°C. Поверхность воды была покрыта свободно плавающей водонепроницаемой тканью. Площадь ткани более чем в два раза превосходила площадь зеркала воды. Таким образом, испытатель, будучи погруженным в толщу воды, был изолирован от непосредственного контакта с ней, в связи с чем, данный метод и получил название «сухой» иммерсии. Режим дня во время иммерсии включал время на проведение экспериментальных процедур, гигиениче-

Рис. 1. Демонстрация условий «сухой» иммерсии и предъявления стимулов в эксперименте с оценкой контрастной чувствительности зрительной системы в разных диапазонах пространственных частот.

ских операций и выполнение профилактических мероприятий. Один раз в день испытателей извлекали из ванны и укладывали на каталку в строго горизонтальном положении для проведения гигиенических процедур, занимавших не более 15 мин.

Так как процесс адаптации – динамическое образование, соответственно контрастную чувствительность зрительной системы регистрировали в динамике. Фоновые замеры проводили дважды до начала эксперимента за 48 ч и за 24 ч до помещения в ванну. Далее замеры контрастной чувствительности проводили на третьи, десятые и двадцатые сутки нахождения в условиях «сухой» иммерсии и через сутки после «выемки».

С помощью метода визоконтрастометрии [33] регистрировали контрастную чувствительность зрительной системы в диапазоне низких, средних и высоких пространственных частот, к которым в разной степени чувствительны нейроны магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной системы. Для этого использовали компьютерную программу, разработанную С.В. Прониным в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН, позволяющую формировать тестовые изображения на мониторе любого типа без предварительной его калибровки.

Для передачи яркостного профиля тестовых изображений в ней использованы вариации плотности случайно расположенных на черном фоне белых точек. Для измерения порогового контраста применена адаптивная «лестничная» процедура (adaptive staircase procedure). Стимулы предъявляли на экране монитора с диагональю 40 см, разрешением 1024 × 600 пикселей, частотой обновления 60 Гц. В случайном порядке слева или справа от центра экрана выводили элементы Габора с пространственной частотой 0.4, 0.8, 1.0, 3.0, 6.0 и 10.0 цикл/град. Задача испытателя состояла в том, чтобы нажать на правую кнопку мыши, если он видит изображение справа, левую кнопку – если видит изображение слева. Выбор просили делать и тогда, когда испытатель не был уверен, что видит тестовое изображение. Измерение начинали с контраста 0.5 и понижали его до порогового уровня, при котором испытатель с вероятностью 0.5 допускал хотя бы одну ошибку, после чего контраст начинал колебаться вокруг этого уровня. Шаг изменения контраста составлял 20%. Количество повторов для каждой пространственной частоты равнялось восьми. Измерения проводили в темноте, источником освещения был только экран монитора.

Иммерсионную ванну с установленным на ней на расстоянии 1.5 м от испытателя монитором накрывали плотной черной тканью, не пропускающей солнечный свет (рис. 1). Монитор был установлен так, чтобы уровень расположения глаз испытателя примерно соответствовал середине экрана. Наблюдение осуществляли бинокулярно. Острота зрения всех испытателей соответствовала норме.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью критерия Манна–Уитни пакета статистических программ SPSS-11.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных выполнен исходя из представлений об изменении контрастной чувствительности в разных диапазонах пространственных частот и контрастно-частотной специфичности магноцеллюлярной и парвоцеллюляр-

ной систем. Контрастную чувствительность при восприятии элементов Габора с пространственной частотой 0.4 и 0.8 цикл/град рассматривали как чувствительность в диапазоне низких пространственных частот, 1.0 и 3.0 цикл/град – средних пространственных частот, 6.0 и 10.0 цикл/град – высоких пространственных частот.

Средние фоновые показатели контрастной чувствительности испытателей в диапазоне низких пространственных частот составили 10.4 ± 5.1, средних частот – 11.7 ± 3.6, высоких пространственных частот – 4.6 ± 2.6 (рис. 2). На третьи сутки нахождения в условиях «сухой» иммерсии контрастная чувствительность в диапазоне низких пространственных частот составила 13.6 ± 4.9, средних – 12.5 ± 4.5, высоких пространственных частот – 5.0 ± 2.2. В результате статистического анализа полученных данных установлено, что при адаптации к условиям «сухой» иммерсии происходит достоверное повышение контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот ($p < 0.02$), к восприятию которых специфична магноцеллюлярная система.

На десятые сутки испытатели демонстрировали практически такую же контрастную чувствительность, как и до начала эксперимента (фоновые показатели). На двадцатые сутки нахождения в условиях «сухой» иммерсии показатели не изменились. Однако через сутки после «выемки» из ванны вновь произошло повышение контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот относительно фонового уровня и показателей на десятые и двадцатые сутки нахождения в условиях «сухой» иммерсии. Контрастная чувствительность составила 12.4 ± 5.0 ($p < 0.02$). В диапазоне средних пространственных частот также произошло некоторое увеличение контрастной чувствительности – до 12.5 ± 3.7 на третьи сутки и 12.9 ± 3.9 после «выемки» по сравнению с контрастной чувствительностью в фоне, равной 11.6 ± 3.6. Контрастная чувствительность в диапазоне высоких пространственных частот, так же как и в диапазоне средних пространственных частот, в эксперименте достоверно не изменялась. Фоновые значения контрастной чувствительности в диапазоне высоких пространственных частот составили 4.6 ± 2.6, на третьи сутки «сухой» иммерсии – 5.0 ± 4.7, после «выемки» – 5.5 ± 2.5.

Таким образом, достоверное повышение контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот, к восприятию которых специфична магноцеллюлярная система, в условиях «сухой» иммерсии свидетельствует о повышении активности этой системы при адаптации к средовым воздействиям. Контрастная чувствительность в диапазоне высоких пространственных частот, к восприятию которых более специфична парвоцеллюлярная система, не изменяется, соответственно, активность этой системы в экстремальных условиях «сухой» иммерсии остается прежней. Так как активность одной из оппонентных систем возрастает, а другой – остается прежней, можно говорить о рассогласовании в работе этих систем при адаптации к новым условиям среды. При этом маркером процесса адаптации является функциональное состояние магноцеллюлярной системы, нейроны которой формируют дорзальный путь передачи информации из затылочных в передние отделы коры головного мозга и обеспечивают глобальный механизм анализа информации (от общего к частному). Чувствительность парвоцеллюлярной системы, формирующей вентральный путь передачи информации из затылочных в передние отделы коры мозга и обеспечивающей механизм локального анализа (от частного к общему), при адаптации к экстремальным условиям «сухой» иммерсии не изменяется.

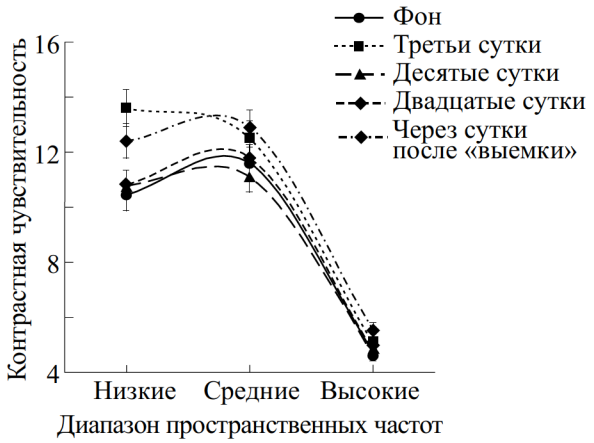


Рис. 2. Показатели контрастной чувствительности в разных диапазонах пространственных частот до начала эксперимента (фон), в условиях «сухой» иммерсии (третьи, десятые и двадцатые сутки) и через сутки после ее окончания (после «выемки» из ванны).

Полученные данные согласуются с результатами исследований на модели профессионального выгорания (по сути, хронического стресса) и модели шизофрении, которые также могут рассматриваться как примеры состояний дезадаптации (срыва адаптации в случае с шизофренией).

Таким образом, оценка контрастной чувствительности зрительной системы в динамике позволила установить участие магноцеллюлярной системы, обеспечивающей механизм глобального анализа информации, в процессах адаптации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предпринято исследование по оценке контрастной чувствительности зрительной системы в динамике: до, во время воздействия условий «сухой» иммерсии, используемой для моделирования физиологических эффектов микрогравитации, и после окончания ее воздействия на организм человека. Контрастная чувствительность в разных диапазонах пространственных частот позволяет судить о функциональном состоянии магно- и парвоцеллюлярной нейронных систем. Магноцеллюлярная система более специфична к низким пространственным частотам, парвоцеллюлярная система – высоким пространственным частотам. Установлено изменение в ходе исследований контрастной чувствительности зрительной системы в диапазоне низких пространственных частот, к которым специфична магноцеллюлярная система. Таким образом, показана роль магноцеллюлярной системы в процессах адаптации к меняющимся условиям среды, что может служить маркером процессов адаптации/дезадаптации.

Получены дополнительные свидетельства важности согласованной работы магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной нейронных систем для адаптивного поведения.

Результаты работы могут найти практическое применение в системе медицинского контроля лиц, работающих в экстремальных условиях, в частности у космонавтов для оценки эффективности подготовки к полету, мониторинга состояния зрительной системы в условиях воздействия неблагоприятных факторов, в частности невесомости, а также позволят найти объяснения тем эффектам, что наблюдаются в условиях таких воздействий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-013-00036).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедура исследований была предварительно рассмотрена и одобрена Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН. Каждый испытатель в соответствии с положением Хельсинкской декларации прав человека подписал информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. W. Campbell and J. G. Robson, J. Physiol. **197**, 551 (1968).
2. В. Д. Глезер, В. А. Иванов и Т. А. Щербач, Физиол. журн. **59** (2), 206 (1973).
3. D. H. Hubel and T. N. Wiesel, J. Physiol. **195**, 215 (1968).
4. D. Hubel and T. Wiesel, J. Neurosci. **3**, 1116 (1983).
5. L. J. Croner and E. Kaplan, Vision Res. **35**, 7 (1995).
6. J. Kulikowski, *in Seeing Contour and Colour,* Ed. by J. Kulikowski, C. Dickinson, and I. Murray (Pergamon Press, Oxford, 1989).
7. D. Regan, *Human Perception of Objects: Early Visual Processing of Spatial Form Defined by Luminance, Color, Texture, Motion, and Binocular Disparity*. (Sinauer, Sunderland, 2000).
8. W. H. Merigan and J. H. R. Maunsell, Annu. Rev. Neurosci. **16**, 369 (1993).
9. Я. Дж. Куликовский и Э. Робсон, Оптич. журн. **66** (9), 37 (1999).
10. S. De la Rosa, R. N. Choudhery, and A. Chatziastros, J. Exp. Psychol. Hum. Percept. Perform. **37**, 38 (2011).
11. D.J. Calderone, M.J. Hoptman, A. Martinez et al., Cereb. Cortex **23**, 1849 (2013).
12. M. Conci, T. Tollner, M. Leszczynski, and H. J. Muller, Neuropsychologia **49**, 2456 (2011).
13. J. F. De Souza, S. P. Dukelow, J. S. Gati, et al., J. Neurosci. **20**, 5835 (2000).
14. A. Thiele, K. R. Dobkins, and T. D. Albright, Neuron **32**, 351 (2001).
15. S. Keri, A. Antal, G. Szekeres, et al., J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. **14**, 190 (2002).
16. P. D. Butler, S. M. Silverstein, and S. C. Dakin, Biol. Psychiatry **64**, 40 (2008).
17. E. Kaplan and R. Shapley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 2755 (1986).
18. J. H. R. Maunsell, T. A. Nealey, and D. D. DePriest, J. Neurosci. **10**, 3323 (1990).
19. J. J. Kulikowski, V. Walsh, and I. J. Murray, *Limits of vision* (Macmillan Press, Lond., 1991).
20. L. G. Ungerleider and M. Mishkin, In *Analysis of visual behavior*, Ed. by D. J. Ingle, M. A. Goodale, and R. J. W. Mansfield (MIT Press, Cambridge, 1982), pp. 549–586.
21. И. И. Шошина и Ю. Е. Шелепин, *Механизмы глобального и локального анализа зрительной информации при шизофрении* (ВВМ, СПб., 2016).
22. I. Shoshina, Y. Shelepin, S. Konkina, et al., Neurosci. Behav. Physiol. **44** (2), 244 (2014).
23. I. I. Shoshina and Yu. E. Shelepin, Neurosci. Behav. Physiol. **45** (5), 512 (2015).
24. I. I. Shoshina, Y. E. Shelepin, E. A. Vershinina, and K. O. Novikova, Human Physiol. **41** (3), 251 (2015).

25. B. P. Keane, D. Paterno, S. Kastner, and S. M. Silverstein, J. Abnormal Psychol. **125** (4), 543 (2016).
26. S. M. Silverstein and R. Rosen, Schizophr. Res. Cog. **2** (2), 46 (2015).
27. Z. Wang, Z. Yu, Z. Pan, et al., Front. Psychol. **9**, 850 (2018).
28. I. I. Shoshina, E. Zavyalova, and R. Sergienko, Int. J. Psychophysiol. **131**, 93 (2018).
29. Ф. З. Меерсон, *Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам* (Медицина, М., 1988).
30. С. Н. Шилов, И. А. Игнатова, Т. А. Муллер и др., Фундаментальные исследования, № 1–6, 1275 (2015).
31. G. Cheron, A. Leroy, E. Palmero-Soler, et al., PLoS One **9** (1), e82371 (2014).
32. E. Tomilovskaya, T. Shigueva, D. Sayenko, et al., Front. Physiol. **10**, 284 (2019).
33. Ю. Е. Шелепин, Л. Н. Колесникова и Ю. И. Левкович, *Визоконтрастометрия* (Наука, СПб., 1985).

Contrast Sensitivity of the Visual System in the “Dry” Immersion Conditions

I.I. Shoshina*, **, I.S. Sosnina*, K.A. Zelenskiy***, V.Yu. Karpinskaya****, V.A. Lyakhovetskii*, and S.V. Pronin***

**Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St-Petersburg, 199034 Russia*

***Saint Petersburg State University, Galernaya ul. 58-60, St. Petersburg, 190121 Russia*

****Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe Shosse 76a, Moscow, 123007 Russia*

*****National Research University “Higher School of Economics”, ul. Soyuza Pechatnikov 16, St. Petersburg, 190121 Russia*

We have studied the contrast sensitivity of the visual system in various ranges of the spatial frequencies in the “dry” immersion conditions that simulate the physiological effects of microgravity. The contrast sensitivity in the range of low and high spatial frequencies is indicative of the functional state of the magnocellular and parvocellular neuronal pathways, which form dorsal and ventral information flow from occipital to frontal lobe. 10 volunteers were recruited to participate in this study. They were exposed to “dry” immersion for 21 days. The contrast sensitivity of the visual system was recorded with a method of visocontrastometry. The Gabor elements were used as stimuli. An increase in the contrast sensitivity was registered in the low spatial frequency range with specific sensitivity of the magnocellular pathway to these frequencies on the third day of immersion and one day after the end of the experiment, compared to background values. The contrast sensitivity in the high spatial frequency range with specific sensitivity of the parvocellular pathway to these frequencies in the experiment remained unchanged. Thus, our findings show that the magnocellular neuronal pathway is involved in the processes of adaptation to the extreme ambient conditions.

Keywords: contrast sensitivity, neural networks, magnocellular system, parvocellular system, spatial-frequency filtration, microgravity, immersion, adaptation

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 804–817

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

ГАЛАКТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, МОЛОДОЕ СОЛНЦЕ, ЗЕМЛЯ И БИОФИЗИКА ЖИВЫХ СИСТЕМ

© 2020 г. М.В. Рагульская*, В.Н. Обридко, Е.Г. Храмова*****

Институт земного магнетизма и распространения радиоволн им. Н.В. Пушкова РАН, 108840, Москва, Троицк, Калужское шоссе, 4

*E-mail: *ra_mary@mail.ru, **obridko@izmiran.ru, ***sinop@yandex.ru*

Поступила в редакцию 28.11.2019 г.
После доработки 30.01.2020 г.
Принята к публикации 03.03.2020 г.

Фактор воздействия излучения молодого Солнца и галактических космических лучей на физические условия на ранней Земле является существенно недооцененным при изучении проблемы возникновения и эволюции биосферы. В статье рассматривается динамика солнечных и галактических факторов за 4.56 млрд лет существования Солнечной системы, оказавшая существенное влияние на формирование адаптационных технологий древних и современных живых систем. Рассмотрены особенности развития биосферы ранней Земли в условиях более тусклого, но более вспышечно-активного молодого Солнца. Обсуждается спектр излучения молодого Солнца и парадокс несоответствия спектра поглощения хлорофилла спектру солнечного излучения, а также пути решения этого парадокса. Подчеркивается роль учета радиационного излучения при рассмотрении моделей ранней биосферы Земли и гипотетических биосфер спутников планет-гигантов и экзопланет.

Ключевые слова: космические лучи, излучение слабого молодого Солнца, первичная биосфера, происхождение жизни, фотосинтез, биофизика сложных систем.

DOI: 10.31857/S0006302920040249

Существование первых земных живых систем датируется 3.8–4.0 млрд лет назад (возраст Солнца и Солнечной системы составляет 4.56 млрд лет). В первые 2 млрд лет условия в Солнечной системе и на самой Земле существенно отличались от современных. Другим было все: период вращения звезды, ее масса, активность и динамика Солнца, конфигурация магнитных полей Солнца и форма гелиосферы, расстояние от Земли до Солнца и Луны, период вращения Земли, химический состав атмосферы и температура поверхности нашей планеты, ее магнитное поле и состав океанов. Первичная биосфера выживала не в райском дарвиновском пруду, а скорее в адских испарениях перегретых соединений серы. Более подробно вопрос физических условий в ранней Солнечной системе и на Земле рассмотрен в работах [1, 2]. Современные модели происхождения жизни обсуждаются в работах [3–6].

Однако есть факторы, сопровождавшие биосферу на протяжении всей ее истории. А именно – излучение Солнца во всех диапазонах и космические лучи, а также галактические факторы. Остро вопрос об уровне радиационного излучения стоит и при рассмотрении условий существования жизни на экзопланетах. Одним из самых существенных факторов, определяющих возможность развития жизни на Земле, планетах земной группы, спутниках планет-гигантов или экзопланет, является светимость материнской звезды и интенсивность радиационного излучения на поверхности планеты. Для Земли она определяется динамикой и магнитными полями Солнца, солнечными и галактическими космическими лучами. Для спутников газовых планет-гигантов к этим факторам присоединяется еще излучение ускоренных частиц основной планеты. Интенсивность солнечных и галактических космических лучей (СКЛ и ГКЛ соответственно) находится в противофазе, поэтому активность Солнца является определяющим фактором радиационной безопасности как древней, так и современной биосферы.

Солнце является основным источником энергии для биосферы. Лишь небольшая часть энергии поступает из недр Земли. Современная биосфера является активным геологическим фактором. Перерабатываемая живыми организмами энергия Солнца почти в 30 раз превышает энергию тектонических и вулканических процессов и практически равна всей тепловой энергии, посту-

Сокращения: СКЛ – солнечные космические лучи, ГКЛ – галактические космические лучи, ЭКГ – электрокардиограмма.

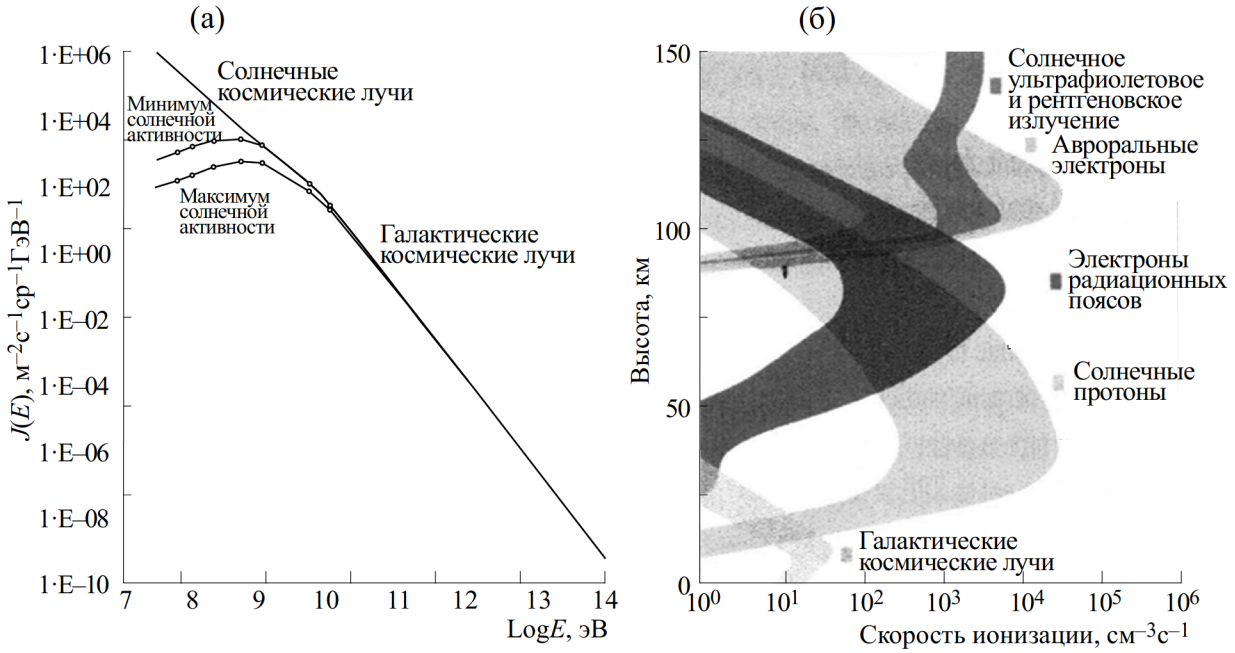


Рис. 1. Галактические и солнечные космические лучи, их энергия и высота проникновения. (а) – Энергетический спектр космических лучей по данным работы [7]. Приведен (в логарифмической шкале) совместный энергетический спектр протонов солнечных и галактических космических лучей в околоземном пространстве в минимуме и максимуме солнечной активности. Максимумы интенсивностей СКЛ и ГКЛ находятся в противофазе. Также рисунок наглядно демонстрирует, что интенсивность галактических космических лучей превышает интенсивность солнечных на много порядков. (б) – Распределение частиц в приповерхностных слоях Земли от 0 до 150 км после взаимодействия с магнитосферой и атмосферой нашей планеты. Приведен состав, высота проникновения и скорость ионизации космических лучей в атмосфере Земли по данным работы [8].

пающей из недр Земли. В отделе солнечно-земных связей ИЗМИРАН с 1998 г. идет ежедневный мониторинг биомедицинских параметров постоянной группы обследуемых, параметров обычной и космической погоды. С 2003 г. проводится разноширотный геомедицинский онлайн-мониторинг «Гелиомед». Описание методик и результатов проекта «Гелиомед» приведено в монографиях [1, 2, 29]. Также авторы статьи десять лет принимают участие в российской Программе Президиума РАН по происхождению жизни и астробиологии. Комплексный анализ результатов одновременных онлайн-мониторингов в различных городах от Якутска, Москвы, Саратова до Симферополя, Софии и Баку (в рамках российско-украинского проекта «Гелиомед» 2003–2018 гг.), а также анализ результатов мониторинга эталонных клеточных культур 2000–2012 гг. (Е.Н. Громозова, Киев, Украина) и динамики параметров космической погоды позволяет сделать вывод, что фиксируемые в настоящее время адаптационные реакции различных биосистем (от человеческого сообщества до колоний клеток) на изменения солнечной активности были заложены на самом раннем этапе формирования биосферы. Более того, формирование и развитие живых организмов происходило под активным влиянием супервспышечного излучения тусклого молодого Солнца и галактических космических лучей. Их проявление фиксируется даже в таких основополагающих для биосферы процессах, как фотосинтез (но практически не обсуждается в биологическом сообществе).

Все вышесказанное заставляет более внимательно рассмотреть роль молодого Солнца и космических лучей в становлении и развитии биосферы.

ГАЛАКТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, КОСМИЧЕСКИЕ ЛУЧИ И БИОСФЕРА

Мощным мутационным фактором, а также фактором, существенно модулирующим динамику биосферы, являются космические лучи. Их два вида: солнечные и галактические, соответственно и два источника: Солнце или галактическая среда. Первые имеют направление от Солнца в окружающее пространство и максимум интенсивности, соответствующий максимуму солнечной активности. Вторые направлены из галактического пространства внутрь Солнечной системы и имеют максимум интенсивности в минимуме солнечной активности. На рис. 1а приведен совместный энергетический спектр протонов солнечных и га-

лактических космических лучей в околоземном пространстве в логарифмической шкале [7]. Видно, что галактические космические лучи обладают на много порядков большей интенсивностью, и только магнитное поле Солнца, создающее гелиосферу, позволяет защищать поверхность внутренних планет Солнечной системы от их губительного излучения. В качестве второго защитного рубежа биосферы Земли выступают магнитное поле и атмосфера нашей планеты. Распределение частиц в атмосфере Земли приведено на рис. 1б [8].

Галактические космические лучи задействованы в живых процессах на всех стадиях и масштабах существования Галактики: от производства органических соединений в галактических облаках [9–11] и до процессов деления клеток в современных биологических структурах. Интенсивность доходящих до Земли галактических космических лучей зависит от вариаций параметров межзвездной среды за пределами Солнечной системы, от распределения магнитных полей на Солнце, формы гелиосферы, формы магнитосферы и состава атмосферы, которые существенно менялись в истории Солнца и Земли [12]. Увеличение интенсивности солнечных вспышек, величины магнитных полей раннего Солнца и более высокая скорость вращения Солнца могло приводить к понижению уровня ГКЛ в Солнечной системе, на планетах земного типа и у поверхности Земли.

Однако существуют и обратные процессы, увеличивающие интенсивность ГКЛ. Это сжатие гелиосферы во время прохождения Солнечной системой рукавов Галактики [13] или в процессе эволюционных изменений конфигурации магнитных полей Солнца [14]. В настоящий момент приблизительный средний размер гелиосферы определяется значениями около 100 а.е. (1 а.е. – расстояние от Земли до Солнца). В процессе эволюции Солнца это расстояние могло изменяться от нескольких астрономических единиц до нескольких сотен астрономических единиц, влияя на интенсивность ГКЛ в Солнечной системе [2].

В качестве еще одного механизма изменения интенсивности ГКЛ при любой солнечной активности можно рассматривать вариации параметров межзвездной среды. В настоящее время Солнце находится в каверне Местной галактической сверхоболочки в теплом разреженном звездном газе, но недалеко от границы с горячим газом. Межзвездный газ в ближайшей окрестности гелиосферы имеет температуру около 8000 K, плотность – несколько десятых долей частицы в кубическом сантиметре, степень ионизации примерно 50%. Горячий газ звездных ветров и взрывов сверхновых звезд обтекает и колеблет галактическую оболочку вокруг Солнца, однако не успевает ее разрушить. По данным о распределении межзвездных облаков по размерам и плотности выяснилось возможное перемещение Солнца по межзвездным облакам с высокой плотностью больше 100 частиц на кубический сантиметр примерно 130 раз за 4.5 млрд лет [2]. Примерно 16 раз за время своего существования наша звезда перемещалась по облакам с очень высокой плотностью – больше 1000 частиц на кубический сантиметр. В таких условиях резко возрастает образование аномальной субрелятивистской компоненты галактических космических лучей на двуслойной границе гелиосферы, а также возможность интенсивной бомбардировки внутренних планет космическими телами из облака Оорта. Каждая из этих ситуаций может ставить биосферу на грань существования. Сопоставление положения Солнца относительно рукавов Галактики с событиями на Земле приведено в работе [15].

На границе гелиосферы гасится до 90% интенсивности космических лучей, идущих извне. Однако и оставшегося количества сверхэнергичных ГКЛ хватает для весьма существенных изменений параметров межпланетного пространства в Солнечной системе и ситуации на поверхности самой Земли. Более того, интенсивность галактических космических лучей, доходящих до границ гелиосферы, существенно изменяется и в зависимости от места положения Солнца в Галактике. Она может возрастать почти на порядок во время прохождения нашей солнечной системой рукавов Галактики. За время существования биосферы эта ситуация могла возникать от 20 до 80 раз. Десятикратное увеличение плотности межзвездного газа на границе Солнечной системы вызывает сжатие гелиосферы на четверть и соответственно увеличение интенсивности космических лучей на орбите Земли до шести раз. Если учитывать, что в рукавах Галактики плотность межзвездного газа имеет именно такой порядок величины, то периодичность вымираний живых организмов на Земле – ~62 млн лет – вполне может объясняться усиленной бомбардировкой Земли космическими лучами из-за эффекта, описанного выше.

Также существенное влияние на биосферу оказывают такие общегалактические процессы, как вспышки сверхновых звезд. В работе [16] приводится соответствие между крупными вымираниями земной биоты и увеличениями потока излучения из-за вспышек сверхновых в относительной близости от Солнечной системы. Совокупность рассматриваемых солнечных и галактических факторов могла приводить к колебаниям уровня ГКЛ в эволюционно значимое для биосферы время от 25 до 600% от современного значения.

В ранних океанах верхние слои воды под градиентным воздействием космических лучей становились буквально инкубатором биоразнообразия живого мира нашей планеты. Да и сейчас до 15% ионизирующего излучения, воздействующего на биосферу, определяется вторичными космическими лучами. Первичные космические лучи до поверхности не доходят (как и ультрафиолетовое излучение). Сталкиваясь с молекулами атмосферы, они порождают вторичные космические лучи, вызывая так называемые атмосферные ливни. Также вследствие наличия у Земли собственного магнитного поля существует геомагнитный барьер, из-за которого интенсивность космических лучей зависит от широты: в районе полярного овала она максимальная, на полюсах – минимальная. В современных океанах максимум вторичного излучения космических лучей приходится на глубину 2–10 см от поверхности воды, а самые активные мюоны приникают на несколько километров земной поверхности (до 3–4 км в твердых породах, до 9 км – в воде). Более подробно физика космических лучей рассмотрена в работе [17]. Существует и еще один канал влияния космических лучей на оболочки Земли и биосферу. Вследствие понижения (повышения) потока космических лучей (ГКЛ и СКЛ) при их вторжении в атмосферу Земли происходит понижение (повышение) ионизации воздуха, Тем самым космические лучи могут активно воздействовать на состав и динамику атмосферы Земли, и в конечном счете на ее погоду, климат, состояние океанов и биосферы.

По совокупности изученных эффектов космические лучи можно считать одним из основных постоянно действующих биотропных агентов космической погоды. Образование новых химических связей между молекулами и разрывы молекул – важные реакции в полимерах, которые сильнее всего изменяют их физические свойства. Космические лучи оказывают существенное воздействие на эти процессы. В работе [18] впервые на экспериментальном материале показано значение возрастания потоков солнечных космических лучей, сопряженных с возрастанием нейтронной компоненты вторичных космических лучей у поверхности Земли, и вариаций галактических космических лучей для генетического материала клеточных систем. Авторы длительного мониторинга 2000–2012 гг. в работах [19, 20] также связывают изменение окраски дрожжевых культур *Saccharomyces cerevisiae* УКМ-517 и *Rhodococcus erytrhopolis* УКМ-741 с вариациями ГКЛ.

РАННЕЕ СОЛНЦЕ, ПАРАДОКС СЛАБОГО МОЛОДОГО СОЛНЦА И РАЗВИТИЕ БИОСФЕРЫ

Общая картина представлений о строении и эволюции звезд солнечного типа, самого Солнца и первых 0.5–1.0 млрд лет его существования строится на основе наблюдений за солнцеподобными звездами (программа «Солнце во времени»). Раннее Солнце резко отличается от сегодняшнего. Оно было более тусклым, но при этом – значительно более активным. Молодое Солнце имело период вращения 6–8 суток, массу – до 103%, активность – нестабильную и нерегулярную. Интенсивность вспышечных спорадических процессов излучения была в 100–1000 раз выше современной, особенно в гамма-излучении, рентгеновском, ультрафиолетовом и радиоизлучении [2, 21, 22]. Возможно, что установление упорядоченных циклов (существенно более коротких, чем сегодня) произошло не сразу, а около 2.0–2.5 млрд лет назад при периоде вращения 15 суток и солнечной активности в 5–10 раз выше современного максимального уровня [23]. Вспышки на раннем Солнце происходили гораздо чаще, длились дольше современных и достигали энергий на два порядка больших, чем сегодня. Из наблюдений за солнцеподобными звездами можно предположить, что частота вспышек могла быть в 20 раз, а длительность событий – в 500 раз больше современных значений. Это оценка относится и к потоку мощного коротковолнового рентгеновского и ультрафиолетового излучения. Молодое Солнце обеспечивало на несколько порядков более интенсивный солнечный ветер и поток солнечных космических лучей, усиленно бомбардировавших поверхность Земли и первые биологические системы [1, 2, 24].

Одновременно с высокой солнечной радиационной активностью для молодой биосферы существовала и другая проблема – недостаток солнечного излучения, особенно в видимом диапазоне спектра. К моменту возникновения первичной биосферы Земли (~4 млрд лет назад) светимость Солнца составляла примерно 75% от современной (рис. 2а из работы [24]). Несмотря на существенно более высокую вспышечную активность, молодое Солнце было тусклым, и его энергии было недостаточно для наличия больших объемов жидкой воды на поверхности Земли. Исходя из низкой светимости Солнца, первые 2.8 млрд лет планета должна была бы быть замерзшей. Можно придумать модели ранней биосферы Земли, зародившейся и существовавшей первые 2.0–2.5 млрд лет под ледяной коркой, однако исследования геологов показывают существование открытых океанов, а генетики утверждают, что первые белки функционировали при температурах не менее +60°C [25]. Есть и физический аргумент «про-

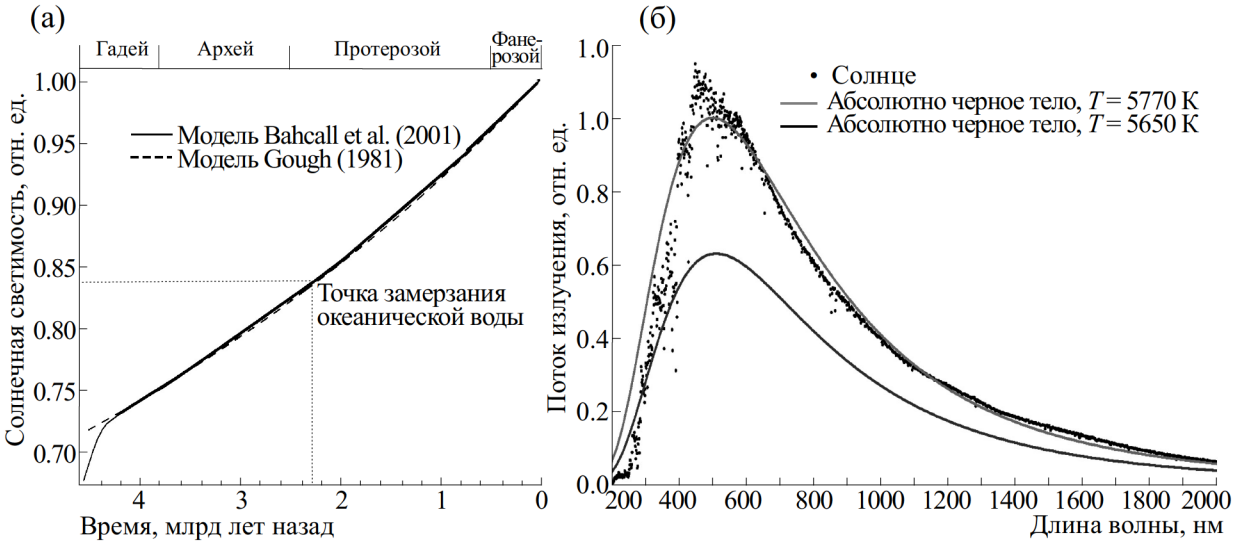


Рис. 2. (а) – Парадокс слабого молодого Солнца и эволюционное изменение светимости Солнца. Приведена болометрическая светимость Солнца за время его эволюции за последние 4,6 млрд лет по стандартной модели (сплошная линия) и в аппроксимации (пунктирная линия). По оси абсцисс – время, млрд лет, по оси ординат – изменение солнечной светимости относительно современности (современная светимость принята за единицу). Около значения 0. 85 (примерно 2.0–2.5 млрд лет назад) отмечена светимость Солнца, определяющая точку замерзания океанической воды при современном химическом составе океанов и атмосферы Земли [1]. Из графика следует, что первые 2.0–2.5 млрд лет Земля должна была бы быть замерзшей, однако геологические и палеонтологические данные показывают, что это не так. Уже 4 млрд лет назад на Земле были океаны жидкой воды. (б) – Спектральный состав излучения Солнца (точки) и абсолютно черного тела при эффективных температурах, соответствующих современному Солнцу. По оси ординат – поток излучения на земной орбите, нормированный таким образом, что максимум потока для абсолютно черного тела равен 1 (согласно работе [2]). Из графика видно, что смещение спектра излучения молодого Солнца было незначительным и не могло покрыть недостаток поступающей на Землю энергии из-за тусклости молодого Солнца.

тив»: если бы Земля действительно изначально представляла собой «снежный ком», альбедо планеты возросло бы примерно до 70% (современное значение альбедо – 30%). При таком высоком альбедо даже полуторакратное последующее увеличение светимости до современного уровня не позволило бы растопить Землю. И наша планета до сих пор оставалась бы в замороженном состоянии.

Между тем существование биосферы и жидкой воды зафиксировано около 3.8 млрд лет назад (оптимистичная оценка – 4 млрд лет назад), одновременно с зафиксированным началом развития жизни на Земле. На самом деле недостаток тепла является еще более существенным, так как по данным биологов и палеонтологов средняя температура на Земле в этот период была около +70°C (по самым скромным оценкам – не ниже +40°C) против современных +15°C. Таким образом, наблюдается явный парадокс, так называемый «парадокс слабого молодого Солнца». Он заключается в противоречии между палеоклиматическими данными и астрофизическими моделями эволюции Солнца и требует решения, например, за счет интенсивной потери массы Солнца, другого расстояния между Землей и Солнцем, высокой геотермальной активности на поверхности нашей планеты или другого состава атмосферы ранней Земли, обеспечивающего сильный парниковый эффект [26]. У всех этих моделей есть свои достоинства и недостатки, но ни одна из них в полной мере не решает парадокс. В то же время каждая из этих моделей предполагает разные условия для существования первичной биосферы. Похоже, что выбор наиболее оптимальной модели ранней Солнечной системы будут осуществлять биологи, а не физики. Подробно пути решения парадокса слабого молодого Солнца были рассмотрены в работах [1, 2, 24, 26, 27]. В этой работе обратим внимание на аспекты, которые могли оказаться существенными для развития биосферы.

При рассмотрении вопроса об условиях существования ранней биосферы Земли существенным может быть не только изменение солнечной светимости, но и изменение спектра солнечного излучения. При прохождении солнечного излучения сквозь современную земную атмосферу на рэлеевское рассеяние приходится примерно 30%. Из них треть излучается в космос, т. е. примерно 10% теряется. Так как интенсивность рассеяния падает с уменьшением частоты излучения, спектральный сдвиг излучения молодого Солнца в холодную сторону мог бы сэкономить несколько

процентов полученной Землей энергии, а также повлиять на выбор предпочтительных длин волн, поглощаемых бактериями.

Из стандартной модели Солнца следует эволюционное возрастание солнечной светимости за счет увеличения эффективной температуры Солнца и солнечного радиуса. Поэтому эффективная температура за 4.6 млрд лет выросла незначительно, от 5650 до 5770 K (рис. 2б). Это соответствует спектральному сдвигу примерно в 100 Å, что могло дать лишь небольшую экономию энергии ранней земной атмосферой в пределах 1.5%. Для нагрева поверхности ранней Земли до плюсовой температуры этой величины недостаточно. Однако даже слабый спектральный сдвиг мог повлиять на формирование способов переработки и накопление энергии живыми организмами, например на развитие фотосинтеза.

Для смягчения парадокса слабого молодого Солнца одним из авторов данной работы (Е.Г. Храмовой) была предложена гипотеза органических пленок (как предшественника развитой биосферы) на поверхности земного океана [2]. Наличие такой пленки нарушает газообмен между океаном и атмосферой и вносит изменения в теплообмен. Химический состав этой пленки мог быть весьма разнообразным. Пленка, находившаяся на границе раздела фаз, попадала под облучение интенсивным ультрафиолетовым светом молодого Солнца, которое хорошо пропускала бескислородная атмосфера. В результате фотодиссоциации должны были образовываться различные парниковые газы. В бескислородной атмосфере это в первую очередь метан, в меньших количествах – углекислый газ, возможно, также оксиды азота. В процессе насыщения кислородом непрозрачность атмосферы для ультрафиолетового облучения увеличивается, и фотолиз органической пленки уменьшается. При этом усиливается ее окисление, а выход продуктов разложения смещается в сторону углекислого газа. Следовательно, эта пленка могла быть постоянным донором парниковых газов.

Таким образом, приповерхностный слой ранних земных океанов с глобальной органической пленкой, который активно бомбардировался ультрафиолетовым светом, рентгеновскими и космическими лучами и обладал необходимым градиентом температуры и питательных веществ, мог стать удачным местом для формирования последующей развитой биосферы. Также в условиях тусклого молодого Солнца глобальная органическая пленка могла внести свой вклад в дополнительный нагрев поверхности Земли.

РАНЕЕ СОЛНЦЕ, ОРГАНИЧЕСКИЕ ПЛЕНКИ, ФОТОСИНТЕЗ И АДАПТАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРВЫХ ЖИВЫХ СИСТЕМ

По-видимому, отбор альтернативных технологий получения, переработки и накопления энергии первыми живыми организмами также существенно зависел от активности молодого Солнца. И не случайно развитие фотосинтеза произошло не сразу, а в тот момент, когда излучение Солнца стало более ярким и стабильным. Более того, при рассмотрении вопроса фотосинтеза возникает еще один парадокс, который имеет фундаментальное значение при рассмотрении эволюции биосферы и тоже может быть связан с глобальной океанской органической пленкой. Он заключается в несоответствии спектра поглощения хлорофилла спектру солнечного излучения. Именно на длинах волн максимальной интенсивности излучения как современного, так и раннего Солнца в спектре поглощения хлорофилла наблюдается провал в области зеленого цвета видимого излучения. Биологи связывают такую ситуацию с необходимостью защиты первых живых организмов от интенсивного излучения молодого Солнца. Однако в этом объяснении не выдерживают критики ни предположение об излишней интенсивности Солнца, ни предположение о защите именно от этой части спектра. Во-первых, как мы уже рассмотрели выше, излучение молодого Солнца было крайне тусклым и являлось ценным энергетическим ресурсом. Первые живые организмы должны были отчаянно конкурировать за него, а не закрываться от ценного и постоянного источника поступления энергии. Во-вторых, во время мощных и длительных вспышек (происходящих на раннем Солнце постоянно) максимальные скачки губительной для живых организмов интенсивности излучения наблюдались в диапазоне синего, ультрафиолетового и рентгеновского излучения (излучение возрастало от 10 до 1000 раз, увеличиваясь в более коротковолновой части спектра). В оптическом же максимуме видимого зеленого света интенсивность излучения изменялась незначительно, не более 5% [21]. Таким образом, сдвиг максимума поглощения хлорофиллов в область максимума нестабильности излучения Солнца явно не способствовал сохранению и защите организмов.

Отметим, что проблема несовпадения спектров лежит не в области биохимического синтеза. Существуют пигменты, которые поглощают в центральной области видимого спектра (например, из групп каротиноидов и фикобилинов). Спектр поглощения воды (фотосинтез зародился у организмов, живущих в воде) тоже не объясняет особенности спектра поглощения хлорофиллов.

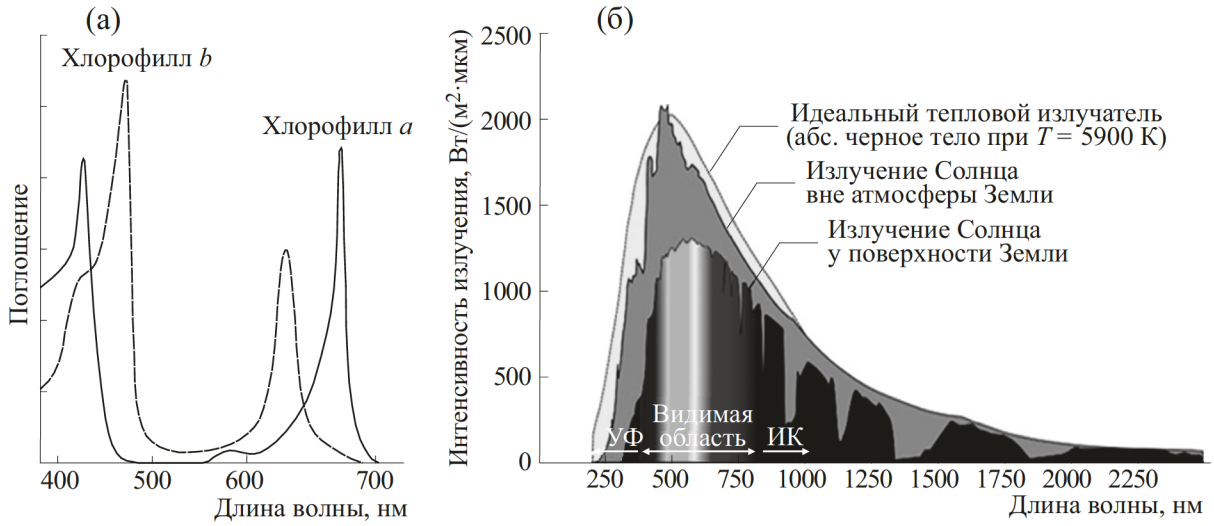


Рис. 3. Парадокс фотосинтеза. (а) – Спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b*. (б) – Сравнительные спектры излучения черного тела и Солнца вне атмосферы Земли и у поверхности Земли. Видно, что именно на длинах волн максимальной интенсивности излучения как современного, так и раннего Солнца в спектре поглощения хлорофилла наблюдается провал в области зеленого цвета видимого излучения. В условиях катастрофической нехватки энергии тусклого молодого Солнца на поверхности ранней Земли, отказ первых фотосинтезирующих организмов максимально использовать поступающее солнечное излучение в самом стабильном и интенсивном участке спектра является парадоксальным.

Таким образом, существует выраженный парадокс несоответствия спектров излучения Солнца и поглощения хлорофиллов физическим условиям на ранней Земле в решении задачи максимальной сохранности живых систем. Рассмотрим этот парадокс подробнее.

Фотосинтез – это преобразование энергии света в энергию химических связей органических соединений. Сравним спектр поглощения хлорофиллов *a* и *b* (основных хлорофиллов оксигенного фотосинтеза) со спектром солнечного излучения (рис. 3). В спектре поглощения хлорофиллы *a* и *b* имеют две интенсивные полосы поглощения в красной (640–700 нм) и синей (400–450 нм) областях видимой части спектра. Из рис. 3 очевидно, что максимумы поглощения хлорофиллов не совпадают с областью максимума солнечного спектра у поверхности Земли. Более того, именно в максимуме интенсивности как современного, так и раннего Солнца наблюдается провал. Возникает логичное предположение, что в момент формирования технологии фотосинтеза на поверхности Земли присутствовало что-то, что поглощало самое «вкусную», стабильную и легкодоступную часть солнечного излучения и перекрывало доступ к свету эволюционно новым формам бактерий. И это «что-то» эволюционно существовало еще до развития фотосинтеза, заняв самую выгодную экологическую нишу. В результате первым фотосинтезирующим организмам пришлось довольствоваться только доступным источником света, по краям спектра солнечного излучения.

Что в водной среде молодой Земли в период формирования фотосинтеза могло поглощать солнечное излучение в центральной части видимого спектра, оставляя окна прозрачности в красной и синей части? Самый простой ответ – появившаяся одновременно с возникновением океанов 4 млрд лет назад биогенная или абиогенная пленка, уже упоминавшаяся в качестве одного из возможных путей решения парадокса слабого молодого Солнца. К сожалению, на данный момент состав этой пленки неизвестен. К тому же этот состав скорее всего эволюционно менялся под воздействием окружающих факторов. Но существует хорошо изученный современный аналог той древней пленки – пленка нефтяная.

Спектры поглощения нефтяных пленок приведены на рис. 4а [28]. При уменьшении длины волны в диапазоне 300–600 нм оптическая плотность нефтяных пленок растет вне зависимости от сорта нефти. Для излучения свыше 600 нм нефтяная пленка толщиной в 1 мкм практически прозрачна. Это согласуется с максимумами поглощения хлорофиллов в красной области, но не объясняет максимум поглощения хлорофиллов в синей области спектра.

Для объяснения стоит вспомнить еще одно свойство органических пленок – флуоресценцию. Спектр флуоресценции нефтяной пленки имеет один выраженный максимум, который практически не зависит от длины волны облучающего ее ультрафиолета, а зависит от толщины и типа нефти, ее образующей (рис. 4б). При увели-

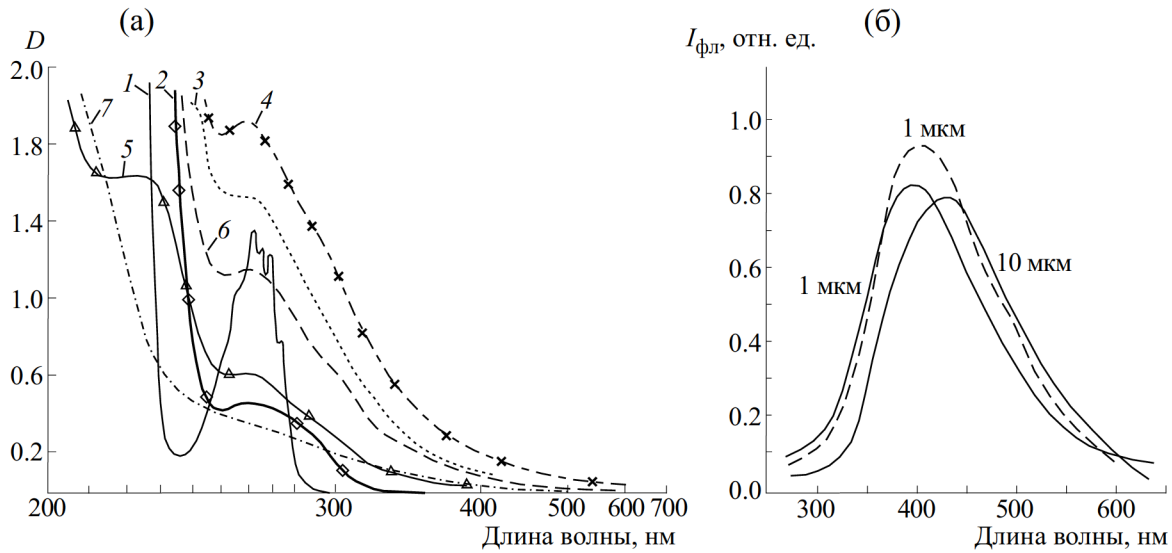


Рис. 4. Пути решения парадокса фотосинтеза: спектральные характеристики современных аналогов древних океанических пленок (согласно работе [28]). (а) – Зависимости оптической плотности от длины волны для нефтепродуктов: бензин (1), дизельное топливо (2), саратовская (3), грузинская (4), шаимская (5) и ливийская (6) нефти. Для бензина толщина кюветы 100 мкм, для остальных нефтепродуктов – 1 мкм. (б) – Спектры флуоресценции ливийской нефти (сплошные линии, толщина кюветы 1 и 10 мкм) и саратовской нефти (пунктирная линия, толщина кюветы 1 мкм) при длине волны возбуждающего излучения 308 нм. Видно, что для сырой нефти различных видов в состоянии пленки максимум флуоресценции расположен в области 420–490 нм при любой длине волны возбуждения, что практически совпадает с максимумами спектра поглощения хлорофиллов (максимум спектра поглощения хлорофиллов 400–450 нм). Можно предположить существование на ранней Земле океанической поверхностной пленки с функцией защиты от разрушительного воздействия жесткого ультрафиолета и рентгена, а также с функцией источника различной органики для находящихся ниже ее микроорганизмов. При этом аккумулированная пленкой энергия коротковолнового солнечного излучения передавалась через флуоресценцию в окружающую среду, причем на длинах волн, которые смогли использовать фотосинтезирующие организмы.

чении толщины пленки от 1 до 100 мкм максимум спектра сдвигается в сторону больших длин волн на 10–40 нм в зависимости от типа нефти [28].

Для сырой нефти различных видов в состоянии пленки максимум флуоресценции расположен в области 420–490 нм при любой длине волны возбуждения, что практически совпадает с максимумами спектра поглощения хлорофиллов (максимум спектра поглощения хлорофиллов 400–450 нм). Так, максимум флуоресценции пленки ливийской нефти толщиной 10 мкм находится в области примерно 430 нм, что соответствует синему максимуму поглощения хлорофилла *a*. К тому же под действием ультрафиолета в поверхностном слое нефтяных пленок происходят активные одновременные процессы разложения исходного материала и возникновения новой органики, например, ароматических соединений [29]. Они отличаются высокими показателями преломления и поглощения в близкой ультрафиолетовой и видимой областях спектра и могут служить сырьем для дальнейшего производства кетонов, альдегидов и кислот ароматического ряда, а также многих других органических веществ.

В результате существенной функцией древней океанической поверхностной пленки оказывается защита находящихся ниже ее микроорганизмов от разрушительного воздействия жесткого ультрафиолета и рентгена. Более того, океаническая пленка, активно разрушающаяся под действием ультрафиолетового излучения Солнца, служила ценным источником различных органических веществ. А вариации интенсивности ультрафиолетового излучения молодого Солнца (возрастающие во время вспышек на несколько порядков величины) обеспечивали биоразнообразие формирующихся живых организмов и биосистем. При этом аккумулированная энергия коротковолнового солнечного излучения передавалась через флуоресценцию в окружающую среду, причем на длинах волн, которые смогли использовать фотосинтезирующие организмы [30].

Таким образом, глобальная океаническая органическая пленка вполне могла объяснить особенности спектров поглощения хлорофиллов. Она же могла выступить в качестве защиты ранних микроорганизмов от рентгеновского излучения и жесткого ультрафиолетового излучения активного молодого Солнца и источника необходимых химических веществ. Сопоставление спектров поглощения и флуоресценции разных органических пленок, в том числе нефтяных, со спектрами поглощения хлорофиллов может по-

мочь существенно расширить и уточнить наши представления об эволюции климата и состава атмосферы молодой Земли. А учет наличия органической пленки как климатообразующего фактора может внести существенные коррективы как в решение парадокса слабого молодого Солнца, так и в современные климатические модели [27, 30].

Существуют и другие адаптационные стратегии живых систем, имеющие скорее всего не биологическую, а физическую природу, и сформировавшиеся в качестве защитной реакции на активное вспышечное излучение молодого Солнца и космические лучи [4]. Например, чрезвычайно велика роль интенсивного ультрафиолетового излучения молодого Солнца в формировании единого генетического кода земной биосферы. Формирующиеся биологические структуры и экологические системы должны были одновременно «уметь использовать» ультрафиолетовое излучение в качестве источника энергии, эффективно от него защищаться и проходить отбор на устойчивость к разрушительному воздействию излучения молодого Солнца. Благодаря мощному ультрафиолетовому излучению раннего Солнца в формирующейся биосфере одновременно происходили разные типы отбора: отбор стойких к ультрафиолетовому излучению азотистых оснований; отбор нуклеотидов в комплиментарные пары; отбор более длинных и устойчивых молекул РНК; отбор гомохиральных нуклеотидов (смесь изомеров менее устойчива к ультрафиолетовому излучению, чем изомеры с одинаковой хиральностью). В результате существующие молекулы ДНК являются максимально устойчивыми структурами к ультрафиолетовому излучению, хотя не являются единственно возможными. По-видимому, именно ультрафиолетовое излучение молодого Солнца провело отбор единого кода нашей биосферы.

Еще одной адаптационной стратегией могло являться «сбивание в кучу» и «скручивание». Первые земные биологические объекты вынуждены были приспосабливаться к жизни в условиях повышенного импульсного излучения молодого Солнца, а для этого пришлось «сбиваться в кучу» и образовывать структурированный кластер. Такая адаптационная стратегия повышала шансы для бактерий из центра образования остаться неповрежденными при проникающем внешнем излучении. Эти кластеры послужили прообразами клеток. До сих пор в нашей крови после интенсивных рентгеновских вспышек на Солнце красные кровяные тельца слипаются в кучу, повышая тем самым свертываемость крови [31]. Кластеризация колоний однотипных клеток и передача «сигнала опасности» также существенно повышала выживаемость. В кластеризированных колониях клеток условия существования во внутренней и наружной частях биообразования были различными. Различались по кластеру химический состав и условия внешней среды (по крайней мере в интенсивности внешних излучений и доступе к ресурсам).

Еще одна успешная адаптационная «стратегия» древних биологических структур в условиях импульсного агрессивного Солнца, имеющая чисто физическую природу, – это способность создавать конгломераты из различных видов биообъектов. Жизнеспособность таких образований существенно выше не только за счет эффективного совместного использования питательных ресурсов и температурных градиентов, но и за счет повышения радиационной устойчивости. Как показано в работах [2, 32], сообщества из различных видов бактерий выдерживают в 10–12 раз более интенсивное облучение, чем каждый из видов в отдельности.

Столь оптимистичные результаты по радиационной устойчивости живых организмов существенно расширяют зону поиска возможной внеземной жизни на Марсе, спутниках планет-гигантов внутри Солнечной системы и на экзопланетах [1, 2]. Астробиологи~~и~~ пытаются смоделировать типы биосфер, которые могли бы существовать в условиях пониженной светимости Солнца и повышенной радиации, одновременно решая задачу поиска возможной внеземной жизни и моделирования биосферы ранней Земли. Потенциально обитаемые спутники Юпитера и Сатурна подробнее рассмотрены в работе [33]. Из космических тел Солнечной системы именно атмосфера Титана считается максимально приближенной к атмосфере ранней Земли. В современных земных условиях организмы используют различные окислительно-восстановительные пары, основной из которых является $O_2 \rightarrow H_2O$ (аэробное дыхание). Но вполне можно подобрать такую пару, на которой может быть основана биосфера Титана. Например, $NH_4^+ \rightarrow N_2$; $NO_3^- \rightarrow N_2$, $CH_4 \rightarrow CO_2$ и обратная ей $CO_2 \rightarrow CH_4$, $SO_4^{2-} \rightarrow H_2S$ и множество других. В качестве источника углерода организмы могут использовать метанол, этанол, карбонаты (HCO_3^-, CO_3^{2-}), формиат ($HCOO^-$). Хемолитотрофные организмы могут быть основой биосферы, снабжая органическими соединениями гетеротрофов. В качестве возможных основ для внеземных биологических циклов особенно часто рассматривают такие процессы, как метаногенез и метанотрофия. Возможно, метанотрофы были одними из первичных организмов и нашей планеты Земля.

Открытие планеты земной группы (Проксимы b), вращающейся вокруг звезды Проксима Центавра, привело к множеству работ, обсуждающих возможные условия на этой планете. Поскольку в Солнечной системе основные факто-

ры, определяющие космическую погоду, – это солнечный ветер и космические лучи, представляется важным понять, каковы параметры звездного ветра, галактических и звездных космических лучей около экзопланет. На основе имеющихся данных в работе [34] были представлены оценки скорости и плотности звездного ветра, возможных потоков и флюенсов космических лучей около Проксимы b. Мощные и частые по сравнению с Солнцем вспышки на Проксиме Центавра могут ускорять частицы до максимальных энергий порядка 3150 ГэВ, поэтому интенсивность звездных космических лучей в астросфере экзопланет может оказаться сравнимой с интенсивностью низкоэнергичных космических лучей в гелиосфере. В таких условиях гипотетическая внеземная биосфера должна состоять из радиационно устойчивых организмов.

Таким образом, вопрос об активности молодого Солнца и интенсивности космических лучей в ранней Солнечной системе оказывается важным не только для моделирования биосферы ранней Земли, но и для рассмотрения астробиологических вопросов [35]. Последние данные космических миссий позволяют расширить поиск жизни на целый новый класс объектов. В него вошли ледяные спутники планет-гигантов и другие планетные тела, получающие мало энергии от материнской звезды из-за далекого от нее расположения, но благодаря приливному или радиационному разогреву имеющие подледные океаны, энергию и химические вещества для создания не совсем привычных вариантов биосферы.

СОВРЕМЕННАЯ БИОСФЕРА И ДРЕВНИЕ АДАПТАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

В Солнечной системе в первую сотню миллионов лет ее существования протопланеты находились в условиях жесткой конкуренции. Одни планеты и астероиды попадали в топку молодой звезды, другие выбрасывались за пределы планетной системы, третьи путешествовали по системе, увлекаемые более массивными планетами-гигантами. Внутренние области Солнечной системы были заполнены большим количеством газа, пыли и планетезималей. Молодые сформировавшиеся планеты подвергались активной бомбардировке космическими телами, на поверхности планет активно действовали вулканы [1, 4]. Все эти факторы дополнительно понижало количество и без того тусклого солнечного света, достигающего поверхности планет. Само Солнце приобрело схожие с современными особенности динамики и излучательных процессов только к 2.5–2.0 млрд лет назад. В таких условиях питание от солнечного света было крайне неэффективно и нерегулярно, поэтому первым живым организмам необходимо было осваивать другие источники энергии и способы их накопления.

Одними из первичных длительных хранилищ энергии в биообъектах ранней Земли являются полифосфаты – полимеры ортофосфорной кислоты, остатки которой соединены ангидридными полифосфатными связями. Эти пробиологические структуры до сих пор присутствуют, например, в клетках современных дрожжей (в виде волютиновых гранул) или в тромбоцитах человека и высших животных. Сложные органические вещества могли синтезироваться еще в молекулярных галактических облаках, причем при активном участии галактических космических лучей. Космические лучи могли оказывать существенное влияние и на формирование обменных процессов в первичной биосфере Земли в условиях нехватки излучения молодого Солнца.

Первичная биосфера недоступна для прямого изучения, но имеются аналоги древних биообъектов, содержащие волютиновые гранулы полифосфатов, которые дожили до наших дней. В работах [18–20, 36–41] рассматривался аспект воздействия ГКЛ на современные биосистемы. При длительных мониторингах зафиксированы вариации динамических показателей эталонных клеточных структур с волютиновыми гранулами, статистически значимо совпадающие именно с вариациями ГКЛ (мониторинг 2000–2013 гг., *Saccharomyces cerevisiae* Y-517, Е.Н. Громозова). Эволюционные адаптивные реакции, связанные с ГКЛ и СКЛ, особенно востребованы в минимуме цикла солнечной активности, длительных минимумах (подобных Маундеровскому), и при инверсиях геомагнитного поля. Влияние ГКЛ усиливается при длительных минимумах солнечной активности и инверсиях геомагнитного поля, СКЛ – при циклах солнечной активности высокой интенсивности [39].

Влияние солнечной активности и космогеофизических факторов на биосферу зафиксировано не только на клеточном уровне, но и на популяционном уровне. В 2003–2015 гг. одновременно в различных городах от Баку и Киева до Москвы и Якутска был проведен масштабный онлайн-мониторинг биомедицинских параметров постоянной группы обследуемых и параметров космической погоды. Общая база данных составила более трех миллионов измерений, собранных по единому протоколу и на идентичном оборудовании. В результате многолетнего мониторинга во всех городах были выявлены одновременные статистически значимые изменения биомедицинских параметров обследуемых, связанные с вариациями солнечной динамики, геомагнитного поля и космических лучей. Также рассматривалась связь здоровья обследуемых с вариациями параметров обычной погоды. Подробно технология междуна-

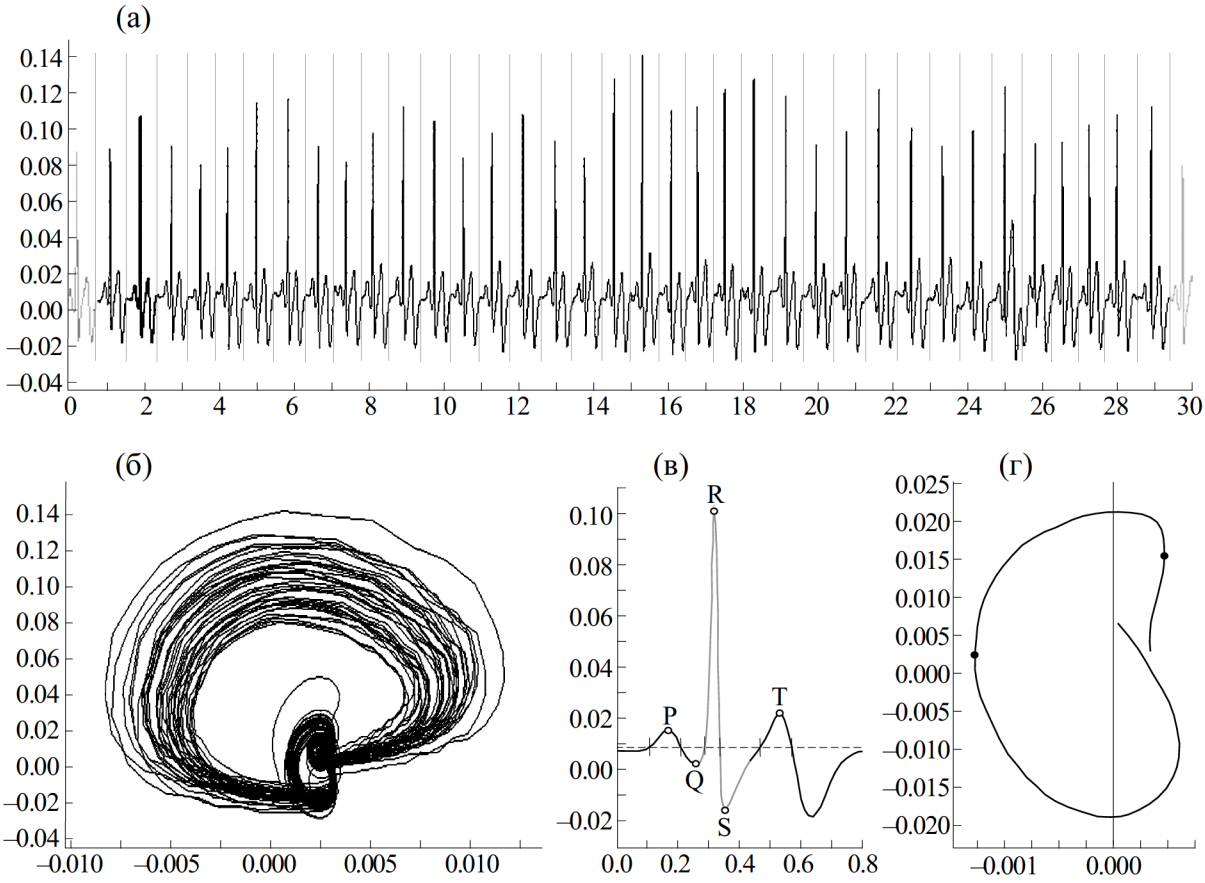


Рис. 5. Схема анализа кардиосигнала в фазовом пространстве: (а) – исходная ЭКГ; (б) – циклы ЭКГ и усреднение в фазовом пространстве; (в) – восстановленный эталонный кардиоцикл [1]; (г) – сегмент S–T в фазовом пространстве. Чем более северной является широта этнического происхождения обследуемых, тем короче в их ЭКГ длина S–T-сегмента и больше коэффициент симметрии Т-зубца. Поскольку в более высоких широтах амплитуда переменного геомагнитного поля увеличивается, найденные этнические изменения Т-зубца скорее всего являются проявлением эволюционных процессов адаптации, обусловленной динамикой Солнца, в масштабе всей популяции.

родного проекта «Гелиомед» и результаты многофакторного комплексного анализа данных изложены в работах [1, 36–40].

Одним из изучаемых параметров мониторинга был кардиосигнал первого отведения электрокардиограммы (ЭКГ) в состоянии покоя и после различных нагрузок, анализируемый в фазовом пространстве. Схема анализа сигнала в фазовом пространстве и построение эталонного кардиоцикла приведена на рис. 5 [38]. Было выявлено, что наиболее выраженно внешние нагрузки, связанные с вариациями космической и обычной погоды, проявляются вблизи особых точек около Q-зубца и S–T-сегмента. Также после вспышечных процессов на Солнце даже у здоровых людей наблюдался переход динамики сердца в более хаотический режим функционирования [37]. Статистически значимых изменений R–R-интервалов в зависимости от резких вариаций геомагнитного поля (так называемых «магнитных бурь») у здоровых людей выявлено не было.

Еще одним результатом мониторинга было выявление широтных и этнических особенностей ЭКГ, связанных с вариациями солнечной активности и космогеофизических факторов. Как оказалось, фазовый портрет кардиоцикла является уникальной характеристикой человека, подобной отпечаткам пальцев. При этом у близких родственников одного поколения фазовые портреты в покое различаются незначительно. Аналитическая программа различала их по измерениям, сделанным после интенсивной физической нагрузки. В результате мониторинга различных этнических групп, проведенных на медицинском факультете Российского университета дружбы народов (138 человек), выявлено, что исторически сформировавшиеся этнические группы в фазовом пространстве демонстрируют схожую совокупность признаков ЭКГ [40].

Дополнительный мониторинг пяти семей, насчитывающих в своем составе четыре поколения, выявил передачу характерных признаков фазово-

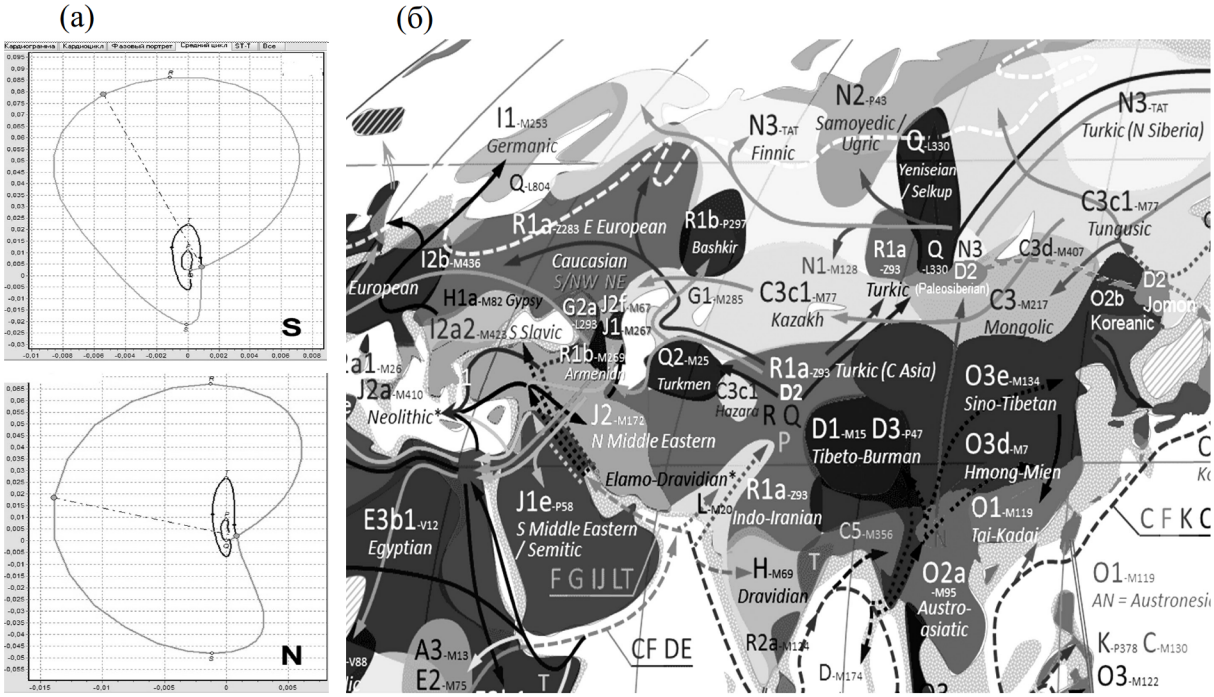


Рис. 6. (а) – Характерные фазовые портреты кардиоцикла «южно-русского» типа (S) и «северо-русского» типа (N); (б) – генетическая карта Евразии. Характерная сердечная динамика передается по наследству и является генетически детерминированной величиной. Она отражает эволюционную адаптацию человечества как биологического вида, а также этнические процессы исторического переселения и смешения народов.

го портрета ЭКГ по наследству, с попеременной сменой половой принадлежности наследника в каждом следующем поколении (мать – сын – внучка – правнук).

Обнаружено разделение ЭКГ по «южно-русскому» и «северо-русскому» типу. Выраженное разделение на «южно-индийский» и «северо-индийский» тип фазового портрета ЭКГ наблюдается у граждан различных районов Индии, приехавших в Москву на обучение. У студентов из других стран также фиксируются этнические отличия фазовых портретов ЭКГ. На рис. 6а приведены характерные фазовые портреты кардиоцикла «южно-русского» (S) и «северо-русского» типа (N). В ходе дальнейших исследований выявлено совпадение «южно-русского» и «северо-индийского» типов фазового портрета.

Для определения возможных причин неожиданных совпадений фазовых портретов кардиоцикла в различных этносах, разделенных многими тысячами километров, было проведено рассмотрение миграционных исторических потоков Евразии. Сравнение результатов мониторинга с генетической картой мира (рис. 6б), а также выборочные генетические анализы показали, что представители обнаруженного нами «южно-русского» и «северо-индийского» типа фазового портрета ЭКГ принадлежат к гаплогруппе R1a, а «северо-русского» – к гаплогруппе N3. Таким образом, показано, что характерная сердечная динамика передается по наследству и является генетически детерминированной величиной. Она отражает эволюционную адаптацию человечества как биологического вида, а также этнические процессы исторического переселения и смешения народов.

Характерные этнические совокупности признаков имеют выраженное широтное различие. Так, чем более северной является широта этнического происхождения обследуемых, тем короче в их ЭКГ длина S–T-сегмента и больше коэффициент симметрии Т-зубца. Такая динамика параметров сердечной деятельности характерна для более активного потребления кислорода миокардом. Поскольку в более высоких широтах амплитуда переменного геомагнитного поля увеличивается, найденные этнические изменения Т-зубца скорее всего являются проявлением эволюционных процессов адаптации, обусловленной динамикой Солнца, в масштабе всей популяции. Возможно, что существенную роль в зафиксированных реакциях играют волютиновые зерна, присутствующие в тромбоцитах человека [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе своего возникновения и развития биосфера постоянно находилась под воздействи-

ем солнечного излучения и космофизических факторов. Эти факторы оказывали существенное влияние на физические условия на ранней Земле, состав атмосферы и химический состав океанов, температуру поверхности. Как показали наблюдения за солнцеподобными звездами, эволюционная адаптация первых живых систем происходила в условиях пониженной светимости и повышенной радиационной опасности молодого Солнца. Вспышечная активность и интенсивность солнечного излучения была на два порядка выше современной, особенно в ультрафиолетовом и рентгеновском диапазоне. Формировавшиеся живые системы должны были не только противостоять, но и использовать космогеофизические факторы в своем развитии, например, в отборе единого кода ДНК. В условиях тусклого молодого Солнца одним из факторов, повышающих температуру поверхности планеты до геологически зафиксированных значений, могла стать глобальная океаническая органическая пленка. Наличие такой пленки также объясняет спектр поглощения хлорофилла, который не соответствует максимуму солнечного излучения. Пленка защищала находящихся ниже ее микроорганизмы от разрушительного воздействия жесткого ультрафиолетового и рентгеновского облучения. При этом аккумулированная энергия коротковолнового солнечного излучения передавалась через флуоресценцию в окружающую среду, причем на длинах волн, которые смогли использовать формирующиеся фотосинтезирующие организмы. Через 2.5–2.0 млрд лет Солнце вышло на близкий к современному режим циклической динамики, однако эволюционные адаптационные механизмы проявляются и в современных живых системах, от дрожжевых клеток до человека. Вопрос об активности молодого Солнца и интенсивности космических лучей в ранней Солнечной системе оказывается важным не только для моделирования биосферы ранней Земли, но и для рассмотрения астробиологических вопросов возможности существования жизни на спутниках планет-гигантов и экзопланетах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы 17 Президиума РАН «Эволюция органического мира и планетарных процессов» и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-52-06002-Аз_а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. В. Рагульская, *Солнце и биосфера: миллиарды лет вместе* (Радиотехника, М., 2019). URL: http://www.izmiran.ru/pub/izmiran/Ragulskaya-Sun-2019.pdf
2. Е. Г. Храмова, в кн. *Жизнь и Вселенная*, под ред. В. Н. Обридко и М. В. Рагульской (ООО «Изд-во ВВМ», СПб., 2017). URL: http://www.izmiran.ru/pub/izmiran/Life-n-Universe.pdf.
3. М. Никитин, *Происхождение жизни: от туманности до клетки* (Из-во АНФ, М., 2016)
4. М. В. Рагульская, Технологии живых систем **16** (5), 60 (2019).
5. В. А. Твердислов и Е. В. Малышко, Успехи физ. наук **189** (4), 375 (2019).
6. A. Y. Mulkidjan and M. Y. Galperin, Biol. Direct **4**, 27 (2009).
7. А. Б. Струминский, Дис. ... докт. ф.-м. н., М., 2011.
8. I. A. Mironova, et al., J. Atmospher. Solar-Terrestr. Phys. **149**, 146 (2016).
9. О. В. Кочина, Д. З. Вибе, С. В. Каленский и А. И. Васюнин, Астрон. журн. **90**, 892 (2013).
10. Th. Henning and D. Semenov, Chem. Rev. **113**, 9016 (2013).
11. K. I. Öberg, V. V. Guzmán, K. Furuya, et al., Nature **520**, 198 (2015).
12. D. Atri and A. Melot, Astroparticle Phys. **53**, 186 (2014).
13. K. Wyman and S. Redfield, Astrophys. J. **773**, A96 (2013).
14. Q. Pognan, C. Garraffo, O. Cohen, et al., Astrophys. J. **856**, 1 (2018).
15. N. J. Shaviv, New Astronomy **8**, 39 (2003).
16. H. Svensmark, Monthly Notices Roy. Astronom. Soc. **423** (2), 1234 (2012).
17. В. С. Мурзин, *Введение в физику космических лучей* (Изд-во МГУ, М., 1988).
18. N. K. Belisheva, H. Lammer, at al., Astrophys. Space Sci. Trans. **8**, 7 (2012). DOI: 10.5194/astra-8-7-2012
19. E. Gromozova, at al., Sun and Geosphere **7** (2), 117 (2012).
20. M. V. Ragul'skaya, E. A. Rudenchik, S. M. Chibisov, and E. N. Gromozova, Bul. Exp. Biol. Med. **159** (2), 269 (2015). DOI: 10.1007/s10517-015-2939-0
21. M. Güdel, Living Rev. Solar Phys. **4**, Art. nu. 3 (2007). DOI: 10.12942/lrsp-2007-3
22. В. Н. Обридко и Ю. А. Наговицин, Солнечная активность, цикличность и методы прогноза (ООО «Изд-во ВВМ», СПб., 2017).

23. V. V. Pipin, Monthly Notices Roy. Astron. Soc. **466** (3), 3007 (2017).
24. М. В. Рагульская, Земля и Вселенная, № 3, 91 (2017).
25. E. Gaucher, et al., Nature **451** (7179), 704 (2008).
26. C. Goldblatt and K. Zahnle, Nature **474**, E1 (2011). DOI: 10.1038/nature09961
27. V. Obridko, M. Ragulskaya, and E. Khramova, J. Atmospher. Solar-Terrestr. Phys. **197** (2020).
28. Т. Абд Дейдан, С. В. Пацаева, В. В. Фадеев и В. И. Южаков, Вестн. МГУ, сер. 3. Физика. Астрономия **35** (2), 51 (1994).
29. Т. С. Идрисов, М. А. Курбанов и У. А. Кулиева, Хим. безопасность **2** (2), 106 (2018).
30. E. Khramova, J. Atmospher. Solar-Terrestr. Phys. **197** (2020).
31. Ю. И. Гурфинкель, *Ишемическая болезнь сердца и солнечная активность* (Изд-во «Эльф-3», М., 2004).
32. V. S. Cheptsov, et al., Geosciences, № 8, 298 (2018).
33. M. Simakov, in *Origins: Genesis, Evolution and Diversity of Life*, Ed. by J. Seckbach (Kluwer, 2004), pp. 645–665.
34. А. М. Садовский, А. Б. Струминский и А. В. Белов, Письма в Астрономич. журн.: Астрономия и космическая астрофизика **44** (5), 347 (2018).
35. F. Westall, et al., Astrobiology **15**, 998 (2015).
36. В. В. Вишневский, М. В. Рагульская и С. Н. Самсонов, Технологии живых систем, № 4, 61 (2007).
37. М. В. Рагульская и В. В. Пипин, Динамика сложных систем, **1** (1), 17 (2010).
38. *Биотропное воздействие космической погоды*, под ред М. В. Рагульской (ООО «Изд-во ВВМ», СПб., 2010).
39. V. Obridko, M. Ragulskaya, E. Rudenchik, et al., Technologies Live Systems, **11** (3), 12 (2014).
40. С. М. Чибисов, Г. С. Катинас и М. В. Рагульская, *Биоритмы и космос: мониторинг космо-биосферных связей* (М., 2013)
41. М. В. Рагульская, В. Н. Обридко и Е. Г. Храмова, в сб. *Материалы VI Съезда биофизиков России*, (Сочи, 2019), сс. 367–368.

Galactic Factors, the Young Sun and Earth, and Biophysics of Living Systems

M.V. Ragulskaya, V.N. Obridko, and E.G. Khramova

Institute of Terrestrial Magnetism and Radio Wave Propagation, Russian Academy of Sciences, Kaluzhskoye shosse 4, Troitsk, Moscow, 108840 Russia

The factor of the radiation effects of the young Sun and galactic cosmic rays on physical conditions on the early Earth and is significantly underestimated while studying problems related to the origin and evolution of the biosphere. This paper reviews the dynamics of solar and galactic processes over 4.56 billion years of the existence of the solar system. These factors had a significant impact on the formation of adaptive technologies of living systems in ancient and modern times. The features of the biosphere development on the early Earth under a faint but more flash-active young Sun are considered. The radiation spectrum of the young Sun and the paradox of the mismatch between the solar radiation and the chlorophyll absorption spectrum are discussed. The ways of solving this paradox are proposed. The role of solar radiation when studying models of the Earth's early biosphere and hypothetical biospheres of the giant planets satellites and exoplanets is highlighted.

Keywords: cosmic rays, faint young Sun radiation, primary biosphere, life origin, photosynthesis, biophysics of living systems

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 818–823

ДИСКУССИИ

УДК 577.3

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ МОГУТ КАК ДОНОРЫ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ ПОДАВЛЯТЬ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ (ГИПОТЕЗА)

© 2020 г. А.Ф. Ванин

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

Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

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

Поступила в редакцию 06.04.2020 г.
После доработки 08.05.2020 г.
Принята к публикации 12.05.2020 г.

Аргументируется целесообразность проверки возможного противовирусного действия динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами как донорами катионов нитрозония (NO^+). Есть основание надеяться, что ингаляция дыхательных путей и легких человека при COVID-19 инфекции распыленными растворами динитрозильных комплексов железа с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином как донорами NO^+ может инициировать S-нитрозирование клеточных протеаз и тем самым подавить вирусную инфекцию.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, нитрозоний, S-нитрозирование, вирусные инфекции.

DOI: 10.31857/S0006302920040250

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В настоящее время установлено, что у всех представителей живого мира – животных и человека, растений и микроорганизмов – ферментативным путем непрерывно продуцируется простейшее соединение монооксид азота (или просто оксид азота, NO), функционирующее в живых организмах в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных метаболических и физиологических процессов [1–3]. Кроме того, как правило, при повышенных концентрациях (до 100 микромолей/кг веса животных) оксид азота выступает в качестве одного из основных эффекторов системы клеточного иммунитета.

Есть основание предполагать, что функционирование NO как аутокринного и особенно паракринного эффектора в организме животных и человека обеспечивается его включением в динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими (RS-) лигандами [4–6]. Эти комплексы, существующие в моноядерной и биядерной формах (М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ соответственно) и описываемые соответственно формулами $[(RS\text{-})_2Fe(NO)_2]$ и $[(RS\text{-})_2Fe_2(NO)_4]$, возникают в клетках и тканях животных, продуцирующих NO и полностью имитируют биологическую активность этого агента [5–8]. Говоря о последнем, представляется целесообразным говорить не только о нейтральных молекулах NO, а о системе их производных, ответственных за реализацию разнообразных метаболических и физиологических процессов, т.е. говорить о биологической системе оксида азота. Есть основание предполагать, что М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами выступают в живых организмах в качестве важнейшего компонента этой системы. Это предположение основывается на трех выборках экспериментальных данных, касающихся указанных комплексов. Первая – многочисленная выборка данных, о которой уже сказано выше, свидетельствующая о разнообразном биологическом действии синтезированных химическим путем (экзогенных) М- и Б-ДНКЖ, имитирующем биологическую активность системы эндогенного NO [5–8]. Вторая выборка – факты, свидетельствующие о том, что появляющийся в тканях животных оксид азота практически полностью включается в Б-ДНКЖ, обеспечивающих его стабилизацию и, оче-

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ – моноядерные динитрозильные комплексы железа, Б-ДНКЖ – биядерные динитрозильные комплексы железа.

видно, перенос NO к мишеням его биологического действия [9, 10]. Третья выборка данных демонстрирует способность обеих форм ДНКЖ инициировать превращение включающихся в эти комплексы нейтральных молекул NO в катионы нитрозония (NO^+) [11–13]. В результате динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, как доноры этих катионов, способны вызывать S-нитрозирование высоко- и низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, т.е. имитировать одно из важнейших проявлений биологической активности системы эндогенного NO – инициирование в живых организмах образование S-нитрозотиолов.

Следует отметить, что в отличие от моноядерной, парамагнитной формы ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характеризующейся сигналом электронного парамагнитного резонанса с $g_{ср}$ = 2.03 (так называемого сигнала 2.03), Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами диамагнитны, т.е. ЭПР-неактивны [14]. Тем не менее их наличие в тканях животных можно выявить путем обработки тканей как *in vivo*, так и *in vitro* производными дитиокарбамата (диэтилдитиокарбаматом или N-метил-D-глюкаминдитиокарбаматом), способными акцептировать из железо-динитрозильных ($[Fe(NO)_2]$) групп ДНКЖ их железо-мононитрозильные ($[Fe(NO)]$) фрагменты с образованием ЭПР-регистрируемых мононитрозильных комплексов железа с производными дитиокарбамата [9, 10].

ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и другая форма стабилизация NO в живых организмах – S-нитрозотиолы (общая формула – RS-NO) – взаимосвязаны, т.е. взаимоопределяют существование друг друга. Проявляется это в том, что как ДНКЖ могут возникать из RS-NO, так и последние могут появляться в живых организмах в результате высвобождения из динитрозильных комплексов катионов нитрозония, взаимодействие которых с тиолами приводит к образованию RS-NO [5, 6].

В соответствии с развиваемыми нашей группой представлениями о механизмах образования ДНКЖ при участии молекулярного NO или RS-NO, в обоих случаях эти механизмы определяются реакцией диспропорционирования NO или RS-NO, т.е. реакцией одноэлектронного взаимного окисления-восстановления этих агентов, реализующейся после связывания NO или RS-NO с ионами двухвалентного железа (по две молекулы на один ион железа), см. схемы 1 и 2:

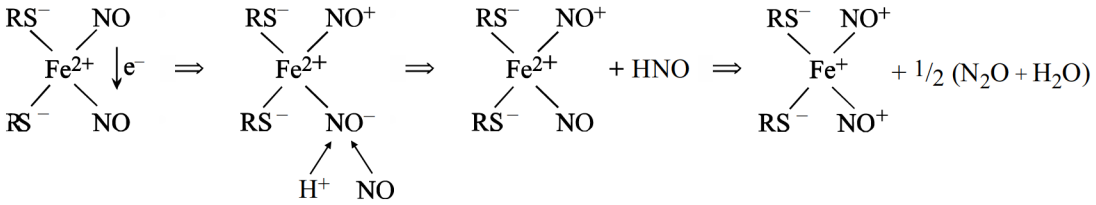


Схема 1. Предполагаемая схема образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции двухвалентного железа, тиолов и газообразного NO [4–6, 15–17].

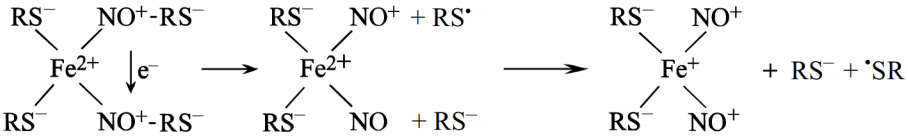


Схема 2. Предполагаемый механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции Fe^{2+}, тиолов и RS-NO [15–18].

Приведенные на схемах 1 и 2 механизмы образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами подробно рассматриваются в наших предыдущих публикациях [15–18]. Здесь же следует отметить, что в обоих случаях образуются одинаковые по своей электронной и пространственной структуре комплексы, характеризующиеся электронной конфигурацией железа d^7 с соответствующей резонансной структурой $[(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2]^+$.

Что касается биядерной формы ДНКЖ (Б-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами, показано, что она образуется при конденсации двух моноядерных форм этих комплексов [14] вне зависимости от способов синтеза последних при понижении содержания в растворе тиолсодержащих лигандов в соответствии со схемой обратимого взаимопревращения М- и Б-ДНКЖ (схема 3) и характеризуется соответственно резонансной структурой, аналогичной структуре М-ДНКЖ – $[(RS^-)_2Fe^+{}_2(NO^+)_4]^{+4}$:

$$\text{М-ДНКЖ} \underset{+\,RS^-}{\overset{-\,RS^-}{\Longleftrightarrow}} \text{Б-ДНКЖ}$$

Схема 3. Обратимое взаимопревращение М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [14].

Исходя из приведенной выше резонансной структуры М-ДНКЖ, химическое равновесие между этими комплексами и составляющими их компонентами может быть представлено в соответствии со схемой 4 как

$$[(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2 \Longleftrightarrow Fe^{2+} + NO + \underline{RS^- + NO^+} + RS^-$$
$$\text{RS-NO}$$

Схема 4. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и составляющими их компонентами [15–18].

Точно такие же компоненты этого набора составляющих М-ДНКЖ компонентов – Fe^{2+}, NO, RS-NO и тиолы (RS^-) могут высвобождаться из этих комплексов в зависимости от механизма их распада. Так, при распаде, вызванном удалением из М-ДНКЖ двухвалентного железа под действием соответствующих хелаторов железа, в раствор в свободном состоянии должны, очевидно, переходить молекулы NO и катионы нитрозония, гидролиз которых предотвращается их включением в RS-NO. Это предположение согласуется с результатами исследований нашей группы, касающихся взаимодействия ДНКЖ с производными дитиокарбамата, перехватывающими на себя из этих комплексов железо-мононитрозильные фрагменты [19]. С другой стороны, при распаде, вызванном удалением из комплексов молекул NO [20] в результате их включения в более стойкие нитрозильные комплексы гемового железа или в результате связывания молекул NO с анионами супероксида [21], в раствор в свободном состоянии должны, очевидно, переходить ионы Fe^{2+} и катионы нитрозония (точнее, RS-NO).

КАКИМ ОБРАЗОМ М- И Б-ДНКЖ С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ МОГУТ ПОДАВЛЯТЬ РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСОВ В ТКАНЯХ И КЛЕТКАХ ХОЗЯИНА

В 80–90-е годы сразу же после установления роли NO как одного из основных эффекторов системы клеточного иммунитета началось интенсивное изучение влияния этого агента и его доноров на развитие разнообразных инфекционных патологий, в том числе вирусного происхождения. К настоящему времени опубликованы сотни статей и множество обзоров, в которых было показано, что для большинства патологий, вызванных в организме животных и человека вирусной инфекцией, характерно резкое повышение в клетках и тканях хозяина уровня оксида азота (в основном в результате активации синтеза индуцибельной NO-синтазы – iNOS или NOS2), активных форм кислорода, а также резкое повышение концентрации разнообразных цитокинов [22–32]. К настоящему времени установлено, что именно повышение уровня NO подавляет в клетках хозяина репликацию вирусных РНК и ДНК, приводит к дезактивации важнейших вирусных белков, необходимых для воспроизведения вирусов, таких как вирусные протеазы, обратные транскриптазы, факторы транскрипции и др., причем эта дезактивация инициируется S-нитрозированием в этих белках функционально важных тиоловых групп. Аналогичный результат был получен в опытах с использованием экзогенных доноров NO – S-нитрозо-N-ацетилпенициллламина (SNAP), NONO-атов, нитропруссида натрия и даже нитроглицерина.

Не исключено, что при некоторых вирусных инфекциях S-нитрозирование не вирусных белков, а белков хозяина, например, его протеиназ, может подавлять начальную стадию инфекции. Последнее может иметь место при вирусных инфекциях, при которых контакт и последующее слияние вирусов и клеток хозяина могут реализоваться при участии соответствующих белков хозяина.

В 2006 г. была опубликована работа [33], в которой показано, что М-ДНКЖ с цистеином сам по себе и в особенности присоединенный к цистеиновому остатку тетрапептида Leu-Ser-Tre-Cis, избирательно связывающегося с протеазой 2A Coxsackie-B-вируса, полностью подавляет активность этого фермента. Это ингибирование, наблюдавшееся в экспериментах как на изолированной протеазе А, так и на включенной в клеточные культуры, было обусловлено S-нитрозированием одной из тиоловых групп этого фермента и было полностью обратимым. При обработке S-нитрозированной протеазы 2A дитиотреитолом, перехватывающим на свои тиоловые группы катионы нитрозония, входившие в состав белковых S-нитрозотиолов, активность протеазы А полностью восстанавливалась. Аналогичным

образом М-ДНКЖ с цистеином сам по себе инициировал S-нитрозирование внутриклеточной каспазы 3.

Отмечается, что S-нитрозирование протеазы 2А в тканях миокарда мышей существенно ослабляло вирусную инфекцию [34].

Как предполагают авторы работы [33], способность М-ДНКЖ с цистеином вызывать S-нитрозирование протеазы 2А была обусловлена существованием обоих нитрозильных лигандов в железо-динитрозильных группах этих комплексов в форме катионов нитрозония, которые и инициировали образование S-нитрозотиолов в составе протеазы 2А и каспазы 3. Такое предположение справедливо лишь отчасти. В соответствии с результатами наших исследований ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами эти комплексы могут выступать не только в качестве доноров катионов нитрозония, обеспечивающих S-нитрозирование тиолов, но и в качестве доноров нейтральных молекул NO, причем, как правило, эти молекулы высвобождаются из ДНКЖ в количестве, примерно равным количеству высвобождающихся катионов нитрозония [5–8, 15–18]. Этот феномен обеспечивается переносом электрона с атома железа на один из нитрозильных лигандов в резонансной структуре М-ДНКЖ – $[(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2]^+$ – и переходом ее в структуру $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO^+)(NO)]^+$.

Каким же образом может осуществляться S-нитрозирование вирусных белков, появляющихся в клетках хозяина при вирусной инфекции, при включении в эти клетки низкомолекулярных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, одни из которых – М-ДНКЖ с цистеином – были использованы авторами работы [33]? Результаты многих исследований поведения низкомолекулярных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при их введении в белоксодержащие растворы, в клеточные культуры или в организм животных показывают, что в этих системах происходит быстрый перенос железо-динитрозильных групп из этих комплексов на тиоловые группы белков с образованием белковых ДНКЖ. Эти комплексы могут содержать не только два тиолсодержащих (белковых) лиганда – два цистеиновых остатка, – но и включать в себя в качестве тиолсодержащего лиганда только один из из этих остатков, тогда как в качестве второго – азотсодержащего лиганда – в белковые ДНКЖ могут включаться, например, остатки гистидина [35, 36]. Тем не менее и одного остатка цистеина может оказаться достаточно для S-нитрозирования этого белка. Каким же образом будет осуществляться это превращение – переход, например, вирусной протеазы – белка, содержавшего связанный с ним ДНКЖ, в белок с S-нитрозированными остатками цистеина?

Как уже указывалось в предыдущем разделе, S-нитрозирование тиолов, вызванное высвобождением из ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами катионов нитрозония, может обеспечиваться распадом этих комплексов либо в результате удаления железа из этих комплексов под действием соответствующих хелаторов железа, либо в результате связывания с анионом супероксида половины нитрозильных лигандов, представленных в ДНКЖ в форме нейтральных молекул. Такого рода распад белковых ДНКЖ может происходить естественным путем в клетках, инфицированных вирусами, без добавления экзогенных хелаторов железа или доноров супероксидных радикалов. Во-первых, в условиях интенсивной репликации вирусов в клетках хозяина возникает необходимость доставки в эти клетки железа, что может достигаться производством эндогенных хелаторов железа, способных разрушать белковые ДНКЖ. Во-вторых, анионы супероксида в клетках хозяина могут возникать как реакция на воспалительные процессы, вызванные вирусной инфекцией. Кроме того, супероксидные радикалы могут возникать в результате окисления кислородом ионов двухвалентного железа, высвобождающихся из ДНКЖ по механизму положительной обратной связи (по «взрывному» механизму).

Есть основание предполагать, что использование низкомолекулярных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при лечении коронавирусной инфекции может дать наибольший положительной эффект при ингаляции распыленных (пропущенных через небулайзер) водных растворов ДНКЖ. Наибольший эффект, естественно, ожидается от такого рода комплексов, наиболее эффективно проникаюших в клетки эпителия тканей дыхательного пути и легкого. В качестве таких комплексов можно рекомендовать ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином, сравнительно легко проникающие внутрь клеток [13].

В заключение следует отметить, что использование газообразного NO, а также агентов, высвобождающих NO – S-нитрозотиолов или NONOатов, – может приводить к образованию в эпителиальных клетках и клетках легкого, пораженных корановирусами, образование (в соответствии со схемами 1 и 2 при участии слабосвязанного внутриклеточного железа и эндогенных тиолов) сначала ДНКЖ с низкомолекулярными тиолсодержащими лигандами (в первую очередь, с глутатионом), а затем с белковыми тиолами. После этого механизм S-нитрозирования вирусных белков может осуществляться по описанному выше механизму.

Таким образом ДНКЖ с тиолсодержащими как доноры катионов нитрозония, способных инициировать S-нитрозирование вирусных бел-

ков и белков хозяина, могут подавлять вирусную инфекцию как на ее начальной стадии, так и на стадии внутриклеточной репликации вирусов. Что касается блокады вирусной инфекции нейтральными молекулами NO, высвобождающимися из ДНКЖ при действии на них, например, хелаторов железа, то в отличие от катионов NO^+, слабо влияющих на клетки хозяина [22–32], молекулы NO, превращаясь в реакции с супероксидом в весьма токсичный пероксинитрит, могут оказывать токсическое действие на клетки хозяина, причем более эффективно, чем на патогенные вирусы [37–45].

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность д-ру С. Яковенко за предоставление технической помощи, без которой в условиях карантина по COVID-19 написание этой статьи было бы невозможно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного Задания Министерства образования и науки для научных организаций (00008202014-0001б № АААА-А17-117040610310-б, 0082-2014-0008 и № АААА-А17-1170403100008-5), спонсирована Российским академическим проектом «5-100», а также финансирована в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-04-00059а.

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. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide: Biology and Pharmacology* (Academic Press, San Diego, 2000).
2. P. Domingos, A. M. Prado, A.Wong, et al., Mol. Plant **8**, 506 (2015).
3. A. M. Stem, J. Zhu, Appl. Microbiol. **87**, 187 (2014).
4. A. F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. **54**, 15 (2016).
5. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form"of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
6. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: физхимия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Ижевск, 2015).
7. A. F. Vanin, The Open Conf. Proc. J. **4**, 23 (2013).
8. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys. **76**, 3 (2018).
9. А. Ф. Ванин, В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина и др., Биофизика **60**, 735 (2015).
10. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **62**, 1 (2017).
11. A. F. Vanin, Austin J. Analyt. Pharmac. Chem. **5** (4), 1109 (2018).
12. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys. **77**, 279 (2019).
13. А. Ф. Ванин, Биофизика **65**, 421 (2020).
14. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **23**, 136 (2010).
15. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, Nitric Oxide Biol. Chem. **1**, 191 (1997).
16. A. F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. **21**, 1 (2009).
17. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, Biophys. J. **14**, 818 (2011).
18. A. F. Vanin, A. A. Papina, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **10**, 60 (2004).
19. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **29**, 4 (2013).
20. N. A. Sanina, L. A. Syrtsova, N. I. Shkondina, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **16**, 181 (2007).
21. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **18**, 37 (2008).
22. J. B. Mannick, K. Asano, and K. Izumi, Cell **79**, 1137 (1994).
23. D. G. Karupiah and N. Harris, J. Exp. Med. **181**, 2172 (1995).
24. J. MacMicking, A-W. Xie, and C. Nathan, Annu. Rev. Immunol. **15**, 323 (1995).
25. C. S. Reiss and T. Kamatsu, J. Virolog. **72**, 4547 (1998).
26. S. P. Sanders, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **220**, 123 (1999).
27. G. F. Rimmelzwaan, M. M. J. W. Baars, P. deLuster, et al., J. Virulog. **73**, 8880 (1999).
28. C. Tafalla, A. Figneras, and B. Novos, Veterinar. Immunol. Immunopathol. **72**, 249 (1999).
29. T. Akaike and H. Maeda, Immunol. **101**, 300 (2000).
30. M. S. Finkel, Circulation **102**, 2162 (2000).
31. E. Keyaerts, L. Vijgen, L. Chen, et al., Int. J. Infect. Dis. **8**, 223 (2004).
32. M. S. Abdul-Cader, A. Amarasingh, M. R. Abdul-Careem, et al., Arch. Virol. **161**, 2075 (2016).
33. C. Badorff, B. Fichtlscherer, A. Muelsch, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **6**, 305 (2002).
34. C. Badorff, B. Fichtlscherer, R. E. Rhoads, et al., Circulation **102**, 162 (2000).
35. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **2**, 224 (1998).
36. D. R. Truzzi, S. V. Alves, L. E. S. Netto, and O. Augusto, Antioxidants **9**, 276 (2020).
37. G. Karupiah, J-H. Chen, S. Mahalingam, et al., J. Exp. Med. **188**, 1541 (1999).

38. P. Koka, K. He, J.A. Zack, et al., J. Exp. Med. **182**, 941 (1995).
39. T. Akaike, Y. Noguchi, S. Ijiri, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 244 (1996).
40. S. Mihm, A. Fayyzi, and G. Ramadori, Hepatology **26**, 451 (1997).
41. P. L. Majano, M. J. Borque, and R. Moren-Otero, J. Clin. Invest. **101**, 1343 (1998).
42. C-F. Lin, H-Y. Lei, A-L. Shian, et al., J. Immunol. **169**, 657 (2002).
43. X. Lim, M. Janas, and S. Dasguptas J. Biol. Chem. **273**, 39312 (2002).
44. K. Machida, K. T-H. Cheng, V. M-H. Sun, et al., J. Virol. **78**, 8835 (2004).
45. M.-M. Wang, M. Lu, C-L. Zhang, et al., Mol. Med. Rep. $_{18}$, 1867 (2018). DOI: 10.3892/mmr.2018.9089

Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Donors of Nitrosonium Cations Suppress Viral Infections (Hypothesis)

A.F. Vanin

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

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

The importance of exploration of the possible antiviral action of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as donors of nitrosonium cations (NO^+) has been discussed throughout the paper. Evidence suggests that inhalation of nebulized dinitrosyl iron complexes with glutathione or N-acetyl-L-cysteine as NO^+ donors in a person infected with a virus such as COVID-19 might initiate S-nitrosation of cellular proteases, thereby suppressing viral infection.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, nitrosonium, S-nitrosation, viral infections

БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 4, с. 824–832

ДИСКУССИИ

УДК 577.11, 577.22

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ S-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2 КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА АНТИТЕЛОЗАВИСИМОГО УСИЛЕНИЯ ИНФЕКЦИИ И ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА

© 2020 г. Ю.Д. Нечипуренко*, А.А. Анашкина*, О.В. Матвеева, *****

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

***Сендай Виралитикс (Sendai Viralytics), Актон, Массачусетс, США*

****Биополимер Дизайн (Biopolymer Design), Актон, Массачусетс, США*

E-mail: nech99@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2020 г.
После доработки 28.05.2020 г.
Принята к публикации 05.06.2020 г.

Предложена гипотеза о том, что цитокиновый шторм, возникающий как осложнение у больных COVID-19, является следствием феномена антителозависимого усиления инфекции, а сам феномен в свою очередь обусловлен изменением доминантных антигенных детерминант в шиповидном S-белке вируса SARS-CoV-2. Антителозависимое усиление инфекции – это явление, при котором связывание вируса с субоптимальными антителами, которые не являются нейтрализующими, индуцирует проникновение вируса в клетки иммунной системы, что приводит к их массовой гибели. Явление антителозависимого усиления инфекции показано для ряда коронавирусов. Усиление инфекции в этих случаях может быть спровоцировано изменением антигенных детерминант S-белка. Такое изменение может приводить, согласно нашей гипотезе, к уменьшению прочности связывания нейтрализующих антител с вирусом, превращая их в субоптимальные – не нейтрализующие. Изменчивость линейных и/или конформационных антигенных детерминант S-белка может реализоваться за счет смены конформации и вариабельности ряда аминокислот в этом белке. Эта вариабельность является следствием генетического разнообразия квазивидов. Подобная изменчивость может вызывать не только структурные изменения в S-белке, но и влиять на динамику смены его конформаций. Все эти явления могут происходить в процессе вирусной инфекции SARS-CoV-2 и объяснять тяжелое течении болезни у некоторых зараженных.

Ключевые слова: COVID-19, коронавирус, SARS-CoV-2, антителозависимое усиление инфекции, АЗУИ, ADE, шиповидный белок, S-белок, смена конформаций, антигенные детерминанты, смена эпитопов.

DOI: 10.31857/S0006302920040262

Вирусы SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 атакуют клетки, несущие рецептор ACE2, и вызывают их заражение. Для вируса SARS-CoV-1, который изучается с 2002 г. (он вызывает болезнь SARS с высокой летальностью), известен еще один феномен – он может проникать в клетки иммунной системы и провоцировать антителозависимое усиление вирусной инфекции (англ.: antibody dependent enhancement – ADE) [1–4]. Это явление описано для разных вирусов [5]. Чаще всего оно наблюдается у вирусов с геномом, представленным (+)-цепью РНК [6], в том числе и у коронавирусов [1, 2, 7–9].

Сокращения: ADE – антителозависимое усиление инфекции (antibody dependent enhancement), RBD – рецептор-связывающий домен (receptor binding domen). .

АНТИТЕЛОЗАВИСИМОЕ УСИЛЕНИЕ ИНФЕКЦИИ

На рис. 1 представлена схема, иллюстрирующая явление ADE. Специфические антитела (IgG) при ADE формируют несовершенные, недостаточно прочные комплексы с вирусом, помогая ему заражать лейкоциты хозяина, несущие рецептор FcγRII [6, 8, 10–13]. Комплекс антитела с вирусом связывается с FcγRII-рецептором лейкоцитов и поглощается этими клетками. В норме этот процесс приводит к разрушению вируса внутри лейкоцита и выздоровлению, как показано в левой части рис. 1. Однако при патологии вирус, освободившись от антитела, начинает репликативный цикл внутри лейкоцита, как показано в правой части рисунка [1, 2, 7–13].

SARS-CoV-2 (по предварительным данным, которые пока не прошли верификации) способен

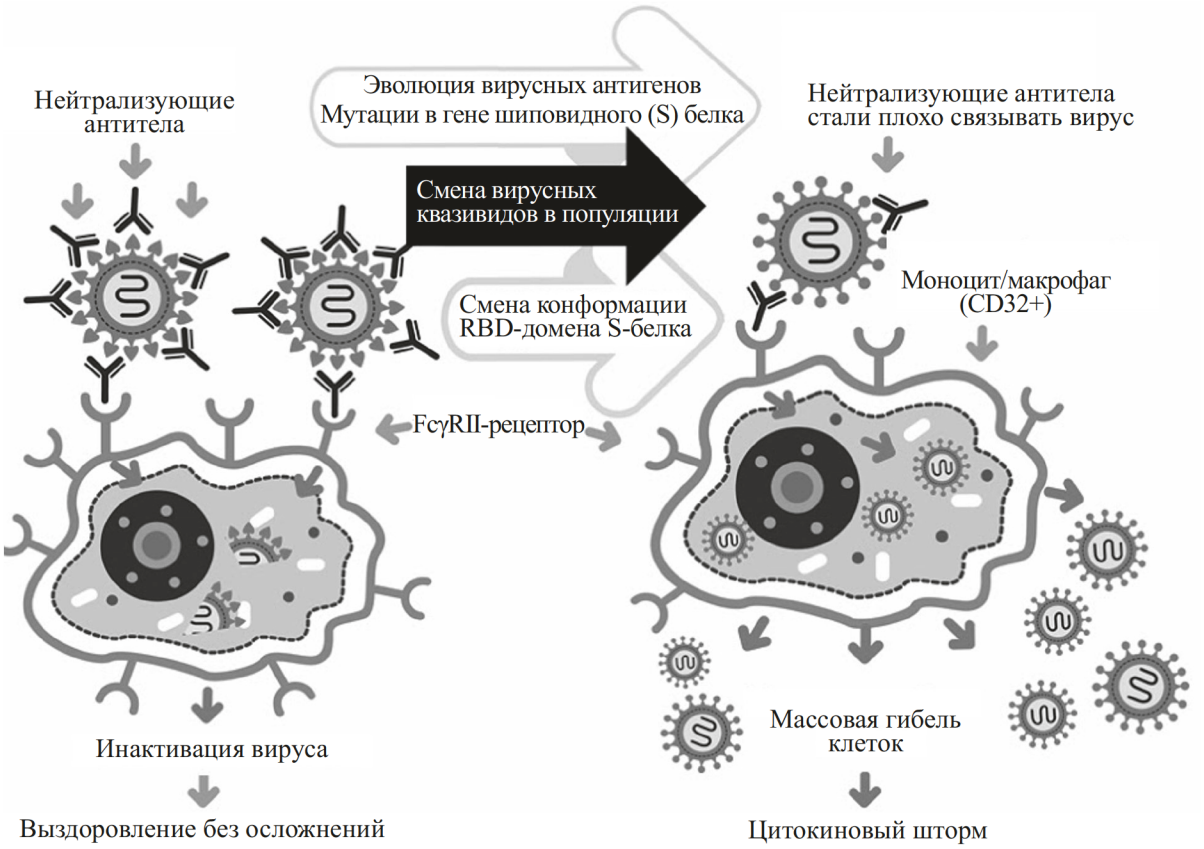


Рис. 1. Схема антитело-зависимого усиления инфекции для SARS-CoV. Слева показан сценарий «правильного» иммунного ответа на бета-коронавирус, когда нейтрализующие антитела способствуют элиминации вируса из организма. Справа представлен сценарий иммунопатологии, которая возникает при изменении антигена коронавирусов. Антитело-зависимое усиление инфекции наблюдается, когда специфические антитела (IgG) формируют несовершенные комплексы с вирусом. Комплекс антитела с вирусом связывается с FcγRII-рецептором лейкоцитов и поглощается ими. Далее внутри лейкоцита вирус выходит из эндосомы уже без антитела и начинает репликативный цикл. Можно предположить, что SARS-CoV-2 тоже вызывает ADE и делает это по сходному механизму. Возможно, что смена аминокислоты в 614-й позиции шиповидного (S) белка отвечает за смену конформации этого белка и в конечном счете за ADE.

напрямую проникать в Т-лимфоциты за счет шиповидного (S) белка и скорее всего способен убивать эти клетки [14]. Однако возможно, что кроме этого процесса, по аналогии с SARS-CoV-1 [1–4], этот вирус за счет комплексообразования с антителами способен инфицировать несущие рецептор FcγRII лейкоциты CD32+ (такие как моноциты и макрофаги). Этот процесс описан для разных бета-коронавирусов [1, 2, 7–11] и может приводить к массовой гибели иммунных клеток и, как следствие этой гибели, вызывать цитокиновый шторм.

Некоторые категории лейкоцитов обладают рецептором FcγRII, и благодаря этому связывают и поглощают комплекс «антитело–вирус» [15]. Нейтрализующие антитела связывают вирус прочно, вирус внутри лейкоцита не может освободиться после поглощения комплекса и подвергается разрушению протеазами и РНКазами. Таким образом, комплекс вируса с нейтрализующими антителами приводит к элиминации вируса из организма, а комплекс с субоптимальными не нейтрализующими антителами может приводить размножению вируса в клетках иммунной системы, усилению инфекции и цитокиновому шторму. Функциональная классификация антител, где включена категория антител, вызывающих ADE, предложена в работах [12, 16].

Ключевую роль в патологическом воспалительном процессе, возникающем у пациентов с COVID-19, по мнению некоторых исследователей, играют моноциты и макрофаги [17]. Эти наблюдения можно объяснить, если предположить, что вирус при тяжелом течении COVID-19 приобретает за счет ADE способность инфицировать эти клетки иммунной системы. Насколько вероятен для SARS-CoV-2 процесс ADE? Патогенез заболеваний SARS и COVID-19, по мнению многих авторов (см., например, работы [3, 18]), связана с ADE, проявляющемся в инфекции макрофагов и

моноцитов. Эта инфекция является важным этапом в развитии болезни и ее эволюции от легкой формы до тяжелой с критическими симптомами. ADE может объяснить наблюдаемое нарушение регуляции иммунитета, включая апоптоз иммунных клеток, способствующий развитию Т-клеточной лимфопении, воспалительный каскад с накоплением макрофагов, цитокинов и хемокинов в легких, а также цитокиновый шторм у некоторых пациентов [19].

Механизм ADE был изучен на примере меняющихся иммунодоминантных антигенных детерминант связывающего рецептор домена шиповидного (S) белка бета-коронавирусов [2, 9].

ХАРАКТЕРИСТИКИ ШИПОВИДНЫХ БЕЛКОВ SARS-CoV-1 И SARS-CoV-2

У коронавирусов в их «короне» располагается шиповидный белок (S-белок). В этом белке есть рецепторсвязывающий домен (RBD), который отвечает за связывание одного и того же мембранного клеточного рецептора ACE2 для обоих вирусов и также является «входной дверью» в клетку [20]. RBD-домен высокогомологичен у SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 [20].

S-белок может претерпевать в процессе своего созревания и функционирования ряд существенных трансформаций, которые выражаются в конформационных изменениях. Эти изменения у разных коронавирусов стали предметом изучения, которое продолжается уже более десяти лет. Превращения белка во время клеточного цикла вируса, включающего протеолитическое расщепление участка между S1 и S2 субъединицами S-белка, образование комплекса RBD с рецептором клетки, «протыкание» мембраны клетки эпителия при помощи пептида слияния (fusion peptide) и, наконец, проникновение вируса в клетку при слиянии мембраны вируса и мембраны клетки довольно подробно описаны в серии работ [21–24]. Нас будут интересовать только некоторые этапы функционирования S-белка у SARS-CoV-2, а именно протеолитический процессинг, связывание с рецептором, а также связывание с антителами, которые могут быть подобны участку рецептора. Эти этапы подробно описаны в работах [25, 26].

S-белок вируса SARS-CoV-2 функционирует в виде тримера, он состоит из трех одинаковых молекул, которые кодируются одним и тем же геном. Каждая из таких молекул распадается на две субъединицы S1 и S2 [26]. Субъединица S1 может находиться в двух конформациях – открытой и закрытой: RBD-домен может быть поднят или опущен. В работе [27] показано, что RBD-домен S-белка вируса SARS-CoV-2 большую часть времени находится в закрытом состоянии. Такая форма белка является слабо иммуногенной. При приближении к рецептору ACE2 домен RBD поднимается и связывается с ним, причем связывание это характеризуется более высокой константой, чем для RBD-домена S-белка вируса SARS-CoV-1. Как считается в работе [27], для вируса SARS-CoV-1 более характерна открытая конформация RBD-домена, а для SARS-CoV-2 – закрытая.

Таким образом, одна из субъединиц шиповидного белка способна к значительным конформационным перестройкам и может существовать по меньшей мере в двух конформационных состояниях (см. рис. 2). Заметим, что биофизическое исследование S-белка SARS-CoV-2 и анализ его структуры с разрешением в 3.5 Å показали, что наиболее часто встречается белок, у которого две из трех S1-субъединиц тримера находятся в закрытой конформации, а одна – в открытой [26], в то время как для SARS-CoV-1 ранее было показано, что чаще всего встречается белок, у которого две субъединицы тримера находятся в открытой конформации [28]. Если все три цепи эквивалентны, возможны четыре разных конформации тримера (если хотя бы одна из цепей отличается от других, таких конформаций может быть восемь). Также в работе [27] было показано, что для активации S-белка вируса SARS-CoV-2 нужно расщепление протеазой фурин в сайте разрезания, расположенном между субъединицами S1 и S2. Расщепление может стабилизировать открытую конформацию [27]. Если не все три цепи будут расщеплены, то появляется еще одна возможность для разнообразия конформаций тримера. Однако разнообразие конформаций может не отражаться в разнообразии антигенных детерминант. Не исключено, что разницу в степени прочности связывания с антителами обуславливают только две конформации S1 субъединицы одной молекулы S-белка, а именно открытая и закрытая.

ГИПОТЕЗЫ О ВЗАИМОСВЯЗИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВИРУСА И ПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Возможная связь между сменой конформаций в S-белке и антителозависимым усилением инфекции. Мы предполагаем, что антитела, выработанные на вариант вируса SARS-CoV-2 с одной конформацией шиповидного (S) белка, могут утратить свойство нейтрализовать инфекцию при смене конформации этого белка и, как следствие, вызывать ADE. Такие антитела, как было показано для вируса SARS-CoV-1 [8], могут по-прежнему связываться с вирусом, но при этом иметь меньшую аффинность и образовывать менее стабильные комплексы, чем те, которые они образуют с S-белком в другой конформации. В результа-

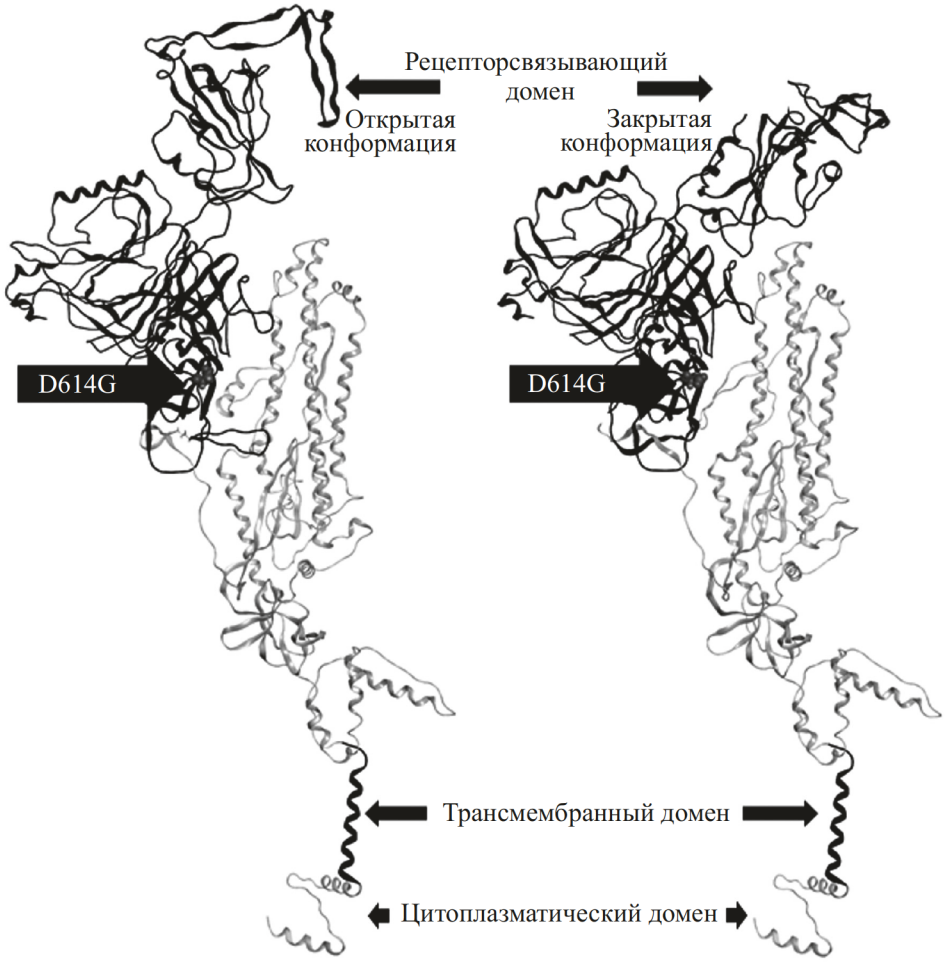


Рис. 2. Субъединицы S-белка в двух конформациях. Каждая молекула белка состоит из двух субъединиц – S1 и S2. Слева показана открытая конформация с поднятым рецепторсвязывающим доменом. Справа показана закрытая конформация с опущенным рецепторсвязываюшим доменом; стрелкой указано положение 614-й аминокислоты. Верхняя часть белка у вируса торчит наружу вириона и составляет вместе с другими S1-субъединицами из тримера S-белка характерный шип – зубец короны вируса.

те комплекс «антитело–вирус» у SARS-CoV-1 может выступать в качестве «троянского коня», помогая вирусу проникнуть в моноциты или макрофаги хозяина и запустить в этих клетках инфекционный процесс [1, 8].

Замены аминокислот в районе RBD-домена способны вызывать конформационные изменения S-белка у коронавируса SARS-CoV-1, приводящие к худшему связывания рецептора [29]. Мы предполагаем, что такого рода замены могут приводить у SARS-CoV-2 к ухудшению связыванию как рецептора, так и антител – и, как следствие, вызывать ADE.

ADE описано в недавно опубликованной работе для RBD-домена шиповидного (S) белка MERS-CoV [9]. Результаты этой работы свидетельствуют о том, что моноклональные нейтрализующие антитела, специфичные к RBD-домену, опосредуют проникновение вируса в иммунные клетки, функционально имитируя вирусспецифические рецепторы. Авторы считают, что антитела, направленные против других участков шиповидного (S) белка и не связанные с его конформационными изменениями, с меньшей вероятностью будут приводить к ADE. Также показана важность дозировки антител, так как степень ADE зависит от их концентрации.

По-видимому, должен существовать определенный диапазон констант или энергий связывания, в области которого может возникать ADE. Если связывание между антителами и вирионом достаточно прочное, вирус не сможет «выскользнуть» внутри лейкоцита и будет уничтожен. Если связывание слишком слабое, то антитело не сможет провести вирус в лейкоцит. ADE возникает, если связывание достаточно прочное, чтобы провести вирус в лейкоцит, но недостаточно прочное, чтобы лейкоцит мог его уничтожить. Заме-

тим, что функционально похожие шиповидные белки существуют и у других вирусов, в частности, у вируса ВИЧ есть тример Env, который, подобно S-белку коронавируса, состоит из двух субъединиц [30, 31]. Интересно, что описание их конформационных изменений не всегда производится посредством выделения отдельных стадий или состояний белка, порой пишут о «переходных» состояниях и конформационной динамике, которая как раз является решающей в узнавании шиповидного белка рецептором или антителом [32]. Поверхностная часть белка Env ВИЧ подобна субъединице S1 шиповидного белка короновируса. В процессе развития инфекции ВИЧ эта часть шипа мутирует и меняет тропизм – становится способной связываться с разными рецепторами иммунных клеток, что позволяет вирусу ВИЧ их заражать. Примеры изучения шиповидных белков других вирусов, которое ведется уже на протяжении десятилетий, может помочь понять структуру и динамику конформационных превращений S-белка SARS-CoV-2 [30, 31].

Антигенные детерминанты S-белка изменяются при смене одной его конформации на другую [27]. Не исключено, что нейтрализующие антитела хозяина, выработанные на S-белок в одной конформации, могут в этом случае утрачивать аффинность к вирусу в другой конформации и начинать образовывать с ним менее совершенные и нестабильные комплексы. Мы предполагаем, что это может приводить к ADE. Есть данные в пользу того, что только вирус в открытой конформации (с открытым RBD-доменом) в основном провоцирует выработку нейтрализующих антител [27]. В этой же работе высказывается предположение, что для вируса SARS-CoV-2 более характерна закрытая конформация S-белка, в то время как вирусу SARS-CoV-1 свойственна открытая конформация. В то же время стоит отметить, что реальное внутриклеточное распределение закрытых и открытых конформаций S-белков SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 требует дальнейшего изучения.

Если вирус с открытой формой S-белка быстро элиминируется антителами, то вирус с закрытой формой хуже связывается с антителами, но, согласно нашей гипотезе, может провоцировать ADE, вызывая инфекцию моноцитов, макрофагов и дендритных клеток.

Возможная взаимосвязь между заменой аминокислоты D614G и антителозависимым усилением инфекции. Предполагается, что иммунодоминантные эпитопы в шиповидном (S) белке вируса SARS-CoV-2 формируют аминокислоты в последовательности белка с координатами от 441 до 700 [33]. За переключение антигенной детерминанты с одного типа на другой в шиповидном белке может быть ответственна аминокислота в позиции 614 S-белка. В разных изолятах SARS-CoV-2 часто наблюдаются замены в этой позиции: с аспарагиновой кислоты на глицин и наоборот (D614G) [34]. На рис. 2 мы указали положение 614-й аминокислоты в трехмерной модели шиповидного (S) белка (см. также работу [26]). Следует заметить, что аспарагиновая кислота находится здесь на границе участков бета-структуры и левой спирали типа полипролин II (согласно классификации вторичных структур белков, построенной в работах [35, 36]). Хотя эта аминокислота находится на некотором расстоянии от домена RBD, можно предположить, что ее замена приведет к изменению общей конформации S-белка и смене антигенных детерминант (как это наблюдается в аллостерических белках) или к изменению динамики белка в целом.

На вариабельность аминокислоты D614G в S-белке и ее возможную взаимосвязь с патогенезом COVID-19 обратили внимание исследователи из Лос Аламоса [34]. В работе [34] эти авторы выдвигают две гипотезы. Согласно первой D614G затрагивает иммуногенный эпитоп вируса. Таким образом, замена может придавать коронавирусу устойчивость против приобретенного иммунитета, помогая ускользнуть от нейтрализующих антител и уменьшить прочность комплекса антитело-вирус. Вторая гипотеза предполагает, что мутация затрагивает другой эпитоп, вовлеченный в ADE. В этом случае D614G модулирует ADE [34]. Наше предположение больше согласуется со второй гипотезой вышеупомянутых авторов и добавляет шаг в их логическом построении гипотетической взаимосвязи между заменой аминокислоты и биологическими последствиями для здоровья больных. Исследователи из Лос Аламоса предлагают следующую взаимосвязь: смена D614G→ ADE. Мы можем добавить к этому предположению следующее: смена D614G→ изменение конформационной структуры и динамики S-белка→ ADE.

Не исключено, что такого рода замена аминокислоты с одной на другую может приводить к улучшенному или, наоборот, затрудненному доступу протеаз к участкам протеолитического процессирования S-белка. Некоторые исследователи полагают, что эффективное разрезание фурином между S1- и S2-субъединицами может способствовать преобладанию открытой конформации S-белка [27]. Таким образом, модулируя доступ протеазы, аминокислота в определенной позиции S-белка может способствовать преобладанию в равновесии открытой или закрытой конформации.

Квазивиды могут обеспечивать адаптивное генетическое разнообразие вирусных вариантов и его антигенных детерминант, помогающее уходить от иммунонадзора. При заражении нового хозяина реально происходит инфекция не одним вариан-

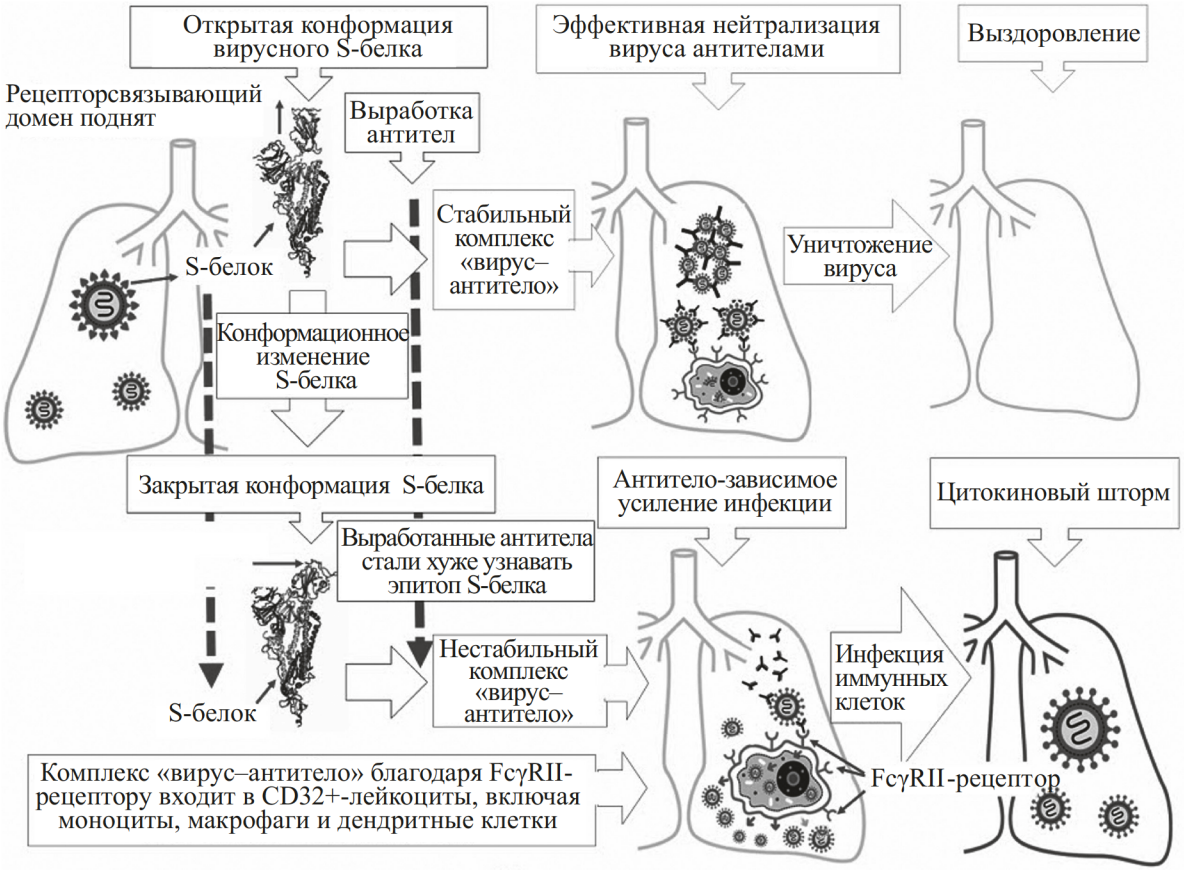


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая гипотезу о взаимосвязи молекулярных характеристик S-белка и патофизиологии заболевания COVID-19

том вируса, а целой популяцией генетически близкородственных вариантов, возникающих в результате мутаций в ходе репликации вируса в организме предыдущих хозяев [37]. Такая популяция получила название квазивида. Концепция квазивидов по отношению к вирусным вариантам очень важна, поскольку она помогает понять, что для ускользания от иммунитета нового вирусного хозяина за счет смены антигенных детерминант вирусу вовсе не обязательно приобретать новые мутации, он может воспользоваться уже существующими, которые произошли при репликации у предыдущих хозяев. Например, некоторые варианты вирусных квазивидов могут иметь преимущественно открытую конформацию S-белка и легко нейтрализоваться антителами нового хозяина, а другие варианты вируса с закрытой конформацией и худшей аффинностью к антителам могут получить эволюционное преимущество после неполноценной нейтрализации и инфекции иммунных клеток.

Возможное объяснение более частого протекания тяжелой формы заболевания у пожилых людей. С феноменом ADE связано несколько гипотез, объясняющих протекание заболевания в более тяжелой форме при COVID-19 у пожилых людей. Не исключено, что с возрастом происходит иммуностарение. В результате этого явления выработка антител у пожилых идет медленнее, чем у молодых. К тому времени, когда антитела выработались в нужном для нейтрализации вируса титре к вирусу с открытой конформацией S-белка, вирус с закрытой конформацией S-белка может дать о себе знать. При этом он может составлять только малую часть вирусной нагрузки при начальном заражении. Однако нейтрализующие антитела к открытой конформации S-белка, достигнув высокой концентрации, начнут находить этот вирус с закрытой конформацией S-белка и образовывать с ним нестабильные комплексы. При этом они могут «затаскивать» вирус в моноциты или макрофаги, где вирус будет способен реплицироваться. Этот процесс может сопровождаться генерализованным развитием инфекции и цитокиновым штормом [38, 39].

В пользу такой гипотезы говорит тот факт, что количество IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, обнаруженных в сыворотке 29 госпитализированных и протестированных пациентов, линейно коррелировало с возрастом больных, и чем

выше был титр таких антител, тем тяжелее протекала болезнь [40, 41]. Кроме того, обнаружена положительная и значимая корреляция между количеством антител в крови и концентрацией маркера воспаления цитореактивного белка С [41].

Гипотеза о взаимосвязи между антигенным дрейфом и антителозависимым усилением инфекции. Не исключено, что ADE может быть обусловлено антигенным дрейфом, происходящим за счет мутаций кодирующего S-белок гена [19, 42], которые могут приводить к изменению как конформационных, так и линейных антигенных детерминант. Тщательный анализ изменчивости аминокислот в разных белках вируса SARS-CoV-2 в массиве данных, состоящем из нескольких тысяч последовательностей, был проведен в работе [19]. Была обнаружена взаимосвязь между вариабельностью аминокислот и их пространственным расположением на поверхностных антигенных детерминантах вируса. Более доступная для антител часть молекулы S-белка, а именно S1-субъединица, включающая RBD-домен, имеет большее количество вариабельных амнокислот [19, 43], в то время как белки, скрытые внутри вирусной капсиды, или белки, не попадающие в вирусную капсиду, состоят из более консервативных аминокислот [19]. Авторы работы [19] объясняют эту изменчивость антигенным дрейфом. Вирус меняет аминокислоты, чтобы изменить антигенные эпитопы и ускользнуть от нейтрализующих антител хозяев. Такой процесс ускользания, как уже было сказано выше, может сопровождаться ADE.

Не исключено, что на вариабельность антигенных детерминант и на способность менять антигенные детерминанты влияет гликозилирование аминокислотных остатков, которое происходит в S-белке SARS-CoV-2. У этого белка обнаружены 22 сайта гликозилирования [25]. Идея о том, что вирус использует вариабельные аминокислоты, конформационные изменения S-белка и гликановую защиту для ускользания антител не нова (см. работы [19, 25]). Мы добавляем к этой идее то, что одним из следствий ускользания от антител может являться ADE.

Согласно предлагаемой гипотезе нейтрализующие антитела, выработанные на одну из «открытых форм» S-белка, могут способствовать ADE при встрече с закрытой конформацией. Каково соотношение между полностью открытой, полностью закрытой и промежуточными конформациями S-белка в организме инфицируемого? Этот вопрос изучен недостаточно хорошо. Не исключено, что некоторые аминокислоты за счет антигенного дрейфа, меняясь в определенных позициях S-белка, как говорилось выше, могут сдвигать равновесие таким образом, что полностью открытая конформация будет становиться термодинамически более выгодной и преобладать. Из литературы мы знаем, что в геном вируса SARS-CoV-1 могут быть внесены мутации, которые стабилизируют определенную конформацию S-белка [28]. Не исключено, что возможен и противоположный сценарий, а именно: некоторые аминокислоты за счет антигенного дрейфа, меняясь в определенных позициях S-белка, могут сдвигать равновесие, делая закрытую конформацию S-белка термодинамически более выгодной и преобладающей. Каждая такая замена будет приводить к сменам антигенных детерминант, за которым может следовать ADE.

Скорее всего вирус с преобладающей закрытой конформацией S-белка будет являться мало инфекционным для своих традиционных клеток-мишеней за счет низкого сродства к рецептору ACE2. Однако можно предположить, что такой вирус может стать более инфекционным по отношению к иммунным клеткам.

ВЫВОД ДЛЯ ДИЗАЙНА ВАКЦИНЫ

Если наша гипотеза о том, что вариации антигенных детерминант S-белка вируса SARS-CoV-2 могут вызывать антителозависимое усиление инфекции и, как следствие, тяжелое течение болезни COVID-19 верна, то она может быть полезна для дизайна противовирусной вакцины. Не исключено, что вакцина, нацеленная на вирусы с открытой формой S-белка, также может провоцировать ADE при появлении в организме человека вируса с закрытой формой этого белка. Закрытая форма может появиться в результате естественной инфекции вариантами вируса, у которого эта форма может быть стабилизирована генетически. Именно такую вакцину, нацеленную исключительно на открытую форму S-белка, испытывает компания «Модерна» (Moderna Inc., Кембридж, США) и многие другие разработчики вакцин (см. [19]).

Мы полагаем, что такая вакцина, как и другие вакцины, нацеленные на S1-субъединицу шиповидного белка, могут провоцировать ADE. Это явление с большей вероятностью может проявиться при встрече провакцинированного вирусом или генетическим конструктом, экспрессирующим S-белок с преобладающей открытой формой, с реальной инфекцией вирусом, у которого преобладает закрытая конформация S-белка. Если наша гипотеза верна, то для общего решения проблемы очень важно, чтобы вакцина не была нацелена на RBD-домен и на S1-субъединицу в целом. У вакцины будет меньше шансов спровоцировать ADE, если она будет нацелена на S2-субъединицу S-белка или другие консервативные антигенные детерминанты вирусных белков (см. работу [43]).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить А.Н. Взорова, Г.В. Кочневу, А.А. Аджубея, Д.В. Купраша, Н.Г. Есипову и М.В. Супотницкого за полезные обсуждения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 01201363818) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-01085).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. S. Yip, H. L. Leung, P. H. Li, et al., Hong Kong Med. J. **22** (3, Suppl. 4), 25 (2016).
2. Q. Wang, L. Zhang, K. Kuwahara, et al., ACS Infect. Dis. **2** (5), 361 (2016).
3. A. Iwasaki and Y. Yang, Nat. Rev. Immunol. **20**, 339 (2020).
4. L. Liu, Q. Wei, Q. Lin, et al., JCI Insight **4** (4), e123158 (2019).
5. А. Н. Миронов, М. В. Супотницкий и Е. В. Лебединская, Биопрепараты: профилактика, диагностика, лечение, № 3, 13 (2013).
6. S. M. Tirado and K. J. Yoon, Viral Immunol. **16** (1), 69 (2003).
7. M. Jaume, M. S. Yip, Y. W. Kam, et al., Virol. J. **11**, 82 (2014).
8. Y. Wan, J. Shang, S. Sun, et al., J. Virol. **94**, e02015 (2020).
9. L. Li, J. Wo, J. Shao, et al., Virus Res. **107** (1), 93 (2005).
10. М. В. Супотницкий, *Слепые пятна вакцинологии* (Русская панорама, М., 2016).
11. М. В. Супотницкий, Актуальная инфектология, № 2 (11), 73 (2016).
12. 14. X. Wang, W. Xu, G. Hu, et al., Cell. Mol. Immunol. (2020). DOI: 10.1038/s41423-020-0424-9
13. C. Bosteels, K. Neyt, M. Vanheerswynghels, et al., Immunity **52** (2020). DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.005
14. A. Takada and Y. Kawaoka, Rev. Med. Virol. **13** (6), 387 (2003).
15. M. Merad and J. C. Martin, Nat. Rev. Immunol. **20**, 355 (2020).
16. J. A. Tetro, Microbes. Infect. **22** (2), 72 (2020).
17. D. O. Ricke and R. W. Malone, Lancet (preprint) (2020). DOI: 10.2139/ssrn.3546070
18. M. Yuan, N. C. Wu, X. Zhu, et al., Science (2020). DOI: 10.1126/science.abb7269
19. B. Tripet, M. W. Howard, M. Jobling, et al., J. Biol. Chem. **279** (20), 20836 (2004).
20. S. Matsuyama and F. Taguchi, J. Virol. **83** (21), 11133 (2009).
21. F. Li, M. Berardi, W. Li, et al., J. Virol. **80** (14), 6794 (2006).
22. A. C. Walls, M. A. Tortorici, J. Snijder, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **114** (42), 11157 (2017).
23. A. C. Walls, Y. J. Park, M. A. Tortorici, et al., Cell **181** (2), 281 (2020).
24. D. Wrapp, N. Wang, K. S. Corbett, et al., Science **367** (6483), 1260 (2020).
25. J. Shang, Yu. Wan, Ch. Luo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **117** (21), 11727 (2020).
26. R. N. Kirchdoerfer, N. Wang, J. Pallesen, et al., Sci. Rep. **8** (1), 15701 (2018).
27. Y. Jia, G. Shen, Yu. Zhang, et al., BioRxiv (2020). DOI: 10.1101/2020.04.09.034942
28. A. Merk and S. Subramaniam, Curr. Opin. Struct. Biol. **23** (2), 268 (2013).
29. A. Bartesaghi, A. Merk, M. J. Borgnia, et al., Nat. Struct. Mol. Biol. **20** (12), 1352 (2013).
30. J. B. Munro, J. Gorman, X. Ma, et al., Science **346** (6210), 759 (2014).
31. L. Lu, I. Manopo, B. P. Leung, et al., J. Clin. Microbiol. **42** (4), 1570 (2004).
32. B. Korber, W. M. Fischer, S. Gnanakaran, et al., BioRxiv (2020). DOI: 10.1101/2020.04.29.069054
33. A. A. Adzhubei, F. Eisenmenger, V. G. Tumanyan, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **146** (3), 934 (1987).
34. A. A. Adzhubei and M. J. Sternberg, J. Mol. Biol. **229** (2), 472 (1993).
35. I. N. Lu, C. P. Muller, and F. Q. He, Virus Res. **283**, 197963 (2020). DOI: 10.1016/j.virusres.2020.197963
36. . J. Gu and C. R. Taylor, Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. **11** (4), 281 (2003).
37. J. Gu, E. Gong, B. Zhang, et al., J. Exp. Med. **202** (3), 415 (2005).
38. J. Zhao, Q. Yuan, H. Wang, et al., Clin. Infect. Dis. (2020). DOI: 10.1093/cid/ciaa344
39. F. Wu, A. Wang, M. Liu, et al., MedRxiv (2020). DOI: 10.1101/2020.03.30.20047365

40. H. Yao, X. Lu, Q. Chen, et al., MedRxiv (2020). DOI: 10.1101/2020.04.14.20060160
41. J. Ou; Z. Zhou, R. Dai, et al., BioRxiv (2020). DOI: 10.1101/2020.03.15.991844
42. M. Jaume, M. S. Yip, C. Y. Cheung, et al., J. Virol. **85** (20), 10582 (2011).
43. Т. А. Зайчук и др., Молекуляр. биология **54** (2020) (в печати).

Change of Antigenic Determinants of SARS-CoV-2 Virus S-Protein as a Possible Cause of Antibody-Dependent Enhancement of Virus Infection and Cytokine Storm

Yu.D. Nechipurenko*, A.A. Anashkina*, and O.V. Matveeva, *****

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

***Sendai Viralytics LLC, Acton, MA 01720, USA*

****Biopolymer Design LLC, Acton, MA 01721, USA*

A hypothesis is proposed that the cytokine storm syndrome, which complicates COVID-19 disease in some patients, is a consequence of antibody-dependent enhancement of viral infection. This enhancement, in turn, according to our hypothesis, caused by changes of S-protein dominant antigenic determinants. Antibody-dependent enhancement of viral infection is a phenomenon in which the binding of the virus to suboptimal antibodies that are not neutralizing, induces the penetration of the virus into the cells of the immune system, which leads to their mass death. Antibody-dependent enhancement in these cases can be triggered by a change in the antigenic determinants of the S-protein. According to our hypothesis, such a change can lead to a decrease in the binding affinity of neutralizing antibodies to the virus, turning them into suboptimal – not neutralizing ones. The variability of linear and/or conformational antigenic determinants of the S-protein can be a result of some changes in its conformation and substitutions of several amino acids in its sequence. This variability is a consequence of the genetic diversity of quasi-species. According to our hypothesis such variability of amino acids can cause not only structural changes in the S-protein, but also affect the dynamics of its conformational changes. If all these phenomena can occur during the SARS-CoV-2 viral infection they can explain the severe course of the disease in some infected individuals.

Keywords: COVID-19, coronavirus, SARS-CoV-2, antibody-dependent enhancement of infection, ADE, spike protein, S-protein, change in conformations, antigenic determinants, variation in epitopes