СОДЕРЖАНИЕ

Том 66, номер 6, 2021

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Процианидин B3 – потенциальный ингибитор человеческого септина 9

А.В. Вахрушева, А.В. Кудрявцев, О.С. Соколова, К.В. Шайтан 1045

Нитрозильные комплексы гемоглобина в различных модельных системах

Д.И. Грачев, К.Б. Шумаев, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов, Э.К. Рууге 1056

Анализ моделей кооперативного связывания кислорода гемоглобином

И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, В.Ю. Сулин, Ю.Д. Нечипуренко 1065

Влияние плазменной субплантации ионов азота на структурно-механические и биомедицинские свойства поверхности упругого полиуретана

И.А. Морозов, А.С. Каменецких, А.Ю. Беляев, М.Г. Щербань, Л.М. Лемкина, Д.В. Ерошенко 1074

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Методы исследования сверхслабого свечения биологических объектов. II. Методы, основанные на биологическом детектировании

И.В. Володяев, Л.В. Белоусов, И.И. Концевая, А.Е. Наумова, Е.В. Наумова 1082

Нановибрации кантилевера атомно-силового микроскопа как система детекции антибиотикорезистентности бактерий в режиме реального времени

С.Н. Плескова, О.И. Фомичев, Р.Н. Крюков, И.С. Судакова 1116

Гипотеза контаминации мембран нейронов, эпилепсия и кетогенная диета

Ю.Д. Нечипуренко, Р.С. Гарсия Рейес, Х.Л. Эрнандес Касерес 1123

Влияние ионов цезия на ингибиторный эффект пуринов в мионевральном синапсе

А.Е. Хайруллин, В.В. Валиуллин, А.Ю. Теплов, А.Р. Шайхутдинова, Н.М. Каштанова, С.Н. Гришин 1133

Резистентность эритроцитов некоторых черноморских рыб при гипоосмии и воздействии неионных детергентов тритона X-100 и твина-20

Ю.А. Силкин, Е.Н. Силкина, М.Ю. Силкин 1137

Моделирование сценариев глубокого популяционного кризиса быстро растущей популяции

А.Ю. Переварюха 1144

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Раннее прогнозирование урожайности зерновых культур на основе спутниковых данных DOVE (PlanetScope)

А.П. Шевырногов, Д.В. Емельянов, Н.О. Мальчиков, Т.Н. Демьяненко, В.К. Ивченко, И.Ю. Ботвич 1164

Цитогенетические эффекты в корневой меристеме проростков салата при облучении семян быстрыми нейтронами в дозе 10 гр и их модификация гипомагнитными условиями проращивания

Н.Г. Платова, В.М. Лебедев, А.В. Спасский, К.А. Труханов 1171

Сезонные изменения содержания жирных кислот в миокарде и m. longissimus dorsi длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*

Т.П. Кулагина, С.С. Попова, А.В. Ариповский 1178

Влияние концентрации внеклеточного Ca^{2+} на зависимость «частота–сила»: эффект потенциации паузой в условиях выраженной гипотермии в миокарде морской свинки

А.С. Аверин, Н.М. Захарова, Д.А. Игнатьев 1186

Метаанализ адаптивных реакций сердечно-сосудистой системы нормотензивных крыс при колебаниях температуры

Н.В. Кузьменко, Н.С. Щербак, М.Г. Плисс, В.А. Цырлин, М.М. Галагудза 1192

Восстановление жизненных функций крыс после клинической смерти, индуцированной погружением в ледяную воду

Е.Л. Гагаринский, А.С. Аверин 1203

Экспериментальная апробация метода объективной регистрации болевого синдрома

А.В. Кожевникова, О.Л. Белянин, О.Л. Власова 1210

Катион нитрозония как компонент динитрозильных комплексов железа, определяющий их противоопухолевый эффект

А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина 1217

Доноры оксида азота – противоопухолевый и цитотоксический эффект биядерного динитрозильного комплекса железа с N-ацетилцистеином

А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, О.О. Рябая, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина 1223

Наночастицы золота как потенциальные радиосенсибилизирующие и цитотоксические агенты

Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина 1229

ХРОНИКА

Памяти Льва Александровича Блюменфельда. К 100-летию

В.А. Твердислов, А.Н. Тихонов 1246

Contents

Vol. 66, No. 6, 2021

Molecular Biophysics

Procyanidin B3 as a Potential Inhibitor of Human Septin 9

A.V. Vakhrusheva, A.V. Kudryavtsev, O.S. Sokolova, and K.V. Shaitan 1045

Nitrosyl Hemoglobin Comlexes in Various Model Systems

D.I. Grachev, K.B. Shumaev, O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov, and E.K. Ruuge 1056

Analysis of Models of Cooperative Oxygen Binding by Hemoglobin

I.A. Lavrinenko, G.A. Vashanov, V.Yu. Sulin, and Yu.D. Nechipurenko 1065

Effects of Plasma Subplantation of Nitrogen Ions on Structure and Mechanical Properties and Biomedical Surface Properties of Elastic Polyurethane

I.A. Morozov, A.S. Kamenetskikh, A.Yu. Beliaev, M.G. Scherban, L.M. Lemkina, and D.V. Eroshenko 1074

Cell Biophysics

Methods of Studying Ultraweak Photon Emission from Biological Objects. II. Methods Based on Biological Detection

I.V. Volodyaev, L.V. Beloussov, I.I. Kontsevaya, A.E. Naumova, and E.V. Naumova 1082

Nanovibrations of Atomic Force Microscope Cantilevers as a System for Real Time Detection of Antibiotic Resistance in Bacteria

S.N. Pleskova, O.I. Fomichev, R.N. Kriukov, and I.S. Sudakova 1116

Hypothesis on Pollution of Neuronal Membranes, Epilepsy and Ketogenic Diet

Yu.D. Nechipurenko, R.C. Garcia Reyes, and J.L. Hernandez Caceres 1123

The Influence of Cesium Ions on the Inhibitory Effect of Purines in Neuromuscular Synapse

A.E. Khairullin, V.V. Valiullin, A.Yu. Teplov, A.R. Shaihutdinova, N.M. Kashtanova, and S.N. Grishin 1133

Resistance of Erythrocytes in Some Black Sea Hyposmic Fishes Exposed to Non-Ionic Detergents Triton-X100 and Tween-20

Yu.A. Silkin, E.N. Silkina, and M.Yu. Silkin 1137

Simulation of Scenarios of the Deep Population Crisis of the Rapidly Growing Population

A.Yu. Perevaryukha 1144

Complex Systems Biophysics

Early Forecast of Crop Yields Based on PlanetScope Dove Satellite Data

A.P. Shevyrnogov, D.V. Emelyanov, N.O. Malchikov, T.N. Demyanenko, V.K. Ivchenko, and I.Yu. Botvich 1164

Cytogenetic Effects of Fast Neutron Seed Irradiation (10 Gy) on the Root Meristem Cells of *Lactuca sativa* L. Seedlings and Modification of Seed Germination in Hypomagnetic Environment

N.G. Platova, V.M. Lebedev, A.V. Spassky, and K.A. Trukhanov 1171

Seasonal Changes in the Fatty Acid Content of Myocardial and Longissimus Dorsi Muscles of Long-Tailed Ground Squirrel *Urocitellus undulatus*

T.P. Kulagina, S.S. Popova, and A.V. Aripovsky 1178

Influence of Extracellular Ca^{2+} Concentration on Force-Frequency Relationship and Rest Effect under Conditions of Pronounced Hypothermia in the Myocardium of Guinea Pig

A.S. Averin, N.M. Zakharova, and D.A. Ignatiev 1186

Meta-Analysis of Cardiovascular Adaptive Responses to Temperature Variations in Normotensive Rats

N.V. Kuzmenko, N.S. Shcherbak, M.G. Pliss, V.A. Tsyrlin, and M.M. Galagudza 1192

Restoration of Vital Functions in Rats after Clinical Death Caused by Cold Water Submersion

E.L. Gagarinsky and A.S. Averin 1203

Experimental Approbation of the Method for Objective Registration of Pain Syndrome

A.V. Kozhevnikova, O.L. Belyanin, and O.L. Vlasova 1210

Nitrosonium Cation as a Component of Dinitrosyl Iron Complexes Acts as an Inducer of the Antitumor Effect

A.F Vanin, L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, N.V. Bluhterova, V.A. Rykova, and M.M. Fomina 1217

Nitric Oxide Donors: Antitumor and Cytotoxic Effects of Binuclear Dinitrosyl Iron Complex with N-Acetylcysteine

A.F Vanin, L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, E.I. Nekrasova, O.O. Riabaya, N.V. Bluhterova, V.A. Rykova, and M.M. Fomina 1223

Gold Nanoparticles as Potential Radiosensitizing and Cytotoxic Agents

D.B. Korman, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluhterova, V.A. Rikova, and M.M. Fomina 1229

Chronicle

In Memory of Lev Alexandrovich Blumenfeld. To the 100th Anniversary

V.A. Tverdislov and A.N. Tikhonov 1246

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1045–1055

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ПРОЦИАНИДИН B3 – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЕПТИНА 9

© 2021 г. А.В. Вахрушева*, А.В. Кудрявцев*, О.С. Соколова*, **, К.В. Шайтан*, ***

**Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ул. Ленинские горы, 1/12*

***Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне, 517182, Провинция Гуандун, Шэньчжэнь, ул. Гоцзидасюеюань, 1, Китай*

****Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4*

E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 23.08.2021 г.
После доработки 23.08.2021 г.
Принята к публикации 31.08.2021 г.

Цитоскелетные белки септины участвуют во многих клеточных процессах, изменение их экспрессии является маркером онкологических заболеваний. В связи с этим септины могут являться потенциальной мишенью при воздействии на раковые клетки. Для поиска новых малых молекул, влияющих на структурную организацию септиновых филаментов, был проведен виртуальный скрининг библиотеки соединений базы данных PubChem и выбрано наиболее аффинное вещество из всех – флавоноид процианидин B3. С помощью молекулярного моделирования показано, что процианидин B3 взаимодействует с мономером септина SEPT9 в важной для связывания ГТФ области G1- и G4-мотивов и предотвращает димеризацию септиновых мономеров. Следовательно, процианидин B3 может рассматриваться как перспективное соединение для воздействия на структуру септиновых филаментов раковых клеток.

Ключевые слова: септин, конформационные изменения, SEPT9, процианидин B3, молекулярное моделирование, фармакофор.

DOI: 10.31857/S0006302921060016

Септины являются ГТФ-связывающими белками, структурно и эволюционно относящимися к суперсемейству Ras ГТФаз [1]. Впервые септины были обнаружены в почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* на месте разделения материнской и дочерней клеток [2, 3]. У млекопитающих известно 13 генов, кодирующих септины. На основе схожести последовательностей септины млекопитающих делятся на четыре группы (табл. 1) [4, 5].

Септины играют важную роль в процессах пролиферации и миграции клеток. Нокдаун SEPT2 и SEPT7 приводил к снижению инвазии раковых клеток и влиял на их механочувствительность [6], также происходило значительное снижение клеточной пролиферации, миграции и инвазии, увеличивался апоптоз [7]. В то же время повышенная экспрессия данных септинов приводила к увеличению миграционной подвижности, пролиферации и инвазии клеток, как предполагается, через активацию сигнального пути MEK/ERK [7]. Аналогичные результаты были получены и для септина изоформы SEPT9 [8].

Во многих исследованиях показано, что септины значительно меняют свою экспрессию при разных типах онкологии [9]. При этом часть из них выступает в качестве супрессоров опухолевых процессов, а часть, наоборот, является онкогенной. При раке груди, яичников и поджелудочной железы наблюдается повышенная экспрессия SEPT2, SEPT7, SEPT9, что коррелирует с худшим прогнозом выживаемости [10]. Показано, что септины путем прямого взаимодействия с HER-2 могут таким образом увеличивать резистентность к онкологическим лекарственным препаратам, направленным на ингибирование протоонкогена, рецепторной тирозинкиназы HER-2 (human epidermal growth factor receptor-2), кодируемую геном ErbB2 и высоко ассоциированную с прогрессией рака груди [11].

Базовые септиновые комплексы являются тетра-, гекса- или октамерами, из которых формируются высокоолигомерные структуры, такие как

Сокращения: GEF – фактор обмена гуанинового нуклеотида, СКО – среднеквадратичное отклонение.

Таблица 1. Классификация септинов млекопитающих

Группа септинов	Септины млекопитающих
SEPT2	SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5
SEPT6	SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14
SEPT7	SEPT7
SEPT3 (в некоторых источниках SEPT9)	SEPT3, SEPT9, SEPT12

филаменты, сетки и кольца [12, 13]. В организме человека септины собираются в гетеро-гексакомплексы SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 [14] и октамеры SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (рис. 1) [15]; также филаменты могут формироваться на основе гексамерного комплекса SEPT2–SEPT6–SEPT7 [14]. Обычно септиновые комплексы формируются из представителей разных групп, в некоторых случаях септины из одной группы могут быть взаимозаменяемы (табл. 1).

Интересно отметить, что SEPT9 может не только участвовать в формировании филаментов, но и напрямую взаимодействовать с фактором обмена гуанинового нуклеотида (GEF). Показано, что SEPT9 через взаимодействие с GEF ингибирует Rho-сигналинг, играющий ключевую роль во многих клеточных процессах, включая реорганизацию цитоскелета [16, 17]. Также обнаружена колокализация GEF-SEPT9 с актиновым цитоскелетом [16]. Нарушение локализации септинов с актином и, как следствие, ремоделирование последнего, может приводить к апоптозу клеток [18, 19].

Формирование септиновых филаментов начинается с того, что две субъединицы септина гетеродимеризуются через два альтернативных интерфейса (G- и NC-) (рис. 1) путем конформационных изменений в ГТФ-связывающем кармане G-интерфейса [20]. Однако стоит отметить, что скорость гидролиза ГТФ у септинов очень низкая [21]. Более того, не все типы септинов имеют возможность гидролизовать ГТФ [20, 22]. Таким образом, предполагается, что связывание нуклеотидов важнее для формирования филаментной структуры септинов, чем непосредственно их гидролиз [21, 23, 24].

В настоящее время активно исследуется только одно вещество, предположительно влияющее на структуру септинов – CPPU (N-(2-хлор-4-пиридил)-N'-фенилмочевина). Микромолярные концентрации этого соединения ингибировали пролиферацию, миграцию и инвазию человеческих раковых линий *in vitro* [25] и *in vivo* [26]. Эксперименты по молекулярному докингу показали преимущественное связывание CPPU с сайтом связывания ГТФ септина, что предположительно стабилизирует филаментную организацию септинов и препятствует дальнейшему связыванию и гидролизу ГТФ [27]. Модификация CPPU путем добавления атомов фтора и хлора UR214-1, UR214-7 и UR214-9 привела к ингибированию пролиферации клеточных линий рака яичников и рака эндометрия [28]. Однако CPPU имеет короткий период полувыведения, обладает цитотоксичностью, его применение вызывает небольшое системное воспаление [26]. Также было показано, что CPPU в низких концентрациях влияет на морфологию и функции митохондрий. В результате было предположено, что эффект CPPU относительно ингибирования пролиферации клеток не является специфичным [29].

В соответствии с этим поиск новых малых молекул, влияющих на структуру септинов и соответственно на миграционные и пролиферативные свойства клеток, является актуальной задачей. В данной работе методами молекулярного моделирования проанализированы различные конформационные состояния септина на примере SEPT9 и выбрана библиотека соединений базы

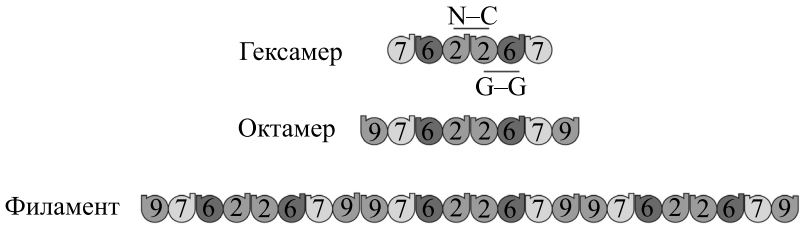


Рис. 1. Схематичное изображение организации септиновых гексамеров, октамеров и филаментов. Цифрами указаны номера септинов, N-C – N-C-интерфейс взаимодействия двух септиновых субъединиц, G-G – G-интерфейс взаимодействия двух септиновых субъединиц.

данных PubChem для проведения виртуального скрининга. В результате было выявлено соединение класса флавоноидов – процианидин B3, связывающееся предположительно с высокой аффинностью с септином SEPT9 в области присоединения ГТФ и препятствующее олигомеризации септиновых филаментов.

МЕТОДЫ

Подготовка белковых структур и лигандов. Подготовка белковых структур проводилась с помощью модуля Protein Preparation (Schrödinger, LLC, New York, США) [30] и включала удаление кристаллографической воды на расстояние более 5 Å от белка, добавление полярных водородов и присвоение частичных зарядов Гастайгера. Силовое поле OPLS_2005 использовали для минимизации структур.

Для исследований методом виртуального скрининга использовали библиотеку PubChem. Для построения фармакофора использовали малую библиотеку FDA Pharm Classes, содержащую около 1 тысячи соединений, являющихся одобренными FDA лекарственными препаратами, прошедшими доклинические и клинические испытания. В связи с тем, что вещества были проверены относительно их безопасности, создание на их основе фармакофора и последующего скрининга библиотеки веществ обладало более высокой вероятностью отбора безопасного соединения, пригодного для применения на человеке. Также для сравнения и валидации результатов докинга в библиотеку были добавлены структуры, связывающиеся с септинами, – ГТФ, ГДФ, ГТФ-γ-S, CPPU и UR214-9. Для виртуального скрининга использовали большую библиотеку соединений, включающую в себя около миллиона субстанций из раздела «Органические соединения» базы данных PubChem [31].

Структуры лигандов подготавливали с использованием модуля LigPrep (Schrödinger, LLC, New York, США). Лигандам приписывали частичные атомные заряды; несколько возможных состояний ионизации генерировали при pH 7.0 ± 2.0 для каждого соединения. Минимизацию энергии проводили для каждого лиганда до тех пор, пока она не достигала среднеквадратичного отклонения (СКО) в 0.01 Å.

Построение 3Д-фармакофора. 3Д-фармакофор для скрининга лигандов был построен на основе анализа лиганд-рецепторного комплекса белка SEPT9 с лигандами, отобранными после молекулярного докинга малой библиотеки FDA Pharm Classes в сайт связывания ГТФ и присоединения соседней септиновой субъединицы. Лиганды, имеющие значения Glide Score от –5 и ниже, использовали далее для построения фармакофора. Их перечень включал следующие препараты: ^{153}SM оксабифор, миглитол, лодоксамид, иопромид, микофеноловая кислота, допамин, занамивир. Данные лиганды предварительно выравнивали для нахождения общих функциональных групп. Построение фармакофора проводили в модуле Phase (Schrödinger, LLC, New York, США) [32]. Для генерации фармакофора соединения были подготовлены со следующими параметрами: до 10 конформационных состояний на одну вращающуюся связь и до 50 конформаций всего. Каждый лиганд был представлен минимум одной конформацией.

Комбинированный виртуальный скрининг на основе фармакофорного скрининга и молекулярного докинга. Для скрининга соединений использовали модули Glide и Phase (Schrödinger, LLC, New York, США) [32, 33]. 3Д-фармакофорный скрининг большой библиотеки соединений проводили по созданной ранее модели фармакофора. Оценку пригодности лигандов в данном случае проводили исходя из СКО и направлений векторов отклонения атомов лиганда от фармакофора, описывающих отличия 3Д-структуры лиганда при наложении на фармакофор. Из приблизительно одного миллиона соединений через данный скрининг было отобрано 25108 веществ, которые затем подготавливали с помощью LigPrep (Schrödinger, LLC, New York, США) по описанной выше процедуре подготовке лигандов для молекулярного докинга.

Пространственная ячейка для докинга имела размеры 20 × 20 × 20 Å с центром относительно ключевых аминокислотных участков, находящихся в активном центре белка. Молекулярный докинг проводили в три стадии: HTVS (high-throughput virtual screening), SP (standard precision) и XP (extra precision). Результаты оценивали с помощью встроенных в пакет Schrödinger оценочных функций: Glide Score, Glide Emodel, а также по свободной энергии связывания, вычисленной по обобщенному методу Борна (MM-GBSA).

Glide Score и Glide Emodel являются эмпирическими оценочными функциями, аппроксимирующими свободную энергию связывания лиганда. Более отрицательные значения по данным параметрам отображают более сильное связывание.

Для сравнения оценочных функций в данной работе использовали оценку свободной энергии Гиббса D$E_{MM/GBSA}$, вычисленне. с использованием обобщенного метода Борна (MM/GBSA) для учета эффекта сольватации на основании учета площади поверхности структуры, контактирующей с растворителем [34]:

$$\Delta E_{MM/GBSA} = E^{комп} - E^{рец} - E^{лиг},$$

$$\Delta E_{MM/GBSA} = E_{MM} + E_{GB} + \gamma A_{SA},$$

где $E^{комп}$ – полная энергия $E_{MM/GBSA}$ комплекса «лиганд–рецептор», $E^{рец}$ – полная энергия $E_{MM/GBSA}$ рецептора, $E^{лиг}$ – полная энергия $E_{MM/GBSA}$ лиганда, E_{MM} – молекулярно-механическая энергия, включающая в себя все механические, электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия; E_{GB} – обобщенная энергия Борна, учитывающая влияние растворителя на свободную энергию молекулы; γA_{SA} – вклад в свободную энергию, пропорциональный площади поверхности молекулы A_{SA}.

Соединения с наилучшими показателями по Glide Score, GlΔide Emodel и MM-GBSA отбирали для последующих исследований.

Молекулярная динамика. Молекулярную динамику проводили с помощью программного пакета Desmond (Schrödinger, LLC, New York, США) [35]. Для этого структуру помещали в ячейку с размерами 1.5 нм в длину; использовали модель явного растворителя – SPC. Далее следовала минимизация методом наискорейшего спуска в силовом поле OPLS3e. Для релаксации использовали стандартный протокол, входящий в состав программного пакета Desmond и подходящий, по информации разработчика, для большинства стандартных систем. Данный протокол включал в себя две стадии минимизации (с фиксированными и нефиксированными тяжелыми атомами), за которыми следовало четыре стадии молекулярной динамики с последовательно уменьшающимися ограничениями. Применение данного протокола апробировано для подготовки сайта связывания белковых молекул и анализа лиганд-рецепторных взаимодействий.

Молекулярную динамику проводили при постоянной температуре (300 K) и давлении с использованием термостата Нозе-Хувера и баростата Паринелло-Рамана соответственно. Времена расчета молекулярно-динамических траекторий указаны отдельно в тексте.

Для оценки траекторий проведенной молекулярной динамики использовали параметры среднеквадратичного отклонения и среднеквадратичной флуктуации, также были проанализированы различные виды лиганд-белковых взаимодействий с помощью модуля Desmond – Simulation Interactions Diagram [35].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие ГТФазного домена септина с аналогом ГТФ. На первом этапе для характеристики сайта и взаимодействий лиганд-рецептор проводили молекулярную динамику димера ГТФазных доменов септина SEPT9 (PDB ID 5CYP) с нерасщепляемым аналогом ГТФ (ГТФ-γ-S). Выбор таргетной молекулы основывался на том, что SEPT9 является замыкающим фрагментом октамерной септиновой единицы и соединяет соседние октамеры в филаменты [15], а также имеет треониновый остаток, необходимый для гидролиза ГТФ [5]. Этот вариант септина еще не исследовался на предмет влияния на него малых молекул, в том числе и единственного известного ингибитора септинов – CPPU.

Была проведена предварительная минимизация кристаллической структуры SEPT9 (PDB ID 5CYP) со связанным аналогом ГТФ-γ-S. Через 3 нс система «лиганд–рецептор» была уравновешена, так как СКО не превышало 2.4 Å (рис. 2а). При анализе полученных данных были выявлены аминокислотные остатки белка SEPT9: Lys36, Ser37, Thr38, Arg60, Lys170, Asp172, которые в основном участвуют в образовании водородных связей; Ser37, Thr64, Asp87 – в образовании ионных связей; Arg241 – единственного гидрофобного взаимодействия; Ile61, His145, Glu178 – в образовании водных мостиков. В этой связи следует отметить аминокислотный остаток His145, который образовывал стабилизирующую связь через водный мостик в димере септинов между одной субъединицей и ГТФ, закрепленным в сайте связывания второй субъединицы (рис. 2б,в). Аминокислотные остатки Lys36, Ser37, Thr38, Arg60, Thr64 на протяжении всего времени моделирования постоянно контактировали с лигандом ГТФ-γ-S.

Так как целью работы был поиск малых молекул, нарушающих олигомеризацию септиновых филаментов, наша задача состояла в том, чтобы предотвратить проникновение ГТФ в сайт связывания SEPT9. Нуклеозидтрифосфаты, связываясь, участвуют в полимеризации и стабилизируют филаментную структуру септинов. Помимо этого, важно было также обеспечить, чтобы новый лиганд не связывал и не стабилизировал две субъединицы димерного SEPT9 друг с другом. Соответственно, для дальнейшего виртуального скрининга была выбрана мономерная структура SEPT9 в конформации без ГТФ и предварительно промоделированная в течение 50 нс (данные не приведены). Отобранные впоследствии лиганды также затем проверяли на димерной структуре.

Комбинированный скрининг библиотеки малых молекул. Для построения фармакофора была выбрана малая библиотека FDA Pharm Classes из базы PubChem, содержащая ориентировочно 1000 соединений. Пространственная ячейка размером 20 × 20 × 20 Å, по которой проводили докинг, была центрирована по координатам –6.943, 14.994, –0.952 (*X*, *Y*, *Z*) и ориентирована на место связывания фосфатной группы ГТФ, а также на область присоединения второй септиновой субъединицы, включая место стабилизирующей связи

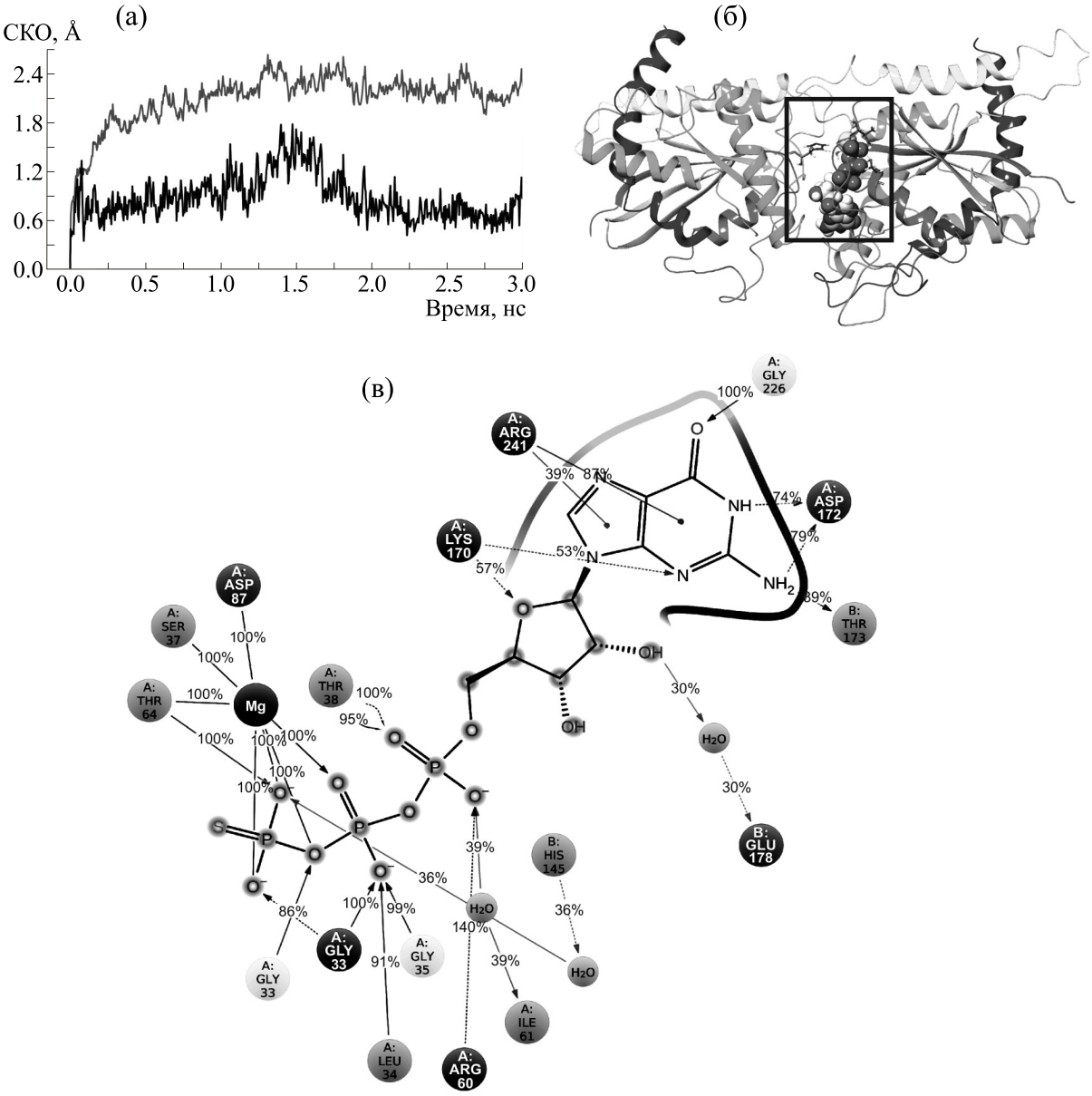


Рис. 2. (а) – СКО в зависимости от времени: серая кривая – Cα-атомы белка SEPT9 относительно референсного фрейма, черная кривая – лиганд ГТФ-γ-S относительно SEPT9; (б) – общий вид димера из ГТФазных доменов септина 9 (SEPT9) в комплексе с ГТФ-γ-S (2.89 Å), PDB ID 5CYP; (в) – схема контактов, образуемых ГТФ-γ-S с аминокислотными остатками SEPT9.

His145. По совокупности лучших значений отобранных веществ на основании Glide Score, Glide Emodel и энергии связывания MM-GBSA (см. раздел «Методы») были определены функциональные группы, важные для формирования взаимодействий лиганд-белок в рассматриваемом сайте. После этого на основании проведенного анализа был сконструирован фармакофор (рис. 3а). Фармакофор содержит пять основных функциональных групп для образования связей – две акцепторные и три отрицательно-ионные. Со стороны белка-рецептора были выделены следующие аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с лигандами: Lys170, Arg241, Lys242, Lys244 и Ile61, находящиеся в «боковой» области стыковки двух септиновых субъединиц (рис. 3б,в). По данному фармакофору проводили скрининг полной библиотеки соединений (около одного миллиона) с помощью программного обеспечения Glide (Glide, Schrödinger, LLC, New York, США).

Рис. 3. (а) – Фармакофор (A – акцепторная группа, N – отрицательно-ионный тип группы), числами указано расстояние (в Å) между функциональными группами фармакофора; (б) – фармакофор в активном сайте белка SEPT9, выделены ключевые аминокислотные остатки; (в) – общий вид положения фармакофора относительно белка SEPT9.

Соединения после скрининга были ранжированы согласно параметрам Glide Score, Glide Emodel и MM-GBSA. Вещества, связавшиеся с наибольшей аффинностью, перечислены в табл. 2. Их потенциальную биологическую антинеопластическую (противоопухолевую) активность оценивали с помощью веб-сервиса PASSonline [36].

Отобранные соединения были протестированы также с помощью других программ для молекулярного докинга, таких как AutoDock Vina [37], DockThor [38], SwissDock [39] и CB-Dock [40]. Наибольшую аффинность к септину по результатам всех тестов, как и ожидалось, показали ГТФ и его производные, а также вещества процианидин B3 и микофеноловая кислота; наименьшая аф-

Таблица 2. Характеристики соединений с наибольшей аффинностью к септину

№	Номер соединения	Название вещества	Glide Score	MM-GBSA, ккал/моль	Glide Emodel	MM-GBSA, ккал/моль	Предсказанная биологическая активность
1	135398633	ГТФ	–8.313	–31.27	–63.713	–37.52	Не определена
2	135398675	ГТФ-γ-S	–8.25	–29.53	–63.542	–31.2	Не определена
3	135398619	ГДФ	–8.824	–33.67	–63.366	–33.49	Не определена
4	126941	Метотрексат	–3.694	–27.25	–36.609	–21.27	0.319
5	6918837	Панобиностат	–5.03	–28.22	–56.272	–30.78	0.44
6	44564	Лодоксамид	–6.813	–28.72	–59.331	–37.52	0.351
7	446541	Микофеноловая кислота	–7.94	–31.53	–54.785	–31.53	0.463
8	53465279	Лезинурад	–7.263	–30.86	–47.539	–30.86	Не определена
9	73417413	Метокарбамол	–4.31	–26.49	–40.735	–25.17	Не определена
10	93379	CPPU	–2.175	–20.36	–30.396	–19.02	0.263
11	–	UR214-9	–2.341	–25.44	–37.638	–23.44	0.194
12	146798	Процианидин B3	–9.339	–30.64	–70.429	–35.64	0.582

финность была выявлена у CPPU и его аналога UR214-9 (данные не приведены).

Для валидации аффинных соединений была выбрана оценочная функция Glide Emodel, так как она имела наилучшую корреляцию с MM-GBSA ($R^2 = 92\%$, $p = 0.001$). В итоге для дальнейших исследований было выбрано вещество процианидин B3, которое показало наибольшую аффинность при связывании с мономерной формой SEPT9 (рис. 4).

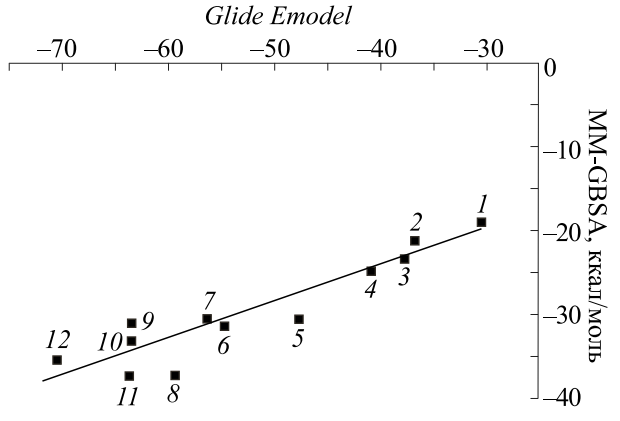


Рис. 4. Оценочная функция Glide Emodel относительно значений свободной энергии MM-GBSA малых молекул: CPPU (1), метотрексат (2), UR214-9 (3), метокарбамол (4), лезинурад (5), микофеноловая кислота (6), панобиностат (7), лодоксамид (8), ГТФ-γ-S (9), ГДФ (10), ГТФ (11), процианидин B3 (12); $p = 0.001$.

Второе найденное вещество с высокой аффинностью – микофеноловая кислота – не препятствовало формированию димерной формы септина и было исключено из дальнейших исследований.

Процианидин B3 с высокой аффинностью связывается с мономерной формой септина в области присоединения второй субъединицы и консервативного сайта для посадки ГТФ – G1- и G4-мотивов, контактирующих с фосфатными группами и гуаниновым основанием нуклеотида соответственно и важных для связывания ГТФ. Процианидины принадлежат к проантоцианидинам класса флавоноидов, встречающихся в яблоках, какао, винограде и ягодах [41].

Для идентификации образуемых взаимодействий между мономером SEPT9 и процианидином B3 проводили молекулярную динамику. Через 3 нс комплекс достигал равновесного состояния и отклонение белка составило не более 1.5 Å, а лиганда – не более 1 Å (рис. 5а). Образуемые связи между процианидином B3 и SEPT9 перечислены в табл. 3. Дополнительно были выделены водные мостики, образованные аминокислотными остатками Gly33, Arg241, Lys244. Помимо этого сама структура мономера в комплексе с процианидином B3 стала более стабильной, в частности, регионы аминокислотных остатков 100–120, 180–210, по сравнению с димерной формой септина в комплексе с ГТФ-

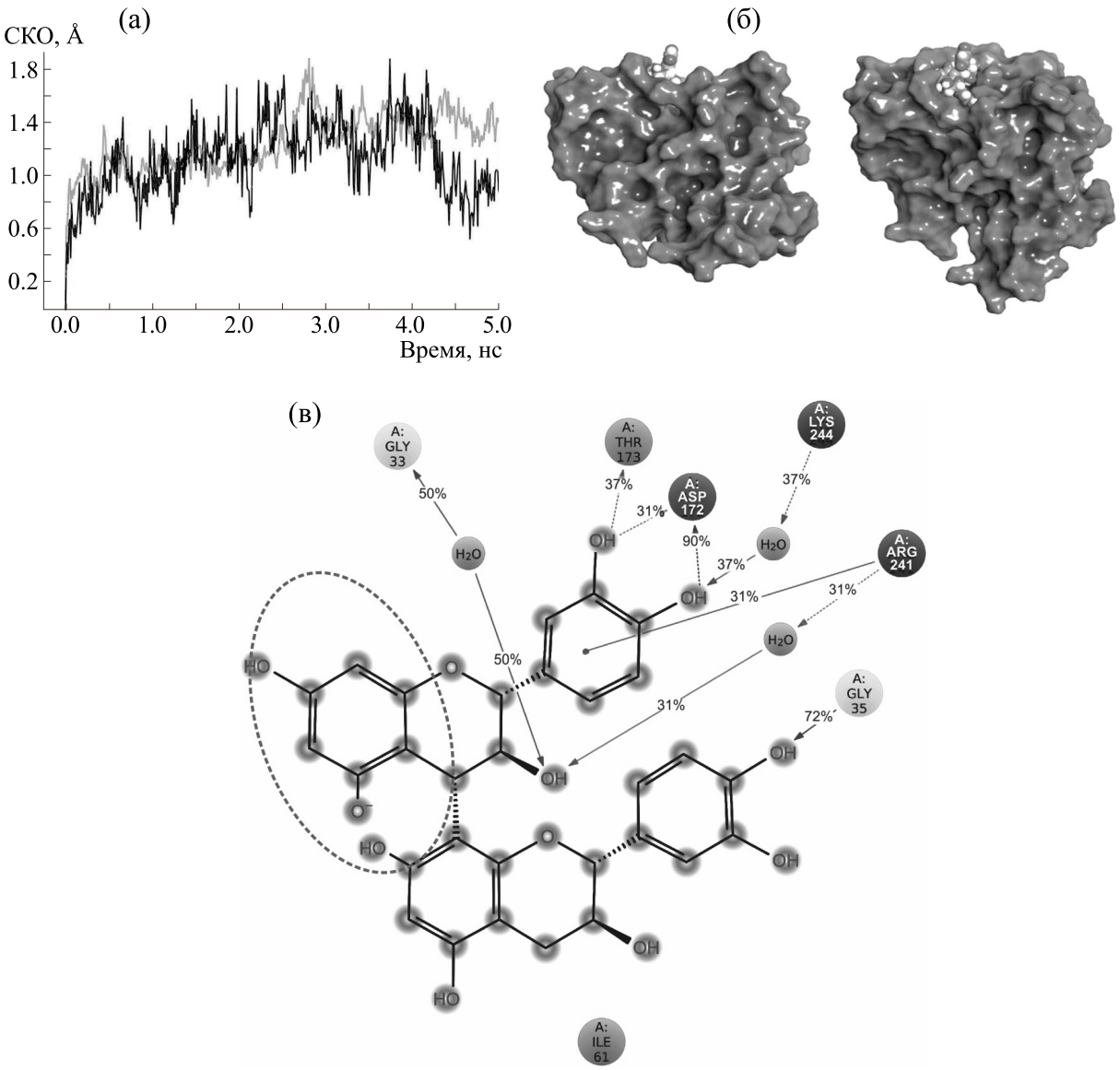


Рис. 5. (а) – СКО в зависимости от времени: серая кривая – Cα атомы мономерного белка SEPT9 относительно референсного фрейма, черная кривая – лиганд относительно SEPT9; (б) – общий вид в двух проекциях структуры мономерной формы SEPT9 с процианидином B3; (в) – схема контактов, образуемых процианидином B3 с аминокислотными остатками SEPT9; пунктирной линией выделена часть молекулы, стерически препятствующая стабилизации димерной формы SEPT9.

γ-S, где среднеквадратичные флуктуации достигали 2.5–3.0 Å, по сравнению с 1.5–2.0 Å в случае комплекса мономерного септина с процианидином B3. При этом вторичная структура белка не нарушилась. Учитывая, что значение ΔG (свободной энергии Гиббса), рассчитанное методом MM-GBSA, для данного комплекса составило около –35 ккал/моль (–147 кДж/моль) в начальной позиции и –52 ккал/моль (–209 кДж/моль) после молекулярной динамики, то можно предполагать высокую стабильность данного лиганд-рецепторного комплекса.

По результатам анализа формируемых взаимодействий процианидина B3 с мономерной формой SEPT9 было обнаружено следующее расположение лиганда (рис. 5б,в): одна из групп процианидина B3 – пирокатехин – связывалась с Gly35 из G1 мотива SEPT9, таким образом занимая место присоединения фосфатных групп ГТФ. При этом бензопирановая часть процианидина B3 фиксировалась со стороны боковой петли через гидрофобные взаимодействия с Ile61 и частично через водородные связи с аминокислотой Arg60, как и в случае комплекса SEPT9 со связан-

Таблица 3. Связи между процианидином B3 и мономерной формой SEPT9

№	Атом со стороны белка SEPT9	Атом со стороны процианидина B3	Тип связи (Å)
1	Gly35(NH)	O12	Водородная (2.31)
2	Arg241(HH22)	Ароматическая группа (C3–C16)	Пи-катионное взаимодействие (4.7)
3	Lys244(NZ)	Ароматическая группа (C13–C27)	Пи-катионное взаимодействие (5.7)
4	Asp172(OD2)	H21	Водородная (1.72)
5	Thr173(HG1)	O10	Водородная (1.96)
6	Thr173(OG1)	H20	Водородная (1.88)
7	Arg60(HH21)	O4	Водородная (2.04)
8	Arg60(HH22)	O6	Водородная (1.99)
9	Arg60(NH2)	O7	Солевой мостик (4.8)
10	Ile61(O)	H22	Водородная (2.47)

ной структурой ГТФ-γ-S. Таким образом, часть процианидина B3 занимала и блокировала место связывания фосфатных групп ГТФ. Более того, вторая часть процианидина B3 формировала связи с регионом связывания гуанинового основания – G4, а именно с аминокислотными остатками Asp172, Thr173. В результате процианидин B3 полностью задействовал основные консервативные регионы структуры SEPT9, фиксировав положения аминокислотных остатков, участвующих в связывании ГТФ, в пре-конформации, т.е. до связывания ГТФ. Помимо этого, процианидин B3 имел два дополнительных пи-катионных взаимодействия, что обеспечивало дополнительную аффинность связывания (см. табл. 3). Стоит отметить, что процианидин B3 располагается в сайте связывания SEPT9 таким образом, что одна из его ароматических групп оказывается развернута в сторону, стерически препятствуя присоединению другой септиновой субъединицы. Докинг процианидина B3 в сайт взаимодействия одной септиновой субъединицы со второй не приводил к высоко аффинному связыванию процианидина B3 в сайте второй субъединицы, в том числе не формировалась стабилизирующая связь с аминокислотным остатком His145, участвующая в образовании димерной молекулы SEPT9 в случае связывания ГТФ или его аналогов. Также при моделировании димерной структуры септинов с процианидином B3 связывание лиганда не происходило, что подтверждает неспособность процианидина B3 стабилизировать димерную форму SEPT9.

В литературе влияние проантоцианидинов на пролиферацию рассматривалось относительно широкого спектра раковых клеток. Например, антипролиферативный эффект был зафиксирован для клеток рака легкого A427, рака груди MCF-7, желудочной аденокарциномы CRL-1739 [42] и других типов рака. При этом механизм действия проантоцианидинов остается не до конца исследованным. Показано, что в большинстве случаев запускаются процессы апоптоза в раковых клетках [43]. В работе [44] был предложен механизм ингибирования процианидином B3 гистоновой ацетилтрансферазы, в работе [45] – механизм снижения процианидином B2 активности ДНК метилтрансфераз или [46] через связывание с фактором NF-κB. Тем не менее пока не были проведены структурные исследования взаимодействий процианидина B3. Стоит отметить, что влияние процианидинов на септины пока не исследовалось. Как отмечалось выше, экспрессия септинов и механизмы их действия изменяются по-разному в зависимости от типа онкологии. В частности, экспрессия SEPT9 повышена при раке груди, яичников [8, 47]. При лейкемии наблюдается другой механизм, а именно образование химерных белков септинов с геном MLL (Mixed Lineage Leukemia) путем хромосомных транслокаций. В связи с этим предполагается разный эффект веществ, влияющих на септины, относительно клеточных процессов, происходящих в раковых клетках различного генеза.

Таким образом, в данной работе был проведен виртуальный скрининг соединений, нарушающих димеризацию септинов SEPT9 и найдено вещество из группы флавоноидов — процианидин B3. Данный флавоноид связывается с септином SEPT9 предположительно с высокой аффинностью в важной для связывания ГТФ области G1- и G4-мотивов, контактирующих с фосфатными

группами и гуаниновым основанием нуклеотида, что, вероятно, может предотвращать димеризацию септиновых мономеров. Для того чтобы подтвердить селективное влияние процианидина B3 на пролиферативную способность раковых клеток, необходимо в дальнейшем провести дополнительные исследования по изучению влияния процианидина B3 на структуру септинов и механизмы пролиферации в раковых клетках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90178.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [48].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. D. Leipe, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, and L. Aravind, J. Mol. Biol. **317** (1), 41 (2002).
2. L. Hartwell, Exp. Cell Res. **69** (2), 265 (1971).
3. B. Byers and L. Goetsch, J. Cell Biol. **69** (3), 717 (1976).
4. C. Martínez, M. A. Sanjuan, J. A. Dent, et al., Biochem. J. **382** (3), 783 (2004).
5. E. T. Spiliotis, J. Cell Sci. **131** (1), 207555 (2018).
6. F. Calvo, R. Ranftl, S. Hooper, et al., Cell Reports **13** (12), 2699 (2015).
7. N. Zhang, L. Liu, N. Fan, et al., Oncotarget **7** (38), 61587 (2016).
8. M. E. Gonzalez, E. A. Peterson, L. M. Privette, et al., Cancer Res. **67** (18), 8554 (2007).
9. D. Connolly, I. Abdesselam, P. Verdier-Pinard, and C. Montagna. Biol. Chem. **392** (8–9), 725 (2011).
10. R. K. Singh, K. K. Kim, N. Khazan, et al., BioRxiv **2020**, 954529 (2020).
11. E. A. Marcus, E. Tokhtaeva, S. Turdikulova, et al., Biochem. J. **473** (12), 1703 (2016).
12. A. A. Rodal, L. Kozubowski, B. L. Goode, et al., Mol. Biol. Cell **16** (1), 372 (2005).
13. M. Kinoshita, C. M. Field, M. L. Coughlin, et al., Developmental Cell **3** (6), 791 (2002).
14. M. Sirajuddin, M. Farkasovsky, F. Hauer, et al., Nature **449** (7160), 311 (2007).
15. M. S. Kim, C. D. Froese, M. P. Estey, and W. S. Trimble, J. Cell Biol. **195** (5), 815 (2011).
16. K.-I. Nagata and M. Inagaki, Oncogene **24** (1), 65 (2004).
17. Y. Zeng, Y. Cao, L. Liu, et al., Cell Death & Disease **10**, 720 (2019).
18. C. Poüs, L. Klipfel, and A. Baillet, Front. Cell Devel. Biol. **4**, 126 (2016).
19. M. Desouza, P. W. Gunning, and J. R. Stehn, BioArchitecture **2** (3), 75 (2012).
20. M. Sirajuddin, M. Farkasovsky, E. Zent, and A. Wittinghofer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106** (39), 16592 (2009).
21. E. Zent and A. Wittinghofer, Biol. Chem. **395** (2), 169 (2014).
22. A. M. Vrabioiu, S. A. Gerber, S. P. Gygi, et al., J. Biol. Chem. **279** (4), 3111 (2004).
23. M. Farkasovsky, P. Herter, B. Voss, and A. Wittinghofer, Biol. Chem. **386** (7) (2005).
24. M. Mendoza, A. A. Hyman, and M. Glotzer, Curr. Biol. **12** (21), 1858 (2002).
25. D. Vardi-Oknin, M. Golan, and N. J. Mabjeesh, PLoS One **8** (8), e73179 (2013).
26. W. Blum, T. Henzi, L. Pecze, et al., Oncotarget **10** (65), 6944 (2019).
27. D. Angelis, E. P. Karasmanis, X. Bai, and E. T. Spiliotis, PLoS One **9** (5), e96390 (2014).
28. K. K. Kim, R. K. Singh, N. Khazan, et al., Sci. Rep. **10** (1) (2020).
29. L. R. Heasley, G. Garcia, and M. A. Mcmurray, Eukaryotic Cell **13** (11), 1411 (2014).
30. G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, et al., J. Computer-Aided Mol. Design **27** (3), 221 (2013).
31. S. Kim, J. Chen, T. Cheng, et al., Nucl. Acids Res. **49** (D1), D1388 (2021).
32. S. L. Dixon, A. M. Smondyrev, and S. N. Rao, Chem. Biol. Drug Design **67** (5), 370 (2006).
33. R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, et al., J. Med. Chem. **49** (21), 6177 (2006).
34. D. A. Case, T. E. Cheatham 3rd, T. Darden, et al., J. Comput. Chem. **26** (16), 1668 (2005).
35. K. J. Bowers, D. E. Chow, H. Xu, et al., in *Proc. 2006 ACM/IEEE Conf. on Supercomputing (SC'06)* (2006), p. 84.
36. D. A. Filimonov, A. A. Lagunin, T. A. Gloriozova, et al., Chem. Heterocyclic Compounds **50** (3), 444 (2014).
37. O. Trott and A. J. Olson, J. Comput. Chem. (2009).
38. I. A. Guedes, A. M. S. Barreto, D. Marinho, et al., Sci. Rep. **11**, 3198 (2021).
39. A. Grosdidier, V. Zoete, and O. Michielin, Nucl. Acids Res. **39**, W270 (2011).
40. Y. Liu, M. Grimm, W. Dai, et al., Acta Pharmacol. Sinica **41** (1), 138 (2019).
41. Y. Lee, Toxicol. Res. **33** (4), 273 (2017).

42. X. Ye, R. L. Krohn, W. Liu, et al., Mol. Cell Biochem. **196** (1–2), 99 (1999).
43. U. Lewandowska, K. Szewczyk, K. Owczarek, et al., Nutrition and Cancer **65** (8), 1219 (2013).
44. K.-C. Choi, S. Park, B. J. Lim, et al., Biochem. J. **433** (1), 235 (2011).
45. A. Shilpi, S. Parbin, D. Sengupta, et al., Chemico-Biological Interactions **233**, 122 (2015).
46. G. G. Mackenzie, A. M. Adamo, N. P. Decker, and P. I. Oteizaet, Biochem. Pharmacol. **75** (7), 1461 (2008).
47. J. F. Burrows, S. Chanduloy, M. A. McIlhatton, et al., J. Pathology **201** (4), 581 (2003).
48. V. V. Voevodin, A. S. Antonov, D. A. Nikitenko, et al., Supercomput. Front. Innovations **6** (2), 4 (2019).

Procyanidin B3 as a Potential Inhibitor of Human Septin 9

A.V. Vakhrusheva*, A.V. Kudryavtsev*, O.S. Sokolova*, **, and K.V. Shaitan *, ***

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

***Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, International University Park Road 1, Guangdong Province, Shenzhen 517182, Chinese People's Republic*

****Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

Septin cytoskeletal proteins are involved in many cellular processes; changes in gene expression are a hallmark of cancer. In this context, septins emerge as a potential target for cancer cells. In search of new small molecules that may affect the organization of septin filaments in the cellular structures, a virtual screening of the PubChem database compound library was performed and procyanidin B3, a flavonoid lipid molecule, with better affinity than other substances, was selected. Molecular modeling showed that procyanidin B3 can interact with the septin monomer SEPT9 in the region of the G1 and G4 motifs important for GTP binding and prevent dimerization of septin monomers. Therefore, procyanidin B3 could be considered to be a promising compound to affect the structure of septin filaments in cancer cells.

Keywords: septin, conformational changes, SEPT9, procyanidin B3, molecular modeling, pharmacophore

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1056–1064

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

НИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕМОГЛОБИНА В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

© 2021 г. Д.И. Грачев*, **, К.Б. Шумаев, ***, О.В. Космачевская***, А.Ф. Топунов***, Э.К. Рууге*, ****

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

***Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а*

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

E-mail: di.grachev@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 31.07.2021 г.
После доработки 31.07.2021 г.
Принята к публикации 14.09.2021 г.

Комплексы оксида азота (NO) с железом гемовой группы гемоглобина (Hb(II)NO) и динитрозильные комплексы железа с тиолами, в том числе с цистеиновыми остатками гемоглобина (Hb-ДНКЖ), могут играть важную роль в процессах окислительного, галогенирующего и нитрозативного стресса в сердечно-сосудистой системе. В работе в различных модельных системах с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса парамагнитных комплексов NO и спиновых аддуктов DEPMPO рассмотрено взаимодействие гемоглобиновых комплексов NO двух этих типов с активными формами галогенов, кислорода и азота, а также алкоксильными и алкилперекисными радикалами. Показано, что хлорноватистая кислота (гипохлорит) и пероксинитрит количественно разрушают Hb-ДНКЖ. В присутствии дитионита S-нитрозоглутатион может участвовать в нитрозилировании дезоксигемоглобина с образованием Hb(II)NO, тогда как добавление в эту систему пероксинитрита приводит к формированию динитрозильных комплексов железа. Вместе с тем Hb(II)NO и Hb-ДНКЖ снижают уровень органических свободных радикалов, продуцируемых в реакции гемоглобина с гидропероксидом трет-бутила. Полученные данные указывают на способность исследованных нитрозильных комплексов гемоглобина перехватывать активные формы кислорода, азота и галогенов и тем самым влиять на процессы свободнорадикального окисления.

Ключевые слова: окислительный стресс, динитрозильные комплексы железа, гемоглобин, антиоксиданты, электронный парамагнитный резонанс, спиновые ловушки.

DOI: 10.31857/S0006302921060028

Изучение воздействия окислительного, галогенирующего и нитрозативного стресса на метаболизм оксида азота (NO) имеет весьма важное значение как для общего понимания физиологических процессов с участием NO и его комплексов, в первую очередь в сердечно-сосудистой системе, так и для изучения патогенеза различных заболеваний, возможностей терапевтического воздействия, а также разработки новых методов диагностики.

Во многих случаях, например при воспалении, проявления окислительного, нитрозативного и галогенирующего стрессов тесно связаны друг с другом. Наиболее существенную роль в развитии различных патофизиологических процессов играют активные формы галогенов, в частности хлорноватистая кислота (HClO), активные формы азота (пероксинитрит, нитроксильный анион и др.), а также активные формы кислорода (различные гидропероксиды, гидроксильный и супероксидный радикалы). Эти активные метаболиты вызывают модификацию и инактивацию биомолекул [1, 2], причем общими мишенями их действия в белках являются тиольные (–SH) группы и металлсодержащие центры. В гемоглобине (Hb) в качестве таких функциональных групп выступают гем и SH-группы цистеинов, в первую очередь остатков Cys93 β-субъединиц.

Наряду с транспортом кислорода гемоглобин участвует в метаболизме столь важной сигнальной молекулы, как оксид азота. Так, оксигемоглобин ($Hb(II)O_2$) реагирует с NO, окисляя его до нитрата (NO-диоксигеназная реакция) [3]. Сле-

Сокращения: Hb – гемоглобин, ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа.

дует отметить, что интермедиатом этой реакции является связанный с гемовым железом пероксинитрит. С другой стороны, дезоксигемоглобин может действовать как нитритредуктаза с образованием оксида азота [4, 5]. Тем не менее NO, продуцируемый в эритроцитах при восстановлении нитрита, будет далее реагировать с другими молекулами гемоглобина. Известно, что ферроформа гема (порфирин-Fe(II)) связывает NO с очень высокой аффинностью, константа диссоциации образующегося нитрозильного комплекса гемового железа (Hb(II)NO) находится в пределах 10^{-10}–10^{-11} М [4]. Комплекс ферриформы гемовой группы (порфирин-Fe(III)) с оксидом азота намного менее прочен, константа его диссоциации равна 2.5×10^{-4} М. Образование нитрозильных комплексов гемового железа происходит в следующих реакциях:

$$\text{порфирин-Fe(II)} + \text{NO} \rightarrow \text{порфирин-Fe(II)-NO}, \quad (1)$$

$$\text{порфирин-Fe(III)} + \text{NO} \rightarrow \text{порфирин-Fe(III)-NO}. \quad (2)$$

Считается, что эти реакции, а также NO-диоксигеназная и нитритредуктазная реакции играют ключевую роль в регуляции гемоглобином сигнальной функции оксида азота [3, 4]. Вместе с тем NO может связываться с ионами железа и тиольными группами Cys93 β-субъединиц Hb с образованием динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [6–8]. Кроме того, в результате нитрозилирования этих SH-групп гемоглобина формируется белковый S-нитрозотиол [6]. В то же время ферриформа Hb (метгемоглобин) в сочетании с нитритом и тиолами участвует в продукции низкомолекулярных S-нитрозотиолов, в том числе S-нитрозоглутатион (GSNO) [5]. Нужно отметить, что S-нитрозотиолы и ДНКЖ, связанные с белками или низкомолекулярными лигандами, ответственны за реализацию большого числа физиологических функций оксида азота [5–8].

В свою очередь такие метаболиты NO, как GSNO и нитрит, в условиях, моделирующих окислительный и карбонильный стресс, вызывают модификацию винильных групп порфирина метгемоглобина и формирование Hb(II)NO [9]. Недавно нами было показано, что включение Cys-93 β-субъединиц как лигандов в состав ДНКЖ является важным способом регуляции реакционной способности SH-групп Hb, причем формирование этих комплексов NO защищает тиольные группы от окисления гидропероксидом *трет*-бутила [10].

Авторы работ [11, 12] установили, что цитопротекторное и антиоксидантное действие NO в культуре обработанных гидропероксидом *трет*-бутила эритролейкемических клеток обусловлено как его взаимодействием с органическими свободными радикалами, так и образованием нитрозильных комплексов гемового и негемового железа. Известно также, что нитрозилирование гемового железа может ингибировать прооксидантное действие гемопротеидов [13–15]. Имеются данные о том, что NO способен ингибировать реакции фентоновского типа, т.е. генерацию гидроксильного радикала при взаимодействии пероксида водорода с ионами двухвалентного железа. Однако механизм подобного действия NO остается не вполне ясным [16, 17].

Важно, что Hb(II)NO и моноядерные ДНКЖ являются парамагнитными, что позволяет исследовать их с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [6–8]. Структура этих нитрозильных комплексов гемового и негемового железа представлена на рис. 1.

Целью настоящей работы является изучение взаимодействия между различными прооксидантами и комплексами гемоглобина с оксидом азота в системах, моделирующих галогенирующий, нитрозативный и оксилительный стресс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Парамагнитные комплексы NO с гемоглобином регистрировали методом ЭПР-спектроскопии в суспензии эритроцитов крови человека и в модельных системах, содержавших бычий гемоглобин (Sigma-Aldrich, США) в различных реакционных смесях, в том числе с гипохлоритом натрия (NaClO) и донорами NO – DEA/NO (diethylamine NONOate) (Sigma-Aldrich, США). Спиновая ловушка DEPMPO (5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пирролин-N-оксид) была получена от фирмы Cayman Chemical Europe (Эстония).

Пероксинитрит ($ONOO^-$) был синтезирован в соответствии с методикой, описанной в работах [7, 18]. GSNO получали, смешивая эквимолярные концентрации восстановленного глутатиона и нитрита в кислой среде [9].

ДНКЖ с фосфатными лигандами получали, пропуская в сосуде Тунберга газообразный оксид азота через раствор $FeSO_4$ в 100 мМ K,Na-фосфатном буфере (pH 6.8). Для получения ДНКЖ, связанных с глутатионом, к фосфатным комплексам добавляли восстановленный глутатион, в результате чего Fe-NO-группа переходила на новые лиганды.

Эритроциты крови человека были получены в клинико-диагностической лаборатории НМИЦ кардиологии (Москва). Эритроциты отмывали центрифугированием в изотоническом растворе (0.9% NaCl) при ускорении 1000 *g* в течение 5 мин, далее надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в изотоническом растворе. Процедуру повторяли еще два раза.

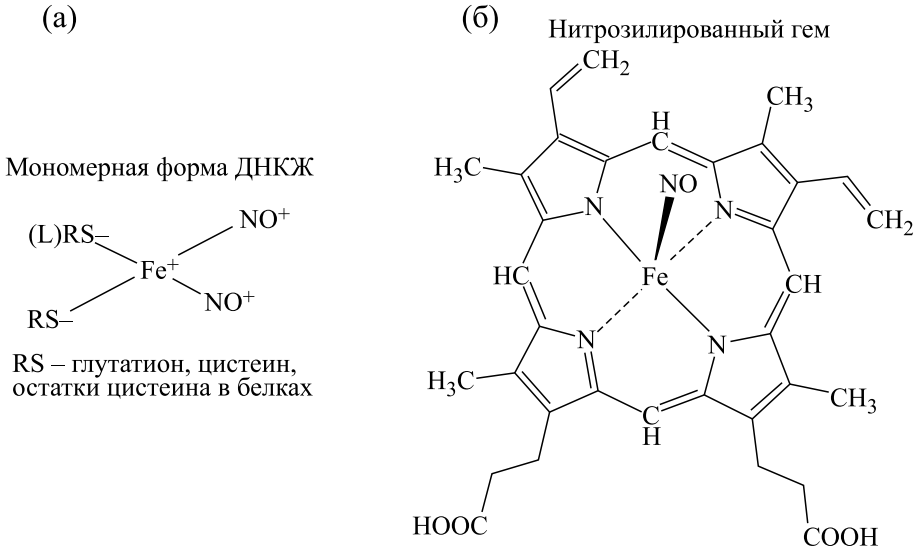


Рис. 1. (а) – Динитрозильные комплексы железа с тиольными лигандами (в белках один из остатков цистеина может быть заменен на другой лиганд (L), например, на остаток гистидина); (б) – нитрозилированный по железу гем (порфирин-Fe(II)-NO).

Концентрация гемоглобина, растворенного в 0.2 М K,Na-фосфатном буфере (pH 7.5), составляла 0.4 мМ.

Hb-ДНКЖ получали в результате добавления к раствору метгемоглобина фосфатных ДНКЖ в молярном соотношении 1 : 2.5.

Концентрация дитионита натрия во всех экспериментах с его использованием составляла 70 мМ.

Регистрация спектров ЭПР динитрозильных комплексов железа и спиновых аддуктов DEPMPO. Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25°C) на спектрометре E-109E фирмы Varian (США), а также малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Беларусь).

Условия записи спектров ЭПР: на Varian E-109E СВЧ-мощность 10 мВт, СВ-частота 9.15 ГГц; на ЭПР-спектрометре ESR 70-03 XD/2 частота 9.35 ГГц, ослабление СВЧ 5 дБ. Амплитуда модуляции внешнего магнитного поля составляла 0.2 мТл при регистрации сигналов ДНКЖ и Hb(II)NO, а при регистрации сигналов спиновых аддуктов DEPMPO – 0.025 мТл.

Для исследования алкоксильного и алкилперекисного радикалов *трет*-бутила использовали спиновую ловушку DEPMPO в соответствии с методикой, которая продемонстрирована в работах [19–21].

Статистический анализ. Обработка и анализ экспериментальных результатов, в том числе статистические расчеты, были проведены в программе Origin Pro 8 (OriginLab Corp., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в работе [22] было показано, что низкомолекулярные ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) эффективно защищают эритроциты человеческой крови от гемолиза, вызванного хлорноватистой кислотой. В связи с этим мы также исследовали взаимодействие GS-ДНКЖ с HClO в присутствии эритроцитов и донора NO, который имитировал продукцию оксида азота NO-синтазой. В данной системе моделировался галогенирующий стресс, возникающий при респираторном взрыве в ходе воспалительного ответа. Из спектров ЭПР, представленных на рис. 2, видно, что в суспензии эритроцитов человека, содержащей донор NO (DEA/NO), GS-ДНКЖ и HClO, образуется Hb(II)NO (рис. 1б), хотя кинетика этого процесса более медленная, чем в аналогичной реакционной среде без HClO (рис. 2а). Вместе с тем GS-ДНКЖ в этих условиях разрушаются почти полностью. Быстрое разрушение GS-ДНКЖ под действием HClO согласуется с данными работы [22]. При этом регенерация ДНКЖ не происходит даже в присутствии свободного NO, образующегося при распаде DEA/NO. В то же время Hb(II)NO внутри эритроцитов, вероятно, менее доступен окислению хлорноватистой кислотой. Также было показано, что ДНКЖ, связанные с бычьим гемоглобином, количественно разрушаются под действием HClO (рис. 3). Следовательно, если Hb-ДНКЖ образуется в модельной системе с эритроцитами, описанной выше, то эти комплексы NO не регистрируются, поскольку они должны быстро разрушаться.

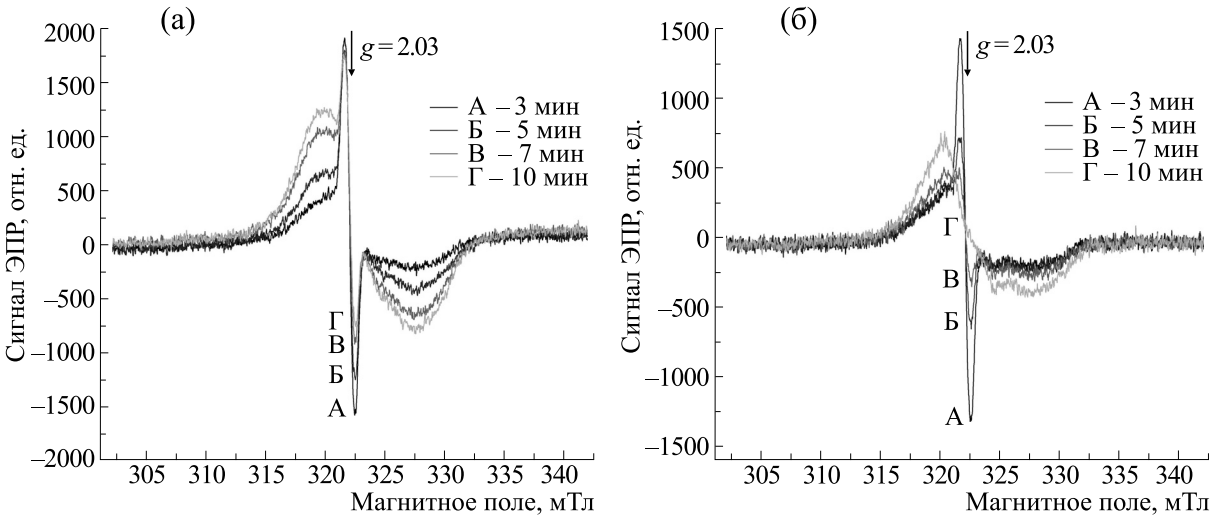


Рис. 2. Спектры ЭПР, зарегистрированные в реакционной среде, содержавшей эритроциты, 0.8 мМ GS-ДНКЖ и 10 мМ DEA/NO (а), а также после добавления в реакционную среду 0.1 мМ NaOCl (б). Узкий сигнал с *g*-фактором 2.03 принадлежит ДНКЖ с глутатионовыми лигандами, широкий сигнал является суперпозицией сигналов ЭПР нитрозилированных гемовых групп Hb. Во всех образцах содержался изотонический K,Na-фосфатный буфер (pH 7.4).

В условиях, моделирующих нитрозативный стресс, исследовали взаимодействие Hb-ДНКЖ и пероксинитрита ($ONOO^-$). Было показано, что пероксинитрит, аналогично HClO, дозозависимо разрушает Hb-ДНКЖ. Кинетика разрушения Hb-ДНКЖ при трех разных концентрациях пероксинитрита в сравнении с контрольным образцом без пероксинитрита продемонстрирована на рис. 4. Нельзя исключить, что при разрушении Hb-ДНКЖ высвобождается NO и происходит нитрозилирование гемовой группы гемоглобина. Такой процесс происходил при разрушении Hb-ДНКЖ под действием супероксида [8]. Тем не менее в данном эксперименте образование Hb(II)NO не наблюдалось.

Известно, что образование Hb(II)NO в присутствии S-нитрозоглутатиона существенно стимулируется таким сильным восстановителем, как дитионит [23]. Авторы статьи предполагают, что при восстановлении GSNO образуется свободный NO и тиолят-анион глутатиона:

$$GSNO + e^- \rightarrow GSNO^- \rightarrow GS^- + NO. \qquad (3)$$

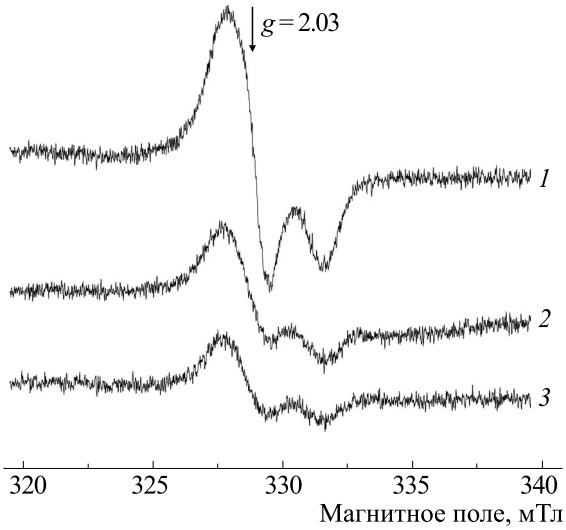


Рис. 3. Разрушение гемоглобиновых ДНКЖ под действием хлорноватистой кислоты. Спектры ЭПР Hb-ДНКЖ (концентрация 0.4 мМ): *1* – образец без хлорноватистой кислоты (контрольный); *2* – то же, что и (1), + HClO в концентрации 0.02 мМ; *3* – то же, что и (1), + HClO в концентрации 0.2 мМ. Во всех образцах содержался 100 мМ K,Na-фосфатный буфер.

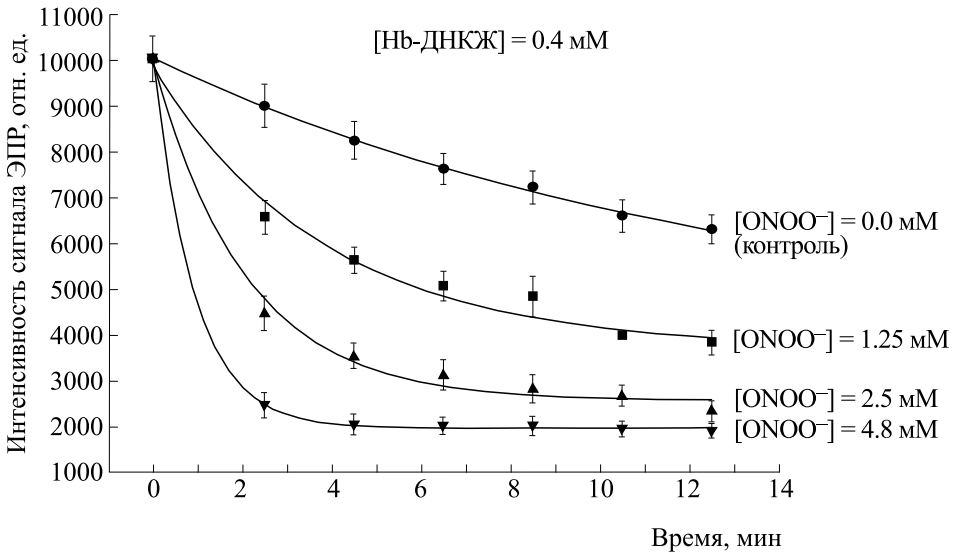


Рис. 4. Кинетические кривые дозозависимого разрушения Hb-ДНКЖ (концентрация 0.4 мМ) под действием пероксинитрита (используемые концентрации указаны на рисунке).

Действительно, в реакционной среде, содержащей метгемоглобин, дитионит и GSNO, мы наблюдали образование Hb(II)NO (рис. 5, спектр 1). Кроме того, на этом спектре мы видим ЭПР-сигнал самого дитионита. Следует отметить, что дитионит в данной системе также восстанавливает метгемоглобин до дезоксигемоглобина. После добавления в реакционную среду пероксинитрита мы наблюдаем появление сигнала ЭПР с g-фактором 2.03, характерного для ДНКЖ, который, по-видимому, соответствует глутатион-содержащим ДНКЖ. Вместе с тем сохраняется сигнал нитрозильного комплекса гемового железа, тогда как сигнал дитионита исчезает (рис. 5, спектры 2–4). В литературе имеются данные, что под действием хлорноватистой кислоты или пероксинитрита происходит высвобождение гема в гемолизате эритроцитов [7, 24]. Также $ONOO^-$ вызывает модификацию и деструкцию гемовых групп Hb и NO-синтазы [9, 25]. Можно предполо-

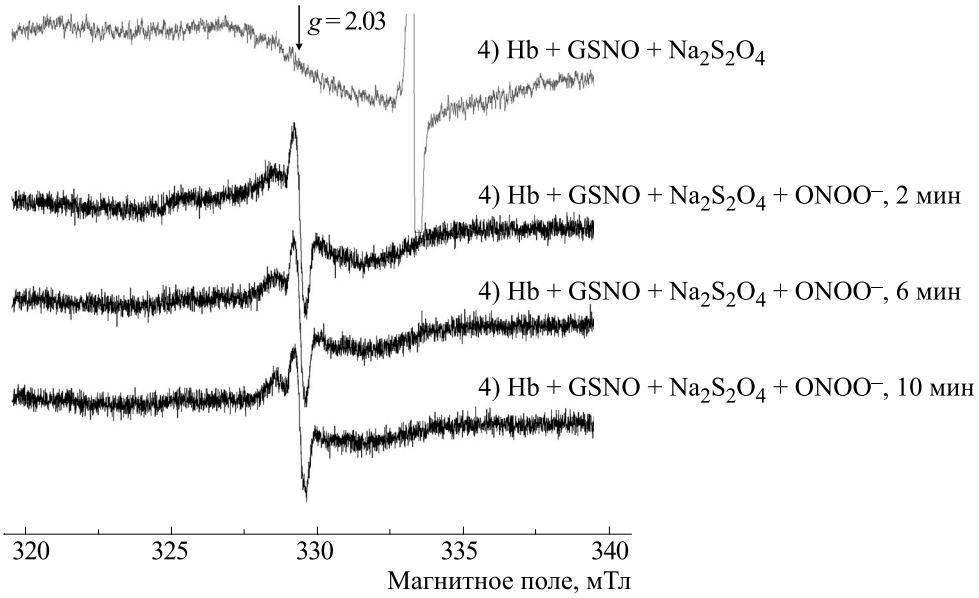


Рис. 5. Спектры ЭПР реакционной смеси, содержащей: *1* – 0.5 мМ гемоглобина, 12 мМ S-нитрозоглутатиона (GSNO) и 70 мМ дитионита натрия ($Na_2S_2O_4$); *2–4* – то же + пероксинитрит (8 мМ $ONOO^-$ через 2, 6 и 10 мин после добавления пероксинитрита соответственно).

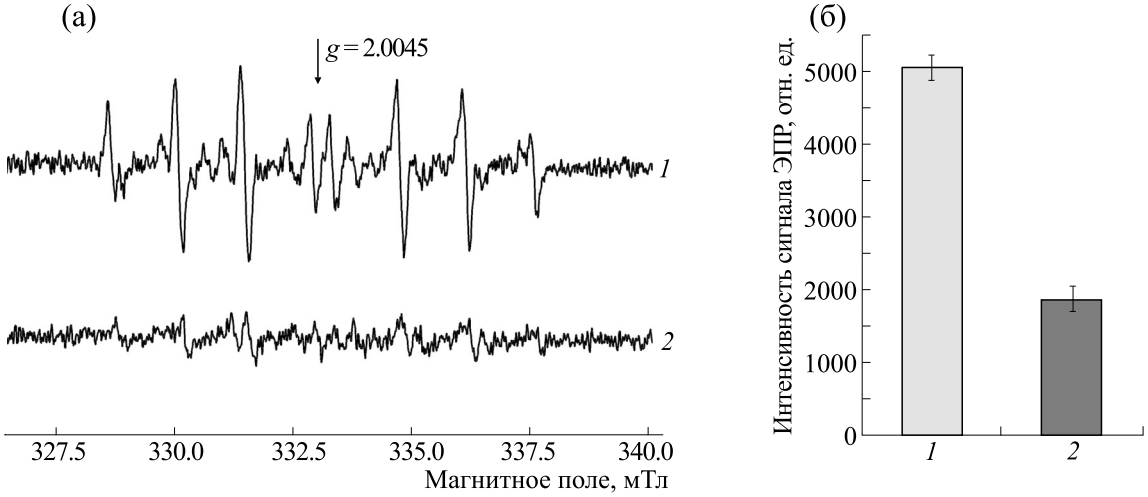


Рис. 6. Антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ. (а) – Спектры ЭПР спинового аддукта DEPMPO, демонстрирующие антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ. Концентрация DEPMPO в реакционной смеси составляла 70 мМ, гидропероксида *трет*-бутила – 1 мМ, метгемоглобина (1) или Hb-ДНКЖ (2) – 0.3 мМ. (б) – Средние значения интенсивности сигнала ЭПР спинового аддукта DEPMPO в двух группах образцов: *1* – контрольные образцы с 0.3 мМ метгемоглобина, *2* – образцы с Hb-ДНКЖ в расчетной концентрации 0.3 мМ.

жить, что S-нитрозоглутатион участвует в образовании не только Hb(II)NO, но и ДНКЖ, причем источником железа для последних является деструкция гемовой группы под действием пероксинитрита, а тиольный лиганд, как и NO, образуется в реакции (3). В этом случае связывание железа в составе ДНКЖ может ингибировать реакции фентоновского типа, в которых взаимодействие ионов переходных металлов с гидропероксидами приводит к генерации свободных радикалов.

Взаимодействие гемопротеидов с различными гидропероксидами можно моделировать при помощи гидропероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH) [11, 20]. Считается, что реакции гемопротеидов с гидропероксидом *трет*-бутила приводят к образованию органических свободных радикалов [8, 20, 26]:

$$\text{порфирин-Fe(II)} + t\text{-BOOH} \rightarrow \text{порфирин-Fe(III)} + t\text{-BO}\bullet + OH^-, \quad (4)$$

$$\text{порфирин-Fe(III)} + t\text{-BOOH} \rightarrow \text{порфирин-Fe(IV)=O} + t\text{-BO}\bullet + H^+, \quad (5)$$

$$\text{порфирин-Fe(III)} + t\text{-BOOH} \rightarrow \text{порфирин}\bullet\text{-Fe(IV)=O} + t\text{-BOH}, \quad (6)$$

$$\text{порфирин}\bullet\text{-Fe(IV)=O} + t\text{-BOOH} \rightarrow \text{порфирин-Fe(IV)=O} + t\text{-BOO}\bullet + H^+, \quad (7)$$

$$\text{порфирин-Fe(IV)=O} + t\text{-BOOH} \rightarrow \text{порфирин-Fe(III)-OH} + t\text{-BOO}\bullet, \quad (8)$$

$$t\text{-BOO}\bullet \rightarrow CH_3\bullet + \text{ацетон}, \quad (9)$$

$$CH_3\bullet + O_2 \rightarrow CH_3OO\bullet. \quad (10)$$

Кроме того, продуктом этих реакций является такой сильный окислитель, как оксоферрильный гем (порфирин-Fe(IV)=O). В условиях окислительного стресса аналогичные реакции гемовых групп с липидными гидропероксидами стимулируют перекисное окисление липидов и окислительную модификацию белков и других биополимеров.

В наших экспериментах также исследовалось взаимодействие между гемоглобином или его комплексами с NO и гидропероксидом *трет*-бутила, причем для регистрации свободных радикалов мы использовали спиновую ловушку DEPMPO [20, 21]. На рис. 6а представлены спектры спиновых аддуктов DEPMPO со свободнорадикальными интермедиатами реакции метгемоглобина и *t*-BOOH. Исходя из данных работы [20], можно заключить, что основным свободным радикалом, образующимся в исследуемой модельной системе, является алкоксильный радикал (*трет*-бутоксильный радикал, *t*-BO•). Кроме того, в меньшей степени регистрируется метил-

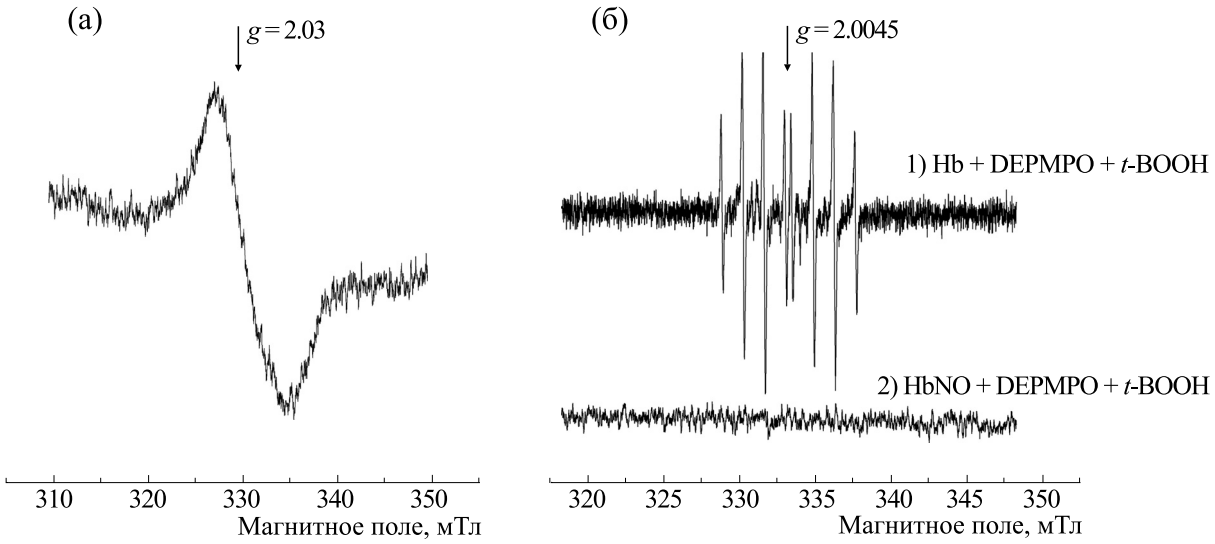


Рис. 7. (а) – Спектр ЭПР Hb(II)NO, образованных при добавлении соли Анджели (концентрация $Na_2(ONNO_2)$ в образце – 12 мМ) к 0.3 мМ раствору метгемоглобина. (б) – Антиоксидантное действие Hb(II)NO (донор NO – соль Анджели) в системе с гидропероксидом *трет*-бутила. Спектры образца 1, который содержал 0.3 мМ метгемоглобина, 70 мМ DEPMPO, 2 мМ *t*-BOOH; в случае образца 2 сначала получали Hb(II)NO добавлением соли Анджели к раствору метгемоглобина, затем в образец добавляли DEPMPO и *t*-BOOH (конечные концентрации 70 и 2 мМ соответственно).

пероксильный радикал ($CH_3OO\bullet$) (реакция 10). Как видно из рис. 6, Hb-ДНКЖ достоверно снижают уровень свободных радикалов, формирующихся в реакциях (4)–(10). Существенное уменьшение концентрации свободнорадикальных интермедиатов наблюдалось уже при молярном соотношении ДНКЖ : *t*-BOOH ~ 1 : 9 (молярное соотношение Hb : *t*-BOOH равно 1 : 4) (рис. 6б). Можно предположить, что этот эффект обусловлен реакциями алкоксильных и алкилпероксильных радикалов с NO-лигандами ДНКЖ [27]. Считается также, что взаимодействие NO и свободных радикалов липидов приводят к терминации цепных реакций перекисного окисления липидов и образованию нитролипидов [27]. В условиях наших экспериментов оксид азота может высвобождаться при распаде ДНКЖ. Ранее мы показали, что ДНКЖ с глутатионовыми лигандами восстанавливают оксоферрильную гемовую группу миоглобина и перехватывают свободные радикалы, образующиеся при взаимодействии этого гемопротеида с *t*-BOOH [26].

Интересно, что нитрозилирование гемоглобина по железу гема приводит к еще большему антиоксидантному эффекту (рис. 7). Нитрозилирование гема производили путем добавления донора нитроксильного аниона (NO^-) – соли Анджели – к раствору метгемоглобина. В этом случае, в отличие от реакции (2), происходит восстановление ферроформы гема и образование Hb(II)NO (рис. 7а):

$$\text{порфирин-Fe(III)} + NO^- \rightarrow \text{порфирин-Fe(II)NO}. \quad (11)$$

После добавления в реакционную систему гидропероксида *трет*-бутила и спиновой ловушки сигнал спинового аддукта DEPMPO не наблюдался, в отличие от контрольного образца с раствором метгемоглобина без соли Анджели (рис. 7б). Можно предположить, что нитрозилгемоглобин восстанавливает *t*-BOOH, как это было показано для нитрозилмиоглобина в работе [15], причем при взаимодействии последнего с гидропероксидами образуется нитрит и метмиоглобин:

$$\text{порфирин-Fe(II)-NO} + ROOH + H_2O \rightarrow \text{порфирин-Fe(III)} + ROH + HNO_2 + OH^-. \quad (12)$$

Вместе с тем подобный механизм взаимодействия с гидропероксидами предлагается и для нитрозильных комплексов негемового железа [11, 17].

ВЫВОДЫ

Деструкция ДНКЖ в условиях, моделирующих галогенирующий и нитрозилирующий стресс, может быть важным элементом регуляции метаболизма оксида азота, а также влиять на сигнальную функцию этой важнейшей молекулы. Кроме того, взаимодействие комплексов NO с гемоглобином с прооксидантными и антиоксидантными системами в системе кровообращения требует дальнейшего исследования. Нужно отметить, что нарушение функционирования различных форм NO играет ключевую роль в развитии многих патологий сердечно-сосудистой системы. Также не исключено, что ДНКЖ предотвращают модификацию гемоглобина, перехватывая активные формы азота и галогенов, а также свободные радикалы, образующиеся при распаде органических гидропероксидов. Действительно, в предшествующих работах нами было установлено, что комплексы железа с NO способны ингибировать окислительную модификацию гемоглобина [7, 8, 10]. В настоящей работе подтверждаются основные выводы наших предыдущих работ об антиоксидантном и антирадикальном действии комплексов NO.

По мнению авторов, в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

– ДНКЖ эффективно перехватывают свободные радикалы, образующиеся в различных системах, моделирующих окислительный стресс при некоторых патологиях;

– ДНКЖ являются одним из универсальных регуляторов свободнорадикальных процессов в живых системах и в этом качестве обладают значительным терапевтическим потенциалом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 19-015-00444 и 19-29-12052.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, Physiol. Rev. **87** (1), 315 (2007).
2. О. М. Панасенко, Т. И. Торховская, А. В. Соколов и др., Успехи биол. химии **60**, 75 (2020).
3. P. R. Gardner, Scientifica **2012** (50), 683729 (2012).
4. C. Helms and D. B. Kim-Shapiro, Free Radic. Biol. Med. **61**, 464 (2013).
5. E. Nagababu and J. M. Rifkind, Cell Biochem. Biophys. **67** (2), 385 (2013).
6. E. Faassen and A. F. Vanin, *Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide* (Elsevier Science, Amsterdam, 2007).
7. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide **18**, 37 (2008).
8. K. B. Shumaev, O. V. Kosmachevskaya, A. A. Timoshin, et al., Methods Enzymol. **436**, 445 (2008).
9. O. V. Kosmachevskaya, K. B. Shumaev, E. I. Nasybullina, et al., Clin. Chem. Lab. Med. **52** (1), 161 (2014).
10. О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, К. Б. Шумаев и др., Прикл. биохим. микробиол. **56** (5), 436 (2020).
11. N. V. Gorbunov, J. C. Yalowich, A. Gaddam, et al., J. Biol. Chem. **272** (19), 12328 (1997).
12. J. C. Yalowich, N. V. Gorbunov, A. V. Kozlov, et al., Biochemistry **38** (33), 10691 (1999).
13. J. Kanner, I. Ben-Gera, and S. Berman, Lipids **15**, 944 (1980).
14. J. Kanner, S. Harel, and R. Granit, Lipids **27** (1), 46 (1992).
15. C. P. Baron, J. S. Møller, L. Skibsted, et al., Free Radic. Res. **41**, 892 (2007).
16. V. E. Kagan, A. V. Kozlov, and Y. Y. Tyurina, Antioxid. Redox Signal. **3** (2), 189 (2001).
17. C. Lu and W. H. Koppenol, J. Biol. Inorg. Chem. **10** (7), 732 (2005).
18. K. M. Robinson and J. S. Beckman, Methods Enzymol. **396**, 207 (2005).
19. H. Karoui, N. Hogg, C. Fréjaville, et al., J. Biol. Chem. **271** (11), 6000 (1996).
20. H. Karoui, F. Chalier, J. P. Finet, et al., Org. Biomol. Chem. **9** (7), 2473 (2011).
21. K. Stolze, N. Udilova, and H. Nohl, Free Radic. Biol. Med. **29** (10), 1005 (2000).
22. K. B. Shumaev, I. V. Gorudko, O. V. Kosmachevskaya, et al., Oxid. Med. Cell Longev. **2019**, 2798154 (2019).
23. M. R. Kumar, T. Clover, A. D. Olaitan, et al., Nitric Oxide **77**, 96 (2018).
24. J. Y. Oh, A. Williams, and R. P. Patel, Arch. Biochem. Biophys. **662**, 111 (2019).
25. W. Chen, L. J. Druhan, C. A. Chen, et al., Biochemistry **49** (14), 3129 (2010).
26. К. Б. Шумаев, Н. Э. Петрова, И. В. Заббарова и др., Биохимия **69** (5), 699 (2004).
27. К. Б. Шумаев, О. В. Космачевская, Д. И. Грачев, и др., Биомед. химия **67** (2), 162 (2021).

Nitrosyl Hemoglobin Comlexes in Various Model Systems

D.I. Grachev*, **, K.B. Shumaev, ***, O.V. Kosmachevskaya***, A.F. Topunov***, and E.K. Ruuge*, ****

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

***National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 3rd Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

****Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

Complexes of nitric oxide (NO) with iron from the heme group of hemoglobin (HbNO) and dinitrosyl iron complexes with thiols, including complexes with hemoglobin cysteine residues (Hb-DNIC), may play an important role in the processes associated with oxidative, halogenative, and nitrosative stress in the cardiovascular system. In our work, in various model systems, electron paramagnetic resonance spectrum of paramagnetic NO complexes and DEPMPO spin adducts were used to explore the interaction of these two types of NO hemoglobin complexes with reactive halogen, oxygen, and nitrogen species, as well as with alkoxyl and alkyl peroxide radicals. It was shown that hypochlorous acid (sodium hypochlorite) and peroxynitrite quantitatively destroy Hb-DNIC. In the presence of sodium dithionite, S-nitrosoglutathione can participate in heme nitrosylation of deoxyhemoglobin with the formation of Hb(II)NO, but when this system is exposed to peroxinitrite, dinitrosyl iron complexes are formed. At the same time, Hb(II)NO and Hb-DNIC reduce the level of organic free radicals produced in the reaction between hemoglobin and tert-butyl hydroperoxide. The results obtained demonstrate the ability of the nitrosyl hemoglobin complexes under study to intercept reactive oxygen, nitrogen and halogen species and thereby influence the processes of free radical oxidation.

Keywords: oxidative stress, dinitrosyl iron complexes, hemoglobin, antioxidants, electron paramagnetic resonance, spin traps

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1065–1073

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.2.01:(57.052.2+577.322.23+577.322.54)

АНАЛИЗ МОДЕЛЕЙ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА ГЕМОГЛОБИНОМ

© 2021 г. И.А. Лавриненко*, Г.А. Вашанов*, В.Ю. Сулин*, Ю.Д. Нечипуренко**

**Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская площадь, 1*

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

E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 14.05.2021 г.
После доработки 26.07.2021 г.
Принята к публикации 27.07.2021 г.

Дан обзор наиболее известных моделей, описывающих связывание гемоглобина с кислородом. Предложен подход, позволяющий на основе формальных критериев находить оптимальные математические и физические модели кооперативного связывания кислорода гемоглобином. При помощи методов регрессионного и кластерного анализа на основе экспериментальных данных диссоциации оксигемоглобина проведено сравнение основных моделей оксигенации, несущих в своей основе степенную и экспоненциальную зависимости. Показано, что модели Эдера, Бернарда и Хилла, соответствующие степенным функциям, обладают преимуществом в описании связывания олигомерным белком лиганда по сравнению с моделями, соответствующими экспоненциальным функциям. Установлено, что последовательная четырехступенчатая модель Кошланда–Немети–Филмера, которая соответствует уравнению Эдера, наилучшим образом позволяет описать экспериментальные данные.

Ключевые слова: гемоглобин, аллостерический эффект, кооперативность, математическая модель кооперативного связывания, изотермы адсорбции, связывание белков с лигандами, регрессионный анализ, кластерный анализ.

DOI: 10.31857/S000630292106003X

Гемоглобин – одна из самых исследованных в молекулярной биологии макромолекул. Именно для гемоглобина было предложено А. Хиллом более ста лет назад знаменитое уравнение, которое описывает кооперативное связывание лигандов с белками [1, 2]. На примере этой молекулы Ж. Моно развил теорию аллостерических взаимодействий [3–6], лежащих в основе многих процессов регуляции биологической активности макромолекул. Под аллостерической регуляцией понимают такой тип регуляции, когда связывание одной молекулы лиганда в одном месте белка влияет на связывание другой молекулы в другом месте (в этом смысле аллостерические взаимодействия можно считать частным случаем более общих кооперативных эффектов, которые проявляются также и в виде «контактных» взаимодействий сближенных в пространстве центров связывания лиганда [7, 8]). До сих пор многие аспекты функционирования гемоглобина остаются неясными. Четыре его каталитически активные субъединицы способны связывать различные лиганды. Этот гетеротетрамер может управлять базовыми функциями входящих в его состав мономеров за счет кооперативных эффектов (см., например, работы [9, 10]). Особый интерес в последнее время вызывают альтернативные и дополнительные функции гемоглобина [11]. Однако и само явление кооперативного связывания кислорода гемоглобином, которое является классическим примером аллостерических взаимодействий, нельзя считать изученным в должной степени, чтобы могли выбрать сейчас одну из многих теоретических моделей его описания. Согласованная работа субъединиц макромолекулы реализуется именно за счет их кооперативного взаимодействия. Высокая функциональная адаптивность гемоглобина к условиям среды организма достигается за счет тонкой подстройки его элементов, работающих как единое целое [12–14]. Формальное описание взаимодействия гемоглобина с лигандами не соответствует уравнению Михаэлиса-Ментен [15, 16]. Именно благодаря кооперативности возникают нелинейные эффекты, описание которых для такой системы проводится посредством самых разных подходов: концептуальных моделей взаимодействия «белок–лиганд», химических ре-

Сокращение: КДО – кривая диссоциации оксигемоглобина.

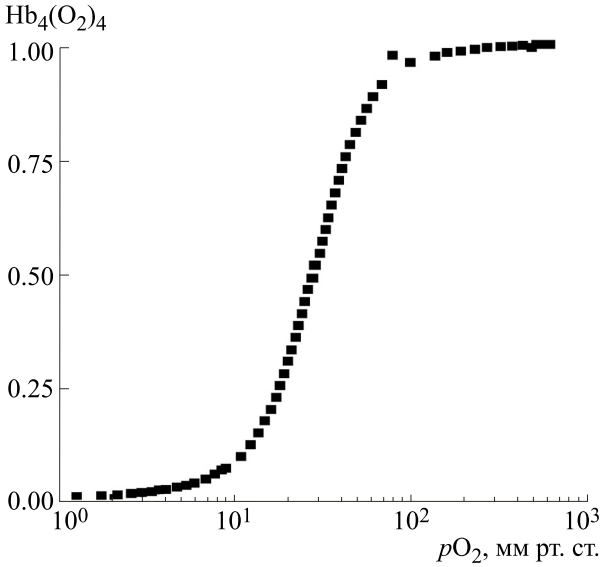


Рис. 1. Экспериментальные точки кривой диссоциации оксигемоглобина (по данным работы [24]). $Hb_4(O_2)_4$ – тетрамер молекулы оксигемоглобина, pO_2 – парциальное давление кислорода.

акций, а также регрессионных моделей. Заметим, что такие подходы в ряде случаев не имеют физического смысла [17–19]. Существует целый ряд различных описаний кооперативных эффектов в молекуле гемоглобина, однако связь между соответствующими моделями в настоящий момент не выявлена и критерии, позволяющие выбрать адекватную (или наилучшую) модель не развиты. Этот вопрос, на наш взгляд, требует специального изучения (см. работы [20, 21]).

Ранее в работе [22] были предложены критерии оценки регрессионных моделей связывания кислорода гемоглобином [23], здесь мы рассматриваем широкий класс моделей, описывающих связывание кислорода гемоглобином, и проводим систематизацию подходов, развитых в этой области.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследования были использованы модели связывания кислорода гемоглобином, анализ которых проводили численными методами на основе экспериментальных данных, опубликованных в работе [24], как одних из наиболее полных и точных известных результатов измерений представленной функциональной зависимости (рис. 1).

Для устранения случайных ошибок измерений эти данные были подвергнуты цифровой обработке с применением алгоритмов кусочно-полиномиального сглаживания (массив 1) [25] и с помощью глобально аппроксимирующих полиномов (массив 2) [26].

Устойчивость решения задачи моделирования кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) оценивали по вышеприведенным массивам, а также по исходным данным (массив 3) [24].

Оптимизация параметров моделей проведена методом наименьших квадратов [27]. Оценка степени соответствия модели экспериментальным данным осуществлена через коэффициент детерминации [28]. Формальная классификация объектов-моделей реализована с помощью кластерного анализа [29].

Необходимые вычисления выполнены в процессоре электронных таблиц MS Excel с модулем Visual Basic for Applications (VBA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описание (обзор) моделей связывания кислорода гемоглобином. Отправной точкой в хронологии построения математических моделей взаимодействия гемоглобин-кислород стало уравнение Гюфнера (1890 г.) [30], описывающее процесс оксигенации как химическую реакцию первого порядка:

$$\mathrm{Hb} + \mathrm{O_2} \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\rightleftarrows}} \mathrm{HbO_2}, \qquad (1)$$

$$y = \frac{\mathrm{HbO_2}}{\mathrm{Hb} + \mathrm{HbO_2}} = \frac{kp}{1 + kp} = \frac{p}{k^{-1} + p} = \frac{p}{p_{50} + p}, \qquad (2)$$

где Hb – дезоксигемоглобин, O_2 – кислород, HbO_2 – оксигемоглобин, α и β – кинетические коэффициенты прямой и обратной реакции, y – степень насыщения гемоглобина кислородом, p – парциальное давление кислорода, $k = \alpha/\beta$ – константа равновесной реакции, k^{-1} – обозначаемая далее, как p_{50} – давление кислорода при $y = 50\%$.

Данная модель не способна объяснить S-образный характер КДО и может быть использована только при расчетах связывания кислорода миоглобином или отдельной субъединицей молекулы гемоглобина, а также служить основой при построении уравнений, учитывающих кооперативный эффект.

Следует также отметить, что уравнения Гюфнера, Лэнгмюра [31] и Михаэлиса–Ментен [32, 33] по сути эквиваленты друг другу, так как описывают сходные физические процессы:

$$\frac{kp}{1 + kp} = \frac{p}{p_{50} + p} = \frac{k'C}{1 + k'C} = \frac{C}{K'' + C} = \frac{[S]}{K_m + [S]}, \qquad (3)$$

где k' – адсорбционная константа, K'' – константа адсорбционного равновесия ($1/k'$), C – равновесная концентрация адсорбата в уравнении

Лэнгмюра, [S] – концентрация субстрата и K_m – константа Михаэлиса в одноименном уравнении.

Уравнение Хилла (1910 г.) [1, 2] опирается на модель, которая представляет собой молекулу гемоглобина в виде полимера, состоящего из h субъединиц и связывающего одновременно h молекул O_2. В этом случае процесс оксигенации рассматривается как реакция h-го порядка:

$$(\mathrm{Hb})_h + h\mathrm{O_2} \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\rightleftarrows}} (\mathrm{HbO_2})_h, \quad (4)$$

$$y = \frac{(kp)^h}{1+(kp)^h} = \frac{p^h}{k^{-h}+p^h} = \frac{p^h}{p_{50}^h+p^h} = \frac{(p/p_{50})^h}{1+(p/p_{50})^h}, \quad (5)$$

где h – константа Хилла.

Г. Эдером (1925 г.) [34] была предложена основанная на гипотезе промежуточного насыщения гемоглобина кислородом модель, в которой связывание лиганда осуществляется последовательно в четыре этапа:

$$\mathrm{Hb_4} + \mathrm{O_2} \underset{\beta_1}{\overset{\alpha_1}{\rightleftarrows}} \mathrm{Hb_4O_2}, \quad (6)$$

$$\mathrm{Hb_4O_2} + \mathrm{O_2} \underset{\beta_2}{\overset{\alpha_2}{\rightleftarrows}} \mathrm{Hb_4(O_2)_2}, \quad (7)$$

$$\mathrm{Hb_4(O_2)_2} + \mathrm{O_2} \underset{\beta_3}{\overset{\alpha_3}{\rightleftarrows}} \mathrm{Hb_4(O_2)_3}, \quad (8)$$

$$\mathrm{Hb_4(O_2)_3} + \mathrm{O_2} \underset{\beta_4}{\overset{\alpha_4}{\rightleftarrows}} \mathrm{Hb_4(O_2)_4}, \quad (9)$$

$$y = \frac{a_1p + 2a_2p^2 + 3a_3p^3 + 4a_4p^4}{4\left(1 + a_1p + a_2p^2 + a_3p^3 + a_4p^4\right)}, \quad (10)$$

где $a_1 = k_1$, $a_2 = k_1k_2$, $a_3 = k_1k_2k_3$, $a_4 = k_1k_2k_3k_4$ – коэффициенты Эдера, $k_i = \alpha_i/\beta_i$ (i = 1, 2, 3 и 4) – константы равновесия реакций, Hb_4 – тетрамер гемоглобина.

Основываясь на гипотезе Ваймана–Аллена [35], предполагающей одновременное присоединение двух молекул кислорода к молекуле гем-белка, С. Бернард (1960 г.) [36] предложил уравнение оксигенации вида:

$$y = \frac{0.5a(p/p_{50})^2 + (p/p_{50})^4}{1 + a(p/p_{50})^2 + (p/p_{50})^4}, \quad (11)$$

где a – некоторый постоянный кинетический коэффициент. Данная модель в принципе является комбинированным вариантом уравнений Хилла и Эдера.

Основой для отмеченных (и родственных с ними) математических уравнений служит представление о взаимодействии лигандов с белком в рамках закона действующих масс как обобщенной химической модели, опирающейся на степенную функцию n-го порядка.

Рассматриваются альтернативные модели связывания кислорода гемоглобином, базирующиеся на постулировании переходного процесса, к которому неприменим данный закон [37–40]. При этом скорость оксигенации гемопротеида определяется показательной (экспоненциальной) функцией, аргументом (показателем степени) которой является парциальное давление кислорода.

Исходя из этих представлений, И. Высочина (1963 г.) [37] предложила уравнение следующего вида:

$$y = 1 - \left[1 + bp + \frac{(bp)^2}{2} + \frac{(bp)^3}{3}\right]\exp(-bp), \quad (12)$$

где b – переменный кинетический коэффициент.

Опираясь в своей основе на уравнение Гюфнера и предполагая, что константа связывания лиганда является функцией степени деформации макромолекулы белка, экспоненциально зависящей от pO_2, П. Подрабинек и П. Каменский (1968 г.) [38] представили свою модель:

$$y = \frac{\alpha p \exp(\lambda p)}{1 + \alpha p \exp(\lambda p)}, \quad (13)$$

где α и λ – постоянные положительные кинетические коэффициенты, а $k = \alpha\exp(\lambda p)$ – константа равновесия реакции.

Этот подход сродни подходу Ч. Тенфорда [41], на основе которого рассматриваются модели адсорбции свободных лигандов на молекуле нуклеиновой кислоты с ее частично заполненными центрами связывания этих лигандов.

Уравнение, представленное Ю. Кисляковым (1975 г.) [39], выглядит следующим образом:

$$y = \left[1 - \exp\left(-\frac{bp}{10}\right)\right]^{\frac{1}{b}}, \quad (14)$$

где b – кинетический коэффициент, равный $a_0 + a_1z + a_2z^2$, a_0, a_1, a_2 – постоянные кинетические коэффициенты.

Функция, предложенная М. Ханиным с соавторами (1978 г.) [40], аналогична предыдущим и имеет следующий вид:

$$y = 1 + \delta_1 \exp(-\delta_2 p), \quad (15)$$

где δ_1 и δ_2 – постоянные кинетические коэффициенты.

Анализ моделей кооперативного связывания кислорода гемоглобином. Можно оценить точность аппроксимации экспериментальной кривой диссоциации оксигемоглобина математическими функциями, имеющими в той или иной степени физический смысл, где в качестве крите-

рия соответствия выступает коэффициент детерминации (R^2).

Так как экспериментальные данные практически всегда содержат определенную долю случайных ошибок, которые в принципе могут качественно изменить трактовку результатов эксперимента, нами была выполнена двухступенчатая фильтрация исходных значений КДО.

На первом этапе были устранены так называемые «выбросы точек». Невязка в более чем 1% между исходным единичными экспериментальными точками кривой и ее аппроксимацией неоднородными рациональными B-сплайнами третьего порядка исключала эти точки из дальнейшей обработки [42–44]. Таких точек было всего две из 65. Следующий шаг включал в себя сглаживание кусочно-полиномиальным фильтром Савицкого–Голея третьего порядка. Этот фильтр является развитием метода скользящего среднего, что делает его простым, доступным и популярным инструментом при решении ряда аналогичных задач [45, 46]. Полученные после цифровой фильтрации данные были передискретизированы к равномерному шагу сетки в 0.5 мм рт. ст. в диапазоне парциального давления O_2 0–622.5 мм рт. ст. с суммарным количеством точек 1246 (массив 1).

Ранжирование функций выполнено по степени убывания значения величины R^2 (табл. 1). Как следует из представленных данных, в списке аппроксимаций с существенным отрывом лидируют функции, несущие в своей основе степенну́ю зависимость, за ожидаемым исключением уравнения Гюфнера, являющегося базовой моделью.

Близость величин R^2 для моделей Эдера, Бернарда и Хилла в совокупности с общностью в представлении ими процесса оксигенации может косвенно указывать на характер присоединения кислорода гемоглобином, а именно на его ступенчатость, обусловленную структурными перестройками макромолекулы белка при связывании ею лигандов в ходе равновесных реакций.

При этом используемый в построении альтернативных моделей подход, основанный на экспоненциальной зависимости, в совокупности с разбросом значений коэффициента детерминации в группе уравнений 4–7 (табл. 1) также, на наш взгляд, опосредованно (методом исключения) это подтверждает.

С целью формализованного соотнесения рассматриваемых аппроксимирующих функций к тому или иному типу физических (и соответственно математических) моделей нами была проведена классификация данных объектов по критерию R^2 методом кластерного анализа по принципу «ближайшего соседа», где дистанция между объектами определялась через обычную евклидову метрику (рис. 2а). Следует также отме-

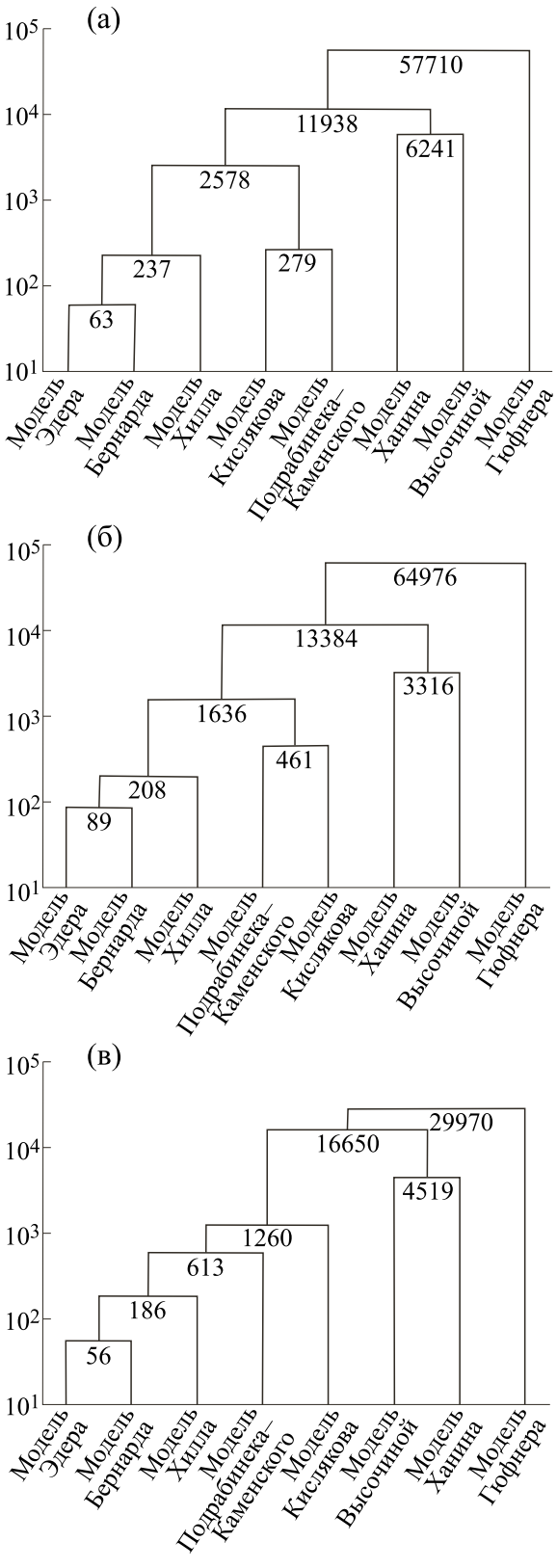


Рис. 2. Дендрограмма (матрица расстояний) распределения некоторых моделей кривой диссоциации оксигемоглобина для массивов 1 (а), 2 (б) и 3 (в).

Таблица 1. Аппроксимирующие КДО функции, имеющие физический смысл (данные по массиву 1)

№	Модель (уравнение)	R^2, ppm	Число констант
1	Модель Эдера	999686	4
2	Модель Бернарда	999623	2
3	Модель Хилла	999386	2
4	Модель Кислякова	996808	1
5	Модель Подрабинека–Каменского	996529	2
6	Модель Ханина	984591	2
7	Модель Высочиной	978350	1
8	Модель Гюфнера	920640	1

Примечание – здесь и далее в таблицах значения R^2 приведены в миллионных долях (ppm).

тить, что анализ на основе «дальнего соседа» принципиально не меняет картину дендрограммы, т.е. качество кластеризации при использовании данных методов присоединения кластер-объектов не страдает.

Нами были последовательно рассмотрены особенности группировки в кластеры исследуемых математических моделей, исходя из характера их аналитического представления по мере уменьшения дистанции между объектами.

Исходно на дистанции 57710 точек наблюдается дихотомия между группами моделей 1–7 и группой 8 (табл. 1), состоящей всего из одного объекта (уравнение Гюфнера). И хотя известно, что данная модель не может описать кооперативность процесса оксигенации, кластерный анализ наглядно и математически формально это подтверждает (рис. 2а).

Уменьшение дистанции до 11938 точек показывает разделение оставшихся моделей на два подкластера (листья кластера). Кластер с расстоянием между объектами в 6241 точку представляет собой уравнения Ханина и Высочиной. Сходство этих аппроксимаций обусловлено составляющей уравнения вида: $a\exp(-bp)$, где a и b – кинетические коэффициенты, а p – парциальное давление кислорода.

Другой кластер (2578 точек) содержит в себе модели 1–5 (табл. 1). Близость данных объектов формально указывает на бóльшую эффективность применения степенных уравнений в описании процесса оксигенации. Так, уравнение Кислякова, несмотря на свою экспоненциальную природу, имеет показатель степени вида b^{-1}, а модель Подрабинека-Каменского, как уже отмечалось, построена на соотношении вида: $kpn/(1 + kpn)$, где $n = \exp(\lambda p)$.

Небольшая дистанция (279 точек) между объектами-уравнениями 4 и 5 показывает на их общность в части содержания в них экспоненциальной составляющей, но не на высокую степень соответствия экспериментальным данным.

Подкластер с дистанцией между объектами в 237 точек представляет собой семейство степенных моделей: Эдера, Бернарда и Хилла, что усиливает версию о процессах связывания лигандов как химической реакции n-го порядка.

Тогда возможно ассоциировать эти математические аппроксимации с физическими моделями: уравнение Эдера может быть связано с моделью Кошланда–Немети–Филмера [47], так как рассматривает последовательное присоединение лигандов (асимметричная модель), уравнение Бернарда (гибридное решение) – модель Ваймана-Аллена [48], а уравнение Хилла – модель Моно–Уаймена–Шанжё (симметричная модель) [3].

Кластер из этих объектов распадается на два подкластера: уравнение Эдера и Бернарда (с дистанцией между объектами 63 точки) и уравнение Хилла. Уравнение Хилла проигрывает остальным по значению R^2. Аппроксимация Бернарда входит в один кластер с аппроксимацией Эдера, что означает их сходство в описании по состояниям последовательности присоединения лиганда. Так как значение R^2 для уравнения Эдера максимально из рассмотренных зависимостей, то на основании формального подхода преимуществом в описании связывания лигандов макромолекулой будет обладать модель Кошланда–Немети–Филмера с математической проекцией в виде уравнения Эдера.

В следующем варианте эксперимента исходные данные были непосредственно аппроксимированы полиномом вида:

Таблица 2. Аппроксимирующие КДО функции, имеющие физический смысл (данные по массиву 2)

№	Модель (уравнение)	R^2, ppm	Число констант
1	Модель Эдера	999548	4
2	Модель Бернарда	999340	2
3	Модель Хилла	999251	2
4	Модель Подрабинека-Каменского	997615	2
5	Модель Кислякова	997154	1
6	Модель Ханина	983770	2
7	Модель Высочиной	980454	1
8	Модель Гюфнера	915478	1

$$y = \frac{a + b_1 \ln p + b_2 (\ln p)^2 + b_3 (\ln p)^3 + b_4 (\ln p)^4}{1 + c_1 \ln p + c_2 (\ln p)^2 + c_3 (\ln p)^3 + c_4 (\ln p)^4}, \quad (16)$$

где a, b_{1-4} и c_{1-4} – некоторые коэффициенты, а p (>0) – парциальное давление кислорода. Этот подход позволяет, на наш взгляд, оценить влияние как промахов эксперимента типа «выброс точки», так и систематической ошибки аппроксимации на устойчивость решения задачи численного моделирования. Полином был подобран таким образом, чтобы не вносить значимых преимуществ в пользу уравнений Эдера, Бернарда или Хилла относительно оставшихся моделей, и включал в себя как степенные, так и логарифмические преобразования. Коэффициент детерминации для него составил 999918 ppm, что выше, чем для любой из представленных регрессионных моделей. Это обстоятельство, по нашему мнению, является формальным подтверждением адекватности выбранного аппроксимирующего полинома. Увеличение степени полинома от 4 и выше повышает, естественно, величину R^2, однако в таком случае он приближается к интерполирующему полиному, аналогично, например, высшим полиномам Фурье и Чебышёва [49].

Полученные численные значения, аналогичные предыдущему эксперименту, также были передискретизированы к равномерному шагу сетки в 0.5 мм рт. ст. с общим количеством точек 1246 (массив 2), что позволяет сопоставлять результаты вычислений R^2 от массивов 1 и 2.

Как следует из представленных данных (табл. 2), наличие операции логарифмирования в составе полинома ожидаемо приводит к некоторому уменьшению значений R^2 относительно

Таблица 3. Аппроксимирующие КДО функции, имеющие физический смысл (данные по массиву 3)

№	Модель (уравнение)	R^2, ppm	Число констант
1	Модель Эдера	999545	4
2	Модель Бернарда	999489	2
3	Модель Хилла	999303	2
4	Модель Подрабинека-Каменского	998690	2
5	Модель Кислякова	997430	1
6	Модель Высочиной	980780	1
7	Модель Ханина	976261	2
8	Модель Гюфнера	946291	1

предыдущих результатов для степенных уравнений и повышению для уравнений, несущих в своей основе экспоненциальную функцию (табл. 1), за исключением регрессионной модели Ханина. Однако это практически не влияет на ранжирование исследуемых регрессионных моделей. Изменения произошли только в позициях 4 и 5 (табл. 1 и 2). В текущем случае уравнение Подрабинека–Каменского имеет более высокий коэффициент детерминации относительно уравнения Кислякова. При этом дендрограмма распределения моделей КДО также не претерпевает структурных изменений (рис. 2б).

Следовательно, выбор кусочно-полиномиального сглаживания или глобально аппроксимирующих полиномов в данном случае не меняет общей картины рейтинга функций и характера их кластеризации в дендрограммах, что делает версию о последовательном присоединении лигандов наиболее вероятной.

Вместе с тем в этих исследованиях в качестве эталонных значений КДО были использованы данные, прошедшие цифровую обработку, которая в принципе могла внести артефакты преобразований, изменить значения коэффициентов детерминации, а также расстановку объектов в кластере.

В связи с этим в последующем эксперименте были использованы исходные данные «как есть» (массив 3). Это также позволяет оценить устойчивость предлагаемого алгоритма анализа для данных, содержащих случайные ошибки, и по возможности отказаться от дополнительных математических преобразований.

Результаты исследования представлены в виде рейтинга аппроксимирующих функций (табл. 3). В представленном списке уравнения Высочиной и Ханина поменялись местами, что в принципе не меняет общей картины расстановок, вполне предсказуемо из анализа результатов предыдущих экспериментов и подтверждает корректность наших оценок.

По этим данным был выполнен кластерный анализ (рис. 2в). Как следует из представленных результатов эксперимента, структура дендрограммы практически не претерпела изменений. На дистанции 1260 точек формируются два кластера: объекты 1–4 (табл. 3) и объект 5 (уравнение Кислякова). Относительно предыдущих исследований (массивы 1 и 2): в данном случае наблюдается переход модели Подрабинека–Каменского из кластера, содержащего модель Кислякова, в кластер степенных моделей (Эдера, Бернарда и Хилла). Однако дистанция между кластером, содержащим степенные модели, и текущим объектом достаточно высока (613 точек). Это обстоятельство указывает, прежде всего, как на фактор случайной ошибки, так и некоторую близость в описании моделью Подрабинека–Каменского кинетики связывания кислорода гем-белком относительно моделей Эдера, Бернарда и Хилла, что уже было отмечено ранее.

Для степенных моделей структура кластера, расположение его листьев, пропорции и абсолютные дистанции между объектами аналогичны предыдущим исследованиям (рис. 2а,б). Следует отметить, что значения величин расстояний между объектами Эдера, Бернарда (56 точек), а также Эдера, Бернарда против Хилла (186 точек) в последнем эксперименте меньше, чем для предшествующих оценок: (63/89 точек) и (237/208 точек) соответственно. Это обусловлено, вероятно, различием в количестве точек сравнения: 1246 точек (массив 1 и 2) против 65 (массив 3). В таком случае дистанция размерностью 613 точек для предыдущих экспериментов, если бы для них в объект-модель Подрабинека–Каменского входил кластер степенных моделей, могла бы быть еще более высокой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опираясь на результаты исследований, показано, что последовательная четырехступенчатая модель связывания олигомерным белком лиганда (т.е. модель Кошланда–Немети–Филмера) наилучшим образом подходит для аппроксимации экспериментальных данных связывания гемоглобином кислорода.

Предложенный в работе подход в оценке эффективности аппроксимации КДО может быть использован также и для решения сходных по своей постановке задач, т.е. тестирования математических моделей, имеющих физический смысл. В конечном итоге это позволяет, на наш взгляд, повысить эффективность поиска наиболее перспективных вариантов в разработке современных молекулярных моделей, а также верификации существующих в исследуемой области шаблонов, моделей и схем. Заметим, что анализ кооперативного связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами [6] также может проводиться подобным образом. Модели, развитые в этой области, в значительной степени перекрываются с моделями, описанными выше [50, 51]. Базовыми математическими построениями в описании связывания лигандов биополимерами здесь являются уравнения Г. Скетчарда [52], позволяющие рассчитать ход изотермы адсорбции, уравнения Р. Сипса [53], где описывается гетерогенное связывание лигандов, а также результаты теоретических исследований Ч. Тенфорда [41], Т. Хилла [54], С. Собера [55], Д. Крозерса [56], в которых сформулирован подход, позволяющий описывать адсорбцию лигандов на линейных полимерах. Следует отметить в этой области исследований работы

А. Заседателева с соавторами [57–63], а также Ландо и Тейфа с соавторами [64–66], в которых развит современный подход к описанию кооперативного связывания протяженных лигандов на линейных матрицах нуклеиновых кислот.

Использованный в данной работе способ оценки эффективности аппроксимации КДО, на наш взгляд, может быть использован также и для решения сходных по своей постановке задач медико-биологического, химического, а также фармацевтического профиля.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность Н.Г. Есиповой, Г.Ю. Ризниченко и А.Ф. Топунову за ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (темы № 01201363818 и № 01201363820).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. V. Hill, J. Physiol. **40**, i (1910).
2. W. E. L. Brown and A. V. Hill, Proc. Roy. Soc. Biol. **94**, 297 (1923). DOI: 10.1098/rspb.1923.0006
3. J. Monod, J. Wyman, and J. P. Changeux, J. Mol. Biol. **12**, 88 (1965). DOI: 10.1016/s0022-2836(65)80285-6
4. M. F. Perutz, *Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins* (Cambridge University Press, Cambridge – New York, 1990).
5. А. А. Болдырев, Биохимия. **57**, 1433 (1992).
6. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т компл. исслед. (ИКИ), М.–Ижевск, 2015).
7. D. Whitford, *Proteins: structure and function* (John Wiley & Sons, Chichester, 2005).
8. H. Abeliovich, Biophys. J. **89**, 76 (2005) DOI: 10.1529/biophysj.105.060194
9. M. H. Ahmed, M. S. Ghatge, and M. K. Safo, Subcell. Biochem. **94**, 345 (2020). DOI: 10.1007/978-3-030-41769-7_14
10. H. A. Saroff, J. Phys. Chem. **76**, 1597 (1972). DOI: 10.1021/j100655a020
11. О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов, Биохимия **84**, 3 (2019). DOI: 10.1134/S0320972519010019
12. G. K. Ackers and J. M. Holt, J. Biol. Chem. **281**, 11441 (2006). DOI: 10.1074/jbc.R500019200
13. N. B. Terwilliger, J. Exp. Biol. 201, 1085 (1998).
14. A. Szabo, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **75**, 2108 (1978). DOI: 10.1073/pnas.75.5.2108
15. R. T. K. Ariyawansha, B. F. A. Basnayake, A. K. Karunarathna, et al., Sci. Rep. **8**, 16586 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-34675-2
16. W. J. Deal, Biopolymers **12**, 2057 (1973). DOI: 10.1002/bip.1973.360120912
17. O. Siggaard-Andersen, P. D. Wimberley, I. Göthgen, et al., Clin Chem. **30**, 1646 (1984). DOI: 10.1093/clinchem/30.10.1646
18. W. Eaton, E. Henry, J. Hofrichter, et al., Nat. Struct. Mol. Biol. **6**, 351 (1999). DOI: 10.1038/7586
19. M. Sharan, M. P. Singh, and A. Aminataei, BioSystems. **22**, 249 (1989). DOI: 10.1016/0303-2647(89)90066-x
20. J. Otsuka and T. Kunisawa, Adv. Biophys. 11, 53 (1978).
21. W. G. Gutheil, Biophys. Chem. **241**, 38 (2018). DOI: 10.1016/j.bpc.2018.07.008
22. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов и В. Г. Артюхов, Актуальные вопросы биологической физики и химии **1**, 232 (2016).
23. Ю. А. Власов и С. М. Смирнов, *От молекулы гемоглобина — к системе микроциркуляции* (Наука, Новосибирск, 1993).
24. R. M. Winslow, M. Swenberg, R. L. Berger, et al., J. Biol. Chem. **252**, 2331 (1977). DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40559-X
25. N. D. Dikusar, Matem. Mod. 27 (9), 89 (2015).
26. А. А. Амосов, Ю. А. Дубинский и *Н. В. Копченова, Вычислительные* методы для инженеров (Высш. шк., М., 1994).
27. F. M. Dekking, C. Kraaikamp, H. P. Lopuhaä, et al., *A Modern Introduction to Probability and Statistics: Understanding Why and How* (Springer-Verlag, London, 2005). DOI: 10.1007/1-84628-168-7
28. M. H. Katz, Multivariable *Analysis: A Practical Guide for Clinicians and Public Health Researchers* (Cambridge University Press, Cambridge, 2011). DOI: 10.1017/CBO9780511974175
29. L. Kaufman and P. J. *Rousseeuw, Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis* (John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005). DOI: 10.1002/9780470316801
30. G. Hüfner, Arch. ges. Physiol. **31**, 28 (1890).
31. I. Langmuir, J. Am. Chem. Soc. **38**, 2267 (1916).
32. L. Michaelis and M. L. Menten, Biochem. Z. **49**, 333 (1913).
33. K. A. Johnson and R. S. Goody, Biochemistry. **50**, 8264 (2011). DOI: 10.1021/bi201284u
34. G. S. Adair, A. V. Bock, and H. Jr. Field, J. Biol. Chem. **63**, 529 (1925).
35. J. Wyman and D. W. Allen, J. Polymer Sci. **7**, 499 (1951). DOI: 10.1002/pol.1951.120070506
36. S. R. Bernard, Bull. Math. Biophys. **22**, 391 (1960). DOI: 10.1007/BF02476722
37. И. В. Высочина, Биофизика **8**, 361 (1963).
38. П. А. Подрабенек и И. И. Каменский, Молекуляр. биология **2**, 120 (1968).

39. Ю. А. Кисляков, *Математическое моделирование кровообращения и газообмена в мозгу* (Наука, Ленингр. отд-ние, Л., 1975).
40. М. А. Ханин, Н. Л. Дорфман, И. Б. Бухаров и др., *Экстремальные принципы в биологии и физиологии* (Наука, М., 1978).
41. Ч. Тенфорд, *Физическая химия полимеров* (Химия, М., 1975).
42. C. T. Kelley, *Iterative Methods for Linear and Nonlinear Equations* (Society for Industrial and Applied Mathematics (SIAM), Philadelphia, 1995). DOI: 10.1137/1.9781611970944
43. J. H. Ahlberg, E. N. Nilson, and J. L. Walsh, *The Theory of Splines and Their Applications* (Academic Press, New York – London, 1967).
44. L. Piegl, Computer-Aided Design **21**, 509 (1989). DOI: 10.1016/0010-4485(89)90059-6
45. A. Savitzky and M. J. E. Golay, Anal. Chem. **36**, 1627 (1964). DOI: 10.1021/ac60214a047
46. A. Gorry, Anal. Chem. **62**, 570 (1990). DOI: 10.1021/ac00205a007
47. D. E. Jr. Koshland, G. Némethy, and D. Filmer, Biochemistry **5**, 365 (1966). DOI: 10.1021/bi00865a047
48. J. Jr. Wyman and D. W. Allen, J. Polym. Sci. **7**, 499 (1951). DOI: 10.1002/pol.1951.120070506
49. В. К. Дзядык, *Введение в теорию равномерного приближения функций полиномами* (Наука, М., 1977).
50. Ч. Кантор и П. Шиммел, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984).
51. А. Б. Рубин, *Биофизика* (Наука, М., 2004).
52. G. Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. **15**, 660 (1949).
53. R. Sips, J. Chem. Phys. **16**, 490 (1948).
54. T.L. Hill, J. Polymer Sci. **23**, 549 (1957). DOI: 10.1002/pol.1957.1202310403
55. S. A. Latt and L. H. Sober, Biochemistry **6**, 3293 (1967). DOI: 10.1021/bi00862a040
56. D. Crothers, Biopolymers **6**, 575 (1968). DOI: 10.1002/bip.1968.360060411
57. А. С. Заседателев, Г. В. Гурский и М. В. Волькенштейн, Молекуляр. биология **5**, 245 (1971).
58. Г. В. Гурский, А. С. Заседателев и М. В. Волькенштейн, Молекуляр. биология **6**, 479 (1972).
59. G. V. Gursky and A. S. Zasedatelev, Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. **5**, 53 (1984).
60. Ю. Д. Нечипуренко, А. С. Заседателев и Г. В. Гурский, Биофизика **24**, 351 (1979).
61. Ю. Д. Нечипуренко, А. С. Заседателев и Г. В. Гурский, Молекуляр. биология **18**, 798 (1984).
62. Yu. D. Nechipurenko and G. V. Gursky, Bioph. Chem. **24**, 195 (1986). DOI: 10.1016/0301-4622(86)85025-6
63. Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, Биофизика **48**, 773 (2003).
64. D. Y. Lando and V. B. Teif, J. Biomol. Struct. Dyn. **17**, 903 (2000). DOI: 10.1080/07391102.2000.10506578
65. В. Б. Тейф, Д. Ю. Ландо, Молекуляр. биология **35**, 117 (2001).
66. V. B. Teif, K. Rippe, Brief Bioinform. **13**, 187 (2012). DOI: 10.1093/bib/bbr03.

Analysis of Models of Cooperative Oxygen Binding by Hemoglobin

I.A. Lavrinenko*, G.A. Vashanov*, V.Yu. Sulin*, and Yu.D. Nechipurenko**

**Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

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

This paper presents an overview of the most well-known models which describe the binding of oxygen to hemoglobin. This study attempts to provide a formal criteria-based approach that can be used to find optimal mathematical and physical models of cooperative oxygen binding by hemoglobin. Using the methods of regression and cluster analysis based on experimental data of oxyhemoglobin dissociation, the main models of oxygenation, which are based on power and exponential dependencies, are compared. It is shown that the models proposed by Eder, Bernard, and Hill which correspond to power-law models are more accurate for describing ligand binding by an oligomeric protein than exponential models. It is established that the sequential four-stage Koshland–Nemeti–Filmer model, which corresponds to the Eder equation, is the most accurate model for describing the experimental data.

Keywords: hemoglobin, allosteric effects, cooperative binding, binding curve, protein-ligand binding, isotherm of adsorption, mathematical model, , regression analysis, cluster analysis

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1074–1081

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЕННОЙ СУБПЛАНТАЦИИ ИОНОВ АЗОТА НА СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОМЕДИЦИНСКИЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТИ УПРУГОГО ПОЛИУРЕТАНА

© 2021 г. И.А. Морозов*, А.С. Каменецких, А.Ю. Беляев*, М.Г. Щербань***, Л.М. Лемкина****, Д.В. Ерошенко*******

**Институт механики сплошных сред УрО РАН, 614013, Пермь, ул. Академика Королёва, 1*

***Институт электрофизики УрО РАН, 620016, Екатеринбург, ул. Амундсена, 106*

****Пермский государственный национальный исследовательский университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15*

*****Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13*

******Институт технической химии УрО РАН, 614013, Пермь, ул. Академика Королёва, 3*

E-mail: ilya.morozov@gmail.com

Поступила в редакцию 24.12.2019 г.
После доработки 25.05.2020 г.
Принята к публикации 07.09.2021 г.

Исследовано влияние плазменной субплантации ионов азота с энергией до 0.5 кэВ на свойства упругого полиуретана (модуль упругости 30 МПа). В результате обработки изменяются структурно-механические свойства поверхностного слоя материала толщиной в несколько нанометров. Полиуретан имеет фазовое разделение на жесткую и мягкую фазы; модифицированные поверхности также не являются механически однородными. Благодаря увеличению гидрофобности и энергии поверхности обработанные материалы показали улучшенную сорбционную активность к альбумину и снижение количества жизнеспособных бактерий кишечной палочки. Незначительное увеличение жесткости модифицированного слоя (в 1.5–2.0 раза по сравнению с необработанным материалом) позволило избежать повреждения поверхности при растяжении до деформаций не менее 50%.

Ключевые слова: полиуретаны, плазма, медицинские полимеры, деформация, бактерии.

DOI: 10.31857/S0006302921060041

Эффективным средством улучшения биомедицинских характеристик материалов является плазменная модификация поверхности. Особый интерес представляет обработка полимеров – материалов со сложной и неоднородной на наноуровне структурой. Одним из полимеров, нашедших применение в медицине, является полиуретан – синтетический полимер. В зависимости от рецептуры его свойства могут меняться от жестких пластиков до эластомеров. Полиуретан – двухфазный полимер; на структурном уровне жесткая фаза имеет глобулярную [1] или фибриллярную [2] форму; ее доля, энергетические свойства [3], состояние (кристаллическое или аморфное), распределение в матрице мягкой фазы зависят от особенностей изготовления и определяют все макроскопические свойства материала.

При плазменной имплантации ионы внедряются на некоторую глубину (обычно десятки нанометров) в поверхность материала. Максимальная глубина внедрения иона определяется его энергией, а распределение внедренных частиц по глубине – дозой ионов. Взаимодействуя с полимером, ионы вызывают существенное изменение атомарной структуры поверхностного слоя. В частности, образуются атомы с неспаренными электронами – свободные радикалы (изменяется свободная энергия поверхности), происходит перестройка и образование новых углеродных связей [4, 5], т.е. карбонизация, что ведет к увеличению жесткости поверхности.

При определенных условиях обработки (высокая энергия/доза ионов), когда модуль упругости модифицированного слоя приблизительно на два порядка превышает модуль упругости полимерного материала [6], поверхность теряет устойчивость, образуя складчатый рельеф. Хаотичная структура складок сама по себе оказывает антибактериальный эффект [7] и при определенных условиях может выдерживать деформацию [8]. Кроме этого, структурные параметры складок могут быть использованы при определении меха-

Сокращение: АСМ – атомно-силовая микроскопия.

нических характеристик модифицированного слоя [9]. Однако существенная жесткость таких слоев является препятствием при создании деформируемых изделий: уже при 10%-м растяжении поверхности трескаются, жесткие края трещин повреждают подложку [10], а дефекты являются очагами роста бактерий [7].

Очевидно, что снижение интенсивности плазменного воздействия приведет к улучшению деформативности модифицированного слоя. Однако это каким-то образом изменит и требуемый положительный эффект. Известны исследования по обработке полиуретана низкоэнергетической газовой плазмой (энергия ионов – единицы эВ) аргона, кислорода, азота, аммиака [11–14]. Во всех случаях была достигнута повышенная энергия поверхности и гидрофобность, т.е. произошла активация поверхности; показано влияние обработки на клеточную адгезию [11] и коагуляцию крови [12]. В случае активации ионы плазмы взаимодействуют только с поверхностью, не проникая в материал (тем не менее, инициированные на поверхности изменения могут затрагивать и некоторый поверхностный слой материала). Увеличение энергии ионов до десятых долей кэВ приводит к субплантации – ионы проникают в материал на глубину до нескольких нанометров, неоднородно модифицируя поверхностный слой [15, 16].

Под действием внешней среды поверхность многих материалов изменяется со временем, образуется оксидная пленка. В случае полиуретана на поверхности находится низкомолекулярный слой мягкой фазы толщиной до 1 нм [17, 18]. При субплантации происходит модификация как поверхности полимера (в общем случае свойства которой зависят от времени и окружающей среды), так и самого материала, создавая поверхностный слой с более устойчивыми и воспроизводимыми при повторных экспериментах свойствами. В то же время низкая энергия и доза ионов при определенных условиях позволяют избежать чрезмерного повышения жесткости поверхности и его растрескивания при деформации.

Наши исследования [7] полиуретанов, обработанных имплантацией ионов азота с энергией от 1 до 3 кэВ, показали улучшение антибактериальных свойств, однако под действием одноосной деформации поверхности покрывались трещинами, что нивелировало эффект плазменной обработки.

В настоящей работе исследовали воздействие на такие же материалы при более щадящем режиме обработки (имплантация ионов азота с энергией до 0.5 кэВ). Были получены устойчивые к деформации модифицированные поверхности с улучшенными биомедицинскими характеристиками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление полимеров. В работе исследовали полиуретановую композицию, изготовленную из преполимера и сшивающего агента согласно предписаниям поставщика (ООО «Эластопласт», Пермь) в соотношении 100 : 34. Преполимер – форполимер уретановый на основе простого полиэфира; сшивающий агент – отвердитель (МОКА) и пластификатор (полифурит). Компоненты вакуумировали и смешивали при температуре 80°С. Смесь заливали в форму, оставляя верхнюю поверхность свободной, и отверждали в термошкафу (20 ч при температуре 100°С). Толщина полученных пластин – 2 мм. Твердость по Шору – 80, начальный модуль упругости – 30 МПа, разрывная деформация – 800%.

Ионная имплантация азота. Имплантацию проводили в N_2-плазме, генерируемой широким пучком низкоэнергетических (50 эВ) электронов. Ток пучка составлял 0.3 А. Обрабатываемые образцы размещали на водоохлаждаемом держателе, помещенном в плазму. Перед держателем была установлена металлическая сетка с размером ячеек 1.2 × 1.2 мм. При задании высокого отрицательного потенциала сетки, электрически связанной с держателем, в ее ячейках возникал слой пространственного заряда, обеспечивающий ускорение ионов.

Рабочую камеру откачивали до давления $5\cdot10^{-5}$ торр, устанавливали давление азота $3\cdot10^{-4}$ торр и зажигали тлеющий разряд с в источнике низкоэнергетического пучка электронов. Задавали ускоряющее напряжение источника электронов на уровне 50 В и потенциал смещения U образцов 0.1, 0.3 или 0.5 кэВ. Проводили имплантацию за время (4 с), необходимое для набора дозы 10^{15} ион/см^2. После имплантации образцы охлаждали в вакууме 30 мин.

Глубину внедрения ионов азота в полиуретан оценивали при помощи программы Trim [19]. В расчетах использовали упрощенную химическую структуру полиуретана (NHCOO) без разделения на жесткую и мягкие фазы.

Адсорбция бактерий. Необработанные и обработанные плазмой образцы стерилизовали УФО в бактерицидной камере «Микроцид» (ООО «Электронная медицина», Москва) по 20 мин с каждой стороны и помещали в стерильные лунночные планшеты, в которые вносили по 2 мл посевного материала бактерий кишечной палочки (*Escherichia coli* ATCC 25992) или стафилококка (*Staphylococcus cohnii* ВКМ В-3165), содержащих 10^7 КоЕ/мл. Образцы термостатировали 48 ч при 37°С, после чего отмывали в фосфатном буфере (pH 7.2). Количество жизнеспособных клеток в образовавшихся биопленках определяли окра-

шиванием образцов водорастворимым тетразолием в системе Cell Proliferation Assay. Соли тетразолия – реагенты, обладающие способностью под действием ферментов живых клеток превращаться в окрашенные соединения. Чем больше живых клеток в биопленке, тем интенсивнее окрашивание раствора. Результаты выражали в условных единицах (величина оптической плотности окрашенного раствора при 490 нм, деленная на площадь пластинки).

Адсорбция белков. Исследовали сорбционную активность к поверхностям альбумина – белка, составляющего около 60% от всех белков, содержащихся в плазме крови человека. Он может также встречаться в других биологических жидкостях (например, в спинно-мозговой жидкости). Основными функциями альбумина являются поддержание осмотического давления плазмы крови и транспорт молекул, в том числе лекарств. Будучи адсорбированным на поверхность, альбумин совместно с другими белкми, оказывает важную роль в клеточной адгезии и биосовместимости [20].

На поверхность образцов наносили раствор человеческого сывороточного альбумина («Биолот», Россия) в концентрациии 1 мг/мл и инкубировали в течение 120 мин при 37°C. Концентрацию белка в растворах определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра UV 1080 (Shimadzu, Япония), используя калибровочную кривую. В качестве контроля использовали раствор белка без полимера. Количество связавшегося белка рассчитывали как разницу между исходной и конечной концентрациями белка. Результаты представлены в виде количества связавшегося белка (мкг) относительно площади образца ($см^2$).

Энергия поверхности. Краевой угол смачивания определяли методом лежащей капли. В качестве тестовых жидкостей использовали воду и диэтиленгликоль (мы не использовали дийодметан, так как он, наряду с другими растворителями, вступает в реакцию с полимером); размер капель составлял 2–3 мм. Свободную поверхностную энергию вычисляли методом Оуэнса–Вендта–Рабеля–Каелбле как сумму дисперсионной (вандер-ваальсовы взаимодействия) и полярной (дипольные взаимодействия и энергия водородных связей) составляющих. Известно, что сразу после плазменной обработки энергия поверхности максимальна, а затем асимптотически убывает. В нашем случае исследования проводили спустя 7–10 суток после обработки, когда энергия снизилась до равновесного значения.

Атомно-силовая микроскопия. Эксперименты проводили на атомно-силовом микроскопе (АСМ) Ntegra Prima (NT-MDT, Зеленоград) в режиме наномеханического картирования: одновременно со сканированием рельефа происходили индентация поверхности и определение механических характеристик, в частности – модуля упругости. Использовали зонды ScanAsyst Air с калиброванной жесткостью (0.4 Н/м) и радиусом острия (5 нм). Частота индентации – 0.5 кГц, максимальное усилие (порядка 0.25 нН) задавали из условия, чтобы глубина индентации не превышала 20 нм. Приведенный модуль упругости (далее – просто «модуль упругости») $E/(1-\nu^2)$, где E – модуль упругости и ν – коэффициент Пуассона, определяли при помощи встроенной в программное обеспечение обработки силовых кривых моделью Джонсона–Кендалла–Робертса.

Исследование поверхностей до и после индентации не установило изменений рельефа, т.е. имело место упругое вдавливание зонда как в необработанный материал, так и в плазменное покрытие. В последнем случае одновременно с деформацией покрытия происходит его вдавливание в подложку. Таким образом, вычисляемый модуль является нижней оценкой истинного модуля покрытия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

АСМ-изображения рельефа и карты модулей упругости поверхностей представлены на рис. 1. Изображения размером 1.0×0.5 мкм позволяют судить о наноструктуре материала, размером 5.0×5.0 мкм – о представительном распределении механических неоднородностей поверхности. Жесткая фаза полимера имеет фибриллярную структуру (рис. 1а) и распределена в материале неоднородно: участки с низким модулем упругости (~20 МПа, темные области на рис. 1а) чередуются с более жесткими (~35 МПа, светлые области на рис. 1а). Плазменная обработка не приводит к значительным изменениям рельефа (рис. 1б–г): фибриллярная структура жестких связей частично разрушается, но по-прежнему различима на изображениях рельефа. Среднеквадратичная шероховатость изменялась незначительно (измеряли на областях 3.0×3.0 мкм): она составила 1.6 нм для необработанной поверхности и возрастала до 2.0 нм после плазменной обработки с энергией 0.5 кэВ.

Существенные качественные изменения происходят с модулем упругости поверхности: появляются области контрастной жесткости. Фибриллы жесткой фазы (рис. 1в,г) видны на изображениях рельефа, однако пропадают на соответствующих картах модуля. Следовательно, основные изменения материала, вызванные плазмой, происходят не на поверхности, а в некотором поверхностном слое: ионы проникают на глубину до нескольких нанометров (см. распределение ионов по глубине на рис. 2а), изменяя внут-

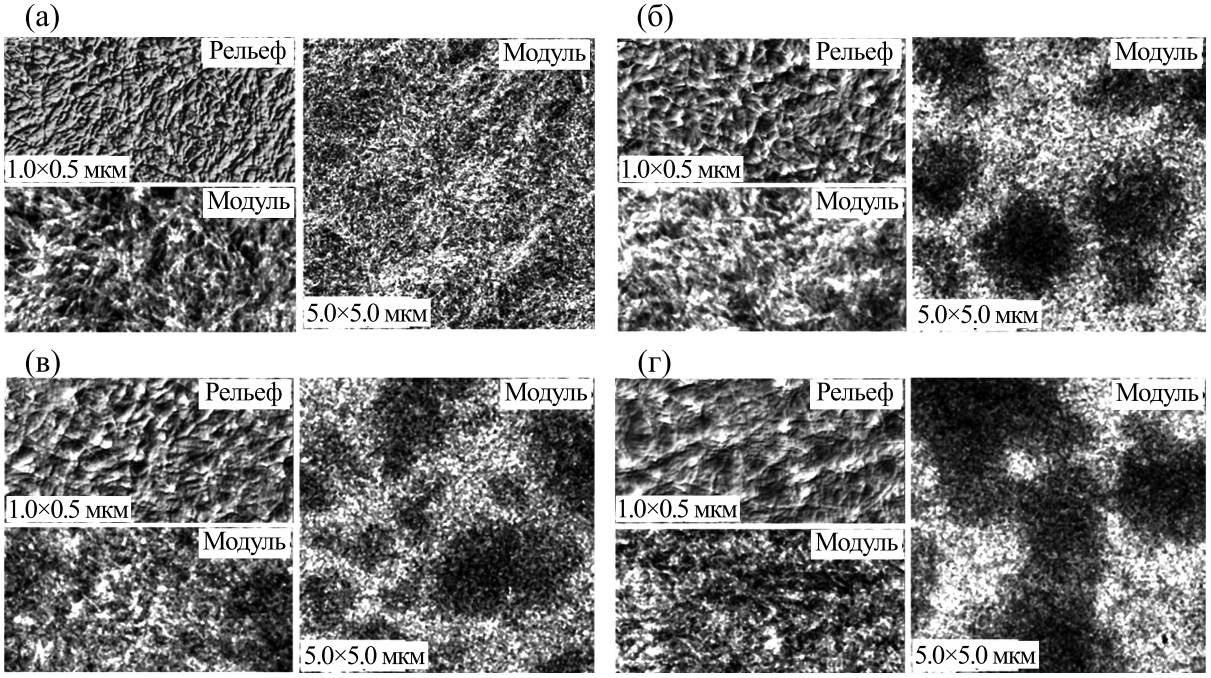


Рис. 1. Рельефы и карты модулей упругости необработанной (а) и обработанных поверхностей: энергия 0.1 кэВ (б), 0.3 кэВ (в) и 0.5 кэВ (г).

реннюю структуру и механические свойства полимера. Полученные результаты указывают на то, что внедрение ионов в жесткую фазу происходит на меньшую глубину и изменение ее свойств в процессе обработки происходит более интенсивно.

Распределения модуля упругости представлены на рис. 2б. В результате обработки величина модуля упругости возрастает в 1.5 (0.3 кэВ) – 2.5 (0.5 кэВ) раза. После обработки с энергией 0.5 кэВ наблюдаются два пика (отмечены стрелками на рис. 2б) – свидетельство различного взаимодействия ионов азота с жесткой и мягкой фазами материала. Такое разделение заметно и после обработки с энергией 0.3 кэВ, однако в этом случае материал становится даже мягче, чем при минимальной обработке (с энергией 0.1 кэВ). По-видимому, это связано с особенностями формирования модифицированного слоя при малых энергиях обработки. Эффекты взаимодействия ионов азота с атомами полимера с учетом фазового разделения требуют дополнительных исследований и выходят за рамки данной работы.

В результате обработки повышаются гидрофобность и свободная энергия поверхности (рис. 2в). Прирост свободной энергии поверхности произошел преимущественно за счет полярной составляющей, связанной с разрушением молекул полимера в процессе обработки и образованием новых водородных связей. Отметим, что более интенсивная обработка с энергией 1 и 3 кэВ [7] не приводит к существенному изменению как контактного угла смачивания, так и свободной энергии поверхности (после обработки с энергией 3 кэВ энергия поверхности данного материала составляла 38 мДж/м^2).

Адсорбция альбумина на разных поверхностях исследована в литературе довольно широко. На эту величину оказывают комплексное влияние гидрофобность (молекулы воды на гидрофильной поверхности создают барьер для адсорбции протеина), свободная энергия поверхности [21], шероховатость (увеличение удельной площади поверхности естественным образом повышает количество адсорбировавшегося протеина [22]), наличие электростатического заряда (на заряженной поверхности преобладающей движущей силой является электростатическое притяжение между поверхностью и противоположно заряженными функциональными группами молекулы альбумина [23]).

В нашем случае (рис. 3а) увеличение альбумина объясняется снизившейся гидрофильностью и возросшей свободной энергией поверхностей [21], ведущую роль при этом играет полярная составляющая свободной энергии. Увеличивает ко-

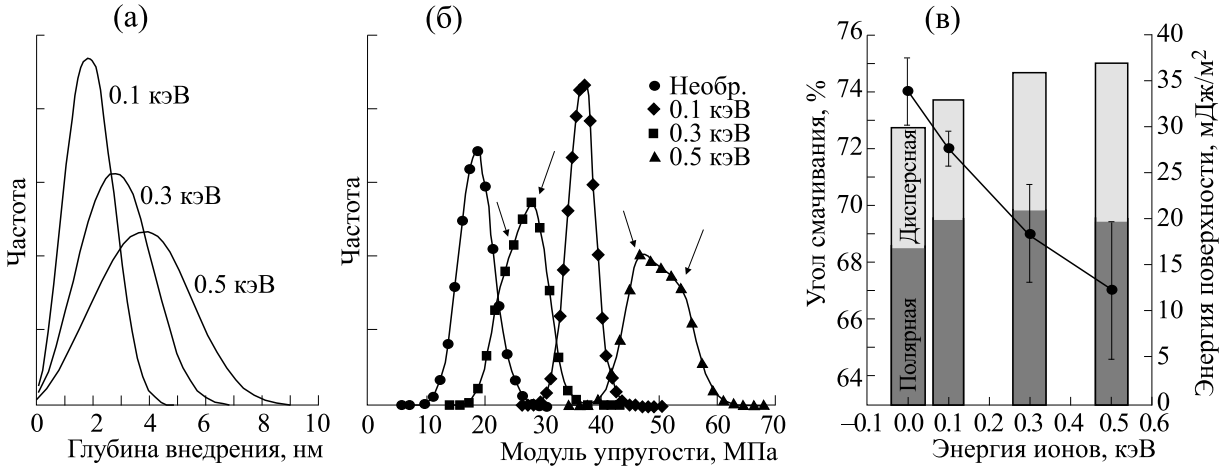


Рис. 2. Плотности распределения глубины внедрения ионов азота в полиуретан (а) и модуля упругости поверхностей (б); смачиваемость (черные кружки) и свободная энергия поверхности материалов (в), показаны полярные и дисперсионные составляющие. Стрелками на рисунке (б) отмечено разделение распределения модуля на два пика.

личество альбумина и рост шероховатости обработанных поверхностей.

На рис. 3б,в представлены АСМ-изображения рельефов поверхностей с нанесенным альбумином до и после плазменной обработки. Изображения были получены после сушки образцов на воздухе, что, безусловно, исказило реальную структуру поверхности. Тем не менее по качественным отличиям можно заключить следующее: на поверхности необработанного полиуретана с нанесенным (высушенным) альбумином видны неоднородно распределенные островки (рис. 3б); на аналогичной обработанной поверхности – однородная ячеистая структура (рис. 3в). Это указывает на то, что поверхность необработанного полиуретана на наноуровне имеет неоднородную активность по отношению к альбумину. Этими неоднородностями являются участки жесткой и мягкой фазы. Островки альбумина видны в низинах рельефа, т.е. в области с преобладающей мягкой фазой полимера обладают повышенной адсорбцией альбумина.

Плазменная обработка привела к выравниванию свойств поверхности, и пленка (высохшего) альбумина становится более однородной.

Количество жизнеспособного стафилококка (грамположительные бактерии) на поверхностях в абсолютных цифрах значительно меньше (рис. 4а), чем кишечной палочки (грамотрицательные бактерии), что объясняется строением их клеточной стенки: грамотрицательные бактерии имеют дополнительную внешнюю мембрану, защищаю-

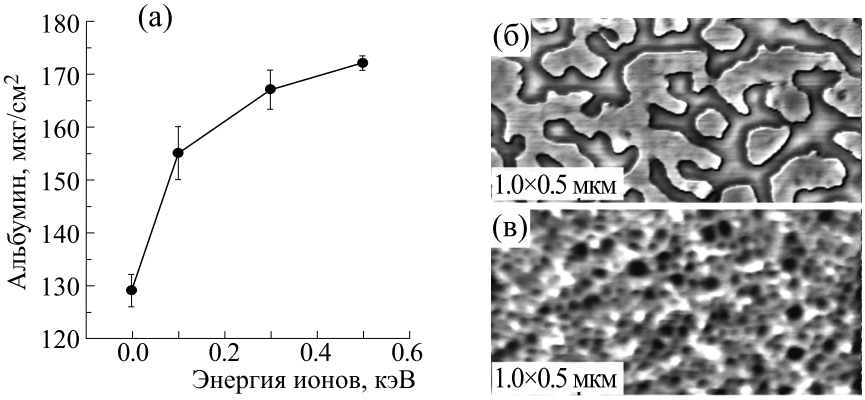


Рис. 3. Количество сорбировавшегося альбумина (а) и АСМ-изображения рельефа поверхности необработанного (б) и обработанного с энергией 0.5 кэВ (в) полиуретана с белковым слоем.

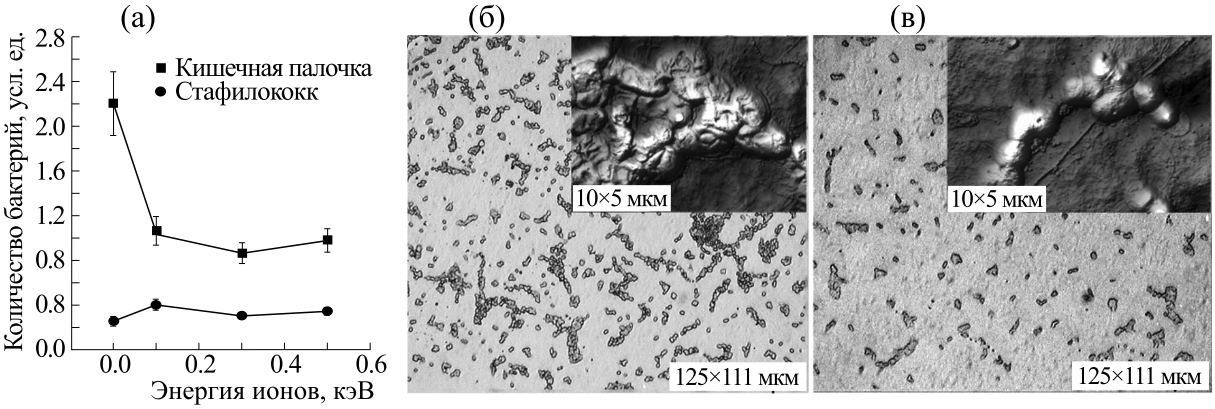


Рис. 4. Количество жизнеспособных бактерий кишечной палочки (а); оптические и АСМ-изображения колоний кишечной палочки на необработанной (б) и обработанной с энергией 0.5 кэВ (в) поверхностях.

щую их от химического воздействия подложки. После обработки количество стафилококка существенно не изменяется – это редкие отдельные бактерии, закрепленные преимущественно вблизи краев образцов, где велика концентрация дефектов поверхности.

Обработанные плазмой поверхности показали хорошие антибактериальные свойства по отношению к кишечной палочке. Количество жизнеспособных болезнетворных бактерий кишечной палочки на обработанных поверхностях уменьшается почти в три раза (рис. 4а). Определенный антибактериальный эффект оказывает шероховатость поверхности (незначительно, но возрастает с ростом энергии плазменной обработки): бактериальным клеткам сложнее закрепиться на поверхности, если размеры особенностей рельефа меньше размеров бактерии. Другим фактором снижения жизнеспособных бактерий является свободная энергия поверхности [24]: свободные радикалы вызывают окислительный стресс, что ведет к гибели клеток. Представительные оптические изображения колоний бактерий изображены на рис. 4б,в; вставками показаны АСМ-изображения отдельных бактерий, полученные на высушенных подложках. На необработанной поверхности (рис. 4б) контуры кишечной палочки четкие, видны начинающие делиться бактерии; на обработанной поверхности бактерии не имеют четкой формы (рис. 4в), их клеточная стенка начала разрушаться на стадии инкубации.

Исследование материалов в растянутом состоянии показало устойчивость их поверхностей к удлинениям не менее 50% (рис. 5). Обработанные участки жесткой и мягкой фазы вытягиваются вдоль оси деформация, образуя на поверхности ориентированные области. Повреждение покрытия при этом не происходит.

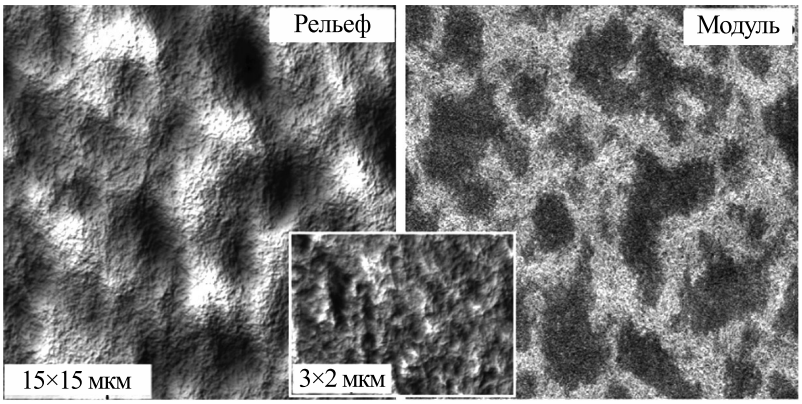


Рис. 5. АСМ-изображения рельефа и модуля упругости поверхности растянутого на 50% обработанного (0.5 кэВ) полиуретана. На врезке показан увеличенный участок рельефа. Ось растяжения – вертикально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовано влияние ионной субплантации ионов (энергия 0.1–0.5 кэВ) азота на свойства поверхности упругого полиуретана. Полиуретан – двухфазный полимер, состоящий из жестких и мягких блоков. В нашем случае жесткие блоки имеют фибриллярную структуру, неоднородно распределенную в матрице мягкой фазы.

Ионы внедряются в материал на глубину до нескольких нанометров, и значительные структурно-механические изменения материала происходят не на поверхности (структура поверхности практически не изменилась), а в поверхностном нанослое. В связи с двухфазной структурой полимера данный слой имеет неоднородную жесткость – участки с относительно высоким и низким модулями упругости, соответствующие модифицированным областям жесткой и мягкой фазы.

Обработка привела к снижению смачиваемости и увеличению свободной энергии поверхности полиуретана. Это положительным образом отразилось на биомедицинских характеристиках образцов: была достигнута улучшенная сорбция альбумина (что связано с возросшей свободной энергией поверхности, шероховатостью и снижением смачиваемости) и снижена жизнеспособность кишечной палочки (объясняется возросшей свободной энергией поверхности и шероховатостью на субмикронном уровне).

Проведенная плазменная обработка вызвала увеличение модуля упругости поверхности по сравнению с необработанным полимером в полтора-два раза. По сравнению с более высокой интенсивностью обработки (1 кэВ и более) данные покрытия показали устойчивость к механическим нагрузкам при растяжении не менее 50%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-48-590057_р_а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Kojio, S. Kugumiya, Y. Uchiba, et al., Polym. J. **41** (2), 118 (2009).
2. I. Yilgör, E. Yilgör, and G. L. Wilkes, Polymer **58**, A1 (2015).
3. A. Takahashi, R. Kita, and M. Kaibara, J. Mater. Sci. Mater. Med. **13**, 259 (2002).
4. L. Calcagno, G. Compagnini, and G. Foti, Nucl. Instrum. Meth. B **65**, 413 (1992).
5. J. López-García, in *Non-Thermal Plasma Technology for Polymeric Materials*, Ed. by S. Thomas, M. Mozetič, U. Cvelbar, et al., (Elsevier: Oxford, UK, 2019), p. 261.
6. I. A. Morozov, A. Y. Beliaev, and R. I. Izyumov, Key Engineer. Mater. **773**, 3 (2018). DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.773.3
7. I. A. Morozov, A. S. Kamenetskikh, A. Yu. Beliaev, et al., Biophysics **64** (3), 527 (2019).
8. I. A. Morozov, A. S. Kamenetskikh, M. G. Scherban, et al., Appl. Surf. Sci. **497**, 143706 (2019). DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.143706
9. J. Y. Chung, A. J. Nolte, and C. M. Stafford, Adv. Mater. **23** (3), 349 (2011).
10. I. A. Morozov, A. S. Mamaev, M. V. Bannikov, et al., Coatings. **8** (2), 75 (2018). DOI: 10.3390/coatings8020075
11. Y. Ozdemir, N. Hasirci, and K. Serbetci, J. Mater. Sci. Mater. Med. **13** (12), 1147 (2002).
12. D. J. Wilson, N. P. Rhodes, and R. L. Williams, Biomaterials **24** (28), 5069 (2003).
13. M. R. Sanchis, O. Calvo, O. Fenollar, et al., Polym. Test. **27** (1), 75 (2008).
14. P. Alves, S. Pinto, H. C. de Sousa, and M. H. Gil, J. Appl. Polym. Sci. **122** (4), 2302 (2011).
15. M. M. M. Bilek and D. R. McKenzie, Surf. Coatings Technol. **200** (14–15), 4345 (2006).
16. A. Catena, Q. Guo, M. R. Kunze, et al., ACS Appl. Mater. Inter. **8** (16), 10636 (2016).
17. A. G. Shard, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, et al., Polymer **36** (4), 775 (1995).
18. R. S. McLean and B. B. Sauer, Macromolecules **30** (26), 8314 (1997).
19. K. Wittmaack and A. Mutzke, J. Appl. Phys. **121** (10), 105104 (2017).
20. M. Zelzer, D. Albutt, M. R. Alexander, and N. A. Russell, Plasma Process Polym. **9** (2), 149 (2012).
21. A. Michiardi, C. Aparicio, B. D. Ratner, et al., Biomaterials **28** (4), 586 (2007).
22. K. Rechendorff, M. B. Hovgaard, M. Foss, et al., Langmuir **22** (26), 10885 (2006).
23. R. Tantipolphan, T. Rades, A. J. McQuillan, and N. J. Medlicott, Int. J. Pharm. **337** (1–2), 40 (2007).
24. S. Yoriya, A. Chumphu, P. Pookmanee, et al., Materials **9** (10), 808 (2016).

Effects of Plasma Subplantation of Nitrogen Ions on Structure and Mechanical Properties and Biomedical Surface Properties of Elastic Polyurethane

I.A. Morozov*, A.S. Kamenetskikh, A.Yu. Beliaev*, M.G. Scherban***, L.M. Lemkina****, and D.V. Eroshenko*******

**Institute of Continuous Media Mechanics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Akademika Koroleva 1, Perm, 614013 Russia*

***Institute of Electrophysics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Amundsena 106, Yekaterinburg, 620016 Russia*

****Perm State National Research University, ul. Bukireva 15, Perm, 614990 Russia*

*****Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Goleva 13, Perm, 614081 Russia*

******Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Akademika Koroleva 3, Perm, 614013 Russia*

The effects of plasma subplantation of nitrogen ions with energies up to 0.5 keV on the properties of elastic polyurethane (elastic modulus, 30 MPa) have been investigated. As a result, the structure and mechanical properties of a surface layer with the thickness of several nanometers alter. Polyurethane is phase separated into hard and soft phases; modified surfaces are also not mechanically homogeneous. Due to enhanced hydrophobicity and an increase in surface energy, the treated materials showed higher adsorption capacity for albumin and the reduced number of viable E. coli bacteria. A slight increase in the stiffness of the modified layer (by a factor of 1.5–2.0 as compared to untreated material) made it possible to prevent surface damage before deformation (at least 50% strain extension).

Keywords: polyurethanes, plasma, medical polymers, deformation, bacteria

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1082–1115

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3: 535.379

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ. II. МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ ДЕТЕКТИРОВАНИИ

© 2021 г. И.В. Володяев*, Л.В. Белоусов*, И.И. Концевая, А.Е. Наумова***, Е.В. Наумова******

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

***Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, 246019, Гомель, ул. Советская, 104, Республика Беларусь*

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

*****Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13*

E-mail: naumova@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.06.2021 г.
После доработки 20.07.2021 г.
Принята к публикации 27.07.2021 г.

Во второй части обзора методов исследования сверхслабого свечения биологических объектов представлена методология биологического детектирования. В течение первых 25 лет (1923–1948 гг.) почти все исследования сверхслабого свечения проводились именно с биологическими детекторами, причем регистрировалась только компонента, относящаяся к среднему ультрафиолетовому диапазону (в ранних работах – митогенетическое излучение), которую обнаруживали по изменению митотического режима детектора. Эти исследования остаются спорными из-за недостаточной доказательности методик, но многие полученные результаты, революционные для того времени, уже подтверждены, а научная проблематика остальных представляет значительный интерес (например, фундаментальные результаты, касающиеся деления клеток и канцерогенеза, ранняя онкодиагностика), поэтому анализ их методологии актуален для дальнейшей экспериментальной проверки этих исследований. В обзоре приведен анализ основных методик с использованием в качестве детекторов корней лука, дрожжевых и бактериальных культур, а также проведено сопоставление методики лукового детектирования с ближайшим современным аналогом (Allium-тест).

Ключевые слова: сверхслабое свечение биологических объектов, митогенетическое излучение, митогенетический эффект, биологические тест-системы, Allium-тест, биофотоника.

DOI: 10.31857/S0006302921060053

Этот раздел обзора посвящен методам, отношение к которым в научном сообществе очень неоднозначно. Эти мнения, как правило, опираются не на оригинальные статьи, а на их пересказы и личные мнения авторов, которые также не читали оригинальных статей, и колеблются от полного доверия до полного неприятия, не имея достаточной базы для научной аргументации. Митогенетический эффект, на котором было основано биологическое детектирование сверхслабого свечения (ССС), к настоящему времени не получил достаточно убедительного и полного теоретического объяснения либо опровержения, также он не был ни опровергнут, ни доказан экспериментальными методами. В первые 25 лет почти все масштабные исследования ССС проводились именно с помощью методов биологического детектирования, и, судя по значительному количеству верных результатов, опередивших время и подтвержденных только десятки лет спустя (например, существование пептидных онкомаркеров крови), заявленные методики по крайней мере в ряде научных школ достаточно эффективно «работали». Вместе с тем с точки зрения современного уровня доказательности эти методы биологического детектирования имели существенные недостатки, а их известные описания недо-

Сокращения: ССС – сверхслабое свечение, МГЭ – митогенетический эффект, УФ-ССС – сверхслабое свечение в ультрафиолетовом диапазоне, МГИ – митогенетическое излучение.

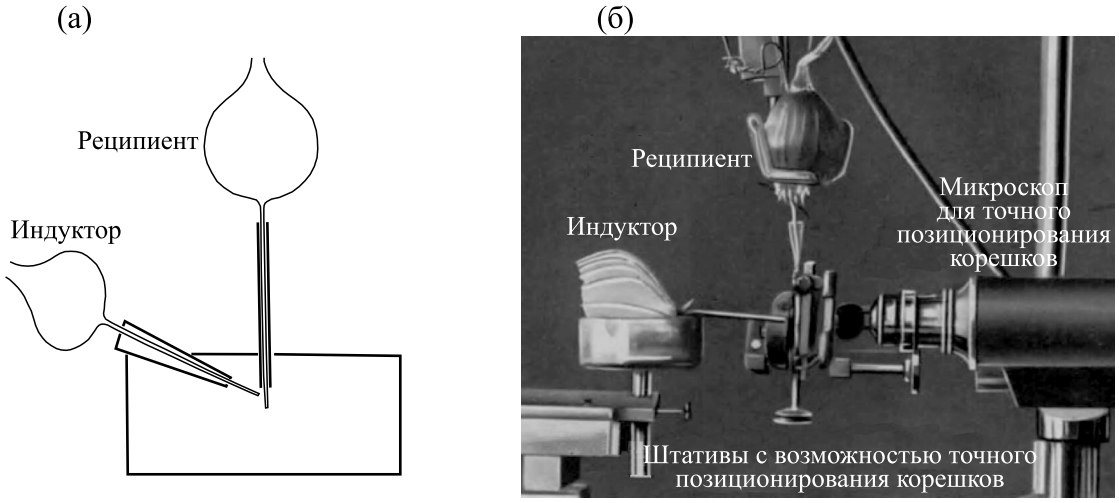


Рис. 1. Эксперимент А.Г. Гурвича с луком: (а) – по работе [2], (б) – по работе [3].

статочно полны для уверенного воспроизведения без дополнительных исследований и анализа первоисточников. Мы считаем важным представить подробный аналитический обзор методов, использованных в оригинальной литературе 1922–1948 гг., и привлечь внимание к работам, экспериментальная проверка которых представляет значительный интерес как с точки зрения фундаментальной, так и прикладной науки. Для обзора был использован уникальный архив научных публикаций, собранный А.Г. Гурвичем и его научной династией.

МИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ И МИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ. ПОНЯТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА

Определения. *Митогенетический эффект* (МГЭ) – изменение режима клеточного деления в культуре микроорганизмов, клеток или ткани под воздействием сверхслабого свечения в ультрафиолетовом диапазоне (УФ-ССС)[1] другого биологического объекта, химической системы или физического источника.

Как правило с увеличением продолжительности воздействия сначала наблюдали стимуляцию, затем эффект исчезал и далее наблюдали подавление митозов (митогенетическая депрессия). Однако при биологическом детектировании ССС использовался только эффект стимуляции.

Митогенетическое излучение (МГИ)[2] – компонента ССС, способная вызвать МГЭ в объекте-реципиенте.

Реципиент митогенетического излучения[3] – клеточная культура или ткань, *«компетентная» к МГЭ,* т.е. способная отреагировать проявлением МГЭ на УФ-ССС.

Индуктор митогенетического излучения – объект-источник УФ-ССС, способный вызвать МГЭ в биологическом реципиенте при оптическом контакте и соблюдении ряда других необходимых условий.

В обширной серии работ 1920–1940-х гг. (см. ниже) МГЭ был продемонстрирован на разнообразных парах биологических индукторов и реципиентов, были показаны широкая общность явления и отсутствие видоспецифичности эффекта.

В классическом эксперименте А.Г. Гурвича [2] использовались два луковых корня: один – в качестве источника ССС (индуктора), второй – в качестве реципиента (детектора) (см. рис. 1). Верхушку корня-индуктора направляли на зону деления детектора и после окончания такой индукции делали гистологические срезы зоны деления. Было показано, что количество митотических фигур на препарате со стороны, подвергнутой облучению ССС, достоверно выше, чем на противопо-

[1] Все работы 1920–1940-х гг. уверенно относили компоненту ССС, обуславливающую эффект (т.е. митогенетическое излучение), к ультрафиолетовому диапазону. В последние два десятилетия появились единичные работы, утверждающие возможность сходных с митогенетическим эффектом дистантных нехимических взаимодействий посредством ССС видимого диапазона (см., например, работу [1]). На этих эффектах не было построено методик биологического детектирования физических параметров ССС, и они не рассматриваются в обзоре.

[2] В старой литературе использовали также термины «лучи Гурвича», «митотические лучи».

[3] В «митогенетический» период часто использовали также слово «детектор», но в рамках обзора мы будем так называть только реципиенты, использованные в качестве детекторов излучения в общепринятом техническом смысле, например в устройствах для спектрального анализа ССС.

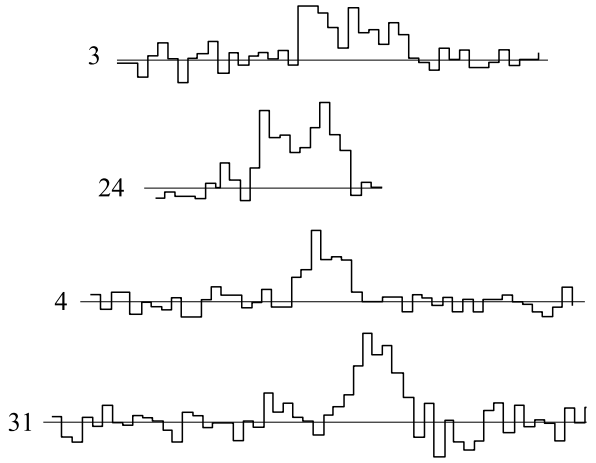


Рис. 2. Разница в количестве митозов между облученной и необлученной сторонами корня в последовательных продольных сечениях (по работе [3]).

ложной стороне – именно и только в той области, куда был направлен корень-индуктор (рис. 2 и 3).

Реципиенты митогенетического излучения. К реципиентам МГЭ, согласно данным различных работ, относятся:

– дрожжевые и бактериальные культуры в лаг-периоде [5–7];

– «стареющие» дрожжевые культуры [8, 9];

– некоторые ткани [10, 11];

– меристема растений [2, 4];

– сетчатка глаза (тритона, лягушки, крысы) [12]);

– развивающиеся эмбрионы (морского ежа [13, 14], лягушки [4]; дрозофилы [15]).

Общими чертами реципиентов являются спонтанное (вне всяких воздействий) протекание клеточного деления, субоптимальные условия роста [16] (т.е. «способность быть простимулированными» по отношению к контрольному состоянию) и «более или менее значительный клеточный комплекс, притом в достаточно близком соседстве клеток друг с другом» ([16], с. 332).

В первые годы после открытия эффекта наиболее распространенным детектором оставались корни лука. Однако «луковые» методики оказались трудоемкими, субъективными и требовали большой затраты времени. Их сменили дрожжевые и бактериальные методики, которые были проще, допускали количественную оценку эффекта без субъективного и трудоемкого подсчета под микроскопом определенных клеток, давали лучшую воспроизводимость результатов, могли использоваться круглый год. В СССР наиболее широкое распространение получили дрожжевые детекторы [8, 16, 17], в западных странах – бактериальные [5, 18].

Несмотря на то что помимо этих реципиентов МГЭ был продемонстрирован на целом ряде других биообъектов, методики для большинства из них не были развиты и отработаны в такой мере, чтобы уверенно использовать их в качестве детекторов для фундаментальных или прикладных исследований ССС. Например, методика с роговицей глаза лягушки [16], по данным авторов обеспечивавшая очень надежные контроли (различие в числе митозов двух глаз одной лягушки не более 1–3%), была весьма трудоемкой и применялась в небольшом числе работ [16, 19, 20]. Помимо перечисленных, был разработан подход, не связанный с изменением митотического режима – он был основан на изменении под действием ССС проницаемости биологических мембран (об этом судили по динамике окрашивания раствора пигментом лепестков цветов) [21], однако и он не получил распространения.

В настоящем обзоре подробно рассмотрены только луковые (см. раздел «Allium-тест»), дрожжевые и бактериальные (раздел «Дрожжевые и

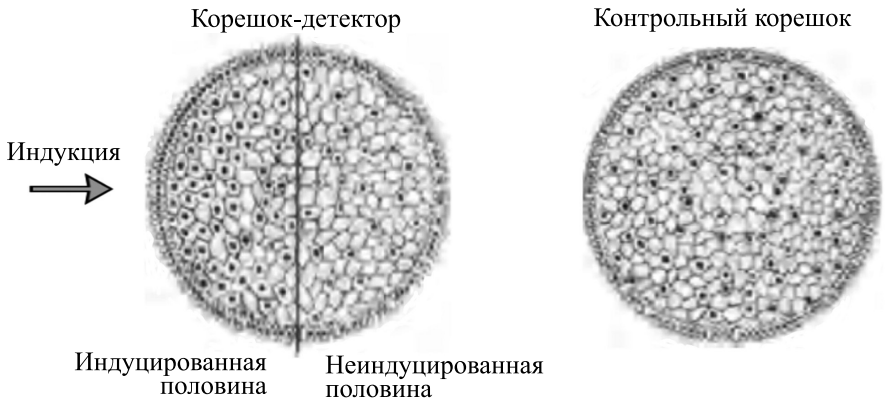


Рис. 3. Схематическое изображение поперечных срезов луковых меристем: (а) – облученный корень, (б) – необлученный корень (по работе [4]).

бактериальные методики детектирования митогенетического излучения») детекторы.

Индукторы митогенетического эффекта. К индукторам МГЭ относятся:

– культуры микроорганизмов [9, 13, 22–24] и клеток [16] в период активного роста;

– меристема растений [2, 4];

– работающие мышцы [16, 25];

– возбужденные нейроны [26];

– кровь здорового человека [27–29];

– злокачественные опухоли (наиболее активные из известных индукторов) [4, 20, 25, 30–34];

– ткани в процессе резорбции или регенерации [35–38];

– ряд химических реакций [39–41].

Также ряду авторов удалось получить МГЭ в реципиентах с помощью многократно ослабленного УФ-излучения от физических источников [42–46]. В работе [47] была исследована зависимость величины МГЭ, наблюдаемого в дрожжевом детекторе, от длины волны и интенсивности искусственного УФ-излучения.

Индукторами МГЭ не являются:

– не растущие или медленно растущие культуры клеток и микроорганизмов [16, 18];

– внутренние органы [18];

– кровь пациентов с онкологическими [27–29] и некоторыми другими заболеваниями (анемия, сепсис, пневмония, скарлатина) [29, 48], а также кровь пожилых, утомленных или истощенных людей [16, 48–50].

ОБЩАЯ МЕТОДИЧЕСКАЯ СХЕМА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Общая последовательность детектирования митогенетического эффекта. Общая последовательность методики биологического детектирования была следующей:

1. Подготовка биологического детектора (как экспериментальной группы, так и контрольной), т.е. приведение биологического детектора в надлежащее физиологическое состояние (например, проращивание корней лука, культивирование дрожжей или бактерий до нужной стадии в нужных условиях и т.д.).

2. Экспозиция (индукция) – приведение детекторов экспериментальной группы в оптический контакт с объектом, ССС которого исследуется.

3. Период развития/проявления эффекта (после вывода из оптического контакта с индуктором детектор требует некоторого времени, чтобы стимуляция деления проявилась в достаточной степени для количественной оценки – например, чтобы в дрожжевой культуре образовалось достаточное количество почек или чтобы рост дрожжевой или бактериальной культуры проявился в помутнении, достаточном для его оценки нефелометром).

4. Количественная оценка параметра, характеризующего эффект (например, для дрожжей это мог быть подсчет абсолютного количества клеток в поле зрения или индекса почкования, измерение объема дрожжевой культуры мицетокритами[4] или оценка степени помутнения культуры нефелометром или колориметром), статистическая обработка результатов. В 1920–40-х гг. обычно эффект количественно характеризовали как разницу в процентах между средними значениями в экспериментальной и контрольной группах (отмечая среднеквадратичное отклонение у каждой группы).

Условия детектирования. *Оптический контакт.* Оптический канал между индуктором и реципиентом должен быть прозрачен для света с $\lambda >$ 190 нм. «Даже кварц можно использовать, только если он очень высокой чистоты» [51].

Расстояние между индуктором и реципиентом. Оптимальное расстояние – от 1 до 10 мм; максимальное расстояние, при котором наблюдается МГЭ, зависит от индуктора и реципиента, длительности индукции и специальных условий, таких как «прерывистая индукция» (см. работу [52]).

Длительность индукции. МГЭ имеет нелинейную дозовую зависимость с отчетливым эффектом подавления в области высоких доз [33, 53, 54] (см. рис. 4). Длительность индукции необходимо специально подбирать для каждого нового набора условий (по крайней мере в диапазоне 1–120 мин).

Примеры оптимальной длительности индукции, упоминаемые в литературе:

1) один-два часа (индуктор и реципиент – корни лука) [16];

2) 30 мин (индуктор и реципиент – дрожжевые культуры) [6];

3) 15–30 мин (индуктор и реципиент – бактериальные культуры). Индукция длительностью 60 мин давала нулевой эффект; индукция длительностью 120 мин приводила к подавлению роста культуры [54].

Условия освещения. Индукцию надо проводить на «рассеянном дневном свету» [57]. МГЭ не наблюдается ни на ярком свету, ни в полной темноте [16].

МГЭ не наблюдается при наличии внешнего ультрафиолетового излучения уже при относительно малых интенсивностях. Так, МГЭ пропа-

[4] Мицетокрит – сосуд для точного измерения объема жидкой культуры.

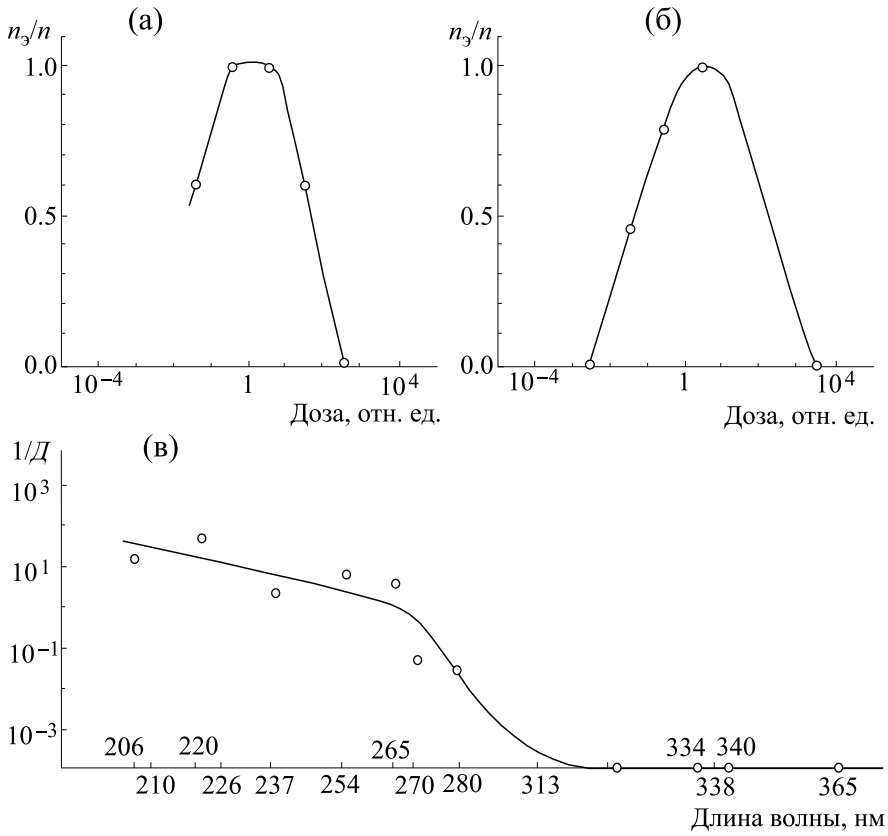


Рис. 4. Дозовые кривые и спектр действия митогенетического излучения: (а) – зависимость вероятности индукции почкования дрожжевых клеток от дозы при длине волны 206 нм, $n_э$ — число опытов с положительным митогенетическим эффектом; n — общее число опытов; (б) – то же, но при длине волны 220 нм; (в) – спектр действия, $Д$ – доза, соответствующая максимальному митогенетическому эффекту. (Из работы [55], построено по данным работы [56].)

дал в присутствии газовой горелки, в солнечный день при открытых окнах лаборатории и пр., но наблюдался при закрытых двойных ставнях в глубине комнаты, т.е. при фильтрации двумя оконными стеклами [16].

Динамика развития эффекта после индукции. МГЭ проявляется не сразу. Так, если регистрировать изменение *плотности культуры*, то максимальный эффект наблюдается через один-четыре часа после окончания индукции [7, 54]; если регистрировать *индекс почкования* (на дрожжевых культурах), то через 30–120 мин [6]. Однако если учитывать только почки меньше 1/10 размера материнской клетки, то МГЭ заметен уже через 5–10 мин после окончания индукции [40, 58]. Было показано, что время развития эффекта существенно зависит от продолжительности индукции [58].

Некоторые специальные условия. 1. Суспензионные культуры можно индуцировать только в очень тонком слое (<0.5 мм) [18, 54]. «Более толстые слои суспензии поглощают излучение и полностью убирают эффект» [18].

2. Следует принимать во внимание отражение, поглощение и рассеяние излучения в стекле, кварце и других материалах конструкции, поскольку они могут значительно снизить эффект или дать артефактную стимуляцию в контроле.

3. Большинство экспериментов выполняли в аэробных условиях, но без специального насыщения атмосферы (или среды) каким-либо газом. Несколько попыток получить МГЭ в анаэробных условиях не увенчались успехом [16].

4. Было отмечено, что временной характер приведения реципиента в оптический контакт с исследуемым индуктором имел существенное значение – более резкая подача ССС к реципиенту, в том числе многократная прерывистая подача с помощью вращающихся дисков с прорезями, была эффективнее, в то время как слишком медленное увеличение интенсивности ССС, например путем плавного сближения с индуктором до обычного расстояния наблюдения МГЭ, нивелировало эффект. Например, при плавном приближении к источнику в течение 5–6 мин реципиент не реагировал, тогда как при ускорении сближе-

ния до 3 мин детектирование было стабильно [16, 33].

ЛУКОВЫЕ МЕТОДИКИ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ МИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

«Основной опыт» Гурвича. А.Г. Гурвич и его сотрудники с 1922 по 1928 гг. провели ряд серий экспериментов с корешками лука обыкновенного (*Allium cepa*) в качестве детектора в разных модификациях, в том числе классический вариант, когда излучателем выступали тоже корни лука [59, 60]. Опыты проводили в лабораториях А.Г. Гурвича в Симферополе, Москве и Ленинграде [61] с разными сортами лука при разных температурных, световых и временных условиях. Общее количество таких «луковых» экспериментов по разным данным было свыше 150 [60] или около 300 [59, 62], причем А.Г. Гурвич упоминал только два отрицательных результата, полученных в его лаборатории, которые объяснял посторонними причинами [3, 63]. Т. Рейтер и Д. Габор выполнили более 200 опытов с биологическим детектированием УФ-ССС (из них 125 опытов с луковыми детекторами), представили подробные методики и протоколы экспериментов [4], в частности, они использовали луковые детекторы в экспериментах с отражением, преломлением и спектральным разложением МГИ (см. раздел «Эксперименты, подтверждающие, что МГЭ обусловлен электромагнитным излучением биообъектов в УФ-диапазоне»).

С помощью «луковой» методики было продемонстрировано МГИ различных биообъектов, причем значительное внимание уделялось высшим растениям – были исследованы корни лука, гороха, подсолнечника, гиацинта, донце лука, первые листья подсолнечника, семядоли подсолнечника, клубни и лептомы картофеля, кашицы из желтой репы, донца лука, листьев *Sedum* и др. [2, 8, 16, 45, 64–74]; было также продемонстрировано МГИ бактерий *Bacterium tumefaciens* [75, 76], дрожжевых культур [66], злокачественных опухолей [30].

В публикациях были изложены методики постановки эксперимента [2, 4, 67, 77–79], описаны (с предоставлением фотографий) разные устройства, приспособления и материалы [3, 78, 80]. Позже была опубликована выдающаяся по методической проработке статья М. Пол по луковым детекторам [71], в которой были проанализированы опыты других исследователей, учтена вся критика и предложены новые подходы для исключения возможных артефактов, в частности, разработан метод по унификации отдельных фаз митоза. Методика была опробована всего на нескольких экспериментах, результаты которых, несмотря на методические отличия, согласовывались с данными школы А.Г. Гурвича. В дальнейшем эксперименты по методикам, предложенным М. Пол, не проводились, а данная методическая работа была проигнорирована в последующих критических обзорах – возможно, отчасти из-за отсутствия достаточного статистического материала, отчасти из-за того, что на смену луковым уже пришли более простые дрожжевые и бактериальные детекторы [81].

Ложноположительные результаты. Результаты работ [73, 82] с корнями *Allium cepa* и *Vicia faba*, подтверждающие МГЭ, А.Г. Гурвич расценивал как неубедительные с методической точки зрения, в частности он подверг критике использование в качестве детекторов двудольных растений и особенно корней бобовых вместо лука [62, 78, 83].

Критика результатов Гурвича. Среди исследований, которые не подтвердили результаты А.Г. Гурвича, наиболее значимыми являются работы Б. Россманна [84][5]. В ответ на них А.Г. Гурвич опубликовал более подробные процедуры и множество статистических материалов, подтверждающих его результаты, а также отметил, что автор не повторял его экспериментальные условия и неудачно выбрал излучающий биообъект (корень гороха) [86–89].

Сильная критика относительно существования митогенетических лучей и выводов Гурвича по «луковому» опыту была высказана Б.П. Токиным [90], который, тем не менее, ссылается в своем резюме не на положительные результаты нескольких сотен опытов своих сотрудников, а на критические работы [91–95]. Ключевой аргумент Б.П. Токина о возможности альтернативного объяснения МГЭ не излучением, а стимуляцией митозов парами эфирного масла, испускаемыми донцем луковицы, несостоятелен, поскольку не охватывает эксперименты с химической изоляцией, эксперименты с источниками, не имеющими подобного химического фактора; отсутствуют также доказательства влияния на митозы такой малой разницы в концентрации паров, которая возникает между облучаемой и тыльной сторонами корня.

В известной критической работе [91][6] авторы на основании своих экспериментов сделали вывод, что корень лука как детектор МГИ не может быть использован из-за значительной асимметрии в количестве делящихся клеток между половинками корня (до 50% в их экспериментах), и оценили результаты школы А.Г. Гурвича как некорректные из-за отсутствия при каждой новой

[5] См. также современное издание [85].

[6] Следует отметить, что авторы работы [91] признают возможность стимуляции митозов слабым внешним УФ, т.е. принципиальную возможность биообъектов детектировать УФ-излучение, но отрицают само существование УФ-излучения у биообъектов.

постановке опыта отдельного отрицательного контроля.

М.Н. Моисеева многократно повторила основной «луковый» опыт, придерживаясь, по ее словам, в мельчайших подробностях методики А.Г. Гурвича [92–96]. Ее замечания были в основном направлены на присутствие внешних факторов (механических воздействий, света, тепла, газообразных химических веществ и т.п.), влияние которых якобы совершенно игнорировалось школой А.Г. Гурвича. При этом, судя по доступным материалам, автор включала в критический анализ только те работы А.Г. Гурвича, которые подтверждали ее мнение. В частности, в основных работах А.Г. Гурвича неоднократно было подчеркнуто сверхосторожное обращение с корнями [17, 83], применение специального оборудования и материалов, использование авторских механических конструкций для предотвращения незапланированных отклонений в положении биообъектов.

Allium-тест. *Растительная тест-система Allium cepa L.* Allium-тест был разработан в 1938 г. [97–99] и стандартизован в 1980-х годах [100–102]. Общий подход в работе с луком обыкновенным остается аналогичным предложенному А.Г. Гурвичем, хотя методика значительно проще. Экспериментальная группа луковиц с проращенными корнями[7] подвергается воздействию исследуемых факторов/условий, затем для оценки их влияния определяются морфологические и микроскопические параметры корней (в частности, одним из факторов, к которым чувствителен Allium-тест, является УФ-излучение). Этот тест является наиболее близким современным аналогом лукового детектора среди биологических тестов, прошедших стандартизацию и активно использующихся на практике в настоящее время[8]. Наряду с *Allium cepa* L. используются и другие тест-объекты (среди растений – наиболее часто *Pisum sativum* L. (горох), *Vicia faba* L. (бобы), *Hordeum vulgare* L. (ячмень), *Zea mays* L. (кукуруза)) [118]. Тем не менее в современных исследованиях *A. cepa* считается эталонным растительным тест-объектом для анализа мутагенности, митотоксичности и токсичности различных факторов [103, 119].

Широкое распространение тесты с *A. cepa* получили из-за того, что они являются более чувствительными и простыми по сравнению с биотестами животных[9], несмотря на большие различия в организации и метаболизме между растительными и животными клетками, многими авторами сделан вывод о возможности экстраполировать полученные результаты *A. cepa* на животные организмы, включая человека [100, 102, 116, 118–142].

Кроме этого, лук обыкновенный толерантен к разным условиям проращивания (pH от 3.5 до 11.0) и доступен практически круглогодично [102, 143, 144]. В работе [100] суммированы оригинальный и модифицированный варианты Allium-теста, в работах [129, 145–147] перечислены основные значимые подходы постановки опыта.

Вопросы методики и стандартизации Allium-теста поднимались в единичных публикациях, например [148]. Проанализировав более 200 работ по Allium-тесту, мы выяснили, что мнения исследователей в отношении постановки теста и условий инкубации материала сильно различаются. Ниже мы сравниваем общие этапы гурвичевской луковой методики детекции УФ-ССС и Allium-теста для выяснения наиболее значимых условий проведения опытов, которые требуют стандартизации и, возможно, дополнительных исследований.

Реализация отдельных этапов Allium-теста. 1. Сорт и размер луковицы. В отличие от методик лукового детектирования МГИ, исследователи Allium-теста не акцентируют внимание на сезонных эффектах в постановке опыта и не всегда упоминают сорт лука, с которым проводят тестирование [101, 118, 128, 133, 148–168]. В тех случаях, когда упоминают название сорта, это, как правило, лук «Штуттгартен Ризен» [144, 146, 169–175].

Размер луковиц в работах большинства исследователей небольшой: диаметр 1.5–2.0 см, вес не более 3–4 г. В единичных работах применяли луковицы больших размеров: весом до 15–30 г [165], 40–60 г [167].

2. Среда для проращивания. Проращивание как правило выполняли на воде неопределенного состава: «пригодной для питья» [129, 147], водопроводной или фильтрованной водопроводной [129, 130, 146, 154, 176]. Редко использовали дистиллированную воду [132, 141, 147, 158, 172–174, 177–

[7] Корни предварительно проращивают в так называемом оригинальном варианте Аллиум-теста, который наиболее удобен при тестировании физических факторов. В модифицированном варианте теста луковицы помещают непосредственно в исследуемый раствор без предварительного проращивания корешков, модифицированный вариант чаще используется при тестировании химических веществ и здесь не рассматривается.

[8] О широком применении лука обыкновенного свидетельствует ряд примеров тестирования химических и физических агентов: антибиотики [103, 104], антиоксиданты [105], гербициды [106], грибковые экстракты [107], инсектициды [108], лекарственные растения [109], наночастицы [110], промышленные отходы [111], пестициды [112], радиоактивность [113], синтетические растительные гормоны [114], тяжелые металлы [115], ядовитые растения [116, 117].

[9] Это подтверждено в совместных международных исследованиях в рамках Программы ООН по окружающей среде, Всемирной организации здравоохранения, Международной программы о химической безопасности, Агентства по охране окружающей среды США [118, 119].

186] и крайне редко – специальные питательные среды либо деионизированную воду [148].

В основных протоколах Allium-теста указана обязательная смена воды либо тестируемой жидкости. Эксперименты, описанные в работе [187], свидетельствуют, что цикл деления клеток сильно зависит от парциального давления кислорода как фактора окружающей среды, и авторы считают, что митотические стадии, на которые наиболее негативно влияет низкое давление кислорода – это метафаза и анафаза.

В работе [188] проанализированы клеточные реакции на повреждения, вызванные оксидативным стрессом.

3. Температура. Проращивание обычно выполняли при комнатной температуре, которая колебалась, в зависимости от времени года и климатических условий региона, от 20 до 30°C [118, 129, 144, 153–155, 159, 160, 162, 172, 177, 179, 185, 186, 189]. В единичных работах температура поддерживалась на одном уровне (22 или 25°C) с использованием фитотронов или иных инкубаторов [153–155, 172, 179, 180].

4. Освещенность. По отношению к световому режиму при постановке теста мнение исследователей также различалось. Большинство тестов выполняли при естественном освещении (при условии защиты от прямых солнечных лучей), очень редко устанавливали 12-часовой световой цикл [180]. В некоторых работах особо подчеркнуто, что луковицы должны оставаться в темноте 100% времени [147, 155, 163, 190, 191].

5. Время фиксации. Корни лука проращивают до достижения ими длины 1–2 см [129, 192].

В единичных работах указано время фиксации: с 8:00 до 9:00 [143, 177] [149] и в 11:00 [109,164].

Анализ этапов индукционного «классического» лукового опыта. Проанализируем этапы индукционного «классического» лукового опыта в работах по МГЭ.

Сорт лука и сезонность. Ни исследователями, ни критиками практически не упомянуты используемые в опыте сорта лука. Мимолетно данный вопрос был затронут в работе [70] и чуть подробнее – в работе [193]. Только в двух работах, использующих биологическое детектирование, была отмечена значимость сорта используемого материала – картофеля [74] и лука[10] [66].

Также А.Г. и Л.Д. Гурвичи подчеркивают, что для того, чтобы объективно обнаружить индукцию, необходимо выполнять эксперимент с зимним и ранневесенним материалом [2, 63, 78, 194].

Предварительные эксперименты в работе [71] подтверждают предположение о влиянии сроков постановки опыта, но результаты показали хорошее прорастание луковиц с марта по ноябрь. Также влияние времени года на постановку индукционного опыта отмечали и другие исследователи [18, 193, 195].

В современном исследовании с использованием Allium-теста на сорте «Штуттгартен Ризен» [143] была подтверждена сезонность чувствительности лука [143]. В ряде работ предложен способ синхронизации и активизации деления клеток [177, 196, 197].

Размер луковиц. Выбор объекта исследования выполняется на двух этапах: 1) при отборе луковиц для проращивания придаточных корней; 2) при отборе используемых в опыте корней [70, 78].

А.Г. Гурвич отдавал предпочтение большим (многолетним) луковицам диаметром 5 см и более, поскольку именно они дают «сильные, митотически активные корни» [78]. В отличие от этого, в работах по Allium-тесту предпочтение в основном отдается более мелким луковицам (см. параграф «Реализация отдельных этапов Allium-теста»).

Среда для проращивания лука. Для проращивания луковиц во всех известных нам работах по МГЭ использовали водопроводную отстоянную воду. Отмечалось, что воду следует менять каждый день [70, 78], рекомендовано было погружать в воду только подошву лука на глубину примерно 1 см. В работах по Allium-тесту этот вопрос также мало стандартизован (см. параграф «Реализация отдельных этапов Allium-теста).

Температура. Практически все эксперименты по МГЭ проводились при нестандартизируемой комнатной температуре. При этом А.Г. Гурвич подчеркивал, что предпочтительна «умеренная комнатная температура» (не выше 15°C) [78], а в работе [70] автором была указана средняя комнатная температура от 18°C в зимний сезон до 26°C летом.

В своем аналитическом обзоре применительно к дрожжевым культурам О. Ран писал: «К сожалению, не было заявлено, что 12°C считается нормальной комнатной температурой в Москве и Ленинграде, и исследователи, следуя [методическим] указаниям [авторов] буквально и при американских комнатных температурах, несомненно, получили бы совершенно другую физиологическую стадию» [198]. По-видимому, это также справедливо и для луковых экспериментов.

В работе [71] М. Пол подчеркивала необходимость стабилизации внешних условий с начала образования корня до конца индукционного эксперимента, чтобы исключить по возможности факторы, которые могли повлиять или размыть

[10]Были исследованы три коммерческих сорта, распространенных на рынках Нью-Йорка – испанский, техасский красный и техасский белый.

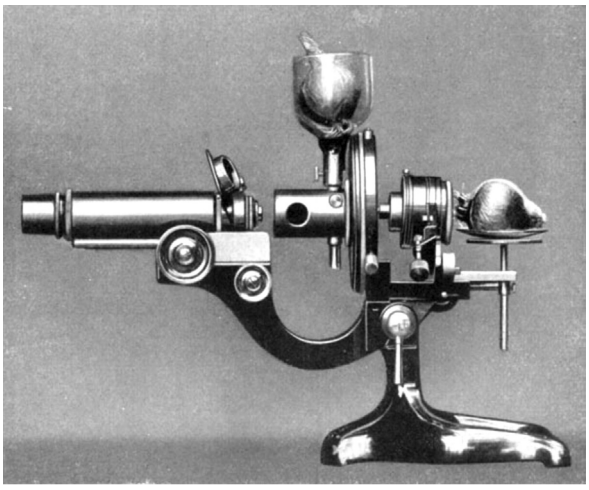


Рис. 5. Установка по получению МГЭ на корнях лука (из работы [4]).

результаты эксперимента. При этом были учтены работы о тормозящем влиянии света на деление [199–201] и о влиянии температуры на продолжительность митоза в корнях лука [202].

Освещенность. Согласно данным работ А.Г. Гурвича [59, 78], при апробировании разнообразных условий нормального освещения и затемнения было доказано отсутствие влияния естественного и искусственного освещения на скорость роста корней, регулярность формы корня, обилие митозов и радиальную симметрию митозов внутри корня. В то же время автор ссылается на доказательства негативного влияния темновых условий культивирования корней лука в работах [4, 73, 82, 85]. Ряд авторов особо подчеркивает необходимость полной защиты от возможного внешнего ультрафиолетового излучения (см. главу «Условия детектирования» раздела «Общая методическая схема биологического детектирования»).

Следует подчеркнуть, что по отношению к световому режиму при постановке Allium-теста мнение исследователей также различалось – от использования естественного освещения до строгого соблюдения 12-часовой периодичности или полной темноты (см. параграф «Реализация отдельных этапов Allium-теста»).

В работе [71] специально отмечалась необходимость стабилизации режима освещенности для корректной работы с луковым детектором.

Выбор корней для опыта. А.Г. Гурвич рекомендовал проращивать луковицы до появления корней длиной не менее 6–7 см и не более 18 см [67]; позднее верхний предел был снижен до 10–12 см [17]. В то же время отдельные исследователи работали с корнями длиной от 1 до 4 см [70, 71, 82]. А.Г. Гурвич также допускал применение корней небольшой длины [78], но полагал, что получение эффекта при этом затруднено из-за существенного влияния собственного МГИ-детектора [67].

Для экспериментов выбирали «крепкий, идеально прямой» корень, «идеально сформированный и с наиболее симметричным кончиком» [17, 78, 203]. При этом луковицу и остальные корни обычно обрезали, так что экспериментальный корень контактировал только с частью луковицы или небольшим кусочком донца.

Автор работы [204], напротив, оставлял луковицу целой, но также удалял оставшиеся корни; в работах [4, 205] в качестве детектора был использован отрезанный корень лука.

В работах по Allium-тесту как правило использовались более короткие корни (1–2 см) – см. параграф «Реализация отдельных этапов Allium-теста».

Экспериментальная установка. Особое внимание авторы уделяли экспериментальной установке (см. рис. 5).

А.Г. Гурвич подчеркивал, что максимальная иммобилизация корня детектора абсолютно необходима для успеха эксперимента [78]. Для этого автор помещал корень в стеклянный капилляр, а центрирование корня в капилляре проводил с помощью микроскопа [2].

У других авторов, за исключением работы [82], расположение двух корней во время эксперимента всегда было таким же. Аналогичные установки использованы в работах [4, 92, 70] и др. При этом, по мнению М.Н. Моисеевой [96], подобные конструкции могут приводить к артефактам за счет неравномерного прикосновения корня к капилляру и механостимулированных митозов в этой части корня[11].

Во избежание подобных эффектов автор работы [82] проращивал часть корней свободно в воде или во влажном воздухе (используя цинковый ящик с небольшим окошком). Позже М. Пол [71], придерживаясь методики работы [82], использовала только свободно растущие корни, без размещения их в капиллярах.

Расстояние от индуктора до детектора. Расстояние от индуктора до детектора в опытах Гурвича составляло от 1.5–2.0 до 12 мм [2, 67], в успешных опытах других исследователей – до 38 мм (максимальное испытанное расстояние) [206]. Не только воздух, но и вода, тонкая кварцевая пластина и даже стекло в очень тонких пластинках (толщиной не более 50 мкм), размещенное между индуктором и детектором, не представляют собой препятствия для МГИ; более

[11] Следует отметить, что неизбежные многократные прикосновения корня к внутренней поверхности трубки скорее могут увеличить разброс результатов, чем вносить систематическую ошибку.

толстый слой стекла задерживал МГИ и нивелировал МГЭ [4, 65].

Локализация эффекта вдоль корня. Согласно данным А.Г. Гурвича [207], эффект индукции локализован латерально, но распространяется продольно на расстояние до 250 мкм [208] (см. рис. 2). По результатам авторов работы [4] в продольном направлении эффект индукции ограничен примерно 150 мкм. В работах [73,82] наблюдался более диффузный эффект в латеральном направлении (возможно, из-за недостаточно жесткой фиксации корней во время индукции).

Следует отметить, что при длительных индукциях начинал играть роль собственный рост корня. Так, за три часа индукции корень мог вырасти на 1.5–2.0 мм [67].

Продолжительность индукции. Продолжительность индукции, как уже рассмотрено в главе «Условия детектирования» раздела «Общая методическая схема биологического детектирования», необходимо подбирать для каждого нового набора условий проведения эксперимента. В научной школе А.Г. Гурвича продолжительность индукции составляла как правило 30–40 мин и более [78], вплоть до одного-двух часов [16]. Согласно данным работ [209] и [82], МГЭ постоянен при воздействии в течение 0.5–3.0 ч и 2–6 ч соответственно; согласно работе [53], эффект становится резко отрицательным при непрерывной индукции меристемы лука в течение 12–26 ч несколько раз обновляемыми культурами дрожжей («митогенетическое истощение» или «депрессия»). По данным работы [70], после первых двух часов индукции наблюдается существенное увеличение числа делящихся клеток меристемы; в дальнейшем (через 4–5 ч) наступает явная депрессия, т.е. падение числа митозов на индуцированной стороне.

Продолжительность развития эффекта. После окончания индукции корни отставляются друг от друга – требуется некоторое время на развитие эффекта [2, 18, 210]. Это время обычно составляет от 30 мин до 2 ч [6]. Согласно данным работы [4], эффект может быть обнаружен через час после окончания индукции (возможно, что и раньше) и наблюдается по крайней мере еще пять часов после индукции. В то же время М. Пол в большинстве случаев фиксацию корешков проводила сразу после окончания индукции [71].

Время фиксации корней. А.Г. Гурвич неоднократно упоминал неоднородность корней и их разную митотическую активность на момент фиксации [20, 59, 78, 79], при этом попытки выяснения суточной периодичности митозов в контрольных образцах, по-видимому, не предпринимались. В работах [78, 79] упоминается время фиксации образцов (10:00), однако без объяснения причин.

В работах [4, 71, 84, 204], напротив, предпринимались попытки выявить регулярные колебания в делениях клеток меристемы корней лука, вслед за работами [199, 200, 202, 211]. Тем не менее из-за неоднозначности полученных результатов авторы не смогли подтвердить эти наблюдения.

Проблема изучения ритмичности клеточных делений у растений представляет повышенный интерес [200, 211–220], поскольку до сих пор не решен вопрос ни о видоспецифичности данного признака, ни об определяющих его механизмах [213, 217] (см. обобщение результатов исследований ритмов клеточных делений меристемы в работах [213, 217]). Несмотря на многочисленные данные по суточной ритмике митозов в меристемах побегов и корней, результаты разных авторов часто не согласуются и даже противоречат друг другу. В том числе различны и данные по *Allium cepa* [145, 169, 187, 202, 211, 214, 216, 218, 219, 221–233]. Величина митотического индекса стабилизируется в корнях лука при длине 2–4 см и остается постоянной в процессе дальнейшего роста [234].

С нашей точки зрения и исследователям феномена МГЭ, и специалистам, работающим с Allium-тестом, следовало тщательнее исследовать суточную периодичность митозов и учитывать эти данные в экспериментах по МГЭ.

Фиксация и окрашивание. Согласно методике школы А.Г. Гурвича, обработку корешков выполняли фиксатором Боуэна на протяжении трехпяти часов [78]. Однако в соответствии с данными последних лет фиксаторы Боуэна, Кларка, Карнуа, а также формалин приводят к продольной, поперечной и объемной деформации (сжатию) [235]. Также отмечено мацерирующее действие фиксатора Боуэна на апексы корня. Эти данные объясняют проблемы, с которыми столкнулась группа А.Г. Гурвича [78] при подсчете делящихся клеток.

Согласно рекомендациям, данным в работе [63], для подсчета митозов подходят только образцы, резко окрашенные железным гематоксилином и столь же резко дифференцированные, в идеале толщиной 10 мкм: «ядра покоя» (согласно сегодняшней терминологии и пониманию – ядра в интерфазе) должны быть обесцвечены насколько возможно, чтобы можно было точно идентифицировать ранние стадии профазы, когда нити хроматина четко окрашиваются.

Техника подсчета митозов. Технике подсчета митозов в школе А.Г. Гурвича уделялось особое внимание [78]. В основу были положены следующие основные правила: 1) каждый срез всегда считается несколько раз, и из них берут среднее [2, 83, 89]; 2) каждый счет, насколько это возмож-

но, пересчитывается другим сотрудником без знания результатов первого.

Приведем основные приемы в методике микроскопирования, используемые школой А.Г. Гурвича и другими исследователями.

1. Гистологические срезы. Изучали в основном продольные срезы толщиной 10 мкм, параллельные направлению индукции, что позволяло четко дифференцировать митозы [3, 78, 236]. Метод поперечных срезов был использован в работе [4] (рис. 3). В опытах М. Пол и поперечные, и продольные срезы показали наличие МГЭ, но автор отметила преимущество продольных срезов (продольная ось ядра и митозов обычно ориентирована вдоль оси корня, поэтому на продольных срезах гораздо легче различать отдельные стадии, чем на поперечных).

Если была идентифицирована «клеточная слизь» центральных столбцов, затрагивающих оставшуюся часть плеромы, а тем более перибле му и дерматоген, то счет не проводили [78].

При подсчетах делящихся клеток предварительно определяли среднюю плоскость [3] (в работе [204] были отмечены проблемы с ее определением). Митозы в каждой секции подсчитываются слева и справа от средней линии каждой секции. По данным микроскопических измерений на продольных срезах, длина верхушечной меристемы составляет 800–1200 мкм, длина корневого чехлика – 200–300 мкм [71, 222, 237].

Было подчеркнуто, что эффект получается всегда на пяти-семи медиальных (центральных) [238] и парамедиальных срезах из десяти, сделанных подряд, т.е. на протяжении приблизительно 60–80 мкм вдоль корня, если индукция происходит на расстоянии от 2 до 38 мм [2, 3, 8, 17, 83, 206]. При соприкосновении корней возникала более широкая полоса индукции (около 180 мкм) [67]. В большинстве поздних опытов сотрудники Гурвича ограничивались подсчетом числа митозов в 10–15 медиальных срезах (по 10 мкм) [2, 83, 194].

Примеры исследований с негативными результатами: в работах [93, 94, 96, 239] авторы подсчитывали именно периферические зоны одинаковой ширины по обе стороны от средней плоскости; в работе [82] подсчитывались все секции корня; автор работы [204] также исследовал корень целиком, а затем сравнивал с цифрами, подсчитанными на центральных срезах.

2. Ткани. А.Г. Гурвич рекомендовал проводить подсчет делящихся клеток от самого кончика корня до зоны растяжения, учет при подсчете всех слоев конуса нарастания из-за их плохой дифференциации: дерматогена и периблемы, плеромы, корневого чехлика, клеток калиптрогена [78]. При этом основной эффект индукции обнаруживался на дерматогене и субдерматогене и захватывал 3–4 клеточных пласта периблемы [83].

М. Пол [71] также проводила подсчет во всех тканях конуса нарастания корня, включая калиптроген и дерматоген, за исключением клеток корневого чехлика.

В негативных работах методика подсчета отличалась: в работе [82] не учитывались митозы в плероме, а автор работ [84, 204] при подсчетах игнорировал дерматоген и дополнительно калиптроген и корневой чехлик.

По вопросу о распределении митозов по цитогистологическим зонам корня в литературе существуют противоречивые сведения. Наибольшая доля делящихся клеток отмечена в дерматогене и периферических слоях периблемы в работах [183, 227, 240, 241], другие данные показывают наибольшую митотическую активность плеромы [171, 242, 243] или утверждается отсутствие существенной разницы в распределении митозов по зонам меристемы [244].

3. Фазы клеточного цикла. Важным моментом методологии, как подчеркивалось в работе [70], является разграничение фаз митоза, подлежащих подсчету. По этому вопросу мнения исследователей также различались [71]. Согласно рекомендациям А.Г. Гурвича [89], необходимо подсчитывать митозы от самой ранней профазы до поздней телофазы в двух половинах каждой секции [63]. При этом разделительная линия фиксируется путем осмотра при малом увеличении. В работах [84, 204] автор критиковал учет профазы, которую трудно отличить от ядер в состоянии покоя, считая включение этой фазы основным источником ошибки при подсчетах[12]. Тем не менее он упоминал, что в ряде опытов при подсчете профаз он также получил доминирование клеток с митозами на индуцированной стороне корня. Согласно представлениям А.Г. Гурвича [78, 83, 89], эффект индукции, напротив, проявлялся в основном в ранней профазе, не учитываемой в работах [84, 204], и именно эти методические расхождения были ответственны за отрицательные результаты. Кроме того, по данным А.Г. Гурвича [89] 40% от общего избытка митозов находится в дерматогене, который в указанных работах игнорирован.

О большей продолжительности профазы по сравнению с другими стадиями митоза свидетельствуют работы [221, 233, 245, 246]. Установлено, что суточный митотический цикл *Allium cepa*

[12] При этом автор работы [204], высказывая сомнение в собственном правильном определении клеток на стадии профазы, критиковал А.Г. Гурвича за небрежность и отсутствие четких критериев подсчета. После этой критики А.Г. Гурвич опубликовал дополнительные подробности процедуры и множество статистических материалов, подтверждающих его результаты [88, 89, 203].

включает 54.14 ± 1.07% интерфазы, 39.07 ± 0.99% профазы, 2.39 ± 0.26% метафазы, 1.56 ± 0.26% анафазы и 2.77 ± 0.38% телофазы [246]. Таким образом, утверждаемое А.Г. Гурвичем влияние МГИ на раннюю профазу митоза действительно должно регистрироваться в первую очередь при подсчете ядер в профазе и может нивелироваться при их исключении из подсчета.

Методика, описанная в работе [4], существенно отличается – авторы считали «зрелые ядра» в дополнение к митозам в обычном смысле, в итоге их подсчеты нельзя сопоставить с результатами других специалистов [70, 71].

Контроль. Исследования распределения митозов в интактных корнях выполняли А.Г. Гурвич [78, 83], М.Н. Моисеева [93, 94, 96] и еще ряд авторов. А.Г. Гурвич заявлял, что общее количество митозов в двух половинах корня отличается максимум на 5%, М.Н. Моисеева обнаружила почти полную симметрию. В работе [239] были отмечены колебания не более 4%. Напротив, подсчет в работе [204] показал разницу в ±10%, а в работах [73, 82] были обнаружены колебания до ±15%. Значительные различия обнаружил и автор работы [205]. Однако следует подчеркнуть, что методы подсчета у всех авторов были разные.

М.Н. Моисеева [93, 94, 96] и авторы работы [91] оценивают как некорректные результаты экспериментов и школы Гурвича, и ряда других исследователей (например, представленные в работе [66]) из-за отсутствия отдельного отрицательного контроля при каждой новой постановке опыта. В то же время А.Г. Гурвич отмечает следующее: «Специальные контроли со свободно растущими корешками нами не предпринимались, отчасти потому, что на основании долголетней предшествовавшей работы с ними мне достаточно была известна их симметрия», «...за нашу продолжительную работу у нас получился богатый материал опытов с «нулевым эффектом», могущим служить наилучшим контролем первоначальной симметрии корешков» [83]. Делается примечание, что в первых сериях (около 40 опытов) выполняли подсчет очень большого количества срезов каждого корешка и убедились в бесполезности этой длительной процедуры [83].

Статистика. Разнородность корней в смысле количества митозов, даже в пределах одной луковицы, отмечена в работах А.Г. Гурвича [20, 67], О. Рана [18] и др. (в то же время использование «идеально симметричных корней» позволяло получать очень близкие значения в пределах одного корня – см. выше). Тем не менее, несмотря на малое применение статистических методов в биологии того времени, авторы признавали необходимость статистического анализа результатов. По мнению А.Г. Гурвича [89], единственно правильное и подходящее решение – это обобщить все существующие протоколы о луковом корне в качестве детектора и максимально объективно интерпретировать полученные данные. Аналогичное мнение было высказано авторами работы [4]. При этом исключаются только протоколы, в которых экспериментальные ошибки (или неточности в подсчетах) не только предполагались, часто безответственно, но и фактически доказывались. Такое статистическое исследование было предпринято в работе [247]. Ее автор графически отобразил все результаты, опубликованные А.Г. Гурвичем и его сотрудниками (около 200 опытов) (рис. 6).

Л.В. Белоусов [248] специально подчеркивает, что новаторским в исследованиях А.Г. Гурвича было то, что он использовал статистическую обработку картин распределения клеточных делений в различных растительных и животных тканях.

Надо отметить, что исследователи Allium-теста также подчеркивали внутриклоновую вариабельность митотического индекса *Allium cepa* как в контрольном, так и в экспериментальном материале, и высказывали предположение о внутривидовой вариабельности признака [119, 148, 249]. При проведении Allium-теста многие исследователи следуют рекомендациям работ [102, 129], используя для микроскопического анализа отбор проб из пяти луковиц по пять корней на луковицу; другие следуют «статистическому стандарту» работы [249]: три луковицы и три корня на луковицу.

Возможности «модернизации» методики лукового детектора в целях повышения ее убедительности. На основании данных по разнородности корней лука в работе [18] был поднят вопрос о корректности их использования в качестве детекторов; в качестве более надежных детекторов предлагались дрожжевые и бактериальные культуры (см. ниже).

Аналогичный вопрос ставили и исследователи Allium-теста. Тем не менее было отмечено [148], что это не компрометирует именно лук в качестве тест-системы, поскольку описанная вариация типична для любого биологического материала. Тщательный анализ тестового материала, соответствующая экспериментальная процедура и статистический анализ полученных результатов позволяют использовать тест с низким риском ошибок.

Лук успешно использовался в качестве детектора для регистрации МГИ тканевых культур растительного или животного происхождения [89], резорбированных и регенерирующих тканей [38, 89], культур микроорганизмов [66, 75, 76], злокачественных опухолей [30]. Следует подчеркнуть, что индукторами не могут выступать не растущие или медленно растущие культуры [16, 203, 250]

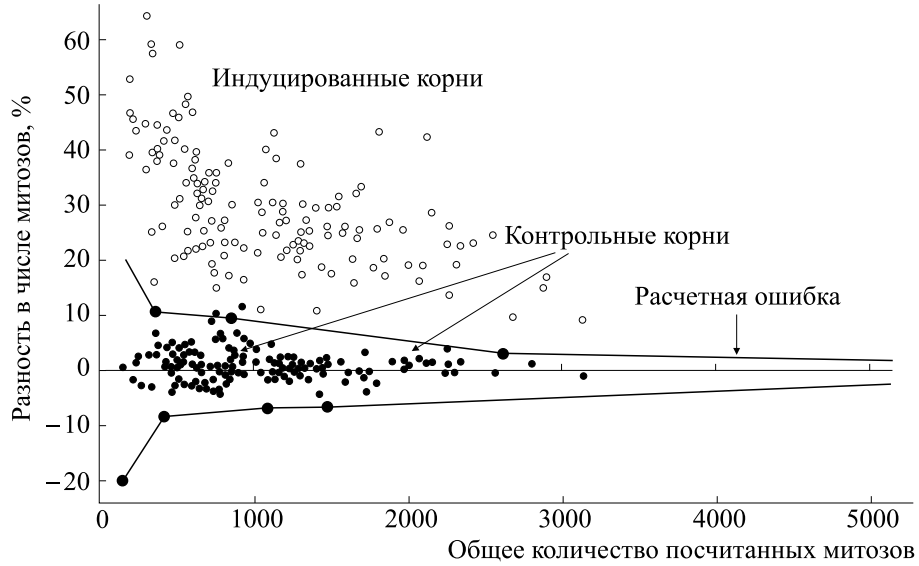


Рис. 6. Обобщенные результаты А.Г. Гурвича и соавторов с корнем лука в качестве детектора. По оси абсцисс – общее количество митозов; по оси ординат – эффект увеличения количества митозов относительно контроля. Кружки указывают на положительную индукцию, черные точки – на отсутствие митогенетического эффекта. Линией указаны пределы погрешности. (Построено по данным работы [247].)

(см. главу «Условия детектирования» раздела «Общая методическая схема биологического детектирования»), в то время как детектор на период индукции должен быть в неоптимальных условиях роста и обладать пониженной митотической активностью. Таким образом, в «луковом методе» должны использоваться детектор и индуктор с противоположными характеристиками в отношении клеточного цикла. Данный критерий не был учтен ни одним из исследователей, поскольку в период активных экспериментов с использованием лука обыкновенного (1920-е годы) представления о клеточном и митотическом цикле были минимальными, противоречивыми, часто неверными. Именно современные знания о митотическом цикле [251] помогают объяснить отдельные подходы в «луковом» методе, например «развитие эффекта», а также свидетельствуют о том, что ошибочно применять одновременно корни лука одного сорта в качестве индуктора и детектора[13].

Мы полагаем, что можно сформулировать следующие рекомендации для «лукового метода»:

– работать с конкретным сортом лука, предварительно выяснив максимумы и минимумы суточной митотической активности;

– проращивать в естественных световых условиях;

– использовать только крупные луковицы;

– отбирать корни с длиной не менее 6 см;

– использовать методику подсчета митозов, предложенную А.Г. Гурвичем.

Из перечисленного значимым «белым пятном» является знание суточной периодичности митозов конкретных сортов лука. Более того, для циклов *Allium cepa* существует значимое взаимодействие между митотическими стадиями и периодами фиксации материала. Данная зависимость свидетельствует о том, что необходимо отрабатывать не только время фиксации материала для цитологического исследования, но и время постановки луковиц на проращивание.

ДРОЖЖЕВЫЕ И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МЕТОДИКИ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ МИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Впервые МГЭ на дрожжевых культурах был показан в работе [8], на бактериальных – в работе [5]. Результаты этих авторов были подтверждены, например, в работах [6, 23, 252] и подверглись критике в работах [253, 254]. Среди наиболее подробных обзоров МГЭ на культурах микроорганизмов следует отметить работы [16, 18, 20, 40]; наиболее значимыми критическими обзорами являются работы [51, 81, 255]. В основном в СССР применяли дрожжевые детекторы, на Западе – бактериальные. В целом наиболее широкое распространение получили дрожжевые детекторы.

Особенности методик детектирования сверхслабого свечения с помощью дрожжевых и бактериаль-

[13] Сведения о суточных максимумах митотической активности недостаточны и противоречивы. Вполне вероятно, что даже при использовании в качестве индуктора и детектора разных сортов нельзя подобрать время суток, оптимальное для высокой эффективности и индуктора, и детектора.

ных культур. *Фаза роста.* МГЭ был показан на дрожжевых и бактериальных культурах в лаг-периоде [6, 7, 54], или в периоде пост-диауксии (неизвестном в то время) [8]. В первом случае для получения реципиентной культуры необходимо использовать инокулят в фазе пост-диауксии (дрожжевые культуры в возрасте 1–6 суток, и лучше агаровые, чем суспензионные [18], или бактериальные двух-четырехсуточные культуры [5, 7, 54]). На более молодых (в период активного роста) или более старых (G0) культурах МГЭ не наблюдается [6, 18].

Период чувствительности. Любая культура-реципиент имеет период чувствительности («окно рецептивности») к МГЭ, зависящий от возраста культуры, взятой для засева. Чем ближе к стационарной фазе используемый инокулят, тем позже «открывается» окно рецептивности у полученной из него культуры микроорганизма. Так, дрожжевые культуры в лаг-периоде, полученные из односуточной культуры, чувствительны к индукции в период до одного часа после засева; культуры, полученные из шестисуточного инокулята – в период 2.0–2.5 ч после его внесения [6]. На культурах, полученных из десятисуточной исходной суспензии, МГЭ не наблюдается [6]. Бактериальные культуры, инокулированные двух-четырехсуточным посевным материалом, чувствительны сразу после посева на питательную среду [54]. В другом варианте индуцировали исходный двух-четырехсуточный инокулят, после чего высевали его на питательную среду [7].

Плотность культуры. МГЭ не наблюдается на «слишком густых» [18] или «слишком разбавленных» культурах [16].

Рекомендованная плотность культуры составляет:

– 20000 кл/мл (стафилококк, суспензионная культура) [5];

– 50–5000 кл/мл (*E. coli*, суспензионная культура) [7];

– отдельные клетки на плотной агаризованной среде, не образующие групп (*S. cerevisiae*, агаровая культура): «Клетки должны быть достаточно далеко друг от друга, чтобы не влиять друг на друга» ([18], с. 68).

Условия роста культуры. МГЭ не наблюдается на «стандартных» культуральных средах. Наилучший эффект достигается при использовании обедненной среды («стандартный бульон, разбавленный в 10 раз» [7]), однако некоторые результаты получены, наоборот, на среде с избыточным количеством субстрата («18-баллинговое сусло» [40]).

Эффект лучше проявляется при пониженной температуре [16].

Характеризация митогенетического эффекта в дрожжевых и бактериальных культурах. Для характеризации МГЭ в дрожжевом детекторе, инкубируемом на плотной агаризованной среде, пользовались методом подсчета абсолютного количества клеток в поле зрения и индекса почкования, т.е. количества почек, отнесенного к общему количеству клеток (размер учитываемых почек также варьировал в разных работах [16]).

Для оценки роста суспензионной культуры использовали, кроме подсчета клеток, и физические методы. Например, прирост объема культуры оценивали с помощью мицетокритов, сосудов для точного измерения объемов (так называемый объемный метод Брайнеса) [49], плотность клеток культуры характеризовали оптическим методом – с помощью нефелометров [252] или колориметров [256].

Методики использования дрожжевых детекторов наиболее подробно изложены в работах [9, 16] и в диссертациях по онкодиагностике 1940-х годов [28, 257, 258]. Бактериальные методики описаны в работах [5, 7, 259]. В методической статье по бактериальному детектированию [259] отмечается, что по сравнению с дрожжами бактериальные детекторы дают более выраженный эффект, но менее стабильный.

Негативные работы и контркритика. Ниже приведены методические особенности основных критических работ (в скобках курсивом даны наши комментарии; ссылки и методику «позитивных работ» см. выше).

Ричардс, Тейлор, 1932 [254]. Основные отличия условий эксперимента от рекомендованных в «позитивных работах»:

1. Использованы суспензионные культуры *S. cerevisiae*, без указания фазы роста (исходя из условий, описанных авторами, культура реципиента находилась в фазе экспоненциального роста). (*МГЭ наблюдается только в лаг-период или в период пост-диауксии. Авторы процитировали эту рекомендацию, но предпочли отклониться от нее.*)

2. Использовали культуральную среду с оптимальным составом и температуру инкубации 28°C. (*МГЭ наблюдается в субоптимальных условиях, включая «обедненный» состав питательной среды и пониженную температуру культивирования.*)

3. Культуру реципиента помещали в пробирки объемом 1.5–2.0 мл и фиксировали их в большом контейнере с культурой индуктора. (*МГЭ в суспензионных культурах наблюдается только в очень тонких слоях (<0.5 мм).*)

4. Индукция продолжалась от 2 до 24 ч. (*Дрожжевые культуры демонстрируют достоверный МГЭ при длительности индукции 15–60 мин. Более длительная индукция приводит к подавлению эффекта.*)

5. Плотность культуры измеряли непосредственно после индукции. (*Индукция приводит к изменению плотности культуры через один-четыре часа после ее окончания.*)

Так как в работе сделан ряд критических нарушений в методике, результаты авторов, по нашему мнению, не могут использоваться для проверки МГЭ.

Голлендер, 1937 [253]. Основные отличия условий эксперимента от рекомендованных в «позитивных работах»:

1. В качестве инокулята (для реципиента) использовали агаровые культуры в возрасте 15–19 ч (позже авторы стали использовать 39-часовые культуры). (*Культуры E. coli приобретают чувствительность к индукции после 48 ч роста (при 37°C) и, в любом случае, после окончания периода активного роста. Здесь кривые роста не приведены, а возраст культуры выбран на основании посторонних соображений.*)

2. Посевную культуру смывали с агаризованной среды солевым раствором (*NaCl, KCl, $CaCl_2$* и вода). Полученную суспензию клеток помещали в чашки диаметром 2 см и высотой 1–2 см и индуцировали от 5 с до 12 мин при 37°C и постоянном перемешивании. (*МГЭ в суспензионных культурах наблюдается только в очень тонких слоях (<0.5 мм); авторы работ [6,54] специально отмечали, что МГЭ невозможно обнаружить в толстом слое суспензии детектора.*

МГЭ на бактериальных культурах наблюдается при длительности индукции 15–30 мин. В любом случае, для любых новых параметров эксперимента необходимо подбирать длительность индукции в диапазоне по крайней мере от 1 мин до 2 ч. В «позитивных работах» этот параметр всегда тщательно отрабатывали.

Использованный солевой раствор – крайне специфическая среда для индукции. Нет ни одной работы с использованием подобных сред.

Постоянное перемешивание суспензии с реципиентом – также крайне специфическое условие, до того ни разу не проверявшееся.)

3. Культуру реципиента использовали в концентрации $(1.5–2.0)\cdot10^5$ кл/мл. (*В работе [54] использовали концентрацию $2\cdot10^4$ кл/мл; в работе [7] – 50–5000 кл/мл. При бо́льших концентрациях эффект не наблюдался.*)

Таким образом, авторы использовали совершенно новые условия эксперимента без проверки и оптимизации. Некоторые параметры однозначно противоречили рекомендациям «позитивных» работ (возраст посевной культуры, толщина слоя реципиента при индукции, плотность культуры реципиента). В то же время авторы очень тщательно подошли к стандартизации второстепенных условий: работали только в резиновых перчатках, делали строго восемь пересевов культуры перед началом эксперимента (конкретное число пересевов никак не объясняется), использовали заземление для кварцевых пластинок и даже для самих себя. К сожалению, огромная работа, проделанная авторами, также не имеет отношения к феномену МГЭ.

Кройхен, Бейтман, 1932 [260], Накайдзуми, Шрайбер, 1931 [261], Вестенберг, 1935 [262]. В этих критических работах также нарушен целый ряд рекомендованных условий. Так, в работе [261] использовали культуры дрожжей в фазе экспоненциального роста (9–12 ч при 25°C); в работе [260] использовали культуру реципиента в концентрации на два-три порядка выше, чем рекомендовано в «позитивных работах». К сожалению, нам не удалось найти оригинал работы [262], однако в монографии [59] разобрана методика этой работы с указанием критических нарушений.

Попытки повторить МГЭ в «новое время». Были попытки воспроизведения МГЭ в дрожжевых культурах, индуцированного дрожжевой культурой [263] и слабым искусственным УФ-излучением [264] после того, как авторы данных работ получили в 1970–1980-е гг. достоверные результаты по физической регистрации ССС в УФ-диапазоне.

К сожалению, данные авторы не имели информации об условиях, необходимых для получения эффекта, и сделали ряд критических ошибок в методике. Ниже приведены использованные ими условия (в скобках курсивом даны наши замечания):

1. В качестве индуктора использовали диплоидный лабораторный штамм *S. cerevisiae* (фаза экспоненциального роста).

2. Культура реципиента была: (1) в стационарной фазе (G_0 – 10 суток при 28°C и насыщении кислородом) или (2) в лаг-периоде – сразу после высева инокулята на свежую питательную среду. (*МГЭ не наблюдается на стационарных культурах или культурах, высеянных из них. Работать можно только с культурами в области пост-диауксии.*)

3. Использовали в качестве реципиента суспензионные культуры при 28°C, продуваемые кислородом. (*МГЭ наблюдается в субоптимальных условиях, включая пониженную температуру. Продувание кислородом никогда не использовалось в «позитивных работах». Ранее подобные условия использовали только в работе* [253]*, в которой МГЭ не был зафиксирован.*)

4. Индукцию проводили с реципиентом в пробирках объемом 10 мл. (*МГЭ на суспензионных культурах наблюдается только в очень тонких слоях (<0.5 мм).*)

5. Индукция начиналась сразу после (или непосредственно перед) высева инокулята на све-

жую питательную среду. (*Культура-реципиент чувствительна к индукции только в определенный период («окно рецептивности»), который зависит от физиологического состояния инокулята. Авторы никак не проверяли этот параметр.*)

6. Единственное проверенное время индукции было 30 мин. (*Длительность индукции необходимо оптимизировать по крайней мере в диапазоне 1–120 мин для любых новых условий.*)

Таким образом, авторы работы [263] использовали совершенно новые условия, без оптимизации ключевых параметров эксперимента. В некоторых случаях использованные условия прямо противоречили рекомендациям «ранних авторов» (возраст культуры-реципиента, «окно рецептивности», метод индукции).

Попытки воспроизвести МГЭ предприняли еще в ряде лабораторий (см., например, работы [265, 266]). Авторам удалось получить хорошие результаты, но не удалось воспроизвести эффект в повторных сериях экспериментов [266]. Судя по описанной ими методике, авторы не были знакомы с рекомендациями «ранних работ» и оставили без внимания ряд важных параметров эксперимента.

К подобным работам, недостаточно полно учитывающим рекомендации ранних авторов, можно отнести и нашу собственную (И.В. и Л.Б.) попытку повторить МГЭ на дрожжевых культурах в 2010–2013 гг. Изучив проблематику по книгам и обзорным статьям (И.В.), мы попытались воспроизвести условия эксперимента, однако получили маловоспроизводимые результаты [267, 268]. После оптимизации условий нам удалось получить достоверную воспроизводимую стимуляцию культуры-реципиента, которая в итоге оказалась вызванной не ССС, а углекислым газом, продуцируемым культурой-индуктором и стимулирующим рост культуры-реципиента [269]. Позднее более тщательный анализ оригинальных работ по МГЭ позволил понять сделанные методические ошибки [270]:

– сверхобедненная среда для реципиента, на которой не мог проявиться МГЭ, а только стимуляция химическими факторами;

– слишком высокая плотность культуры-реципиента;

– неотработанная фаза роста посевной культуры;

– неоптимизированная длительность индукции.

Таким образом, негативный результат нашей собственной работы [267–269] также не имеет отношения к проверке МГЭ и не должен трактоваться в рамках данного вопроса.

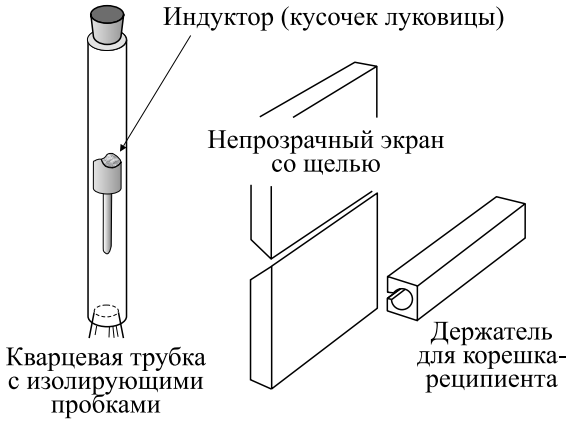


Рис. 7. Эксперимент, подтверждающий прямолинейное распространение и нехимическую природу фактора, обусловливающего МГЭ. Индуктор – кусочек головки лука, размещен в герметично закрытой кварцевой пробирке, реципиент – корень лука. (Из работы [4], с небольшими изменениями.)

ОСНОВНЫЕ СХЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ДИАПАЗОНЕ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ДЕТЕКТОРАМИ

Эксперименты, подтверждающие, что митогенетический эффект обусловлен электромагнитным излучением биообъектов в ультрафиолетовом диапазоне. Первые эксперименты после открытия МГЭ были направлены на исследование обуславливающего его фактора. Было установлено, что эффект имеет не химическую природу, размещение индуктора или детектора в герметичной кварцевой колбе не влияло на эффект (см. рис. 7).

Практически одновременно Д. Габор с Т. Рейтером и А.Г. Гурвич показали, что фактор, обусловливающий митогенетический эффект, проявляет свойства электромагнитного излучения – распространяется прямолинейно (рис. 7), отражается (рис. 8), преломляется в кварцевой призме (рис. 9) (в более поздних работах были получены детальные спектры МГИ – см. ниже).

Размещение между индуктором и детектором пластин из материалов с различными окнами прозрачности (слюда, стекло, желатин, кварц, дерево и т.п.) [4, 16, 271] позволило отнести это излучение к УФ-диапазону. Кварцевая пластинка не влияла на эффект, со стеклянной же пластинкой он исчезал. Также подтвердили УФ-диапазон излучения первые довольно простые эксперименты с призмами (см. рис. 9). Впоследствии этот вывод был косвенно подтвержден тем, что митогенетический эффект наблюдался под действием многократно ослабленного УФ-излучения физических источников (искровых разрядов, ртутных ламп) [42–47].

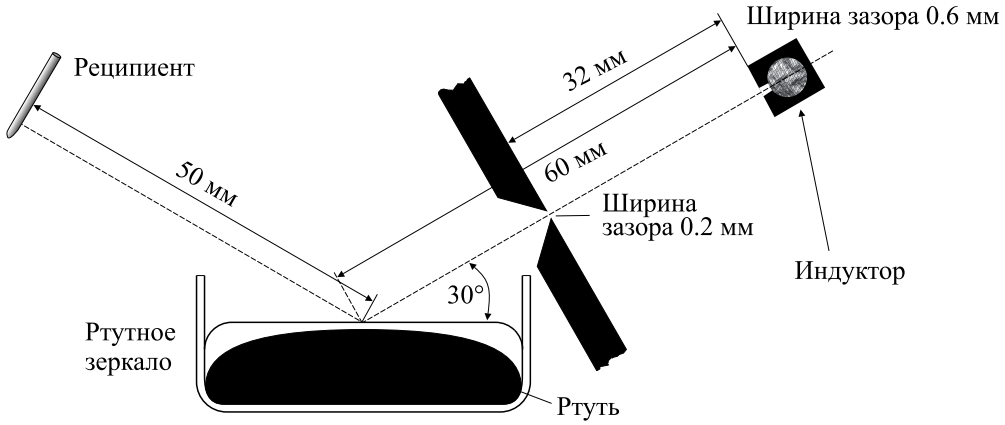


Рис. 8. Эксперимент с отражением УФ-ССС от поверхности ртути. (Схема из работы [4], с незначительными изменениями.)

Метод спектрального митогенетического анализа. *Схема спектрального митогенетического анализа.* Первые работы по исследованию физических свойств МГИ, проведенные с помощью призм и зеркал, получили дальнейшее развитие с применением монохроматоров. В работах [44, 272] были представлены установки для получения детальных спектров МГИ (рис. 10–12).

Индуктор размещали перед входной щелью монохроматора, а на месте выходной щели устанавливали линейку независимых биологических реципиентов (как правило, агаровых блоков с дрожжевой культурой) – детекторов МГИ. При этом МГЭ наблюдался не во всех детекторах, а только в определенных, и заранее известное положение спектральных линий на этой линейке позволяло получить «биологический спектр МГИ».

Существенно повысить разрешение за счет дальнейшего уменьшения ширины агаровых блоков было невозможно, и из спектра излучения стали выделять полосы шириной по 10 Å с помощью монохроматора [273]. Схема с монохроматором требовала значительных затрат времени на последовательную экспозицию детекторов. Дальнейшее усовершенствование повысило разрешение спектров до 5 Å [274].

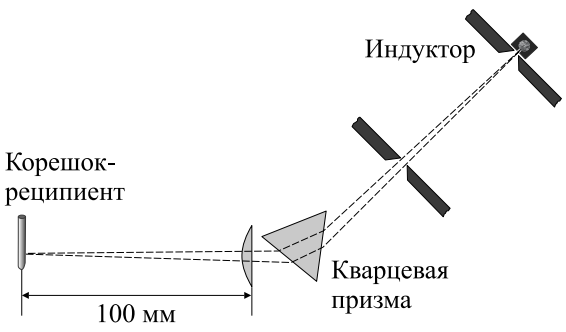


Рис. 9. Эксперимент с преломлением УФ-ССС в кварцевой призме. (Схема из работы [4], с незначительными изменениями.)

С помощью спектральных установок с биологическими детекторами была обнаружена и исследована УФ-хемилюминесценция целого ряда биохимических и химических реакций. На рис. 13 представлены митогенетические спектры различных ферментативных реакций – расщепления креатинфосфата, глюкозы и др. [20].

Сенсибилизированная флуоресценция. В. Франкенбургер, развивая свою гипотезу о свободнорадикальном механизме ультрафиолетовой хемилюминесценции, предположил, что энергия, образовавшаяся при рекомбинации радикалов, может передаваться веществу, не принимающему участия в реакции, и высвечиваться с характерным для него спектром[14] [275]. Спектральный анализ подтвердил его гипотезу, это явление было названо сенсибилизированной флуоресценцией и исследовано в различных модельных системах. Например, добавление в водный раствор облученного глицина[15] солей NaH_2PO_4 или NaCl приводит к появлению характерных спектральных полос ионов этих веществ [277, 278] (см. рис. 14). Исследования сенсибилизированной флуоресценции в различных модельных системах были использованы для выяснения механизмов УФ-ССС биологических объектов. Например, анализ данных МГИ-спектров различных систем привел авторов к заключению, что так называе-

[14] Сама возможность передачи энергии возбужденного состояния атома/молекулы другому атому/молекуле с последующим высвечиванием была известна ранее.

[15] Предварительно облученный глицин широко использовался в экспериментах «митогенетического периода» как система с наиболее простым спектром – излучение наблюдалось только в полосе 229–230 нм [276].

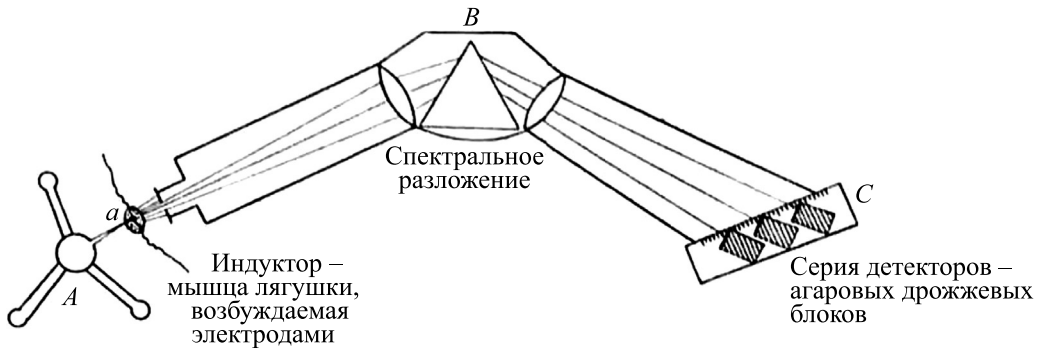


Рис. 10. «Митогенетический» спектральный анализ. Схема эксперимента по работе [44], с незначительными изменениями.

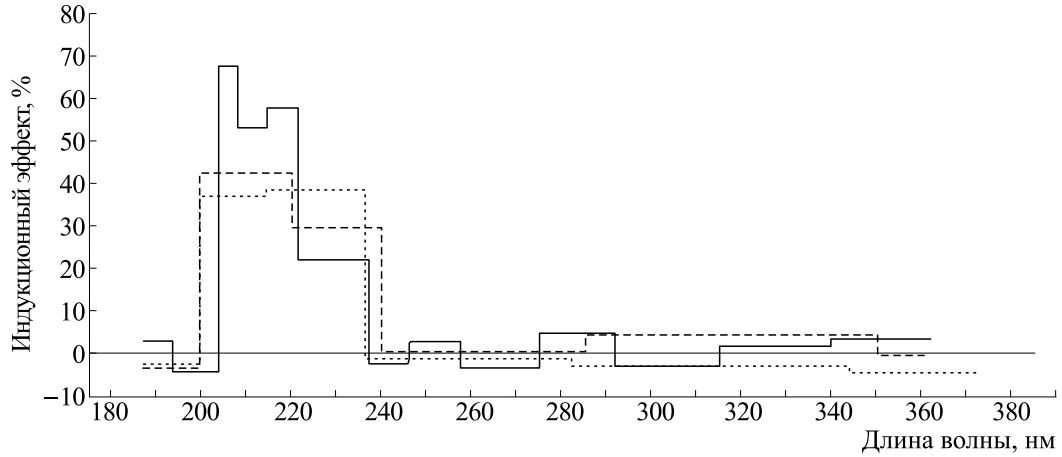


Рис. 11. Три спектра МГИ от мышцы лягушки в состоянии тетануса, полученные с использованием биологических детекторов – агаровых дрожжевых культур (по работе [44], с незначительными изменениями). Наблюдается митогенетический эффект (изменение индекса почкования относительно контрольной дрожжевой культуры). Различие в дискретности спектров связано с разной шириной блоков детектора.

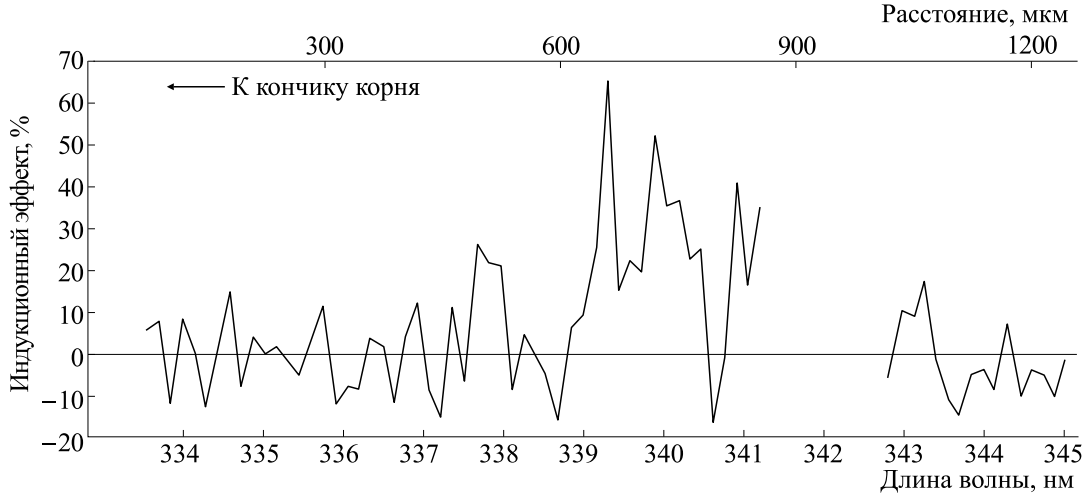


Рис. 12. Спектр МГИ саркомы крысы, полученный с использованием биологических детекторов – корешков лука (по работе [4], с незначительными изменениями).

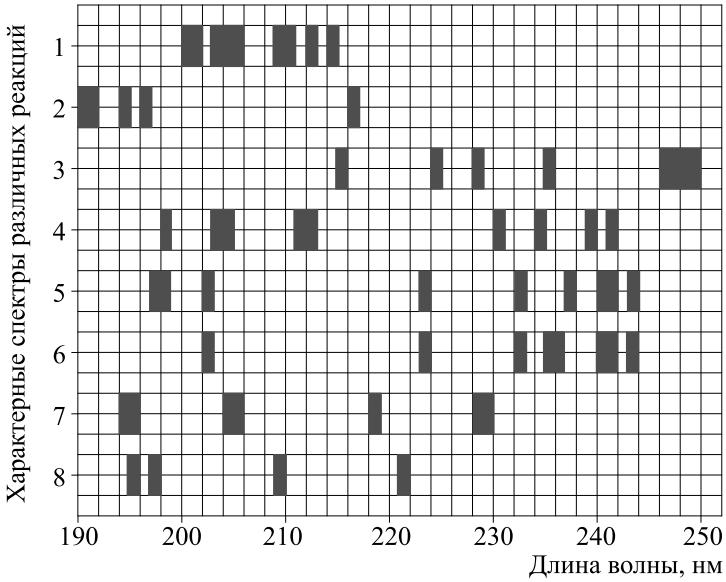


Рис. 13. Спектры некоторых типичных источников ССС ферментативных реакций (из работы [20]): 1 – расщепление креатинфосфата, 2 – расщепление глюкозы, 3 – расщепление нуклеиновой кислоты и лецитина, 4 – расщепление пептидов, 5 – расщепление мальтозы, 6 – расщепление сахарозы, 7 – расщепление мочевины, 8 – расщепление липидов.

мый гликолитический спектр (см. спектр *2* на рис. 13), т.е. спектр, который наблюдался при ферментативном расщеплении глюкозы и других гликолитических процессах и был характерен для ССС многих биологических объектов (крови, раковых опухолей и др.), обусловлен возбуждением целых молекул глюкозы [279], а спектр расщепления нуклеиновой кислоты фосфатазой (см. спектр 3 на рис. 13), наблюдаемый в ССС печени, нерва и др., связан не с целой молекулой нуклеиновой кислоты, а с фосфатным ионом (см. рис. 14).

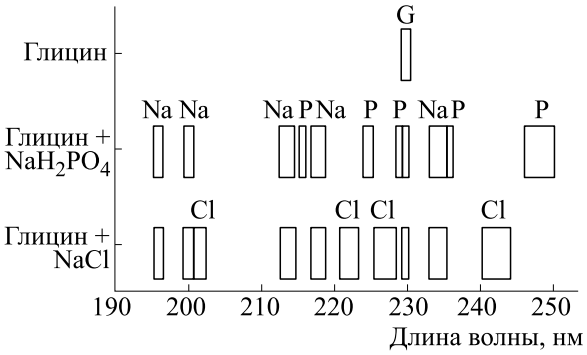


Рис. 14. Сенсибилизированная флуоресценция в водных растворах облученного глицина. Спектры облученного глицина, глицина с NaH_2PO_4, глицина с NaCl (использованы дрожжевые детекторы). Характерные спектральные полосы глицина и ионов PO_4 обозначены буквами G и P соответственно. (Данные взяты из работы [278], см. также детали эксперимента в работе [277].)

Концепция сенсибилизированной флуоресценции была подкреплена сравнением МГЭ-спектра бензольной воды с предварительно облученным глицином [280] и обычных спектров флуоресценции паров бензола [281] (см. рис. 15 и таблицу).

Специфика митогенетических спектров (отличия митогенетических спектров от спектров, полученных стандартными методами). Спектральный анализ УФ-излучения с биологическими детекторами был ограничен областью очень низких интенсивностей и относительно узким спектральным диапазоном чувствительности биологических детекторов. Исследуемый диапазон

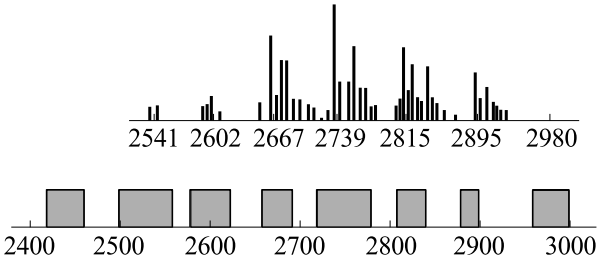


Рис. 15. Сравнение МГЭ-спектров сенсибилизированной флуоресценции бензола и обычного спектра флуоресценции паров бензола: сверху – спектр флуоресценции паров бензола; снизу – МГЭ-спектр флуоресценции водного раствора бензола с добавлением предварительно облученного и высушенного глицина (около 0.08% бензола и 1% глицина, по результатам 90 экспериментов). Приведены спектральные данные из работы [280].

МГЭ-спектр сенсибилизированной флуоресценции бензола в сравнении с данными П. Прингсгейма по флуоресценции паров бензола

Флуоресценция паров бензола (П. Прингсгейм [282])	Полосы, выделенные монохроматором (Е.А. Гордон [280])	Средний митогенетический эффект, % (дрожжевой детектор)	Число экспериментов
	2280–2300	0	5
	2300–2360	0	3
	2420–2460	41	6
	2460–2480	12	3
2541	2500–2560	35	7
	2560–2580	16	3
2602	2580–2620	25	4
	2620–2645	8	4
	2645–2660	3	2
2667	2660–2685	45	6
	2685–2720	4	2
2739	2730–2760	42	8
	2760–2780	38	7
	2780–2810	5	2
2815	2810–2840	30	2
	2840–2860	1	2
	2860–2880	3	2
2895	2880–2900	26	4
	2920–2960	0	2
–2980	2960–3000	45	5

распространялся от 190 нм, что соответствует границе прозрачности кварцевой оптики, до длинноволнового порога чувствительности биологических детекторов (примерно 290–325 нм) [16, 18, 26, 44, 283–285]. Самая длинноволновая полоса ССС биологических источников, зарегистрированная с помощью спектрального анализа с МГЭ-детекторами, – 287–291 нм (источником была текущая протоплазма в листьях *Elodea* [285]), но обычно митогенетические спектры обнаруживали в пределах 190–250 нм.

Такие спектры существенно отличались от традиционных спектров, получаемых с помощью физических приборов, тем, что показывали только наличие или отсутствие излучения в пределах дискретных полос спектра, ничего не говоря о его интенсивности. Следует отметить, что были попытки оценить относительную интенсивность, снимая спектры с различной продолжительностью экспозиции [59]. Предполагалось, что излучение имеет большую интенсивность на тех полосах, на которых эффект проявлялся при минимальной экспозиции. Основные недостатки МГИ-спектрального анализа были связаны с использованием биологического принципа детектирования. Измерения одного спектра с разрешением 1 нм требовали проведения сотен экспериментов и около трех-четырех месяцев работы. Для грубой оценки наличия спектральных особенностей, характерных для наиболее распространенных спектров, обнаруживаемых при ферментативных реакциях гликолиза, расщепления пептидных связей, окисления и действия фосфатазы, т.е. четырех наиболее распространенных у

биологических объектов типов спектров, использовали упрощенную методику: непосредственно перед детекторами располагали шаблоны с прорезями; прорези соответствовали характерным полосам четырех основных спектров, каждая из которых отсутствовала в остальных трех спектрах.

Несмотря на все эти недостатки, биологические детекторы оставались непревзойденными по чувствительности к слабому УФ-излучению по сравнению с физическими детекторами того времени (см часть III настоящего обзора), поэтому именно схемы с биологическими детекторами использовались для спектрального анализа в 1930–1940-х гг.

Применения и значение спектрального анализа митогенетического излучения. Спектральный анализ был применен Г.М. Франком вначале с единственной целью – доказать, что митогенетические лучи действительно относятся к средней ультрафиолетовой области [44], но очень скоро спектральный МГЭ-анализ стал инструментом для неинвазивных бесконтактных исследований биохимии живых организмов. Как писал А.Г. Гурвич: «... в противоположность любым биохимическим методам, анализ совершается не после, а во время функционирования» [16]. Чувствительность метода была чрезвычайно высока для того времени, например, при расщеплении всего 10^{-7}–10^{-8} г глюкозы наблюдался отчетливый гликолитический спектр; в системе «желудочный сок–белок» по спектру белок обнаруживался при концентрации 10^{-6} г.

Результаты митогенетического спектрального анализа хорошо согласовывались с известной информацией, например внутренние некротические области раковых опухолей демонстрировали протеолитический спектр, в то время как в периферийных областях с активным метаболизмом излучение имело гликолитический и нуклеотический характер (т.е. совпадающий со спектром расщепления нуклеиновой кислоты фосфатазой) [286]. Спектральный анализ позволял получить и новую информацию. Например, ранее исследователи столкнулись с явлением, которое не могли объяснить – МГИ крови и глаза кролика полностью прекращалось при голодании и возобновлялось примерно через неделю. Спектральный анализ показал, что во время голодания излучение с гликолитическим спектром исчезает, а примерно через неделю появляется излучение со спектром, характерным для процессов протеолиза [33]. После затухания гликолитической компоненты излучения она быстро восстанавливалась при инъекциях глюкозы [20]).

В середине 1930-х гг. в СССР спектральный МГИ-анализ стал одной из основных областей исследований, связанных с МГИ [17, 20, 274, 276, 287, 288]. Наиболее обширные данные были получены по митогенетическим спектрам излучения нервов [26, 284, 289–295].

Обзоры применений спектрального МГИ-анализа в биологии представлены в работах [16, 18, 20, 33, 40].

ПРИКЛАДНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Митогенетическое излучение крови в норме и при различных заболеваниях. Митогенетическое излучение крови исследовалось довольно широко из-за того, что кровь является доступным активным индуктором митогенетического эффекта и представляет интерес с точки зрения медицинской диагностики. Было показано, что хорошо излучает кровь у здоровых людей и целого ряда млекопитающих, птиц и амфибий, а также гемолимфа крабов и моллюсков. «Healthy blood never fails. If a failure occurs, it is time to test either the yeast or the apparatus» – писал Г. Гезениус [296]. Было показано, что излучение крови млекопитающих главным образом обусловлено гликолитическими процессами, крови амфибий – окислительными процессами [16, 297]. Подробный обзор ранних работ по митогенетическому излучению крови был представлен во втором томе справочника по общей гематологии в 1934 г. [298] (цитируется по работе [18]).

Было обнаружено, что при раковых заболеваниях различных типов излучение крови исчезает на начальных стадиях малигнизации, задолго до появления первых морфологических признаков злокачественного роста, за счет появления в крови высокоспецифичного вещества, которое тушит УФ-хемилюминесценцию [297]. Это вещество было названо «раковым тушителем». Было показано, что при онкологических заболеваниях кроме прекращения излучения крови наблюдается также и прекращение излучения мочи [29]. Сами злокачественные опухоли, напротив, неоднократно были отмечены как наиболее активные источники митогенетического излучения ([16, 30], см также работы [4, 20, 25, 30–34]).

Физико-химические свойства тушителя были исследованы достаточно подробно, хотя его химический состав не был идентифицирован [20, 297]. Тушитель содержится в свободной от белков фракции крови, имеет отрицательный электрический заряд, в растворе довольно стоек, но термолабилен, диффундирует через коллодийную перегородку только при электрофорезе, выдерживает высушивание при комнатной температуре, адсорбируется на каолин и может быть отмыт от него щелочным раствором [20, 297]. Была разработана методика его выделения из крови. В монографии [297], посвященной тушителю, по анализу результатов исследований было сделано за-

ключение, что раковый тушитель представляет собой «пептид с преобладанием энольной формы пептидной связи», имеющий нитевидную форму и относительно небольшую длину (около 3 нм). Именно в работах по раковому тушителю впервые утверждалось, что пептид крови может являться онкомаркером. Не исключено, что найденное вещество представляло собой не один пептид, а целую группу различных пептидов, обладающих тушащими свойствами. Активная специфичная часть пептидов должна была иметь довольно малые размеры, поскольку после «осторожного гидролиза» в соляной кислоте полученное вещество диффундировало через коллодийную пленку без потери тушащих свойств [297].

Обширные экспериментальные исследования показали, что митогенетическое излучение крови прекращается или ослабевает при ряде физиологических состояний: физическом утомлении [49], умственной нагрузке [50], голодании [16], в пожилом возрасте [49], а также при различных заболеваниях (перниционзная анемия, лейкемия, пневмония, сепсис [33, 298, 299], хронический тонзиллит [300], диабет, цирроз печени и др. [16, 297]). Было обнаружено, что во всех случаях, не связанных с онкологическими заболеваниями, кровь перестает излучать из-за появления веществ, не обладающих свойствами тушителя, но поглощающих УФ-излучение. Они были названы гасителями [20, 297]. Гасители представляют собой низкомолекулярные продукты патологического метаболизма, например, кетоновые тела при диабете. Было показано, что, в отличие от гасителей, раковый тушитель не поглощает УФ-излучение и не влияет на прозрачность тонких слоев крови существенным образом. Принципиальные отличия свойств тушителя и гасителей позволили разработать методику, которая с помощью дрожжевых детекторов митогенетического излучения позволяла идентифицировать наличие тушителя в крови [28, 257, 258].

Тушитель имеется только в крови людей и животных со злокачественными опухолями и состояниями, которые относят к предраковым, появляется на ранних стадиях заболевания. Излучение крови у крыс исчезало на девятые-двенадцатые сутки после прививки опухоли здоровому животному, тогда как прощупываться опухоль начинала через 28–32 суток после прививки [301]. В экспериментах на мышах раковый тушитель появлялся в крови на первые-вторые сутки после имплантации карциномы и исчезал через трое-восемь суток после ее радикального хирургического удаления; в случае стойкого сохранения тушителя в крови неизменно наблюдались рецидивы [302, 303]. В экспериментах с регулярным смазыванием кожи мышей канцерогенными веществами было показано, что тушитель появляется в крови еще на обратимых стадиях канцерогенеза [28, 297, 304]. При воздействии относительно малой дозой канцерогенов опухоли образовывались только у части мышей. Через 32–53 суток после введения канцерогена у всех этих мышей в крови появлялся тушитель, опухоли диагностировались к 191–222 суткам. У мышей, в крови которых тушитель не появлялся, опухоли не образовывались [28, 304]. Клинические исследования пациентов с различной локализацией опухолей показали высокую чувствительность и специфичность (согласно данным авторов >95%) онкодиагностики, основанной на раковом тушителе, и ее ценность для определения эффективности проведенной терапии [20, 28, 257, 297, 304].

Некоторые другие применения митогенетического детектирования. Биологические МГЭ-детекторы использовались для исследований не только биообъектов. С их помощью были проведены широкие спектральные исследования ССС различных биохимических систем, моделирующих ферментативные процессы в живом организме [273, 276, 305], а также неорганических химических реакций [39, 306]. Была показана чувствительность луковых [4] и дрожжевых [307] детекторов к слабому искусственному УФ. Дрожжевой детектор использовали для определения наличия радиоактивного осадка на коже после радиоактивных ванн (оценка объемным методом Брайнеса) [308].

ОБСУЖДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ МИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Особенности биологических методов детектирования сверхслабого свечения: достоинства и недостатки. Использование в качестве детекторов биологических объектов имело целый ряд недостатков. Во-первых, оно было чрезвычайно *трудоемким и длительным*. Например, одна регистрация УФ-излучения с помощью лукового детектора требовала тщательной подготовки гистологических срезов кончиков корней, включая этапы фиксации, окрашивания, парафинирования, подсчета под микроскопом числа митозов в различных зонах меристемы при разных увеличениях микроскопа, общее поле составляло несколько тысяч клеток, причем подсчет под микроскопом делящихся клеток был не только долгим, но и субъективным. Так называемая агаровая дрожжевая методика требовала подсчета под микроскопом почкующихся клеток на суммарном поле, содержащем более 10000 клеток; только на подсчет уходило около трех-четырех часов, не считая времени на приготовление детектора, индуктора, препаратов для микроскопии, а также длительности самого детектирования [309]. Для получения одного спектра обычно проводили несколько сотен эксперимен-

тов по дрожжевому детектированию, что занимало три-четыре месяца. Так, например, в работе [305] спектр излучения в системе «мочевина–уреаза» был построен на основании результатов 300 экспериментов.

Во-вторых, работа с биологическими детекторами требовала очень *тщательного соблюдения методики*. Некоторые авторы не смогли повторить известные эксперименты по митогенетическому эффекту именно из-за нарушения методики работы с биологическими детекторами. Подробно их ошибки разобраны в обзорной работе [52] и выше в настоящем обзоре. В-третьих, *вариабельность* как самих биологических детекторов, так и многочисленных внешних факторов, влияющих на их чувствительность, делала такой метод регистрации слабого УФ-излучения *довольно нестабильным*. Биологические системы сложнее технических устройств, им свойственна значительная естественная вариабельность. Биологическая реакция системы не может быть точно количественно предсказана, как бы подробно ни были описаны ее текущие физиологические параметры, внешние условия и история развития. Например, на современном уровне знаний невозможно предсказать со 100%-й вероятностью даже всхожесть семян, хотя это не противоречит биологическому закону их прорастания. Биологические законы имеют вероятностный характер, и митогенетический эффект не является исключением из этого правила.

Во всех лабораториях, где проводили тысячи экспериментов с дрожжевыми и бактерийными детекторами, иногда наблюдали необъяснимые перебои – детекторы переставали реагировать на излучение [18, 54], причем, по свидетельству А.Г. Гурвича, это наблюдали одновременно в течение нескольких дней все сотрудники, ведущие независимые эксперименты. Потом также необъяснимо способность к детектированию восстанавливалась. Какой фактор (или факторы) обуславливал перебои в работе биологических детекторов, осталось неясным. Гурвич предполагал изменения радиофона, тем более что радиосвязь в те годы активно развивалась. Были и другие предположения, например влияние погодных условий и др. [18].

Продолжительность экспонирования в каждой серии экспериментов с любым биологическим детектором приходилось подбирать *индивидуально*. При увеличении дозы митогенетического излучения стимуляция сменяется его угнетением (см. рис. 4а,б). Это чрезвычайно затрудняло применение биологических детекторов, так как в каждой серии экспериментов приходилось подбирать время экспозиции. Сами эффекты были, как правило, невелики (20–30% превышения над фоном), а подсчет почек подразумевал довольно субъективный выбор («еще не почка, почка, уже не почка») и не только требовал мастерства, но и не мог гарантировать от систематических ошибок (в поздних работах подчеркивалась необходимость слепого метода проведения подобных экспериментов).

Любой биологический детектор использовался однократно, не мог быть предварительно протестирован или прокалиброван. Преодолеть проблемы вариабельности биологических детекторов можно было только многократным повторением экспериментов и хорошей постановкой методики с предельно точным воспроизведением значимых условий. Например, вывод о наличии или отсутствии излучения в одной полосе спектра при измерениях дрожжевым детектором делали после серии не менее десяти экспериментов с согласованными результатами[16].

МГЭ-детекторы были чувствительны только в узком диапазоне длин волн, примерно от 190 до 290–320 нм (см., например, рис. 4в), из-за поглощения в кварцевых элементах возможности детектирования излучения с длинами волн менее 190 нм не могли быть исследованы. Биологическое детектирование не позволяло количественно характеризовать интенсивность излучения, но применялось для грубой сравнительной оценки интенсивностей биообъектов по минимальной продолжительности экспозиции, при которой наблюдался МГЭ (при прочих равных условиях). Предполагалось, что более интенсивное УФ-ССС биообъекта способно стимулировать митозы в детекторе при меньших экспозициях. Сравнивать между собой можно было только ССС биологических объектов, а также модельных химических систем, поскольку чувствительность к ослабленному излучению физических источников была гораздо ниже [47].

Единственным, но принципиальным преимуществом биологических детекторов, обусловившим их широкое применение в «митогенетический» период исследований, была их чрезвычайно высокая чувствительность к ССС. Длительное время после обнаружения эффекта биологические детекторы оставались единственным возможным средством регистрации МГИ, появившиеся затем модификации счетчиков Гейгера–Мюллера имели меньшую чувствительность и не могли быть использованы, например, для спектрального анализа и многих других исследований.

[16] Следует отметить, что дрожжевой детектор был наиболее методически проработанным из всех биологических МГЭ-детекторов. А.Г. Гурвич указывал, что он наилучший по воспроизводимости [17], приведенное количество повторов относится к этапу его массового применения для спектрального анализа, после практически предельного развития дрожжевой методики.

Следует отметить, что развитие биологических методик детектирования было очень сложной задачей, требующей масштабных многофакторных трудоемких экспериментов, в первую очередь из-за естественных трудностей стандартизации биологических объектов, выступающих в качестве детекторов, отсутствия знаний о механизмах детектирования, недостаточной информации о том, какие внешние факторы необходимо стандартизовать.

О современном значении биологического детектирования митогенетического эффекта. Биологическое детектирование занимает важное значение в истории исследований ССС, поскольку само излучение было открыто и исследовалось в первые десятилетия в основном именно с помощью биологических детекторов. В настоящее время биологические МГЭ-детекторы представляют интерес только для исследования самого эффекта, т.е. как реципиенты в схеме наблюдения МГЭ (например, для исследования механизма детектирования, выяснения вопроса о биологической роли эффекта). Из-за низкой воспроизводимости методик и трудоемкости они не востребованы как детекторы в установках для исследования физических свойств ССС (например, для спектрального анализа) или в прикладных задачах, связанных с детектированием малых количеств вещества по хемилюминесценции (например, методика онкодиагностики по наличию в крови тушителя хемилюминесценции) как это было в 1920–1940-х гг. В ближайшем времени исследования ССС будут проводиться, вероятно, исключительно с помощью современных технических средств (ФЭУ, ЭОП, ПЗС-матриц и т.д.) (см часть III настоящего обзора). Вместе с тем в отдаленной перспективе при выяснении механизма биологического детектирования ССС, причин более высокой чувствительности [47] биологических детекторов к ССС биообъектов по сравнению с излучением физических источников, разработке хорошо воспроизводимых методик биологическое детектирование на основе использования МГЭ или других биологических эффектов ССС, возможно, найдет свою нишу.

Неоднозначное состояние вопроса о принципе биологического детектирования митогенетического эффекта. Главная проблема в области биологического детектирования ССС – крайне неопределенное состояние вопроса о самом эффекте, на котором оно основано, т.е. МГЭ. Этот эффект не только не общепризнан, но часто ассоциируется с «лженаукой» [310]. Отметим несколько причин такого положения.

Дискредитация: ложноположительные результаты. К сожалению, в литературе встречается достаточно много работ, якобы подтверждающих МГЭ или ссылающихся на него, которые выполнены на крайне низком уровне. Как писал А. Голлендер, «особенно жаль, что в этой теме стали участвовать авторы, увидевшие в ней лишь возможность привлечь к себе внимание» [51]. Целый ряд явлений, исходно относимых авторами к разряду «дистантных нехимических взаимодействий» в период 1990–2010-х гг., либо оказались артефактами, либо получили чисто «химическое» объяснение.

Следует отметить, что результаты экспериментов митогенетического периода исследований, не имея достаточной теоретической базы для их объяснения на уровне знаний того времени, зачастую приводили к неверным гипотезам, это отмечал и сам А.Г. Гурвич. Кроме того, он подчеркивал, что мультидисциплинарный характер предмета неоднократно подталкивал исследователей к попыткам работать и выдвигать гипотезы в научных областях, в которых они не были специалистами [17].

Как писал О. Ран [198]: «Российские ученые, которые первыми использовали дрожжи и бактерии в качестве детекторов митогенетических лучей, не были бактериологами; это очень очевидно из их инструкций по подготовке культуральной среды и их описания эксперимента. Ничего не сказано о физиологическом состоянии клетки, хотя вскоре они заметили, что клетки не реагировали в течение всего периода своего роста. Барон (1930) заново открыл лаг-фазу роста дрожжей, с которой он не был знаком. Отсюда его инструкция, что дрожжи следует выращивать в течение шести-десяти часов при комнатной температуре, чтобы они быстро отреагировали. К сожалению, не было заявлено, что 12°C считается нормальной комнатной температурой в Москве и Ленинграде, и исследователи, следуя этим указаниям буквально и при американских комнатных температурах, несомненно, достигли бы совершенно иной физиологической стадии».

Вместе с тем неверная теоретическая интерпретация не умаляет значимости накопленного в тот период обширного экспериментального материала.

Влиятельные критические работы. Существует ряд работ с серьезной критикой феномена МГЭ. Большинство их них детально разобрано выше в сравнении с основными «позитивными работами», отмечены принципиальные расхождения в методике. По словам О. Рана: «Некоторые авторы считают, что их отрицательные результаты опровергают положительные результаты других исследователей. Это – ошибка. Если два автора получают разные результаты, это не доказывает, что один из них прав, а другой ошибается. Это доказывает только, что они поставили *разные эксперименты*» [198].

Кроме того, существует ряд критических обзоров, явно предвзятых в пользу всех (даже плохо

сделанных) «негативных» и против любых «позитивных» работ. Так, обзор [81] посвящен в основном поиску несоответствий между «позитивными» работами разных авторов (часть из которых действительно не отвечает требованиям к научной статье, другая же часть сделана на очень высоком уровне) и делает акцент на дискредитирующие работы по МГЭ, «пропуская» все серьезные публикации, такие как [6, 23, 54, 252]. Крайне жесткая критика результатов по вторичному излучению, полученных с помощью биологических детекторов, была основана на их несоответствии закону Стокса: «Это неизвестный до сих пор тип флуоресценции... Он предполагает присутствие в дрожжевой культуре пивного сусла демона, способного делать непрозрачную суспензию прозрачной для ультрафиолетового света. Подобно демону Максвелла, демон Гурвича – это просто изобретение для уклонения – на бумаге – от термодинамического закона с той важной разницей, что нас серьезно просят поверить в его существование» [81]. Следует отметить, что возможность антистоксовых процессов была показана Л. Ландау через 12 лет, а экспериментально они были продемонстрированы физическими методами только 25 лет спустя. Другой пример предвзятой необъективной критики – влиятельная анонимная публикация в журнале «Nature» [311], полностью основанная на данных работы [253] (детально проанализированных выше) и использующая не вполне научную риторику при упоминании «позитивных» работ.

Т. Квикенден с соавторами [263, 264] также весьма критичны в отношении «ранних работ». При этом во всех публикациях авторы ссылаются на три работы [253, 312, 313], в которых видят окончательное опровержение феномена МГЭ, хотя в работах [312, 313] авторы пытались обнаружить с помощью модифицированных газоразрядных счетчиков излучения от объектов, которые, как ранее уже было показано биологическими детекторами, не являлись источниками УФ-ССС, более того, следует отметить низкую чувствительность и существенные конструктивные недостатки используемых ими модификаций газоразрядных счетчиков, приводящие к повышенным шумам (см. критику этих модификаций в работе [314] и части III настоящего обзора). Критика биологической части известной негативной экспериментальной работы [253] была представлена выше, критику ее физической части см. в части III настоящего обзора.

Методические детали экспериментов по МГЭ и критика ряда ключевых авторов были проанализированы также в работе [52].

Исторические и геополитические факторы. Большая часть исследований МГЭ относится к 1920–1930-м гг. и обрывается с началом Второй мировой войны. Во время войны продолжаются отдельные попытки апробации и использования МГЭ для медицинской диагностики, многие из которых остались неопубликованными; другие вошли в диссертации [28, 258, 315, 316], но, по очевидным причинам, фундаментальные исследования почти прекратились. После 1945 г. исследования МГЭ в СССР возобновились только в нескольких лабораториях А.Г. Гурвича и его коллег. После сессии ВАСХНИЛ в 1948 г., на которой митогенетическое направление было подвергнуто крайне жесткой критике вместе с генетикой, А.Г. Гурвич окончательно потерял возможность вести экспериментальную работу. Впоследствии, с подтверждением существования ССС биообъектов с помощью ФЭУ и некоторой реабилитацией феномена, исследования А.Г. Гурвича отчасти продолжились в лабораториях его дочери А.А. Гурвич и С.В. Конева, однако существенного развития исследования компоненты УФ-ССС уже не получили. В Европе и США после войны исследования МГЭ не возобновила ни одна из ранее работавших лабораторий. Ситуация усугубилась тем, что основные работы по МГЭ, опубликованные на русском языке, оказались совершенно недоступны для западных авторов, в частности это практически все работы по онкодиагностике, наиболее интересные с точки зрения прикладной науки.

Проблемы с воспроизводимостью митогенетического эффекта. Наиболее критический фактор для «признания» МГЭ – это сложности с его воспроизведением. «Если он такой универсальный, почему его так сложно поймать?» Это – не только стандартный вопрос, но и частый аргумент против МГЭ. Хотя, конечно, никакие рассуждения не могут быть аргументами в экспериментальной науке, этот вопрос действительно приводит в замешательство...

С нашей точки зрения одна из основных причин трудностей воспроизведения МГЭ связана с тем, что биологический детектор должен проявить чувствительность к внешнему ССС на фоне значительного внутреннего фона. Любой объект, используемый в экспериментах по МГЭ, состоит из большого числа клеток с характерным расстоянием между ними ~10^{-6}–10^{-4} м, расстояние же до внешнего индуктора МГЭ в любом случае составляет не менее чем 10^{-3}–10^{-2} м (при этом, как известно, средняя интенсивность излучения от точечного источника падает пропорционально квадрату расстояния от него). Также интенсивность излучения снижается за счет отражения от имеющихся границ сред с разным показателем преломления («кварц–воздух», «кварц–среда» и пр.), кроме того имеется некоторое поглощение и рассеяние в средах, разделяющих индуктор и детектор (например, отмечалось, что для химиче-

ской изоляции детектора и индуктора требуется кварц высокой чистоты, с кварцем более низкого качества эффект пропадал).

Таким образом, для достаточно высокого соотношения сигнал/шум необходимо следующее:

1. Культура индуктора должна быть достаточно «сильной», чтобы произвести МГЭ на таком большом «нетипичном» расстоянии.

2. Клетки реципиента должны быть чувствительны к внешней индукции.

3. «Собственный» МГЭ в культуре реципиента должен быть по возможности подавлен, но так, чтобы культура сохранила жизнеспособность и чувствительность к внешним индукторам.

4. Интенсивность сигнала не должна быть подавлена ниже некоторого критического уровня при преодолении расстояния между индуктором и детектором.

Следуя этим требованиям, можно легко понять большинство условий, необходимых для воспроизведения МГЭ (см. выше):

1. Тщательный отбор индукторов и еще более тщательная подготовка реципиента, включая подбор фазы роста культуры-реципиента и посевного материала.

2. Создание специальных условий для культуры реципиента – пониженной температуры, обедненной среды, низкой плотности культуры и т.д. – так, чтобы культура реципиента оказалась ослабленной, но при этом жизнеспособной.

3. Минимизация потерь излучения между индуктором и детектором за счет уменьшения расстояния между ними, снижения отражения и рассеяния.

4. Специальные предосторожности, такие как слабый фоновый видимый свет, экранирование внешнего ультрафиолета, очень тонкий слой культуры-реципиента и т.д.

Кажется гораздо более удивительным, что МГЭ вообще удалось обнаружить, чем то, что он оказался таким «капризным».

Недостаточное для воспроизведения описание методик[17] делает их неубедительными и соответственно компрометирует результаты, полученные с их помощью, и затрудняет проверку. Только на уровне воспроизводимой методики имеет смысл применение биологического объекта в качестве детектора в обычном техническом понимании этого термина, до этого можно вести речь только об исследовании самого эффекта.

Более вероятным представляется, что методики биологического детектирования, разработанные в ряде научных коллективов при экспериментах на большом материале, обеспечивали воспроизводимость, достаточную для получения верных результатов, и были вполне пригодным инструментом исследований. Когда методики успешно перенимали, например, в пределах школы Гурвича и сотрудничавших с ней научных и медицинских организаций, то, вероятно, часто воспроизводили при этом и некоторые условия эксперимента, которым не придавалось значения в самих описаниях методик.

Более того, в разных независимых лабораториях отработанные методики детектирования могли быть различны, что и могло быть причиной расхождения количественных результатов при наблюдении близких эффектов. Например, луковые методики, которые использовали Д. Габор и Т. Рейтер [272], существенно отличались от методик школы А.Г. Гурвича [78], в первую очередь тем, что Д. Габор и Т. Рейтер работали с отрезанными корнями. Это значительно меняло режим митогенетического излучения внутри корня, в частности отрезанный корень не являлся индуктором.

Прошлое и будущее биологического детектирования. Итак, как мы постарались продемонстрировать во второй части нашего обзора, «ранние работы» по МГИ – это не несколько отдельных сомнительных публикаций (как полагали, например, в работе [317]), а около тысячи работ, в том числе в наиболее высокорейтинговых журналах; часть этих работ была выполнена очень авторитетными учеными (проф. О. Ран, США; нобелевский лауреат Д. Габор, Германия; проф. Л.К. Вольф, Нидерланды; проф. А.Г. Гурвич, Б.С. Песоченский, академики Ю. А. Харитон и Г.М. Франк и др., СССР). Исследования митогенетического излучения широко обсуждались на международном научном уровне, ключевые эксперименты подвергались неоднократной проверке в научных коллективах разных стран, публикации имели массовый характер и были подкреплены значительным количеством подробных протоколов испытаний. Негативные работы составили менее 3% от общего количества экспериментальных работ, выполненных по тематике МГИ, например, это работы [91, 204, 253, 254]. Все они были выполнены с серьезными отклонениями от известных методик, которые тщательно

[17] Из методик того периода наиболее подробно было описано определение в крови тушителя хемилюминесценции в целях онкодиагностики, имелись обширные результаты, в том числе более 1300 протоколов в ведущих клинических лабораториях, которые показали высокую эффективность предложенной онкодиагностики. В этой методике использовали наиболее распространенный тогда биологический детектор – дрожжевой, эффект тушения тестировали при послесвечении раствора глицина (это один из наиболее часто используемых контрольных источников МГИ). Вместе с тем Н.И. Линтварева (Центральный онкологический институт), согласно ее отчету в архиве А.Г. Гурвича, ни разу не только не смогла обнаружить тушения, но даже зарегистрировать свечение контрольного источника МГИ при многократном тщательном повторении экспериментов по описанной методике.

обсуждались в ответных публикациях [16, 18, 59, 198, 301, 318]. Более подробно методические ошибки этих и других негативных работ проанализированы в обзоре [52] (см. также историю и результаты исследований митогенетического излучения в обзорах [52, 248, 319–321]). Все аргументы критиков, утверждавших невозможность заявленных феноменов с теоретической точки зрения, давно устарели, а экспериментальные исследования ССС «митогенетического» периода не были опровергнуты.

В то же время комплекс работ по исследованиям ССС митогенетического периода нельзя считать и доказанным. Биологические методики, с помощью которых были получены эти результаты, не представляются достаточно полными в том виде, в котором они описаны в старых работах. Описание методик, недостаточное для их уверенного воспроизведения, компрометирует выполненные исследования и затрудняет их проверку (см. выше).

Авторы настоящего обзора полагают, что исследования ССС «митогенетического» периода – не фальсификация и не иллюзия, основанная на случайной или систематической ошибке, но сложно наблюдаемые эффекты, мало понятные и трудно воспроизводимые в работах того времени.

На основании анализа методик и результатов того периода мы можем предположить, что целому ряду научных коллективов, которые вели масштабные исследования ССС в 1923—1948 гг., действительно удалось подобрать условия, в которых достаточно стабильно и воспроизводимо работали МГЭ-детекторы. Перенести эти отработанные методики в другие лабораторные условия удавалось не всегда[18]; это заставляет предполагать, что в методиках были описаны не все значимые условия (возможно, режим освещения, радиофон и другие условия). Например, почти все спектральные исследования проводили в школе Гурвича, либо исследователями, которые перенимали методику непосредственно у представителей этой школы (вероятно, повторяя некоторые важные детали, которым не придавалось значения и которые не оговаривались в статьях).

Биологическое детектирование занимает важное значение в истории исследований ССС, поскольку само излучение было открыто и первые десятилетия подавляющая часть исследований его физических свойств проводилась именно с использованием биологического детектирования. В настоящее время биологические МГЭ-детекторы представляют собой интерес только для исследования самого эффекта, т.е. как реципиенты в схеме наблюдения МГЭ (например, для исследования механизма детектирования, выяснения вопроса о биологической роли эффекта). Из-за низкой воспроизводимости методик и их трудоемкости они не востребованы как детекторы в установках для исследования физических свойств ССС (например, для спектрального анализа) или в прикладных задачах, связанных с детектированием малых количеств вещества по хемилюминесценции (например, методика онкодиагностики по наличию в крови тушителя хемилюминесценции), как это было в 1920–1940-х гг. В ближайшем времени исследования ССС будут проводиться, вероятно, исключительно с помощью современных технических средств (ФЭУ, ЭОП, ПЗС-матриц и т.д.). Вместе с тем в отдаленной перспективе – при выяснении механизма биологического детектирования ССС, причин более высокой чувствительности [47] биологических детекторов к ССС биообъектов по сравнению с излучением физических источников, разработке хорошо воспроизводимых методик, – биологическое детектирование на основе использования МГЭ или других биологических эффектов ССС, возможно, найдет свою нишу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современное состояние проблемы УФ-ССС можно назвать парадоксальным. С одной стороны, само существование МГЭ-эффекта не доказано и не опровергнуто. С другой стороны, целый ряд концепций, происходящих из работ по МГЭ с использованием биологических детекторов, общепризнан и относится к «фактам из учебников». Кратко перечислим их:

– *Существование сверхслабого свечения биологических объектов*.

– *Ультрафиолетовая компонента сверхслабого свечения* [322, 323], по спектру и времени появления полностью совпадает с МГИ.

– *Свободнорадикальный механизм генерации сверхслабого свечения*. Впервые (в 1930-е годы!) предложен в работах по МГЭ, как вывод из данных «спектрального анализа МГЭ» (см. работу [52]).

– *Повышение интенсивности сверхслабого свечения в ответ на внешнее повреждающее воздействие* [52, 322]. Впервые обнаружено в работах по МГЭ, в которых названо «деградационным излучением» [16].

– *Временная структура сверхслабого свечения*. По современным данным спонтанное ССС биологических образцов состоит из отдельных вспышек длительностью не более 10^{-3} с [324, 325].

[18] Следует отметить, что нередко положительные результаты получали исследователи, начавшие работы с предвзятым негативным отношением к существованию эффекта (например, Р. Одюбер) и, наоборот, негативные результаты получали исследователи, изначально настроенные позитивно (А. Голлендер).

Этот же вывод сделан в 1930-е гг. в работах по «фракционированию МГЭ» [16] (см. работу [52]).

К простым совпадениям трудно отнести также и корреляцию результатов онкодиагностики первичных больных с опухолевыми процессами неустановленной этиологии и окончательных клинических диагнозов, полученных значительно позже: специфичность и чувствительность методики, построенной на использовании митогенетического эффекта, составляла >95% [28, 257, 297, 304].

Экспериментальные исследования митогенетического излучения с помощью биологических детекторов в 1923–1948 гг. позволили сделать революционные, даже парадоксальные для того времени научные выводы, которые были подтверждены спустя десятилетия другими методами (например, существование пептидных онкомаркеров крови, антистоксовых процессов, фотореактивации и другие). Вместе с тем методики, с помощью которых были получены эти верные результаты, в том виде, в котором они описаны в старых работах, не представляются достаточно убедительными с точки зрения современных требований.

Мы считаем тщательную и объективную проверку МГЭ, с вниманием ко всем накопленным данным и методическим деталям, важной задачей как для фундаментальной, так и (в перспективе) для прикладной науки и медицины. Однозначное доказательство феномена МГИ сыграло бы значимую роль для всей биологии, опровержение закрыло бы важную страницу в истории науки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Fels, Plos One **4** (4), e5086 (2009).
2. A. G. Gurwitsch, Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik **100** (1–2), 11 (1923).
3. A. G. Gurwitsch, *Das Problem der Zellteilung physiologisch betrachtet* (Julius Springer, Berlin, 1926).
4. T. Reiter and D. Gabor, *Zellteilung und Strahlung*. (Springer-Verlag, Berlin, 1928).
5. L. K. Wolff and G. Ras, Ztrbl. f. Bakt. I. **123**, 257 (1931).
6. J. B. Tuthill and O. Rahn, Archiv für Mikrobiologie **4** (1–4), 565 (1933).
7. A. J. Ferguson and O. Rahn, Archiv für Mikrobiologie **4** (1–4), 574 (1933).
8. M. A. Baron, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **108** (4), 617 (1926).
9. M. A. Baron, Planta/Achiv für wissenschaftliche Botanik **10** (1), 28 (1930).
10. H. Guillery, Virchows Archiv **279**, 311 (1929).
11. Г. К. Хрущев, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 317 (1934).
12. L. Gurwitsch and A. Anikin, Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. Mech. Org. **113** (4), 731 (1928).
13. J. Magrou and M. Magrou, Rev. Path. Veg. Ent. Agr. **14**, 244 (1927).
14. M. J. Magrou, M. M. Magrou, and M. P. Reiss, Comptes Rendus de l'Academie des Sciences **189**, 779 (1929).
15. L. K. Wolff and G. Ras, Nature **133** (3361), 499 (1934).
16. А. Г. Гурвич and Л. Д. Гурвич, *Митогенетическое излучение* (Изд-во ВИЭМ, Ленинград, 1934).
17. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, Успехи соврем. биологии **16** (3), 305 (1943).
18. O. Rahn, *Invisible radiations of organisms* (Gebrüder Bornträger, Berlin, 1936).
19. Ю. Н. Пономарева, Бюл. эксперим. биологии и медицины **2** (1), 16 (1936).
20. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетическое излучение: Физико-химические основы и приложения в биологии и медицине* (Медгиз, М, 1945).
21. A. Potozky, Protoplasma **25** (1), 49 (1936).
22. W. W. Siebert, Zeitsch. Klin. Med. (109), 360 (1928).
23. L. Acs, Centr. Bakt. I Abt. Orig. **120** (1/2), 116 (1931).
24. L. Acs, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten **126**, 125 (1932).
25. W. W. Siebert, Biochem. Z. **202**, 115 (1928).
26. А. А. Гурвич, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 127 (1934).
27. L. D. Gurwitsch and S. Salkind, Biochemische Zeitschrift **211** (1–3), 362 (1929).
28. Б. С. Песоченский, Дисс. ... д-ра мед. наук (Ленинградский онкологический институт, Ленинград, 1942).
29. W. W. Siebert, Biochemische Zeitschrift **226** (4/6), 253 (1930).
30. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, Biochemische Zeitschrift **196** (4–6), 257 (1928).
31. M. Kisliak-Statkewitsch, Zeitschrift für Krebsforschung **29** (1), 214 (1929).
32. L. Gurwitsch and A. Gurwitsch, Zeitschrift für Krebsforschung **29** (1–2), 220 (1929).
33. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, *Die mitogenetische Strahlung*. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Berlin, 1932).
34. H. P. Ypsilanti and R. Paltauf, Zeitschrift für Krebsforschung **32** (1–2), 372 (1930).
35. L. J. Blacher and N. W. Bromley, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **122** (1), 79 (1930).

36. L. J. Blacher and N. W. Bromley, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **123** (2), 240 (1931).
37. L. J. Blacher and O. G. Holzmann, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **123** (2), 230 (1931).
38. L. J. Blacher, A. I. Irichimowitsch, L. D. Liosner, et al., Roux' Archiv **127**, 339 (1932).
39. A. Potozky, Biochemische Zeitschrift **249**, 282 (1932).
40. А. А. Гурвич, *Проблема митогенетического излучения как аспект молекулярной биологии* (Медицина, Л., 1968).
41. O. Rahn, in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Berlin, 1934), Vol. II, pp. 226–240.
42. G. M. Frank and A. G. Gurwitsch, Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. Mech. Org. **109** (3), 451 (1927).
43. A. G. Gurwitsch and G. M. Frank, Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences **184**, 903 (1927).
44. G. Frank, Biologisches Zentralblatt **49**, 129 (1929).
45. T. Reiter and D. Gabor, Arch. Exp. Zellforsch **11**, 21 (1931).
46. R. Ruyssen, Acta Brev. Neerl. (3), 141 (1933).
47. J. Chariton, G. Frank, and N. Kannegiesser, Naturwissenschaften **18** (19), 411 (1930).
48. G. Protti, Radiobiologia **1** (4), 49 (1930).
49. С. Н. Брайнес, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 325 (1934).
50. В. В. Ефимов and С. П. Летунов, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 157 (1934).
51. A. Hollaender, in *Biological effects of radiation*, Ed. by B. Duggar (McGraw-Hill Book Company, Inc., NY, London, 1936), Vol. 2, pp. 919–958.
52. I. V. Volodyaev and L. V. Beloussov, Front. Physiol. **6** (00241), 1 (2015).
53. H. Sussmanowitsch, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **113** (4), 753 (1928).
54. L. K. Wolff and G. Ras, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten **128**, 314 (1933).
55. Ю. А. Владимиров, *Сверхслабые свечения при биохимических реакциях* (Наука, М., 1966).
56. С. Родионов и Г. М. Франк, *Вопросы свето-биологии и измерения света*.(Гос. техн.-теорет. изд-во, М.-Л., 1934).
57. A. Potozky, Biologisches Zentralblatt **50**, 712 (1930).
58. А. Г. Гурвич и В. Ф. Еремеев, в кн. *Сборник работ по митогенезу и теории биологического поля*, под ред. А. Г. Гурвича (Изд-во АМН СССР, М., 1947), сс. 5–19.
59. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Введение в учение о митогенезе* (Изд-во Акад. мед. наук СССР, М., 1948).
60. A. G. Gurwitsch, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **116** (1), 20 (1929).
61. A. Gurwitsch, Protoplasma **26**, 23 (1936).
62. С. Я. Залкинд и Г. М. Франк, *Митогенетические лучи и деление клеток* (Госиздат, М.-Л., 1930).
63. A. Gurwitsch and L. Gurwitsch, Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik **104** (1), 109 (1925).
64. С. Я. Залкинд, Природа, № 3, 11 (1934).
65. Л. Л. Васильев, Вестник знания (19–20), 1185 (1925).
66. D. N. Borodin, Plant Physiol. **5** (1), 119 (1930).
67. A. G. Gurwitsch and N. Gurwitsch, Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik **103** (1), 68 (1924).
68. G. Frank and S. Salkind, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **108** (4), 596 (1926).
69. A. Hollaender and E. Schoeffel, Quart. Rev. Biol. **6** (2), 215 (1931).
70. W. Loos, Jahrb. Wiss. Bot. **72** (4), 611 (1930).
71. M. Paul, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **128** (1), 108 (1933).
72. Rawin, Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik **101**, 53 (1924).
73. N. Wagner, Biol. Zentralbl. **47**, 670 (1927).
74. M. Kisliak-Statkewitsch, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **109** (2), 283 (1927).
75. J. Magrou, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 297 (1934).
76. J. Magrou and M. M. Magrou, Bulletin D'Histologie Appliquée **4**, 253 (1927).
77. Л. Я. Бляхер, в кн. *Общая биология (пособие для мединститутов и университетов)*, под ред. А. Ф. Шелла (Гос. мед. изд-во, М.-Л., 1933) , ч. 1, сс. 66–72.
78. A. G. Gurwitsch, in *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Ed. by E. Abderhalden (Urban & Schwarzenberg, Berlin, Wien, 1929), Vol. V, pp. 1401–1470.
79. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **113** (4), 740 (1928).
80. A. Gurwitsch and L. Gurwitsch, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **109** (3), 362 (1927).
81. J. B. Bateman, Biol. Rev. **10** (1), 42 (1935).
82. N. Wagner, Planta **5** (1), 70 (1928).
83. А. Г. Гурвич, Журн. Русского ботанич. об-ва **13**, 179 (1928).
84. B. Rossmann, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **114** (4), 583 (1929).
85. B. Rossmann, *Untersuchungen über die Theorie der mitogenetischen Strahlen* (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
86. A. Gurwitsch, Рус.-нем. мед. журн. **6**, 345 (1927).
87. A. A. Gurwitsch, *The problem of mitogenetic radiation as an aspect of molecular biology* (Meditsina, Leningrad, 1968).
88. A. G. Gurwitsch, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **113** (2), 406 (1928).
89. A. G. Gurwitsch, Protoplasma **6** (1), 449 (1929).

90. 90. Б. П. Токин, *Митогенетические лучи* (Гос. мед. изд-во, М., 1933).
91. G. W. Taylor and E. N. Harvey, Biol. Bull. **61** (3), 280 (1931).
92. М. Н. Моисеева, Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук (Киев, 1960).
93. M. Moissejewa, Ukr. Bot. Rev. (5), 41 (1929).
94. M. Moissejewa, Biochemische Zeitschrift **241**, 1 (1931).
95. M. Moissejewa, Biochemische Zeitschrift **251**, 133 (1932).
96. M. Moissejewa, Biochemische Zeitschrift **243** (1–3), 67 (1931).
97. A. Levan, Heredias (24), 9 (1938).
98. A. Levan, Nature (156), 751 (1945).
99. A. Levan, Heredias (35), 325 (1949).
100. G. Fiskesjö, Hereditas **102**, 99 (1985).
101. G. Fiskesjö, Environmental Toxicology and Water Quality **8** (3), 291 (1993).
102. G. Fiskesjö, in *Plants for environmental studies* (CRC Press LLC, New York, 1997), pp. 308–333.
103. И. И. Концевая, С. В. Жадько и О. Г. Алексеенко, Разнообразие растительного мира, № 1(4), 81 (2020).
104. I. Milionis, C. N. Banti, I. Sainis, et al., J. Biol. Inorgan. Chem. **23** (5), 705 (2018).
105. O. A. Asita, S. Moramang, T. Rants'o, et al., Caryologia **70** (2), 151 (2017).
106. E. Kowalska-Wochna, A. Tylicki, and A. Ościłowicz, Cell. Mol. Biol. Lett. **7** (2002).
107. G. L. R. Dávila, A. J. J. Méndez, and W. M. Arango, Caryologia **71** (2), 166 (2018).
108. R. B. Souza, C. P. De Souza, O. C. Bueno et al., Chemosphere (168), 1093 (2017).
109. S. Pallavi, M. Singh, H. S. Rathore, et al., Ethnobotanical Leaflets **12**, 927 (2008).
110. T. A. Yekeen, M. A. Azeez, A. Lateef, et al., Caryologia **70** (4), 366 (2017).
111. J. Dutta, A. Ahmad, and J. Singh, Caryologia **71** (2), 139 (2018).
112. F. Fatma, S. Verma, A. Kamal et al., Chemosphere (195), 864 (2018).
113. K. Sax, Getetics (26), 418 (1941).
114. A. Ya. Kocaman and E. Kılıç, Caryologia **70** (3), 229 (2017).
115. T. A. Staykova, E. N. Ivanova, and I. G. Velcheva, J. Cell Mol. Biol. **4**, 41 (2005).
116. D. S. Pesnya, Caryologia **66** (3), 275 (2013).
117. I. Khan, C. Kant, A. Sanwaria, et al., Heart Views **11** (3), 115 (2010).
118. I.-D. Adler, J. Cole, N. Danford, et al., *Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals* (World Health Organization, Geneva, 1985).
119. E. Bonciu, P. Firbas, C. S. Fontanetti et al., Caryologia **71** (3), 191 (2018).
120. О. П. Мелехова, Е. И. Егорова, Т. И. Евсеева и др., *Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование* (издательский центр «Академия», М., 2007).
121. Ш. А. Окада, *Радиоционная биохимия клетки* (Мир, М., 1974).
122. И. М. Прохорова, М. И. Ковалева, А. Н. Фомичева и О. В. Бабаназарова, *Пространственная и временная динамика мутагенной активности воды оз. Неро* (Наука, М., 2008).
123. D. Antosiewicz, Acta Soc. Bot. Pol. **56**, 543 (1987).
124. G. L. Cabrera and D. M. G. Rodriguez, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **426** (2), 211 (1999).
125. M. L. Camparoto, R. Teixeira, and P. Vicentini, Gen. Mol. Biol. **25**, 85 (2002).
126. M. P. Chrysouli, C. N. Banti, N. Kourkoumelis, et al., J. Inorgan. Biochem. **179**, 107 (2018).
127. M. P. Chrysouli, C. N. Banti, I. Milionis, et al., Mater Sci. Eng. C Mater. Biol. (93), 902 (2018).
128. S. M. C. M. A. Ferreira, H. L. C. dos Santos, V. G. Jennifer, et al., Braz. J. Pharm. Sci. **56**, 1 (2020).
129. G. Fiskesjö, in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 43. In vitro toxicity testing protocols, Ed. by S. O. Hare and C. K. Atterwell (Humana Press Inc., Totowa, USA, 1995), pp. 119–127.
130. W. F. Grant, Mutat. Res. **99**, 273 (1982).
131. W. F. Grant and K. D. Zura, in *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology*, Ed. by J. A. Heddle (Acad. Press, New York, 1982), pp. 407–433.
132. D. Kumar, A. Rajeshwari, P. S. Jadon, et al., J. Environ. Sci. **38**, 150 (2015).
133. L. P. Kumar and N. Paneerselwam, Facta Universitatis. Ser.: Medicine and Biology **15** (1), 20 (2008).
134. T. H. Ma, Mutat. Res. **99**, 257 (1982).
135. T. H. Ma, Mutat. Res. **426**, 103 (1999).
136. M. H. Nielsen and J. Rank, Hereditas **121** (3), 249 (1994).
137. J. Rank and M. Nielsen, Environmental Mutagenesis and Related Subjects **312**, 17 (1994).
138. H. S. Rathore, Ethnobotanical Leaflets **10**, 92 (2006).
139. K. Sabti, Cytobios **58**, 71 (1989).
140. I. Sainis, C. N. Banti, A. M. Owczarzak, et al., J. Inorgan. Biochem. **160**, 114 (2016).
141. J. Ślusarczyk, M. Dudek, M. Wierzbicka, et al., Caryologia **67** (3), 250 (2014).
142. M. K. Stathopoulou, C. N. Banti, N. Kourkoumelis, et al., J. Inorgan. Biochem. **181**, 41 (2018).
143. И. И. Концевая и Т. А. Толкачева, Веснік Віцебскага Дзяржаўнага Ўніверсітэта, № 6(72), 57 (2012).
144. J. Rank, Ekologija **1**, 38 (2003).
145. C. Balog, Cytologia **1982** (47), 689 (1982).
146. M. Levine, Cancer Res. **5**, 107 (1945).
147. S. Tedesco and H. Laughinghouse, *Bioindicator of genotoxicity: the Allium cepa test* (InTech, Croatia, 2012).
148. M. Wierzbicka and D. Antosiewicz, Acta Soc. Bot. Pol. **57** (2), 201 (1988).

149. Т. И. Евсеева, Т. А. Майстренко, С. А. Гераськин и др., Цитология и генетика, № 5, 73 (2005).
150. M. K. Alotaibi and I. O. Barnawi, Pak. J. Bot. **50** (6), 2245 (2018).
151. Ö. S. Aslantürk and A. Celik Tulay, Pakistan J. Biol. Sci. **8** (6), 482 (2005).
152. Ö. S. Aslantürk, Caryologia **72** (2), 29 (2019).
153. G. A. Bich, M. C. Vedoya, and M. G. Medvedeff, Rev. Cienc. Tecnol. **14** (18), 39 (2012).
154. A. de la Campo, M. Bracho, L. Marcano, et al., Biocell **29** (2), 169 (2005).
155. M. L. Ferrero and C. de la Torre, J. Cell Set. **80**, 171 (1986).
156. C. K. Grisolia, A. B. B. de Oliveira, H. Bonfim, et al., Gen. Mol. Biol. **28** (2), 334 (2005).
157. M. F. Knoll, A. C. F. da Silva, T. S. do Canto-Dorow, et al., Gen. Mol. Biol. **29** (3), 539 (2006).
158. M. Konuk, R. Liman, and İ. H. Ciğerci, Pak. J. Bot. **39** (1), 73 (2007).
159. D. Liu and I. Kottke, J. Biosci. **29** (3), 329 (2004).
160. A. Mesi and D. Kopliku, Procedia Technology **8**, 19 (2013).
161. Y. Mustafa and E. S. Arikan, Caryologia **61** (1), 45 (2014).
162. C. A. Ozel, M. Ozkul, F. Unal, et al., Fresenius Environ. Bull. **27** (12), 8133 (2018).
163. A. Özkara, Caryologia **72** (2), 21 (2019).
164. H. S. Rathore, S. Bi, S. Anjali, et al., Ethnobotanical Leaflets **10**, 272 (2006).
165. P. K. Renjana, S. Anjana, and J. E. Thoppil, Int. J. Pharm. Pharm. Sci. **5**, 311 (2013).
166. C. A. Rosculete, E. Bonciu, E. Rosculete, et al., Int. J. Environ. Res. Public Health **16** (1), 75 (2019).
167. R. Sehgal, S. Roy, and V. L. Kumar, Biocell **30** (1), 9 (2006).
168. M. I. Soliman, J. Biol. Sci. **1** (11), 1021 (2001).
169. С. А. Бездугова, Э. М. Гидова, М. М. Биттуева и др., Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, № 3, 96 (2018).
170. А. Ю. Буданцев, Фундаментальные исследования, № 6, 1393 (2014).
171. П. В. Лебедев, М. Ф. Мельникова и И. А. Уткина, Цитология **8** (5), 584 (1971).
172. О. А. Момот, Автореф. дисс. ... канд. биол. наук (Калуга, 2007).
173. Д. С. Песня, А. В. Романовский и И. М. Прохорова, Ярославский педагогич. вестн., № 3, 80 (2010).
174. Л. Н. Ульяненко, Е. В. Рева и Б. И. Сынзыныс, С.-х. биология **52** (1), 183 (2017).
175. L. Pucciarini, F. Ianni, V. Petesse, et al., Molecules **24** (3) (2019).
176. G. Fiskesjo, Vatten **37**, 232 (1981).
177. Т. Евсеева, Е. Белых и Т. Майстренко, Вестн. Института биологии Коми НЦ УрО РАН, № 9, 2 (2005).
178. Т. И. Евсеева, С. А. Гераськин и Е. С. Храмова, Радиоэкология. Охрана окружающей среды, № 3, 143 (2001).
179. C. N. Banti and S. K. Hadjikakou, BioProtoc. **9** (14), e3311 (2019).
180. M. Ghosh, M. Bandyopadhyay, and A. Mukherjee, Chemosphere **81**, 1253 (2010).
181. R. Liman, U. G. Gökçe, D. Akyıl, et al., Revista Brasileira de Farmacognosia **22** (3), 541 (2012).
182. T. G. Mashanda, A dissertation submitted in partial fulfilment of the requirements for the bachelor of science honours degree in biological sciences (Bindura University of Science Education, Zimbabwe, 2017).
183. M. T. Remacle-Dath, Bull. Soc. Royale Sci. Liege **35** (3–4), 315 (1966).
184. M. C. Silva, A. F. Matos, H. L. C. d. Santos, et al., Braz. J. Pharm. Sci. **56**, e18302 (2020).
185. T. Sifa, Caryologia **62** (3), 171 (2014).
186. B. Tutunoglu, O. Aksoy, R. Ozbek, et al., Biologia plantarum **63** (1), 365 (2019).
187. J. F. Lopez-Saez, F. Gonzalez-Bernaldez, A. Gonzalez-Fernandez, et al., Protoplasma **67**, 213 (1969).
188. A. M. Guarino, A. Troiano, E. Pizzo, et al., Genes (9), 513 (2018).
189. L. P. P. Kumar, N. , Facta universitatis. Ser.: Medicine and Biology **14** (2), 60 (2007).
190. G. Devnarayan, S. Marmat, H. Rathore, et al., Int. Res. J. Biol. Sci. **5** (8), 53 (2016).
191. S. A. Ozlem and A. C. Tulay, Pakistan Journal of Biological Sciences **8** (6), 482 (2005).
192. В. А. Пухальский, А. А. Соловьев, Е. Д. Бадаева и др., *Практикум по цитологии и цитогенетике растений* (КолосС, М., 2013).
193. М. Мойсєєва, Вісник Київського Ботанічного Саду (14), 1 (1932).
194. A. G. Gurwitsch, Bulletin d'histologie appliquée a la physiologie et a la pathologie et de technique microscopique **1** (11), 486 (1924).
195. W. W. Siebert, Biochemische Zeitschrift **202**, 123 (1928).
196. И. Н. Гудков и Д. М. Гродзинский, в сб. *Механизмы радиоустойчивости растений* (Наук. думка, Киев, 1976), сс. 110–137.
197. А. И. Довгалюк, Т. Б. Калиняк и Я. Б. Блюм, Цитология и генетика **35** (1), 3 (2001).
198. O. Rahn, J. Bacteriol. **28** (2), 153 (1934).
199. G. Karsten, Z. Bot. (10), 1 (1918).
200. Y. Karsten, Zeit. Bot. **7** (1), 1 (1915).
201. M. Stalfeit, *Studien über die Periodizität der Zellteilung und sich daran anschließende Erscheinungen. Kungl. Sv. Vetenskapakad* (Almqvist und Wiksell, Stockholm, 1921).
202. H. H. Laughlin, (Publ. Cam. Inst. Wash., 1919), Vol. 265, pp. 1–48.
203. А. Г. Гурвич, Архив биол. наук **46** (3), 3 (1937).
204. B. Rossmann, Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen **113** (2), 346 (1928).
205. F. Wassermann, Bd. 11, 1931, Arch. Experim. Zellforschung **11** (1931).
206. A. G. Gurwitsch, Botanical Gazette **80** (2), 224 (1925).

207. A. G. Gurwitsch, Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik **103** (3–4), 490 (1924).
208. L. D. Gurwitsch, Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere **197** (1/2) (1922).
209. P. G. Rusinoff, Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik **104** (1), 121 (1925).
210. A. G. Gurwitsch, in *Atti del I Congresso Interanzionale di electro-radio-biologia*, Ed. by L. Capelli (Bologna Venezia, 1934), Vol. II.
211. W. E. Kellicott, Bull. Torrey Bot. Club. (31), 529 (1904).
212. В. Г. Гриф, Цитология **1** (2), 229 (1959).
213. В. Г. Гриф, Цитология **36** (11), 1069 (1994).
214. С. Н. Мовсесян, Научн. тр. Арм. отд. Всес. ботан. об-ва (5), 129 (1970).
215. E. Edgar, *Fluctuation of mitotic index in the shoot apex of Lonicera nitida* (University of Canterbury, Canterbury, N.Z., 1961).
216. R. C. Friesner, Am. J. Bot. **7** (9), 380 (1920).
217. V. G. Grif, V. B. Ivanov, and E. M. Machs, Цитология **44** (10), 936 (2002).
218. A. Lance, Ann. Sci. natur. Bot. et bid. veg. **11** (13), 301 (1952).
219. H. Rotta, Planta (37), 399 (1949).
220. M. Tourte, Rev. Cyt. et Biol, veg. (29), 199 (1966).
221. Г. Г. Батикян and Е. Г. Симонян, Биол. журн. Армении **23** (11), 96 (1970).
222. А. Ю. Буданцев, Изв. РАН. Сер. биол., № 3, 293 (2009).
223. R. C. Bishop and R. M. Klein, Genome **13** (3), 597 (2011).
224. A. C. Chandler, Biol. Bull. (112), 305 (1957).
225. C. E. Droogleever-Fortuyn, *Day and night period in nuclear divisions* (1926).
226. S. M. Erickson and W. S. Hillman, Genime **18** (1), 189 (2011).
227. W. A. Jensen and Z. Y. Kavaljian, Am. J. Bot. **45** (5), 365 (1958).
228. A. Lewis, Bot. Gaz. (32), 423 (1901).
229. J. F. Lopez-Saez and E. Fernandez-Gomez, Experientia (21), 591 (1965).
230. M. Jangala, M. Santoshi, M. Suman, et al., Int. J. Toxicol. Appl. Pharmacol. **2** (2), 18 (2012).
231. A. M. A. Matias and I. K. C. Fontanilla, Science Diliman **23** (1), 43 (2011).
232. Y. Mäkinen, Ann. Bot. Vanamo **34** (6), 1 (1963).
233. M. D. Solomon and J. A. Trent, Trans. Kansas Acad. Sci. **44**, 202 (1903).
234. A. Gonzalez-Fernandez, J. Lopez-Saez, and G. Gimenez-Martin, Exp. Cell Res. (43), 255 (1966).
235. А. Ю. Буданцев и А. Ю. Демьянов, Цитология **59** (6), 447 (2017).
236. F. Wassermann, Klinische Wochenschrift **9** (10), 433 (1930).
237. W. A. Jensen и Z. Y. Kavaljian, Am. J. Bot. **45** (5), 365 (1957).
238. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, (1926).
239. W. Schwarz, Biol. Zentralbl. **48**, 302 (1928).
240. З. П. Ростовцева, *Верхушечная меристема* (Изд-во МГУ, М., 1969).
241. R. Hagemann, Kulturpflanze (4), 46 (1956).
242. И. А. Уткина, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (Ин-т экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1972).
243. И. А. Уткина and И. М. Синягина, в сб. *Материалы по экологии и физиологии растений уральской флоры* (УрГУ, Свердловск, 1976), сс. 42–50.
244. R. M. Savelkoul, Am. J. Bot. **44** (4), 311 (1957).
245. C. E. Stephens, Cytologia **40**, 607 (1975).
246. C. E. Stephens, Cytologia **49**, 679 (1984).
247. J. Schwemmle, Biologisches Zentralblatt (49), 421 (1929).
248. Л. В. Белоусов, В. Л. Воейков и Ф.-А. Попп, Природа, № 3, 64 (1997).
249. A. Barberio, in *Water Treatment, Edited by Walid Elshorbagy and Rezaul Kabir Chowdhury* (2013), pp. 317–334.
250. A. G. Gurwitsch, Radiobiologia **1** (1), 15 (1932).
251. Л. В. Высоцкая, Вавиловский журн. генетики и селекции **18** (1), 81 (2014).
252. G. Frank, Biologisches Zentralblatt **52** (1), 1 (1932).
253. A. Hollaender and W. D. Claus, *An experimental study of the problem of mitogenetic radiation*. (National research council of the National academy of sciences, Washington, 1937).
254. O. W. Richards and G. W. Taylor, Biol. Bull. **63** (1), 113 (1932).
255. A. Hollaender and W. D. Claus, J. Optic. Soc. Amer. **25**, 270 (1935).
256. В. Ф. Сарафанов, Архив биол. наук. Сер. Б **35** (1), 309 (1934).
257. Е. Е. Авчина, Дисс. ... канд. мед. наук (Институт онкологии, Ленинград, 1950).
258. О. Е. Нудольская, Дисс. ... д-ра мед. наук (2-й Московский государственный медицинский институт, Москва, 1945).
259. В. И. Иоффе and Е. С. Биллиг, Архив биол. наук **40** (1), 5 (1935).
260. K. H. Kreuchen and J. B. Bateman, Protoplasma **22** (1), 243 (1934).
261. M. Nakaidzumi and H. Schreiber, Biochemische Zeitschrift (237), 358 (1931).
262. J. Westenberg, *Die "slide-cell" Methode von Wolff und Ras zum Nachweis von Gurwitsch-Strahlen* (N.V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij, Amsterdam, 1935).
263. T. I. Quickenden and S. S. Q. Hee, Speculat. Sci. Technol. **4** (5), 453 (1981).
264. T. I. Quickenden and R. N. Tilbury, Radiat. Res. **102**, 254 (1985).
265. F. Grasso, F. Musumeci, A. Triglia, et al., Photochem. Photobiol. **54** (1), 147 (1991).

266. M. Wainwright, K. Killham, C. Russell, et al., Microbiol.-UK **143** (1), 1 (1997).
267. И. В. Володяев, Р. Н. Ивановский, А. С. Богачук и др., в сб. *Матер. V Междунар. конгр. «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»* (Санкт-Петербург, 2009), с. 128.
268. I. V. Volodyaev, R. N. Ivanovsky, A. S. Bogachuk, et al., in *Abstr. Res. Symp. "Progress In Electromagnetics"* (Moscow, Russia, 2009), p. 1025.
269. I. V. Volodyaev, E. N. Krasilnikova, and R. N. Ivanovsky, PloS One **8** (4), e62808 (2013).
270. И. В. Володяев и Е. В. Наумова, в сб. *Матер. VIII Междунар. конгр. «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»* (Санкт-Петербург, 2018), сс. 21–22.
271. С. Я. Залкинд, Природа, № 2, 111 (1932).
272. T. Reiter and D. Gabor, Strahlenther Onkol. (28), 125 (1928).
273. J. Ponomarewa, Biochemische Zeitschrift **239**, 424 (1931).
274. G. Decker, Protoplasma **25** (1), 515 (1936).
275. W. Frankenburger, Strahlenther Onkol. **47** (2), 233 (1933).
276. A. Gurwitsch and L. Gurwitsch, *L'analyse mitogénétique spectrale* (Hermann & Cie, Paris, 1934).
277. А. Гурвич, Л. Д. Гурвич и А. А. Слюсарев, Архив биол. наук **55** (2), 104 (1939).
278. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, Nature **143** (3633), 1022 (1939).
279. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, *Die mitogenetische Strahlung* (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1959).
280. H. A. Gordon, Acta Physicochim. USSR **13** (3), 393 (1940).
281. P. Pringsheim and A. L. Reimann, Zeitschrift für Physik **29** (1), 115 (1924).
282. P. Pringsheim, *Phosphoreszenz und Fluoreszenz, 3rd ed.* (Springer, Berlin, 1928).
283. N. Kannegiesser, Biochemische Zeitschrift **236**, 415 (1931).
284. Л. Д. Гурвич, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 141 (1934).
285. В. Ф. Еремеев, Бюл. эксперим. биологии **45** (6), 95 (1958).
286. С. Я. Залкинд, Природа, № 6, 53 (1938).
287. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, Бюл. эксперим. биологии и медицины **4** (6), 474 (1937).
288. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, Бюл. ВИЭМ (6–7), 29 (1935).
289. A. A. Gurwitsch, Ann. de Physiol. et. Physicochem. Biol. **10** (5), 1153 (1934).
290. G. S. Kalendaroff, Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere **231**, 238 (1933).
291. И. В. Цоглина, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 341 (1934).
292. Г. С. Календаров, Архив биол. наук **32** (1), 26 (1934).
293. Г. С. Календаров, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 183 (1934).
294. A. A. Gurwitsch, Annales de Physiologie et de Physicochimie biologique **10** (5), 1166 (1934).
295. A. A. Gurwitsch, Annales de Physiologie **14** (2), 182 (1938).
296. H. Gesenius, Radiobiologia **1** (2), 33 (1932).
297. А. Г. Гурвич, Л. Д. Гурвич, С. Я. Залкинд и др., *Учение о раковом тушителе: Теория и клиника* (Изд-во АМН СССР, Москва, 1947).
298. W. Siebert, in *Handbuch der allgemeinen Hämatologie*, Ed. by H. Hirschfeld and A. Hittmair (Urban & Schwarzenberg, Berlin, Wien, 1934), Vol. 2, p. 1339.
299. H. Gesenius, Biochemische Zeitschrift **226** (4-6), 257 (1930).
300. M. Heinemann, Klinische Wochenschrift **11** (33), 1375 (1932).
301. С. Я. Залкинд, Природа **1**, 53 (1938).
302. Я. С. Кленицкий, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 213 (1934).
303. 303. М. Б. Новиков, Архив биол. наук **51** (3), 56 (1938).
304. Б. С. Песоченский, в *Сборник работ по митогенезу и теории биологического поля*, под ред. А. Г. Гурвича (Изд-во АМН СССР, Москва, 1947), сс. 102–114.
305. E. G. Prokofiewa, Nature **134** (3389), 574 (1934).
306. А. Е. Браунштейн и А. П. Потоцкая, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 73 (1934).
307. Н. Н. Каннегисер, Ю. А. Харитон и Г. М. Франк, в кн. *Биофизика живой клетки. Избранные труды.* (Наука, М., 1982), сс. 161–167.
308. К. А. Голшмид and В. К. Модестов, в *Сборник работ Пермского отделения Уральского филиала Центрального института курортологии* (Пермь, 1934), сс. 43–50.
309. Е. Т. Кулин, Здравоохранение Белоруссии (12), 17 (1957).
310. I. Langmuir and R. N. Hall, Phys Today **42** (1989).
311. Anonim, Nature (December, 11), 1007 (1937).
312. J. Gray and C. Ouellet, Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B **114** (786), 1 (1933).
313. E. Lorentz, Phys. Rev. (44), 329 (1929).
314. Г. Барт, Архив биол. наук **46** (1), 153 (1937).
315. А. Л. Юделес, Дис. ... д-ра мед. наук (Свердловск, 1944).
316. В. П. Нагорянская, Дисс. ... канд. мед. наук (Центральный Онкологический Институт НКЗ РСФСР, Москва, 1945).
317. W. S. Metcalf and T. I. Quickenden, Nature **216** (5111), 169 (1967).
318. С. Я. Залкинд, Архив биологических наук **57** (2–3), 124 (1940).
319. A. A. Gurwitsch, Experientia **44** (7), 545 (1988).
320. V. L. Voeikov and L. V. Beloussov, in *Biophotonics and Coherent Systems in Biology* (Springer US, Boston, MA, 2007), pp. 1–16.
321. E. V. Naumova, A. E. Naumova, D. A. Isaev, et al., J. Biomed. Photonics Engineer. **4** (4), 040201 (2018).
322. R. N. Tilbury and T. I. Quickenden, J. Bioluminesc. Chemiluminesc. **7** (4), 245 (1992).
323. Н. А. Троицкий, С. В. Конев и М. А. Катибников, Биофизика **6** (2), 238 (1961).
324. L. V. Beloussov, Eur. J. Biophys. **1** (1), 6 (2013).
325. M. Kobayashi and H. Inaba, Appl. Optics 39 (1), **183** (2000).

Methods of Studying Ultraweak Photon Emission from Biological Objects. II. Methods Based on Biological Detection

I.V. Volodyaev*, L.V. Beloussov*, I.I. Kontsevaya, A.E. Naumova***, and E.V. Naumova******

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

***Francysk Skaryna Gomel State University, ul. Sovetskaya 104, Gomel, 246019 Republic of Belarus*

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

*****Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentieva 13, Novosibirsk, 630090 Russia*

The second part of the review, which is devoted to the methods of studying ultraweak photon emission, presents a methodology of biological detection. During the first 25 years of research (1923–1948), almost all experiments in this area were based on biological detection and only the component belonging to the middle ultraviolet region of the spectrum (also called mitogenetic radiation at that time) was studied, because it was observed due to the influence of ultraweak ultraviolet radiation on the mitotic regime of the biological detector. These experiments remain open to debate till present due to the insufficient validation of methods. Many of the results obtained from these investigations have been very impressive for that time period and are now verified, the research questions the other results relate to are of considerable interest (for instance, fundamental results concerning cell division and carcinogenesis, early cancer diagnostics). Thus, the analysis of the methodology employed is an emerging issue for the subsequent experimental verification. The details of the methods with the most common biological detectors (onion roots, yeast and bacterial cultures) are analysed and the onion detection method is compared to the closest analogue (the Allium-test).

Keywords: ultraweak photon emission from biological objects, mitogenetic radiation, mitogenetic effect, biological test systems, Allium- test, biophotonics

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1116–1122

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3, 579.61

НАНОВИБРАЦИИ КАНТИЛЕВЕРА АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА КАК СИСТЕМА ДЕТЕКЦИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

© 2021 г. С.Н. Плескова*, **, О.И. Фомичев*, Р.Н. Крюков*, И.С. Судакова**

**Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23/3*

***Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, 603950, Нижний Новгород, ул. Минина, 24/1*

E-mail: pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.
После доработки 02.07.2021 г.
Принята к публикации 16.09.2021 г.

Атомно-силовая микроскопия была использована для детекции нановибраций кантилевера, возникающих в результате метаболической активности *Escherichia coli*. Показано, что использование поли-L-лизина эффективно для закрепления бактерий на кантилевере с сохранением их метаболической активности. Варианса амплитуды колебаний кантилевера статистически значимо отличается между контролем (кантилевер, функционализированный поли-L-лизином) и опытом (кантилевер с фиксированными на нем бактериями). Продемонстрировано, что использование атомно-силовой микроскопии дает возможность определять антибиотикорезистентность штамма в течение часа, в отличие от методов, используемых в клинической практике и предоставляющих ответ об антибиотикорезистентности за несколько суток.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, антибиотикорезистентность, нановибрации, кантилевер, бактерии, антибиотики.

DOI: 10.31857/S0006302921060065

Антибиотикорезистентность является одним из глобальных медицинских кризисов, поскольку антибиотики теряют свою эффективность в отношении стремительно растущего числа бактериальных патогенов [1]. Вместе с тем инфекционные заболевания по данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно являются этиологической причиной заболеваний у 2 млрд человек и для 17 млн. они заканчиваются летальным исходом [2]. Не менее проблемными являются нозокомиальные инфекции в стационарах как хирургического, так и терапевтического профиля. В частности, в работе [3] показано, что антибиотикорезистентные *Escherichia coli* в условиях многопрофильного стационара в отделении травматологии и ортопедии выявляются в 74% случаев. Проблема формирования множественной лекарственной устойчивости является общемедицинской и общебиологической, поскольку резистентность сформирована у многих штаммов вирусов (например, большинство штаммов гриппа резистентны к амантадину [4], некоторые штаммы вирусов герпеса устойчивы к ацикловиру [5]), грибов (например, резистентность *Candida albicans* к азольным препаратам [6]), простейшим (например, *Plasmodium vivax* резистентна к хлорохину [7]). Одной из причин формирования антибиотикорезистентности является достаточно длительное проведение анализа «на флору и чувствительность к антибиотикам». За время ответа на вопрос о чувствительности/резистентности выделенной микрофлоры к антибиотикам пациентам назначается этиотропная терапия – в основном антибиотики широкого спектра действия, что способствует выработке резистентности и внутрибольничной персистенции нозокомиальных штаммов. Диско-диффузионный метод, традиционно используемый в клинической лабораторной диагностике, дает ответ на вопрос об антибиотиках, к которым чувствителен выделенный штамм, только спустя пять-семь суток после забора материала. В 2017 г. группа проф. С. Казаса [8] предложила принципиально новую методику быстрого определения чувстви-

Сокращения: АЧХ – амплитудно-частотная характеристика, DFL – разностный сигнал между верхним и нижним участками фотодиода (difference signal between top and bottom halves of the photodiode)..

тельности бактерий к антибиотикам. Она основана на использовании принципов работы атомно-силового микроскопа, когда наномеханический сенсор (кантилевер) колеблется в том случае, если прикрепленные на нем бактерии метаболически активны [9, 10]. Эта система имеет следующие преимущества по сравнению с традиционно используемыми: 1) она не зависима от бактериального роста, поэтому результат выдается через один-полтора часа по сравнению с сутками, необходимыми при использовании диско-диффузионного метода; 2) чтобы достичь распознаваемого сигнала, необходимо 10^2 бактерий [11]. Таким образом, предложенная система имеет высокую чувствительность и скорость, что позволяет рассматривать ее как чрезвычайно перспективную для определения резистентности бактерий к антибиотикам. Нужно отметить, что атомно-силовая микроскопия прекрасно зарекомендовала себя не только как метод высокоразрешающей микроскопии. Она используется для динамического мониторинга за состоянием клеток и отдельных молекул, определения наномеханических свойств биологических объектов, внутриклеточного фишинга отдельных молекул, исследования межклеточных адгезионных контактов [12].

В связи с вышесказанным целью данного исследования была разработка собственной методики определения резистентности бактерий к антибиотикам. Для достижения цели ставились следующие задачи: 1) отработка метода фиксации бактерий на кантилевере, который, с одной стороны, не давал бы возможности бактериям десорбироваться с поверхности кантилевера, а с другой – не ограничивал метаболическую активность бактерий, что могло бы отразиться на нановибрациях кантилевера; 2) отработать систему детекции сигнала, для чего выбрать оптимальные по физико-химическим параметрам кантилеверы и режим работы атомно-силового микроскопа; 3) протестировать на одном бактериальном штамме два разных антибиотика, к одному из которых он чувствителен, а к другому – резистентен; 4) выбрать надежные физические параметры, корректно описывающие наблюдаемый эффект антибиотикорезистентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Чувствительный к гентамицину и резистентный к цефтриаксону штамм *E. coli* 321 взяли из музейной культуры Научно-образовательного центра «Физика твердотельных наноструктур» ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Штамм выращивали на LB-бульоне (Invitrogen, 37°C, 18 ч), после чего трижды отмывали LB-бульоном (450 *g*, 5 мин) и взвешивали в концентрации 10^9 кл/мл

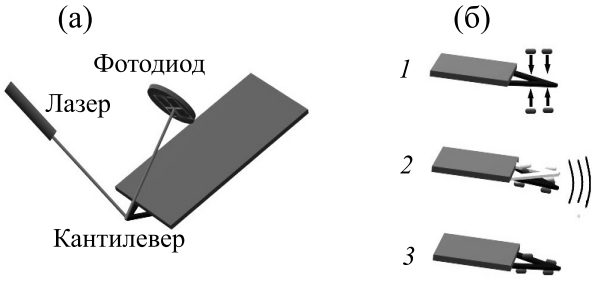


Рис. 1. (а) – Схема установки детектора нановибраций: луч лазера фокусируется на кончике кантилевера и отражается от него в центр четырехсекционного фотодиода, смещения отражения на фотодиоде используются для детектирования нановибраций как сигнала DFL. (б) – Схема эксперимента: *1* – когда бактерии не прикреплены к датчику, нановибрации возникают под действием только теплового движения и малы; *2* – после прикрепления живых бактерий нановибрации связаны с их метаболической активностью и высоки; *3* – после воздействия антибиотика бактерии нежизнеспособны и колебания возвращаются к низким уровням.

на спектрофотометре СПЕКС-ССП («Спектроскопические системы», Россия) при длине волны $\lambda = 670$ нм, что соответствовало 10 МЕ.

Общая схема эксперимента представлена на рис. 1.

Апробировали три вида Si_3N_4-кантилеверов: D-DNP (f_0 – 12–24 кГц, k – 0.06 Н/м), C-MLCT (f_0 – 4–10 кГц, k – 0.010 Н/м) и A-MLCT (f_0 – 22 кГц, k – 0.07 Н/м) (Bruker, США) и фиксацию 0.01%-м поли-L-лизином (Merck, США). Для фиксации бактерий кантилеверы предварительно обрабатывали поли-L-лизином (24°C, 10 мин), после чего трехкратно аккуратно отмывали дистиллированной водой. Кантилеверы оставляли сушиться (24°C, 5 мин), после чего наносили на них суспензию бактерий и инкубировали (37°C, 30 мин).

По окончании инкубации кантилевер устанавливали в холдер атомно-силового микроскопа NTegra («NT-MDT», Россия) и погружали в аналитическую камеру с 5 мл LB-бульона. Для контроля использовали кантилевер, покрытый поли-L-лизином, но без бактерий.

Устанавливали лазер в центр четырехсекционного фотодиода, переводили микроскоп в режим регистрации осцилляций (Nova, версия Px.3.4.0 rev 17188, режим «Oscilloscope») и снимали аналитический сигнал DFL (difference signal between top and bottom halves of the photodiode – разностный сигнал между верхним и нижним участками фотодиода). Нановибрации в контроле и в опыте с бактериями снимали в течение 60 мин.

Затем из аналитической камеры отбирали 2 мл LB-бульона и вносили в нее 4%-й раствор гентамицина сульфата («Микроген», Россия) в количестве 2 мл (конечная концентрация гентамицина сульфата 16 мг/мл), либо 1%-й раствор цефтриаксона (ПАО «Биосинтез», Россия) в количестве 2 мл (конечная концентрация 36 мг/мл). Опускали кантилевер с бактериями в раствор гентамицина либо цефтриаксона, инкубировали (24°C, 60 мин), после чего переводили микроскоп в режим регистрации сигнала DFL. Полученный массив данных обрабатывали в программе Origin Pro 8 SR4 v8.0951. С помощью Фурье-фильтра из аналитического сигнала удаляли колебания с частотами выше 1 Гц (колебания электросети и другие внешние колебания). Проводили определение квадрата стандартного отклонения (вариансы) в каждом из опытов для характеристики амплитуды сигнала кантилевера.

При анализе данных для учета вариаций характеристик кантилевера (поскольку, несмотря на принадлежность к одной партии, для них зафиксированы незначительные различия в резонансной частоте колебаний и отражающей способности покрытий, что сказывалось на учете и записи нановибраций) и различий в количестве фиксированных бактерий проводили нормировку данных, принимая за единицу сигнал DFL от кантилевера с бактериями с последующим принятием за нуль сигнала DFL от пустого кантилевера, функционализированного поли-L-лизином.

Статистическую обработку проводили в программе Origin 8.0 (OriginLab Cor., США). Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределения не соответствовали критериям нормальности, определяли медиану и 25-й процентиль. Для сравнения двух выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для решения первой задачи была апробирована фиксация 0.01%-м поли-L-лизином. В случае использования поли-L-лизина различия в нановибрациях кантилевера в контроле и в опыте были существенными, что говорило о надежной фиксации бактерий на кантилевере при сохранении их метаболической активности, поэтому дальнейшие измерения проводили с поли-L-лизином.

Были апробированы три вида кантилеверов. Изначально были выбраны нитрид кремниевые кантилеверы, поскольку их жесткость ниже, чем у кремниевых. Из трех апробированных вариантов кантилеверов наилучшим образом подходили кантилеверы A-MLCT, поскольку, по всей вероятности, их физико-химические характеристики, прежде всего жесткость и резонансная частота, наилучшим образом соответствуют задачам регистрации нановибраций.

Фурье-преобразование полного спектра записанных результатов не дало существенных преимуществ при последующей обработке результатов. Однако весьма показательным было использование вариансы (квадрата стандартного отклонения), характеризующей изменения амплитудно-частотных характеристик колебаний (АЧХ) кантилевера во всем спектре записи нановибраций.

На рис. 2б очевидно изменение АЧХ кантилевера в случае фиксации на кантилевере A-MLCT поли-L-лизином бактерий *E. coli* по сравнению с чистым кантилевером, функционализированным поли-L-лизином (рис. 2а).

Часовая экспозиция в растворе гентамицина сульфата (16 мг/мл) кантилевера с фиксированными на нем бактериями вновь вызывает существенное изменение АЧХ (рис. 2в). В этом случае АЧХ больше соответствовала нановибрациям пустого кантилевера, функционализированного 0.01%-м поли-L-лизином. При этом часовая экспозиция кантилевера с тем же штаммом *E. coli*, но в растворе цефтриаксона (36 мг/мл), к которому предварительно у данного штамма была выявлена резистентность, показала, что АЧХ кантилевера в контроле (кантилевер,с фиксированным на нем бактериями) и в опыте (кантилевер с бактериями, проинкубированный в растворе цефтриаксона) была одинакова (рис. 3). Таким образом, в случае использования антибиотика, к которому бактерии резистентны, в качестве отрицательного контроля, показано, что бактерии в течение часа не утрачивают своей метаболической активности.

Была проведена серия экспериментов по изучению изменений АЧХ кантилевера под влиянием фиксированных на нем бактерий и воздействующего на бактерии гентамицина сульфата. Результаты статистической обработки DFL в серии из девяти экспериментов представлены на рис. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Механизм действия поли-L-лизина как фиксирующего агента следующий: имеющий положительный заряд поли-L-лизин опосредует взаимодействие отрицательно заряженного верхнего слоя клеточной стенки бактерий – липополисахарида с кантилевером через электростатические «слабые» взаимодействия [13]. Судя по кривым нановибрации, такое взаимодействие не оказывает существенного влияния на метаболизм бактерий. Существенное усиление нановибраций

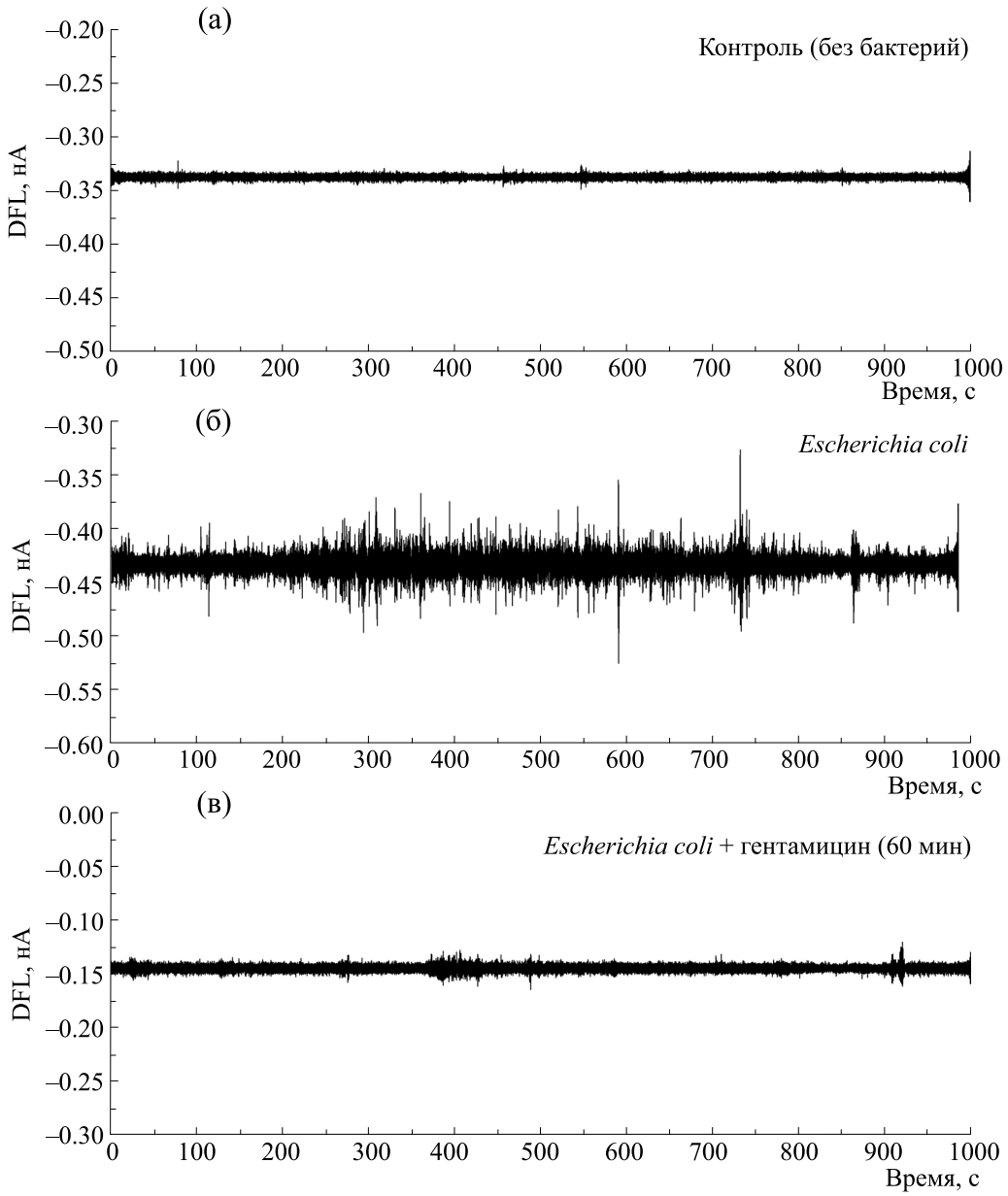


Рис. 2. Кривые нановибраций кантилевера: (а) – кантилевер без бактерий, функционализированный поли-L-лизином, (б) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизином *E. coli*, (в) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизином *E. coli* после обработки гентамицином (16 мг/мл).

кантилевера в случае использования поли-L-лизина говорило о том, что бактерии успешно адгезируются на поверхности кантилевера, а их метаболическая активность при этом не нарушается.

Исследование разных кантилеверов для решения задачи регистрации нановибраций показало, что наилучшие показатели с наименьшим уровнем шума дает использование кантилеверов A-MLCT со следующими характеристиками: f_0 – 22 кГц, k – 0.07 Н/м. Одной из причин хороших результатов, получаемых с использованием данного типа кантилевера, могли являться оптимальные физико-химические характеристики, поскольку у этого типа кантилеверов наибольшая, хотя все равно низкая ригидность, и наибольшая среди используемых кантилеверов резонансная частота. Однако, вероятнее всего, основная причина максимальных «метаболических» нановибраций с наименьшим уровнем шума заключалась в присутствии только одного кантилевера, тогда как на двух других протестированных чипах сформирована «гребенка»: из двух кантилеверов в случае D-DNP (f_0 – 12–24 кГц, k – 0.06 Н/м) и пяти кантилеверов – в случае C-MLCT (f_0 – 4–

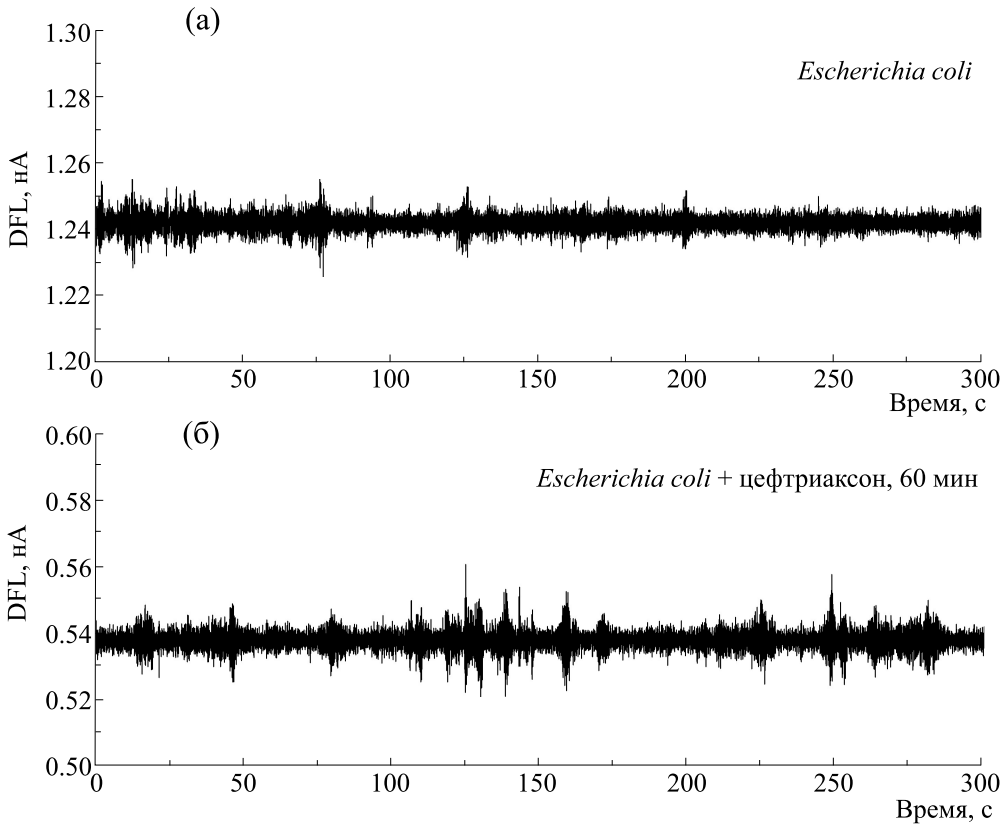


Рис. 3. Кривые нановибраций кантилевера: (а) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизином *E. coli*, (б) – кантилевер с фиксированными на нем поли-L-лизином *E. coli* после обработки цефтриаксоном (36 мг/мл).

10 кГц, k – 0.010 Н/м). В этом случае наличие дополнительных кантилеверов вызывало появление дополнительных резонансных пиков на АЧХ возбуждаемых колебаний тестируемого кантилевера, что приводило к увеличению уровня шума и маскировке полезного сигнала.

В результате фиксации *E. coli* на кантилевере через слабые взаимодействия наблюдается резкое

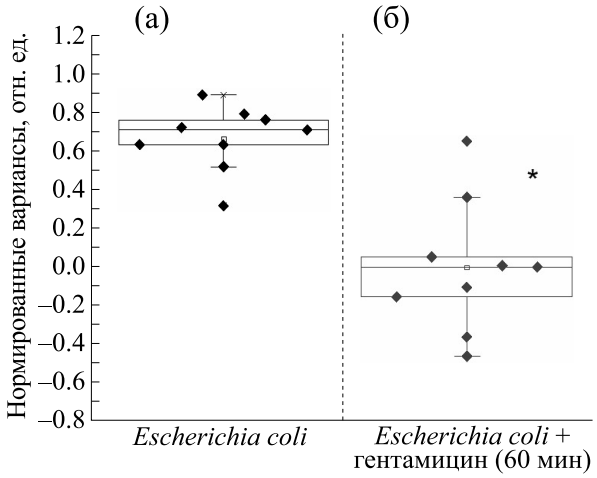


Рис. 4. Изменения вариансы DFL при нановибрациях кантилевера: (а) – статистический анализ по кантилеверам разных партий при фиксации на них 0.01%-м поли-L-лизином *E. coli*, (б) – после обработки *E. coli*, фиксированных на кантилевере гентамицином. * – Различия статистически значимы ($p < 0.05$).

усиление нановибраций, связанное с собственной метаболической активностью бактериальных клеток. Первоначально высказанная гипотеза о том, что усиление нановибраций кантилевера обусловлено двигательной активностью за счет жгутиков бактерий, оказалась несостоятельной, поскольку существенные изменения АЧХ зафиксированы и у безжгутиковых форм, например, у грамположительных бактерий – *Staphylococcus aureus*, дрожжеподобных грибов – *Candida albicans*, дрожжей – *Saccharomyces cerevisiae* [14]. В настоящее время доказанным считается факт, что усиление нановибраций кантилевера в присутствии всех видов микроорганизмов обусловлено именно метаболической активностью живых клеток. В случае гибели клеток и в отсутствие метаболических реакций нановибрации кантилевера возвращаются к исходному уровню. Именно это наблюдалось нами в случае воздействия на *E. coli* бактерицидных концентраций гентамицина сульфата, механизм действия которого обусловлен необратимым связыванием с 30S-субъединицей бактериальной рибосомы и блокадой синтеза бактериального белка. В то же время под воздействием цефтриаксона, механизм действия которого связан с нарушением синтеза пептидогликана клеточной стенки и аутолизом бактерий и для которого у данного штамма предварительно была определена резистентность, в ходе часовой инкубации не выявлено подавление жизнедеятельности бактерий.

Статистическая обработка вариансы DFL у кантилеверов разных партий (но всегда кантилеверов A-MLCT) показала, что часовая экспозиция в растворе гентамицина сульфата вызывает статистически значимое падение в сравнении с вариансами DFL кантилеверов, на которых фиксированы бактерии без воздействия. Таким образом, выбранный критерий – варианса DFL – является информативным критерием, позволяющим оценивать чувствительность бактерий к антибиотикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что использование нановибраций кантилевера для детекции резистентности/чувствительности бактерий к антибиотикам является высокоэффективным, поскольку позволяет дать ответ о наличие антибиотикорезистентности в течение часа, в отличие от имеющихся в настоящее время в распоряжении бактериологических лабораторий методов определения чувствительности бактерий к антибиотикам, которые предоставляют информацию через несколько суток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность проф. Sandor Kasas – автору первичной идеи использования кантилеверов для регистрации антибиотикорезистентности бактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10179).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. A. Lerminiaux and A. D. S. Cameron, Can. J. Microbiol. **65** (1), 34 (2019).
2. Р. В. Полибин, А. Я. Миндлина, А. А. Герасимов и др., Эпидемиология и вакцинопрофилактика **3** (94), 4 (2017).
3. Е. В. Наумкина, Е. В. Матущенко, О. А. Абросимова и др,, Клинич. лабораторная диагностика **63** (2), 113 (2018).
4. Ю. Б. Белан и М. Б. Старикович, Педиатрическая фармакология **4** (4), 42 (2007).
5. J. Piret and G. Boivin, Curr. Opin. Infect. Dis. **29** (6), 654 (2016).
6. Л. М. Иванова, Е. П. Баранцевич и Е. В. Шляхто, Проблемы мед. микологии **13** (1), 14 (2011).
7. M. R. Hassett, B. E. Riegel, P. S. Callaghan, et al., Biochemistry **56** (41), 5615 (2017).
8. P. Stupar, O. Opota, G. Longo, et al., Clin. Microbiol. Infection 23, 400 (2017).
9. A. Boisen, S. Dohn, S. S. Keller, et al., Rep. Prog. Phys. **74** (3), 1 (2011).
10. J. Tamayo, P. M. Kosaka, J. J. Ruz, et al., Chem. Soc. Rev. 3, 1 (2013).
11. S. Aghayee, C. Benadiba, J. Notz, et al., J. Mol. Recognit. JMR **26** (11), 590 (2013).
12. С. Н. Плескова, Р. Н. Крюков, С. З. Бобык и др., Биофизика **65** (1), 80 (2020).
13. S. N. Pleskova, E. R. Mikheeva, and E. E. Gornostaeva, Micron **105**, 82 (2018).
14. R. G. Willaert, P. V. Boer, A. Malovichko, et al., Sci. Advances **6** (26), 1 (2020).

Nanovibrations of Atomic Force Microscope Cantilevers as a System for Real Time Detection of Antibiotic Resistance in Bacteria

S.N. Pleskova*, **, O.I. Fomichev*, R.N. Kriukov*, and I.S. Sudakova**

**National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23/3, Nizhni Novgorod, 603950 Russia*

***Nizhny Novgorod State Technical University named after R.E. Alekseev, ul. Minina 24/1, Nizhni Novgorod, 603950 Russia*

Atomic force microscopy was used for detection of cantilever nanovibrations as a result of the metabolic activity of *Escherichia coli.* Poly-L-lysine has been shown to be effective as an adhesion solution in promoting bacterial cell adhesion process onto the cantilever and has no effect on the metabolic activity of these bacteria. Analysis of variance has been used to track the resonance of the cantilevers: the cantilever which was functionalized with poly-L-lysine (control) and the cantilever with bacteria attached (experiment). The amplitude measures were analyzed, and it was found that there was a statistically significant difference between the averages. It has been demonstrated that the methods used in clinical practice for detecting bacteria and measuring their response to antibiotics require a few days, whereas in contrast atomic force microscopy would permit one to assess the susceptibility of the microorganism for antibiotics within an hour..

Keywords: atomic force microscopy, antibiotic resistance, nanovibrations, cantilever, bacteria, antibiotics

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1123–1132

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.352.5

ГИПОТЕЗА КОНТАМИНАЦИИ МЕМБРАН НЕЙРОНОВ, ЭПИЛЕПСИЯ И КЕТОГЕННАЯ ДИЕТА

© 2021 г. Ю.Д. Нечипуренко*, Р.С. Гарсия Рейес, Х.Л. Эрнандес Касерес****

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32*
E-mail: nech99@mail.ru
***Кубинский Центр нейронаук, 11600, Плайя, Гавана, 25-я ул., 15202, Куба*
E-mail: jose.caceres@cneuro.edu.cu

Поступила в редакцию 01.07.2021 г.
После доработки 30.08.2021 г.
Принята к публикации 31.08.2021 г.

В свете новых данных рассматривается гипотеза Альтрупа о контаминации мембран нейронов при эпилепсии. Эта гипотеза связывает пароксизмальную деполяризацию, наблюдаемую при эпилептической активности, с пейсмекерным потенциалом одиночного нейрона. Физико-химические характеристики мембраны, текучесть и контаминации влияют на ее способность проводить импульс и перезаряжаться. Обсуждаются предложенные ранее способы лечения эпилепсии, основанные на кетогенной диете и их возможные объяснения в связи с гипотезой Альтрупа. Среди возможных механизмов действия кетогенной диеты подчеркивается антиэпилептическое действие кетоновых тел, роль повышенного синтеза глутатиона и эффект полиненасыщенных жирных кислот и холестерина, включенных в состав диеты. Эти три механизма приводят к регуляции текучести и других биофизических свойств липидного бислоя, а также к деконтаминации мембраны от амфифильных примесей, в соответствии с гипотезой Альтрупа.

Ключевые слова: эпилептическая активность, пароксизмальная деполяризация, пейсмейкерный потенциал, гипотеза Альтрупа, контаминация мембран, латеральное давление, кетогенная диета, глутатион, полиненасыщенные жирные кислоты.

DOI: 10.31857/S0006302921060077

Эпилепсией страдают около 50 млн человек во всем мире [1], описано более сорока клинических типов эпилепсии [2]. Несмотря на это разнообразие, общим электрофизиологическим следом для большинства типов эпилептической активности является пароксизмальная деполяризация (ПД). Во время эпилептической активности некоторые нейроны проявляют большую и длительную деполяризацию, это и есть пароксизмальная деполяризация мембранного потенциала (см. работу [3] и рис. 1).

Наши знания о нейрофизиологических основах эпилепсии далеки от полноты, и есть основания для надежды, что понимание биофизических основ ПД позволит прояснить патофизиологию эпилепсии и очертить рациональные способы ее лечения. В рамках доминирующей идеи о том, что эпилепсия является результатом дисбаланса между возбуждением и торможением в нервной ткани [4–6], авторы работы [7] предложили, что ПД и есть гигантский возбуждающий постсинаптический потенциал. В нейрофизиологии принято изучить любое явление в простейшем объекте, где это явление может проявляться. Это позволило Э. Канделю изучить основы механизмов памяти в нервной системе аплизии [8], а А. Ходжкину и Э. Хаксли – основы нервного импульса в гигантском аксоне кальмара [9].

Рядом исследователей изучалось возникновение и распространение эпилептической активности в буккальных ганглиях наземной улитки *Helix pomatia* [7, 10–12]. *Helix* имеет довольно простую нервную систему, что способствует проведению биофизических экспериментов [13, 14]. В частности, оба буккальных ганглия *Helix* имеют по четыре гигантских нейрона с каждой стороны, и из них только нейрон Б3 способен систематически развивать ПД в присутствии проконвульсивных средств, таких как пентилентетразол, этомидат, гептанол (а также при пониженной концентрации магния и т.п.).

Уже давно обсуждается сходство между поведением этой простой клеточной модели и разви-

Сокращения: ПД – пароксизмальная деполяризация, КД – кетогенная диета, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

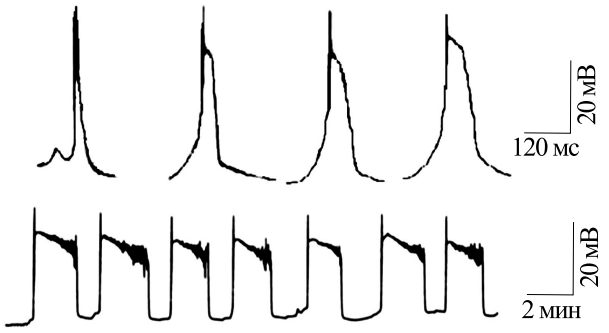


Рис. 1. Сравнение пароксизмальных деполяризаций, регистрируемых внутриклеточно в нейронах коры кошки (вверху) и в нейроне *Helix* Б3 (внизу). Верхняя часть рисунка – адаптировано из работы [3] (измерения проводились с местным применением пентилентетразола), нижняя часть рисунка – после применения 40 мМ пентилентетразола (неопубликованные данные авторов).

тием эпилепсии у человека, и сегодня нет сомнений в том, что с точки зрения фундаментальных механизмов у этих процессов существует ряд общих черт, несмотря на большое филогенетическое расстояние между человеком и улиткой [10].

Идея о том, что пейсмейкерные потенциалы являются основой эпилептиформной активности в нервной системе, обсуждалась в литературе [14]. Возможность генерации ПД в полностью изолированных нейронах, как у беспозвоночных [10], так и у позвоночных [11], и тот факт, что ПД сопровождаются увеличением импеданса нейронов [7, 12], не согласуется с идеей, что ПД имеют синаптическую природу. С другой стороны, в экспериментах на нейроне Б3 было обнаружено, что с увеличением дозы пентилентетразола (как и этомидата) пейсмейкерные потенциалы постепенно трансформируются, их продолжительность и амплитуда увеличиваются, и можно предположить, что они превращаются в ПД (см. рис. 2).

Механизмы генерации пейсмекерных потенциалов еще не выяснены полностью (см., например, работы [16, 17]). «Минимальная» математическая модель для пейсмейкерного потенциала нейронов виноградной улитки *Helix pomatia* была предложена в работах Н.И. Кононенко с соавторами [18–22]. Модель вводит в рассмотрение, во-первых, две стационарные, потенциал-независимые проводимости для натрия и калия, которые образуют линейный ток утечки, во-вторых, натриевую стационарную потенциал-зависимую S-образную проводимость, которой соответствует отрицательная область сопротивления мембранной вольт-амперной характеристики, в-третьих, проводимость, активируемую гиперполяризацией. С использованием модели Кононенко

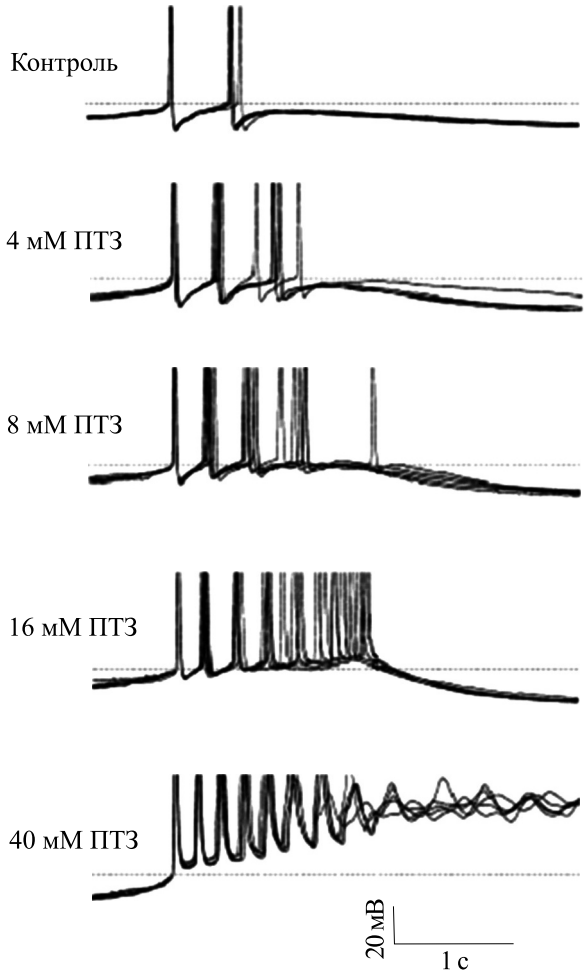


Рис. 2. Постепенное преобразование пейсмейкерного потенциала в ПД с увеличением концентрации пентилентетразола (ПТЗ). Изображение составлено на основе данных, опубликованных в работе [15].

было проведено математическое моделирование и определена область биофизических параметров, обеспечивающая переход от пейсмейкерного потенциала к ПД [23]. Было показано, что ПД-подобные потенциалы могут появляться как за счет изменения параметров модели, так и посредством добавления шума на вход модели (см. рис. 3). При уровне шума 0.2 усл. ед. пейсмекерные потенциалы удлиняются и проявляют стремление к непостоянности, при уровне 0.6 усл. ед. возникает гигантская продолжительная деполяризация, напоминающая ПД (рис. 3б,в) [23].

ГИПОТЕЗА КОНТАМИНАЦИИ МЕМБРАНЫ

У. Альтруп (Ulrich Altrup, 1943–2007), возглавлявший Исследовательский институт экспериментальной эпилепсии в Университете Мюнстера (Германия), изучал эпилептиформную актив-

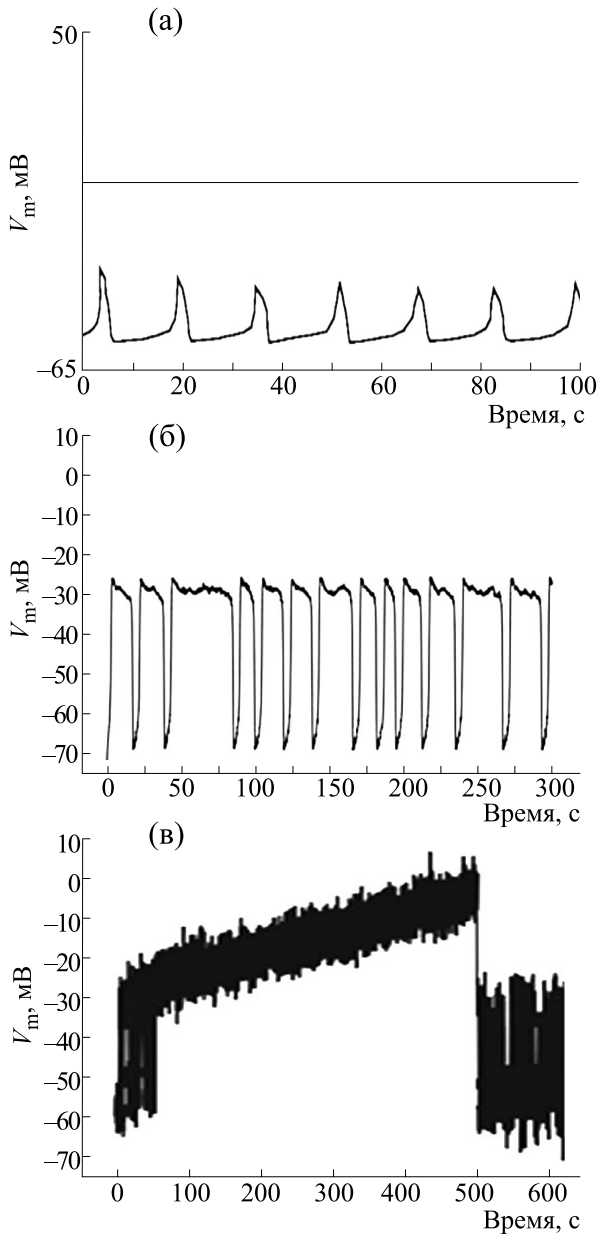


Рис. 3. Постепенное преобразование пейсмейкерного потенциала в ПД при добавлении шума. Расчеты проводили при помощи модели Кононенко [20]: (а) – спонтанные пейсмекерные потенциалы, полученные авторами работы [21]; (б) и (в) – результат добавления белого гауссового шума (0.2 и 0.6 усл. ед. соответственно).

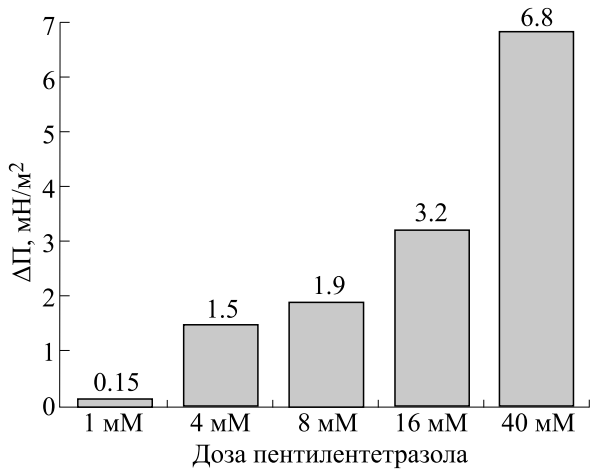


Рис. 4. Средние значения изменения латерального давления на весах Вильгельми при добавлении различных доз пентилентетразола. Диаграмма построена на основе данных, опубликованных в работе [15].

ность в буккальных ганглиях *Helix* почти 30 лет. В последние годы деятельности он выдвинул гипотезу мембранной контаминации. Альтруп полагал, что если вещества, резко различающиеся по механизму действия, такие как гептанол, пентилентетразол, этомидат (как и низкая концентрация магния), способны индуцировать ПД, то основной механизм эпилептогенеза должен быть неспецифическим.

К этому следует добавить, что разнообразные ионные механизмы, связанные с каналами утечки, калиевыми каналами, большим набором лиганд-зависимых каналов и др., подвержены влиянию в одном и том же диапазоне концентраций пентилентетразола (а также этомидата). Эти наблюдения указывают на существование неспецифического механизма эпилептогенеза. Альтруп с соавторами обнаружил при помощи весов Вильгельми, что эпилетогенные вещества пентилентетразол и этомидат вызывают в одном и том же диапазоне эпилептогенных концентраций постепенное повышение латерального давления липидных монослоев [7]. На рис. 4 приводятся результаты этих экспериментов при добавлении пентилентетразола.

Совокупность экспериментальных данных привела Альтрупа к гипотезе, что эпилептогенные амфифильные вещества проникают в липидный бислой мембраны нервной клетки и что эти включения увеличивают латеральное давление в бислое, вызывая ПД в тех нейронах, которые обладают способностью генерации пейсмейкерных потенциалов. Повышенное латеральное давление снижает текучесть мембраны, влияя на подвижность мембранных белков и вызывая переход от жидкого конденсированного состояния к твердому конденсированному состоянию.

Белково-липидные взаимодействия и возбудимость нейронов. Белково-липидные взаимодействия и их связь с возбудимостью обсуждались в течение нескольких десятилетий в биофизических исследованиях [24]. Так, авторы работы [25] обнаружили, что агенты, изменяющие химико-

физические свойства мембран (например, простые спирты и ацетон), способны изменять сродство Na,K-АТФазы к моновалентным катионам.

Наиболее известной моделью генерации и распространения нервного импульса является модель Ходжкина и Хаксли [9]. Ее биофизическая правдоподобность и способность объяснить многие свойства возбуждения нейронов привели к тому, что эта модель получила всеобщее признание в нейронауках и кардиологии. А. Ходжкин и Э. Хаксли обнаружили экспериментально, что электрическая емкость мембраны остается неизменной во время возбуждения. Поэтому роль липидов в этой модели игнорируется и любая модификация ионных каналов рассматривается как результат взаимодействий электростатической природы. В начале 1970-х годов И. Тасаки предложил теорию, которая не вписывается в модель Ходжкина и Хаксли: он предположил, что распространение нервного импульса сопровождается волной механического возбуждения вдоль аксона [26]. Эти идеи не нашли экспериментального подтверждения, в то время как регистрация воротных токов и токов через единичные ионные каналы наряду с другими наблюдениями свидетельствовали в пользу модели Ходжкина и Хаксли [27].

В последнее время появились доказательства того, что распространение потенциала действия сопровождается волной механической деформации клеточной мембраны, которая движется с постоянной скоростью [28]. Разные авторы стараются построить модель, способную описать все электрохимические, механические и термодинамические явления, связанные с генерацией и проведением нервного импульса. Гипотеза о механическом солитоне кажется нам самой привлекательной. Однако понадобится целый ряд экспериментальных доказательств, а также теоретических разработок, чтобы идея о нервном импульсе как о солитоне нашла подтверждение. В работах [28–31] было высказано предложение, что открытие ионных каналов, участвующих в генерации нервного возбуждения, требует механических изменений в двойном липидном слое. В пользу этого предположения приводится аргумент, что во время активации ионных каналов происходит деформация мембраны [28, 29]. С другой стороны, измерения энтальпии во время распространения потенциала действия не соответствуют предсказаниям Ходжкина и Хаксли, но поддерживают модель механического импульса [30, 31].

Авторы работы [31] утверждают, что потенциал действия, смоделированный Ходжкиным и Хаксли, отражает сумму всех потенциальных изменений по всей мембране, зарегистрированных на относительно большой площади, так что на самом деле это результат сочетания эффектов как уже открытых каналов, так и закрытых или инактивированных. Прямая механическая стимуляция аксона могла бы вызывать открытие натриевых каналов, в ходе которого генерируется энергия, необходимая для поддержания движения механического солитона [32].

Если вышеописанные изменения механических свойств двойного липидного бислоя, сопровождающие потенциал действия, окажутся тесно связаны с процессом нервной активности, то станет понятным, почему любое вещество, способное изменять физико-химические свойства двойного липидного слоя, может изменять и возбудимость нейронов. Такой подход мог бы дать правдоподобное объяснение эффекту ингаляционных анестезий, эффективность которых коррелирует с растворимостью применяемых веществ в липидах [33], а также известному антиэпилептическому эффекту ряда пищевых добавок, таких как омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты [34], витамин Д [35] и др. [36]. Можно также ожидать, что изменение механических свойств неспецифических мембранных эпилептогенных амфифильных веществ повлияет и на пейсмейкерные потенциалы, вызывая аномальные изменения, которые приводят к эпилептогенезу, в соответствии с гипотезой контаминации мембран [37].

Кетогенная диета и гипотеза контаминации мембран. Около 30% пациентов с эпилепсией резистентны к лекарственной терапии (это более чем 15 млн человек в мире). Одним из терапевтических вмешательств, способных улучшить состояние более половины пациентов с тяжелой эпилепсией, является кетогенная диета. Типичная кетогенная диета (КД) очень богата жирами и бедна углеводами (обычно пропорция жиров к нежирам равна четырем к одному) и применяется для лечения рефрактерной эпилепсии. Значение такой диеты в клиническом контексте было отмечено еще в 1920-х годах в связи с успешным ее применением для лечения эпилепсии.

Первая ссылка на то, что пост может оказывать антиэпилептическое действие, появилась в 1911 г. Парижские врачи Ж. Гуелпа и А. Мари использовали пост для лечения двадцати пациентов и сообщили об облегчении их симптомов [38]. В начале 1920-х годов Х. Конклин предположил, что эпилепсия проявляется в результате «интоксикации мозга веществами, поступающими из кишечника». Конклин использовал диету, состоящую только из воды, в течение 30 дней для лечения пациентов с рефрактерной эпилепсией и достиг успеха – улучшения состояния у более половины пациентов [39].

Представление о том, что кетоновые тела являются главным эффектором в противоэпилеп-

тическом механизме поста, привело в 1921 г. Р. Уайлдера к идее предложить диету с высоким содержанием жира и низким содержанием углеводов для лечения эпилепсии. Он получил обнадеживающие результаты и назвал такую диету кетогенной [40]. Полезные эффекты этой диеты подтвердились к 1930-м годам, но потом она перестала использоваться врачами, что было связано с появлением в 1938 г. фенитоина и позже – других антиэпилептиков. Однако за последние 30 лет эпилепсия, невосприимчивая к фармакотерапии, привлекла внимание научного сообщества, и кетогенная диета снова вызвала интерес специалистов. Единственным диетическим методом лечения эпилепсии, имеющим научное обоснование и разработанные принципы практического применения, является именно кетогенная диета, физиологической основой которой является создание в организме условий, сходных с теми, что наблюдаются при длительном посте. Среди вариантов КД встречаются классическая КД, диета, обогащенная триглицеридами средней длины, модифицированная диета Аткинса и диета с низким индексом гликемии [41–45].

Заметим, что повышенное содержание кетоновых тел в организме не обязательно связано с диабетическим кетоацидозом – несовместимым с жизнью состоянием. Концентрация кетоновых тел в крови повышается также в результате физиологического ответа на эпизоды кратковременного или умеренного голодания. Целью КД является достижение кетоза, избегая кетоацидоз. Так, в состоянии кетоза, индуцируемого КД, уровни глюкозы, инсулина и pH поддерживаются близкими к нормальным значениям, даже если концентрация кетоновых тел в крови почти на два порядка превышает нормальные значения, но все же остается в три раза ниже значений, характерных для диабетического кетоацидоза (при котором уровень глюкозы в крови увеличивается в три раза, а концентрация инсулина падает почти до нуля и pH опускается ниже 7.3, что несовместимо с жизнью [46]).

При применении КД у 50–60% пациентов, резистентных к нескольким противосудорожным лекарствам, уменьшается по крайней мере в два раза частота припадков и примерно 20% пациентов достигают полного подавления судорог. Кроме того, кетогенная диета способна улучшить самочувствие и когнитивные способности [47]. Доказательства эффективности КД ставят серьезные проблемы перед теоретиками-эпилептологами. Далее мы обсудим возможные механизмы КД, рассматривая их возможную связь с гипотезой Альтрупа о мембранной контаминации.

Метаболизм в условиях кетогенной диеты. При длительном голодании или при сахарном диабете, когда клетка не имеет доступа к глюкозе, организм начинает использовать жирные кислоты. Обычно это происходит посредством β-окисления, и в результате генерируется ацетил-КоА, который входит в цикл Кребса для генерации АТФ. Однако при длительном голодании не весь ацетил-КоА может метаболизироваться через цикл Кребса, и значительная часть ацетил-КоА преобразуется в кетоновые тела: ацетоацетат и β-гидроксибутират, а также ацетон (образующийся путем неферментативного декарбоксилирования ацетоацетата). При этом кетоновые тела могут обеспечить до двух третей энергетических потребностей мозга.

Кетогенная диета, влияя на общий энергетический обмен веществ, может создавать смещения в метаболизме, приводящие к снижению выработки лактата и альфакетоглутарата. В результате уменьшается концентрации глутамата и снижается риск эксайтотоксичности.

Лактат способен подавлять липолиз [48]. Увеличенный уровень липолиза в результате уменьшенного уровня лактата при КД вместе с поступлением с пищей специфических липидов и жирных кислот может оказывать определенные изменения в мембранах, способствуя механизмам борьбы против контаминации липидного бислоя. Важную роль при этом может играть ограниченная доступность глутамата. Снижение уровня глутамата приводит к увеличению абсорбции цистеина, и это вызывает повышение уровня глутатиона с соответствующим удалением ненужных амфифильных веществ, которые могут загрязнять мембрану нейронов. Таким образом, при повышенной защите от окислительного повреждения, обеспечиваемой глутатионом, клетки могут избегать эффекта контаминации мембран при эпилептогенезе [49].

Многие данные указывают на то, что КД проявляет свое противосудорожное действие посредством синергизма, включающего несколько механизмов. Таким образом, противоэпилептический эффект КД может найти объяснение вне традиционного подхода к действиям на синаптическом уровне, и многие из ее эффектов могут быть проанализированы с точки зрения гипотезы о мембранной контаминации. В контексте гипотезы Альтрупа мы сосредоточимся далее на следующих трех аспектах КД:

1) противосудорожный эффект кетоновых тел;

2) связь глутатиона с противоэпилептическими эффектами КД;

3) значение полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и холестерина в действии КД.

Противосудорожное действие кетоновых тел. Довольно давно была предложена гипотеза о том, что кетоновые тела могут действовать непосредственно как фармакологические агенты. Х. Кейт в 1933 г. сообщил, что приступы, вызванные туй-

оном у кроликов, были купированы предварительной обработкой ацетоацетатом [50]. Позже это было подтверждено на модели мышей, чувствительным к аудиогенным припадкам [51]. Также есть раннее сообщение о противосудорожном действии ацетона [52]. Авторы работы [53] сообщили о дозозависимом подавлении судорожных приступов внутрибрюшинным введением ацетона, в четырех отдельных моделях припадков и эпилепсии на животных. В поддержку идеи о том, что эффект ацетона является одним из основных механизмов действия КД, можно привести тот факт, что пациенты с эпилепсией, которые положительно реагировали на КД, демонстрировали высокие уровни ацетона в головном мозге (выше 1 мМ) [54]. Этот результат привел к тому, что авторы работы [53] выдвинули идею о том, что ацетон является причинным фактором противосудорожных эффектов КД.

Что касается возможных молекулярных мишеней для кетоновых тел, то было обнаружено, что VGLUT2 (переносчик глутамата в синаптические пузырьки) ингибируется ацетоацетатом [55] в концентрациях, которые ожидаются при КД. Этот эффект может противодействовать эксайтотоксичности, связанной с глутаматом. В то же время кетоновые тела, по-видимому, не изменяют синаптическую передачу на уровне гиппокампа, что находится в полном соответствии с вышесказанным и наблюдениями Альтрупа [7, 15]. Так, авторы работы [56], используя методы клеточной электрофизиологии, обнаружили, что миллимолярные концентрации бета-гидроксибутирата и ацетоацетата не влияют на: 1) возбуждающие постсинаптические потенциалы и популяционные разряды в пирамидных нейронах CA1 после стимуляции коллатералов Шаффера; 2) спонтанную эпилептиформную активность в модели приступа гиппокампально-энторинальной коры; 3) ионные токи, вызываемые глутаматом, каинатом и гамма-аминомасляной кислотой в нейронах гиппокампа.

В частности, был идентифицирован рецептор β-гидроксибутирата GPR109a (HCAR2), который активируется у мышей с эпилепсией mutUNG1 при КД, что предполагает избирательное влияние КД на механизмы рецепторов кетоновых тел [57, 58].

Другие исследования показывают, что кетоновые тела также могут действовать как нейропротекторные средства [59, 60]. Так, авторы работы [61] показали, что бета-гидроксибутират и ацетоацетат (в миллимолярных концентрациях) предотвращают гипервозбудимость, вызванную перекисью водорода, в острых неокортикальных срезах головного мозга и диссоциированных нейронах, и что кетоновые тела способны значительно снижать образование активных форм кислорода в изолированных митохондриях. Это указывает на эффект КД посредством активации антиоксидантных механизмов жирными кислотами и кетонами. Также было показано, что ацетон способен увеличивать текучесть липидной мембраны [62], действуя в противоположном направлении, чем про-судорожные вещества, и это объясняет его антиэпилептический эффект в контексте гипотезы Альтрупа. В целом следует подытожить, что среди множества возможных механизмов противосудорожного действия кетоновых тел, их влияние на вязкость мембраны и соответствующая стабилизация липидного бислоя может носить фундаментальное значение.

Глутатион и механизм действия кетогенной диеты. Снижение уровня глутамата при сниженном потреблении глюкозы приводит к увеличению абсорбции цистеина, и это вызывает повышение уровня глутатиона с соответствующим удалением ненужных амфифильных веществ, которые могут загрязнять мембрану нейронов. Аналогично, избыток глутамата в синапсах, высвобождающийся при судорогах, препятствует абсорбции цистеина, необходимого компонента глутатиона. Глутатион-трипептидный тиол обнаружен практически во всех клетках, он участвует в окислительно-восстановительных реакциях, и защищает клетку от активных форм кислорода [24–26]. Глутатион путем прямой конъюгации выводит токсины и многие чужеродные и токсические соединения. В частности, за счет устранения свободных радикалов глутатионом стабилизируется структура мембраны [33].

Роль глутатиона при эпилепсии хорошо известна. При помощи модели пилокарпиновых судорог на крысах обнаружено, что концентрации глутатиона при судорогах уменьшились на 54 и 58% в стриатуме и лобной коре соответственно [63]. В модельных экспериментах на животных судороги связаны с производством большого количества активных форм кислорода, которые приводят к окислительному повреждению белков и перекисному окислению липидов и могут влиять на активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Следовательно, уровни глутатиона в головном мозге снижаются. Так, в работе [64] было обнаружено значительное снижение примерно на 35% среднего отношения глутатион/вода даже в областях мозга, удаленных от эпилептогенного очага [65]. При этом ожидается, что глутатион способствует снижению уровня контаминации мембраны, приводящий к развитию эпилепсии [66].

Полиненасыщенные жирные кислоты и кетогенная диета. Кетогенная диета усиливает мобилизацию ПНЖК из жировой ткани в печень и мозг [57, 67]. Одна из разновидностей этой диеты – КД, обогащенная среднецепочечными триглице-

ридами, и является основным методом лечения не поддающейся лекарственному лечению эпилепсии. Было обнаружено, что на пентилентетразольной модели судорог в срезах гиппокампа крыс выявляется специфичная для точки ветвления активность, которая сравнима с антиэпилептическим эффектом вальпроевой кислоты. Это показывает, что жирные кислоты, присутствующие в КД, могут прямым образом оказывать противосудорожное действие [68].

Другим вероятным механизмом противоэпилептического эффекта кетогенной диеты может быть воздействие холестерина. В 1939 г. авторы работы [69] задавались вопросом, действует ли механизм кетогенной диеты через повышение уровня холестерина. Изучалась кокаин-индуцированная модель эпилепсии у крыс, было обнаружено, что внутрибрюшные инъекции холестерина приводят к увеличению порога судорог. Было показано, что кетогенная диета вызывает существенное и монотонное увеличение уровня холестерина на протяжении одного года ее применения [70].

В настоящее время известно, что холестерин регулирует текучесть мембран, и его противоэпилептический эффект может быть обусловлен этим. Холестерин, содержащийся в плазматических мембранах эукариот, модулирует текучесть мембран, делая мембрану менее жидкой при более высоких температурах (например, температуре тела 37°C) за счет ограничения подвижности фосфолипидов и более жидкой при более низких температурах за счет предотвращения плотной упаковки фосфолипидов [71].

Заметим, что гептанол вызывает уменьшение мембранной текучести холестериновых доменов в липидном бислое, и этим эффектом можно объяснить эпилептогенный аффект гептанола [72]. В этом плане также достойно внимания, что пропофол, который оказывает антиэпилептическое действие [73], способен увеличить текучесть мембран [74]. Таким образом, в отличие от других преобладающих теорий по эпилептогенезу, гипотеза контаминации мембраны может дать рациональное объяснение противоэпилептическому эффекту кетогенной диеты и другим экспериментально подтвержденным фактам [68].

ОБСУЖДЕНИЕ

Антиэпилептическое действие КД для многих специалистов является до сих пор загадкой. Клинические и экспериментальные свидетельства показывают, что кетогенная диета эффективна даже при самых тяжелых формах эпилепсии. Тем не менее общепринятые теории о механизмах эпилептогенеза не способны дать этому факту объяснение. Мы считаем, что гипотеза мембранной контаминации может объяснить этот механизм, в этом и состоит основной тезис нашей работы.

Причины контаминации мембран нервных клеток при эпилептогенезе могут быть самыми разными: некроз мозговой ткани (скажем, в результате травмы), выделение токсинов в случае эпилепсии, вызванной нейроинфекцией, или выделение анфифильных веществ при инфламации или эксайтотоксичности.

В связи с возможными биофизическими механизмами противосудорожного эффекта кетогенной диеты можно отметить три главных момента.

1. Роль кетоновых тел в стабилизации бислоя может быть связана с их влиянием на такие биофизические свойства бислоя, как текучесть, а также с их действием в качестве антиоксидантов.

2. Увеличение активности глутатиона способствует деконтаминации мембран и препятствует действию окислительных агентов.

3. ПНЖК, поступающие с КД, играют важную роль в стабилизации поврежденных мембран в эпилептической мозговой ткани.

Не исключается вклад других эффектов в действие КД: диета может менять сольватацию липидов, белков и углеводов, а также ряд межмолекулярных взаимодействий на уровне мембраны, которые могут быть нарушены при эпилепсии и восстановлены в результате применения КД.

Заметим, что возможна контаминация глиальных клеток при эпилептогенезе – в этих клетках не развиваются ПД, но контаминация их мембран может привести к последствиям, усугубляющим эпилептический процесс. В частности, к загрязнению мембран нейронов продуктами метаболизма или к синхронизации эпилептического очага [15].

В целом белково-липидные взаимодействия играют ключевую роль в переходе от пейсмекерного потенциала к ПД, где принимает участие целый набор белков-ионных каналов, ионных насосов, рецепторов и т. д. Так, по мнению Альтрупа: «эпилептическая активность может быть результатом контаминации мембран нейронов анфифильными молекулами...». Включение этих веществ вызывает рост латерального давления в мембране, что может приводить к увеличению электрического сопротивления мембаны, ингибированию потенциало-зависимых калиевых каналов, ингибированию разных типов лигандо-зависимых каналов; в конечном итоге все это приводит к преобразованию пейсмекерных потенциалов в ПД [7].

На рис. 5 представлена схема, объясняющая противосудорожный эффект КД в соответствии с гипотезой Альтрупа.

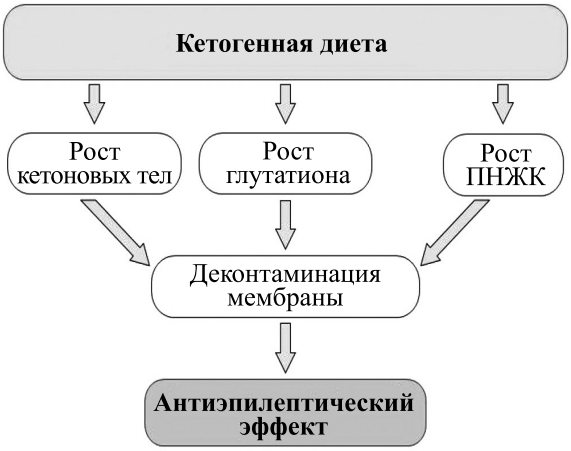


Рис. 5. Схематическое представление механизма действия кетогенной диеты в соответствии с гипотезой контаминации мембраны; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В совокупности наши собственные данные наряду с литературными представляют новые факты, которые поддерживают и уточняют гипотезу контаминации мембраны, предложенную У. Альтрупом. Кетогенная диета может благоприятно изменить свойства двойного липидного слоя нейрональной мембраны при помощи различных механизмов:

– Прямого действия ацетона и других кетоновых тел (как противоэпилептического средства).

– Усиления синтеза холестерина, стабилизирующего текучесть мембраны и обладающего противоэпилептическим действием.

– Снижения эксайтотоксичности, связанной с глутаматом.

– Снижения уровня лактата, необходимого для включения липолиза.

– Повышения уровня глутатиона, который уменьшает уровень активных форм кислорода и захватывает эпилептогенные амфифильные вещества.

– Стабилизирующего действия ПНЖК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить О. Остроумову, Ю. Ермакова, Д. Семёнова и Л. Яковенко за полезные обсуждения, И. Лавриненко – за техническую помощь. Мы также глубоко благодарны рецензенту за внимательное прочтение нашей работы, положительный отзыв и интересные вопросы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Кубинского научного фонда (FONCI) и Проекта нефармакологической антиэпилептической терапии, координируемого Кубинским Центром нейронаук, а также при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук России на 2013–2020 годы (темы № 01201363818 и № 01201363820).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. M. Fiest, K. M. Sauro, S. Wiebe, et al., Neurology **88**, 296, (2017).
2. J. H. Bautista and F. Luders, Epileptic Disord **2** (1), 65 (2000).
3. J. Walden, H. Straub, and E. J. Speckmann, Acta Neurol. Scand. (Suppl.) **140**, 41 (1992).
4. S. Engelborghs, R. D'Hooge, and P. P. De Deyn, Acta Neurol. Belg. **100**, 201 (2000).
5. H. F. Bradford, Prog. Neurobiol. **47**, 477, (1995).
6. A. Bragin, C. L Wilson, and J. Engel Jr, Epilepsia **41**, 144 (2000).
7. U. Altrup, M. Häder, J. L. Hernández Cáceres, et al., Brain Res. **1122**, 65 (2006).

8. E. Kandel, *Behavioral Biology of Aplysia* (New York, 1979).
9. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, J. Physiol. **117**, 500 (1952).
10. M. Wiemann, W. Wittkowski, U. Altrup, et al., Cell Tissue Res. **286**, 43 (1996).
11. E.-J. Speckmann and H. Caspers, Epilepsia **14**, 397 (1973).
12. M. Segal, J. Neurophysiol. **65**, 761 (1991)
13. Е. С. Никитин и П. М. Балабан, Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **61** (6), 750 (2011).
14. Т. П. Норекян, Е. С. Никитин, Н. И. Браваренко и др., Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **51**(6), 717 (2001).
15. U. Altrup, M. Hader, and U. Storz, Brain Res. **975,** 73 (2003).
16. R. H. Kramer and R. S. Zucker. J. Physiol. **362** (1), 107 (1985).
17. T. Budde, L. Caputi, T. Kanyshkova, et al., J. Neurosci. **25**, 9871 (2005).
18. N. I. Kononenko, Comp. Biochem. Physiol. **107A**, 323 (1994).
19. N. I. Kononenko, in: *Proc. IMACS Symp. on Mathematical Modelling* (Vienna, 1994), pp. 315–318.
20. 20. A. O. Komendantov and N. I. Kononenko, Systems Analysis Modelling Simulation **18–19**, 725 (1995).
21. N. M. Berezetskaya, V. N. Kharkyanen, and N. I. Kononenko, J. Theor. Biol. **183** (2), 207 (1996).
22. N. I. Kononenko. Comp. Biochem. Physiol. **106A**, 135 (1993).
23. R. C. García Reyes, *B. Sc. Thesis* (Faculty of Mathematics, Havana University, 2020).
24. С. В. Стовбун и Л. В. Яковенко, Вестн. МГУ. Физика **6**, 101 (2014).
25. М. Н. Резаева, М. Хеншель, Х. Л. Эрнандес и др., Биофизика **25** (1), 41 (1980).
26. И. Тасаки, *Нервное возбуждение. Макромолекулярный подход* (М., Мир, 1971).
27. W. A. Catterall, A. L.Goldin, and S.G. Waxman, Pharmacol. Rev. **57**, 397 (2005).
28. I. Tasaki and K. Iwasa, Japan. J. Physiol. **32** (1), 69 (1982).
29. В. Г. Артюхов и М. А. Наквасина, *Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: Учеб. пособие* (Изд-во ВГУ, Воронеж, 2000).
30. J. R. Godfrey, M. P. Diaz, M. Pincus, et al., Psychoneuroendocrinology **91**, 169 (2018).
31. B. C. Abbott, A. V. Hill, and J. V. Howarth, Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B – Biological Sciences **148** (931), 149 (1958).
32. J. F. Howe, J. D. Loeser, and W. H. Calvin, Pain **3** (1), 25 (1977).
33. N. P. Franks and W. R. Lieb, Nature **333**, 662 (1988).
34. E. K. Lund, L. J. Harvey, S. Ladha, et al., Ann. Nutr. Metab. **43**, 290 (1999).
35. A. Hollo, Z. Clemens, A. Kamondi, et al., Epilepsy Behav. **24**, 131 (2012).
36. K. Ji-Eun and C. Kyung-Ok, Nutrients **11**, 1309 (2019).
37. A. Sukhotin, N. Fokina, and T. Ruokolainen, J. Exp. Biol. **220**, 1423 (2017).
38. G. Guelpa and A. Marie, Rev. Ther. Medico-Chirurgicale **78**, 8 (1911).
39. J. W. Wheless, Epilepsia **49** (8), 3 (2008).
40. R. M. Wilder, Mayo Clinic Proc. **2**, 307 (1921).
41. Y. Zhang, J. Xu, K. Zhang, et al., Curr. Neuropharmacol. **16**, 66 (2018).
42. D. Boison, Curr. Opin. Neurol. **30**, 187 (2017).
43. A. L. Hartman, X. Zheng, E. Bergbower, et al., Epilepsia **51**, 1395 (2010).
44. D. Y. Kim and J. M. Rho, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care **11**, 113 (2008).
45. A. L. Hartman, M. Gasior, E. P. Vining et al., Pediatr. Neurol, **36**, 281 (2007)
46. A. Paoli, G. Bosco, E. M. Camporesi, and D. Mangar, Front. Psychol. **6**, 27 (2015).
47. Е. А. Куринная и М. А. Барабанова, Журн. неврологии и психиатрии **10**, 67 (2005).
48. S. Sun, H. Li, J. Chen, et al., Physiology **32**, 453 (2017).
49. C. F. Pereira and C. R. de Oliveira, Neurosci. Res. **37**, 227 (2000).
50. H. M. Keith, Arch. Neurol. Psych. **29**, 148 (1933).
51. K. J. Bough and J. M. Rho, Epilepsia **48**, 43 (2007).
52. H. M. Keith, Am. J. Dis. Children **41** (3) 532 (1931).
53. S. S. Likhodii, I. Serbanescu, M. A. Cortez, et al., Ann. Neurol. **54** (2), 219 (2003).
54. K. J. Seymour, S. Bluml, J. Sutherling, et al., Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine **8** (1), 33 (1999).
55. N. Juge, J. A. Gray, H. Omote, et al., Neuron **68** (1), 99 (2010).
56. L. L. Thio, M. Wong, and K. A. Yamada, Neurology **54** (2), 325 (2000).
57. M. M. Hasan-Olive, K. H. Lauritzen, M. Ali, et al., Neurochem. Res. **44** (1), 22 (2019).
58. M. A. Rogawski, W. Löscher, and J. M. Rho, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **6** (5), a022780 (2016).
59. R. L. Veech, B. Chance, Y. Kashiwaya, et al., IUBMB Life **51** (4), 241 (2001).
60. R. L. Veech, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **70** (3), 309 (2004).
61. A. Mosek, H. Natour, M. Y. Neufeld, et al., Seizure **18** (1), 30 (2009).
62. G. Dyrda, E. Boniewska-Bernacka, D. Man, et al. Mol. Biol. Reports **46** (3), 3225 (2019).
63. H. V. Júnior, M. M. D. F. Fonteles, and R. M. de Freitas, Oxidative Med. Cell. Longevity **2** (3), 130 (2009).

64. S. G. Mueller, A. H. Trabesinger, P. Boesiger, et al., Neurology **57** (8), 1422 (2001).
65. J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, et al., Eur. J. Biochem. **267** (16), 4904 (2000).
66. C. A. Shaw, in *Glutathione in the nervous system*, Ed. by C. A. Shaw (Taylor & Francis, Lond., 1998).
67. T. Harayama and T. Shimizu, J. Lipid Res. **61** (8), 1150 (2020.)
68. P. Chang, K. Augustin, K. Boddum, et al., Brain **139** (2), 431, (2016).
69. R. B. Aird and C. Gurchot, Arch. Neurol. Psychiatry **42** (3), 491 (1939).
70. A. Mosek, H. Natour, M. Y. Neufeld, et al., PLoS One **5** (6), e11162-1 (2010).
71. M. H. Martinez-Seara, T. Rog, M. Karttunen, et al., Epilepsia **45** (Suppl. 7), 199 (2004).
72. E. L. Bastiaanse, H. J. Jongsma, A. van der Laarse, et al., J. Membrane Biol. **136** (2), 135 (1993)
73. M. T. Baker, Anesthesia & Analgesia **112** (2), 340 (2011).
74. H. Tsuchiya, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **28** (4), 292 (2001).

Hypothesis on Pollution of Neuronal Membranes, Epilepsy and Ketogenic Diet

Yu.D. Nechipurenko*, R.C. Garcia Reyes, and J.L. Hernandez Caceres****

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

***Cuban Neuroscience Center, 15202 Avenida 25, Playa, La Habana, 11600 Cuba*

In the light of new data, Altrup's hypothesis on the contamination of neuronal membranes in epilepsy is deal with. This hypothesis links the paroxysmal depolarization observed during epileptic activity with the pacemaker potential of a single neuron. The physicochemical characteristics of the membrane, fluidity and contamination affect its ability to conduct an impulseand recharge. Previously proposed methods of epilepsy treatment based on ketogenic diet and their possible explanations are discussed in connection with the Altrup's hypothesis. Among the possible action mechanisms of the ketogenic diet, the antiepileptic effect of ketone bodies,the role of increased glutathione synthesis and the effect of dietary polyunsaturated fatty acids and cholesterol are emphasized. These three mechanisms lead to the regulation of the fluidity and other biophysical properties of the lipid bilayer, as well as to the de-contamination of the membrane from amphiphilic impurities, in accordance with Altrup's hypothesis.

Keywords: epileptic activity, paroxysmal depolarization shifts, pacemaker potential, hypothesis proposed by Altrup, membrane pollution, lateral pressure, ketogenic diet, glutathione, polyunsaturated fatty acids

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1133–1136

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦЕЗИЯ НА ИНГИБИТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПУРИНОВ В МИОНЕВРАЛЬНОМ СИНАПСЕ

© 2021 г. А.Е. Хайруллин*, В.В. Валиуллин, А.Ю. Теплов, А.Р. Шайхутдинова, Н.М. Каштанова, С.Н. Гришин

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

**E-mail: khajrulli@yandex.ru*

Поступила в редакцию 16.06.2021 г.
После доработки 25.06.2021 г.
Принята к публикации 01.07.2021 г.

Для выявления участия K^+-каналов в механизме ингибиторного пресинаптического действия пуриновых соединений в нервно-мышечном синапсе холоднокровных животных изучали эффекты АТФ и аденозина на параметры токов концевой пластинки нервно-мышечного синапса лягушек *Rana ridibunda*, в том числе и на фоне модулирующих синаптическую передачу ионов цезия. Наблюдалось различие между эффектами ионов цезия на амплитуду токов концевой пластинки при его получасовом и часовом сроке действия, что отмечалось нами ранее и в присутствии ионов бария, являющегося блокатором некоторых подтипов калиевых каналов. В случае часового воздействия цезия ингибиторный эффект аденозина на амплитуду токов концевой пластинки оставался стабильным, в то время как угнетающее действие на амплитуду постсинаптических ответов АТФ при этом уменьшалось в ~2.5 раза. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что пресинаптический угнетающий эффект АТФ на секрецию трансмиттера из нервных окончаний реализуется через Cs+-чувствительные калиевые каналы нервной терминали.

Ключевые слова: мионевральный синапс, ионы цезия, ингибиторный эффект пуринов, блокаторы калиевых каналов, АТФ.

DOI: 10.31857/S0006302921060089

Широко известно собственное модуляционное действие по принципу отрицательной обратной связи котрансмиттера АТФ на квантовый состав медиатора в синапсах фазных мышц амфибий [1–3]. Выделяясь из синаптических везикул нервного окончания мотонейрона совместно с основным медиатором ацетилхолином, АТФ угнетает квантовую секрецию медиатора из пресинаптических окончаний мотонейронов, действуя на Р2-рецепторы, в то время как конечный продукт его распада – аденозин – реализует свое действие через аденозиновые рецепторы [4]. Известно, что пурины – это ингибиторы синаптической передачи [5], а такое действие можно оказывать, либо блокируя кальциевые, либо активируя калиевые ионные каналы [6].

Многочисленными исследованиями показано, что калиевые каналы обнаруживают наибольшее разнообразие подтипов по сравнению с другими ионными каналами [7–9]; так, различают кальций-зависимые калиевые каналы, калиевые каналы внутреннего выпрямления, двупоровые калиевые каналы и потенциал-зависимые калиевые каналы. В реализации пресинаптического действия пуринов отмечено участие каналов задержанного выпрямления и А-типа калиевых каналов – представителей потенциалозависимых калиевых каналов [8, 10].

Ранее нами было показано, что 4-аминопиридин, блокатор калиевых каналов А-типа, существенно снижает ингибиторный эффект АТФ на секрецию медиатора [10]. Это может означать, что калиевые каналы А-типа участвуют в ингибиторном эффекте АТФ на экзоцитоз медиатора в синаптическую щель. Однако, несмотря на то что 4-аминопиридин считается специфическим блокатором А-типа калиевых каналов [11], во многих случаях обнаруживается его блокирующая способность и на калиевые каналы задержанного выпрямления, что объясняется близкими структурными, кинетическими и фармакологическими свойствами этих подтипов ионных каналов [8].

Для выявления конкретного подтипа калиевого канала, предположительно участвующего в пресинаптическом ингибиторном действии АТФ, мы провели эксперименты на нервно-мы-

Сокращение: ТКП – токи концевой пластинки.

шечном препарате озерной лягушки в цезиевой среде, учитывая, что ионы цезия блокируют каналы задержанного выпрямления, но не калиевые каналы А-типа [12].

МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на изолированном нервно-мышечном препарате «седалищный нерв – портняжная мышца» лягушек *Rana ridibunda* [6]. В течение эксперимента нервно-мышечный препарат непрерывно перфузировали раствором Рингера для холоднокровных животных следующего состава (в мМ/л): NaCl – 115.0, KCl – 2.5, $CaCl_2$ – 1.8, $NaHCO_3$ – 11.0, pH раствора поддерживали на уровне 7.3.

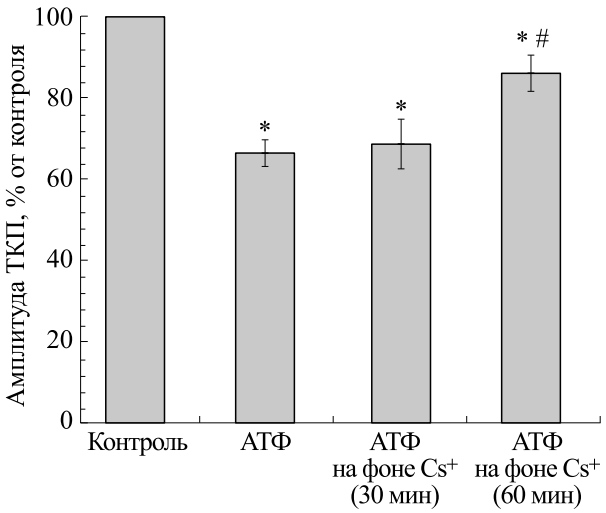
Для непрямого раздражения препарата нерв располагали на серебряных электродах в герметичной увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которую помещали мышцу. Для регистрации токов концевой пластинки (ТКП) нерв раздражали прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц [10, 13].

Вызванную квантовую секрецию оценивали по параметрам вызванных токов концевой пластинки [6]. Для отведения ТКП потенциальный и токовый микроэлектроды фокусировали и вводили в область концевой пластинки мышечного волокна. Накопление и усреднение треков ТКП производили с помощью персонального компьютера с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров ТКП проводили при помощи оригинального программного обеспечения [10]. Все вещества вводили через систему перфузии со скоростью 2 мл/мин. При оценке аддитивного действия АТФ и аденозин подавали через 30 и 60 мин после введения ионов цезия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При фиксации потенциала на уровне –40 мВ средняя амплитуда многоквантовых токов концевой пластинки составила 138 ± 25 нА ($n = 25$). Через 15 мин добавления в инкубационную среду аденозина в концентрации 100 мкМ наблюдали снижение амплитуды ТКП до 70.5 ± 2.9% ($n = 11$, $p < 0.05$) от исходных значений. Эффект аденозина на амплитуду токов был обратим, и после отмывания раствором Рингера амплитуда сигнала восстанавливалась до исходных величин ($n = 25$; $p > 0.05$).

Как показано на рисунке, через 15 мин добавления в инкубационную среду АТФ в концентрации 100 мкМ наблюдалось снижение амплитуды ТКП до двух третей от контрольного значения. Таким образом, снижение амплитуды ТКП при действии АТФ и аденозина при одной и той же



Эффекты АТФ в концентрации 100 мкМ на амплитуду ТКП в контроле и на фоне получасового и часового действия ионов цезия; * – $p < 0.05$ от контроля; # – $p < 0.05$ от базового действия АТФ.

концентрации было аналогичным. При этом, как и при действии аденозина, в случае добавления АТФ падение амплитуды ТКП было обратимым, что было обнаружено при отмывке образцов физиологическим раствором Рингера.

Цезий в концентрации 2 мМ к 30-й минуте своего действия вызывал повышение амплитуды ТКП на 44.3 ± 9.2% ($n = 8$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем, и этот эффект затем сменялся почти полным восстановлением исходной амплитуды постсинаптических ответов. Так, к 60-й минуте действия цезия амплитуда ТКП составила 110.1 ± 8.3% ($n = 8$, $p > 0.05$) от контроля.

На 30-й минуте после внесения цезия эффекты пуринов не были модифицированы. Так, аденозин в этих условиях снижал амплитуду ТКП до 72.0 ± 3.6% ($n = 7$, $p < 0.05$) и, как это показано на рисунке, АТФ полностью воспроизводил свой базовый эффект по снижению амплитуды ТКП.

Через час после действия ионов цезия добавление 100 мкМ АТФ приводило лишь к небольшому угнетению амплитуды ТКП, почти в 2.5 раза меньшему по отношению к базовому эффекту этого пурина. В отличие от АТФ, ингибирующий синаптическую секрецию эффект аденозина и после часового выдерживания препарата в Cs^+ сохранялся в полной мере: 69.8 ± 5.1% ($n = 8$, $p < 0.05$) от контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании мы оценивали модулирующее квантовый выброс медиатора действие АТФ и аденозина на фоне ионов цезия, блокатора калиевых ионных каналов [12]. Из-

вестно, что помимо достаточно сложных органических соединений, таких как иберiотоксин, харибдотоксин и апамин, некоторые подтипы калиевых каналов блокируются одно- и двухвалентными катионами – Cs^+ и Ba^{2+} [8, 12]. Конечно, эти катионы не такие высокоспецифичные блокаторы калиевых каналов, как упомянутые ранее яды скорпионов и пчел, но, тем не менее, их использование вносит свой вклад в исследование разнообразных подтипов калиевых ионных каналов [8, 12], а возможные механизмы их участия в ряде дисфункций мионеврального перехода не изучены.

При исследовании действия Cs^+ на амплитуду ТКП на различных сроках инкубации обнаружено, что к 30-й минуте он вызывал повышение амплитуды ТКП почти в полтора раза по сравнению с контролем, а к 60-й минуте амплитуда ТКП восстанавливалась до исходной. Подобное различие эффектов кратковременного и долговременного присутствия Cs^+ может также получить объяснение медленно развивающимся внутриклеточным действием этих ионов. Аналогичный двухфазный характер имеет и эффект ионов бария, блокатора некоторых подтипов калиевых каналов [7]. Так, в присутствии 2.5 мМ Ba^{2+} мы наблюдали сначала увеличение, а потом снижение амплитуды ТКП [10]. Для функционирования K^+-каналов имеет значение и время взаимодействия с агентами.

Ранее были опубликованы данные о частичном устранении 4-аминопиридином (блокатором калиевых каналов А-типа и задержанного выпрямления) пресинаптического ингибиторного действия АТФ [10]. Подобное наблюдалось и в обнаруженном нами эффекте АТФ на фоне ионов цезия, которые из двух упомянутых подтипов каналов блокируют калиевые каналы задержанного выпрямления. Все это в совокупности может означать, что калиевые каналы задержанного выпрямления участвуют в реализации эффектов АТФ. При этом ранее всегда отмечалось [14, 15], что 4-аминопиридин, помимо прочих эффектов, резко усиливает приток ионов Ca^{2+} в двигательное нервное окончание, и частичная отмена ингибиторного действия АТФ на фоне этого агента могла быть связанна с известным ослаблением ингибиторного эффекта пурина на фоне повышенной концентрации кальция [10, 14]. Полученные нами данные свидетельствуют, что ингибиторный эффект АТФ на амплитуду ТКП опосредован, в том числе, активацией калиевых каналов задержанного выпрямления.

И, наоборот, отсутствие изменения в ингибиторном действии аденозина в цезиевой среде говорит о том, что уже известное почти полное устранение ингибиторного эффекта этого пурина под действием 4-аминопиридина [10] связано именно с блокадой А-типа калиевых каналов.

Исходя из полученных данных, мы полагаем, что пресинаптический угнетающий эффект АТФ на секрецию трансмиттера из нервных окончаний реализуется, в том числе, через Cs^+-чувствительные калиевые каналы нервной терминали.

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. S. N. Grishin and A. U. Ziganshin, Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology **9** (1), 13 (2015).
2. R. A. Cunha and J. A. Ribeiro, Life Sci. **68** (2), 119 (2000).
3. K. J. Todd and R. Robitaille, Pflugers Arch. **452** (5), 608 (2006).
4. G. Burnstock, T. R. Arnett, and I. R. Orriss, Purinergic Signal. **9** (4), 541 (2013).
5. A. U. Ziganshin, C. H. V. Hoyle, A. E. Khairullin, and S. N. Grishin, Int. J. Mol. Sci. **21** (17), 6423 (2020).
6. С. Н. Гришин и А. У. Зиганшин, Биол. мембраны **30** (4), 243 (2013).
7. N. A. Castle, D. G. Haylett, and D.H. Jenkinson, Trends Neurosci. **12** (2), 59 (1989).
8. A. Meir, S. Ginsburg, A. Butkevitch, et al., Physiol. Rev. **79** (3), 1019 (1999).
9. J. G. Nicholls, A. R. Martin, B. G. Wallace, and P. A. Fuchs, Sinauer Associates, Inc. 672 (2001).
10. S. Grishin, A. Shakirzyanova, A. Giniatullin, et al., Eur. J. Neurosci. **21**, 1271 (2005).
11. G. Russo, S. Masetto, and I. Prigioni, Neuroreport **6** (3), 425 (1995).
12. S. Zhang, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **290** (3), 1038 (2006).
13. E. V. Ponomareva, E. V. Kachaeva, E. G. Altaeva, et al., Biophysics **53** (6), 615 (2008).
14. S. N. Grishin, Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology 10 (2), 99 (2016).
15. B. Katz and R. Miledi, Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol Sci. **205** (1160), 369 (1979).

The Influence of Cesium Ions on the Inhibitory Effect of Purines in Neuromuscular Synapse

A.E. Khairullin, V.V. Valiullin, A.Yu. Teplov, A.R. Shaihutdinova, N.M. Kashtanova, and S.N. Grishin

Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

To reveal the participation of K^+-channels in the mechanism of inhibitory presynaptic action of purine compounds in the neuromuscular synapse of cold-blooded animals, we studied the effects of ATP and adenosine on the parameters of the currents of the end plate of the neuromuscular synapse in frogs Rana ridibunda, including against the background of modulating synaptic transmission of cesium ions. A difference was observed between the effects of cesium ions on the amplitude of the end-plate currents during its half-hour and hourly duration of action, which we noted earlier in the presence of barium ions, which is a blocker of some subtypes of potassium channels. In the case of an hourly exposure to cesium, the inhibitory effect of adenosine on the amplitude of end-plate currents remained stable, while the inhibitory effect on the amplitude of postsynaptic ATP responses decreased by ~2.5 times. The data obtained may indicate that the presynaptic inhibitory effect of ATP on the secretion of the transmitter from the nerve endings is realized through the Cs^+-sensitive potassium channels of the nerve terminal.

Keywords: myoneural synapse, cesium ions, inhibitory effect of purines, potassium channel blockers, ATP

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1137–1143

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 547.42: 612.111

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ НЕКОТОРЫХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ ПРИ ГИПООСМИИ И ВОЗДЕЙСТВИИ НЕИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ ТРИТОНА X-100 И ТВИНА-20

© 2021 г. Ю.А. Силкин, Е.Н. Силкина, М.Ю. Силкин

Карадагская научная станция им. Т. И. Вяземского – природный заповедник РАН, 298188, Крым, Феодосия, п/о Курортное, ул. Науки, 24

E-mail: ysilkin@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.
После доработки 24.02.2021 г.
Принята к публикации 20.09.2021 г.

У четырех видов черноморских рыб – ставриды (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev), ласкиря (*Diplodus annularis* L.), скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и морской лисицы (*Raja clavata* L.) – исследованы осмотическая резистентность эритроцитов и влияние на гемолитическую активность красных клеток крови при гипоосмии неионных детергентов тритона X-100 и твина-20. Показано, что в физиологических растворах при гипоосмии эритроциты морской лисицы и скорпены проявляли высокую резистентность к действию гипотонической среды. Определение концентрации физиологического раствора, в котором за время инкубации гемолизировалось 50% эритроцитов рыб ($C_{50\%}$) позволило ранжировать эритроциты рыб по степени осмотической устойчивости в следующем порядке: скорпена > морская лисица > ласкирь > ставрида. Эритроциты исследованных костистых рыб демонстрировали по $C_{50\%}$ четкую зависимость от подвижности, которая возрастала в ряду рыб с уменьшением их двигательной активности. Тритон X-100 не вызывал повышение резистентности или даже слабо стимулировал повышение гемолитической активности эритроцитов ласкиря и морской лисицы. В эритроцитах ставриды в присутствии тритона X-100 резистентность клеток возрастала в 4.7 раза в инкубационной среде с 50%-м разведением. Протекторные свойства тритона X-100 отмечены при инкубации эритроцитов скорпены в средах с 70%-м разведением. Твин-20 также увеличивал резистентность эритроцитов рыб к гемолизу. Результаты работы показали, что твин-20 и в некоторых случаях тритон X-100 могут быть использованы для поддержания стабильности суспензий эритроцитов рыб при проведении экспериментальных исследований.

Ключевые слова: резистентность, эритроциты, плазматическая мембрана, гипоосмия, детергенты, рыбы.

DOI: 10.31857/S0006302921060090

Одной из важнейших характеристик эритроцитов, которая обеспечивает их устойчивость к деформационным нагрузкам при движении в кровотоке и другим стрессовым воздействиям, является резистентность их плазматической мембраны. Резистентность мембраны – это интегральная характеристика, которая позволяет оценить способность эритроцита противостоять стрессовым воздействиям, возникающим в плазме крови в ответ на воздействия факторов среды. Эритроциты млекопитающих функционируют в кровяном русле с достаточно постоянными параметрами, такими как температура, уровень гликемии, ионов, pH и др. Эритроциты низших позвоночных и, в частности, рыб, функционируют в менее упорядоченных условиях, поэтому имеют большую автономность и должны быть наделены особой резистентностью к стрессовым флуктуациям. Действительно, рыбы функционируют в стрессовых условиях, связанных с гипоксией, голоданием, перепадами температуры, интоксикациями, болезнями и так далее. Все это отражается на морфофункциональных свойствах плазматической мембраны эритроцитов, очень важной органелле этих клеток, без нормального функционирования которой невозможна полноценная газотранспортная функция. Одним из экспериментальных приемов, позволяющим изучать растяжение плазматической мембраны эритроцитов, является помещение их в гипоосмотические среды. Резистентность к подобному воздействию позволяет выяснить такую важную характеристику, как наличие или отсутствие мембранного «резерва», или складчатости мембраны. Дело в том, что плазматическая мембрана эритроцитов крайне слабо приспособлена к растяжению на разрыв

[1]. Ее способность противостоять гипоосмотическому набуханию обусловлена прежде всего наличию складок в ее структуре. Известно, что у низших позвоночных эритроциты обладают бóльшей складчатостью по сравнению с эритроцитами млекопитающих. По этой причине эритроциты низших животных обладают меньшей осмотической хрупкостью в гипоосмотических средах [2]. Осмотическая хрупкость эритроцитов определяется не только свойствами мембраны эритроцитов, но также модифицирующим влиянием некоторых веществ, способных встраиваться в мембранный бислой и изменять соотношение площади поверхности клетки к ее объему. К таким веществам относятся детергенты и мембранотропные вещества [3].

В настоящем исследовании проводили сравнение резистентности эритроцитов рыб разной экологии в различных гипотоничных средах и влияние слабых неионных детергентов Тритон X-100 и Твин-20 на устойчивость эритроцитов рыб в этих средах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили эритроциты хрящевой рыбы – ската, морской лисицы *(Raja clvata* L.*)* и костистых рыб – ставриды *(Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev*)*, ласкиря *(Diplodus annularis* L.*)*, скорпены *(Scorpaena porcus* L.*)*.

Костистые рыбы, осмотическая резистентность эритроцитов которых исследована в настоящей работе, различались по уровню естественной подвижности. Ставрида – быстроплавающий вид, осуществляющий значительные миграции. Ласкирь – оседлый, прибрежный вид, характеризуется умеренной подвижностью с хорошими маневренными свойствами. Скорпена – оседлый вид, донная, малоподвижная, рыба – хищник-засадчик. Исследуемый скат – морская лисица – холодолюбивый вид, не отличается значительной активностью движения, однако для него характерны довольно длительные миграции с небольшой скоростью [4].

Кровь получали пункцией хвостовой артерии стеклянной пипеткой у костистых рыб и пункцией желудочка сердца шприцем – у хрящевых. У ската на опыт хватало крови от одной особи, а у костистых рыб – от пяти-семи особей. Полученную кровь помещали (в соотношении 1:20) в соответствующий физиологический раствор следующего состава: для костистых рыб – 0.18 M NaCl + 0.01 M трис-HCl, pH 7.4; для хрящевых рыб – 0.22 M NaCl + 0.3 M мочевины + 0.05 M трис-HCl, pH 7.4. Для предотвращения сворачиваемости крови использовали 5%-й раствор гепарина, которым прополаскивали пипетку, иглу и внутреннюю часть шприца, применяемых для пункции сердца и сосудов рыб. Гепарин также добавляли в отмывающий физиологический раствор рыб из расчета 1 мл на 10 мл омывающей среды. Полученную кровь помещали в физиологический раствор в соотношении 1 : 10, центрифугировали на рефрижераторной центрифуге K-23 (MLW, Германия) и осуществляли осаждение форменных элементов крови центрифугированием в течение 5 мин при 1000–1500 об/мин. После центрифугирования эритроциты отделяли от лейкоцитов и плазмы (процедуру проводили дважды). Полученные эритроциты разводили до определенного гематокрита ($Ht = 25\%$) и использовали клетки для определения их устойчивости в различных гипоосмотических условиях. Для этого в стеклянные центрифужные пробирки помещали по 2 мл гипоосмотического раствора 30, 50 и 70%-го разведения, а также дистиллированную воду. Затем в гипоосмотическую среду добавляли по 20 мкл суспензии эритроцитов, перемешивали, через 5 мин проводили центрифугирование (5 мин, 1000–1500 об/мин). Надосадочную жидкость отбирали и определяли ее оптическую плотность на спектрофотометре с использованием светофильтра с длиной волны в 550 нм. Для изучения влияния детергентов на осмотическую хрупкость эритроцитов использовали тритон X-100 и твин-20, которые добавляли в пробы в количестве 20 мкл до конечной концентрации в инкубационной среде, равной 0.01%.

Результаты выражали в процентах, за 100% брали самый высокий показатель распада клеток, когда гемоглобин выходил из эритроцита и окрашивал раствор в красный цвет. По отношению к нему рассчитывали процентную долю распада клеток в других гипотоничных средах по формуле:

$$\%\ \mathrm{Hem} = (E_o/E_{max}) \times 100,$$

где E_o – экстинкция пробы, E_{max} – экстинкция, соответствующая 100%-му гемолизу.

Для количественной оценки осмотической резистентности эритроцитов использовали величину осмотичности инкубационной среды (физиологического раствора), соответствующую 50%-му гемолизу клеток ($C_{50\%}$), – центр распределения эритроцитов по осмотической резистентности [5].

Все результаты подвергали статистической обработке. Результаты были получены при проведении пяти-двенадцати независимых экспериментов. Данные подвергали статистической обработке и представляли как среднее арифметическое ± стандартное отклонение, достоверность различий оценивали при помощи критерия Стьюдента.

Влияние гипоосмотической среды и неионных детергентов на количество распавшихся эритроцитов рыб разной экологии

Вид рыб	Изотоничная среда (физ. раствор, контроль № 1)	Степень гипотоничности среды (% разведения физ. раствора)				C_{50} %	Изотоничная среда (физ. раствор + 0.01% тритона X-100, контроль № 2)	Степень гипотоничности среды (% разведения физ. раствора + 0,01% тритона X-100)			Изотоничная среда (физ. раствор + 0,01% твин-20, контроль № 3)	Степень гипотоничности среды (% разведения физ. раствора + 0.01% твин-20)		
		30%	50%	70%	0% (дист. H_2O)			30%	50%	70%		30%	50%	70%
Ставрида	4.5 ± 0.3 $n = 7$	7.2 ± 0.5 $n = 9$	75.5 ± 7.2* $n = 5$	100.0 ± 0.0* $n = 10$	85.0 ± 7.0* $n = 12$	45.0 ± 2.0 $n = 5$	6.5 ± 0.1 $n = 5$	8.9 ± 0.5 $n = 7$	16.2 ± 1.2*(**) $n = 5$	100.0 ± 0.0* $n = 10$	–	–	–	–
Ласкирь	3.5 ± 0.4 $n = 4$	3.8 ± 0.4 $n = 4$	5.6 ± 0.7 $n = 4$	100.0 ± 0.0* $n = 4$	95.0 ± 3.0* $n = 4$	60.0 ± 3.5 $n = 5$	5.0 ± 0.5 $n = 4$	6.0 ± 0.3 $n = 4$	10.0 ± 0.5 $n = 4$	100.0 ± 0.0* $n = 4$	–	–	–	–
Скорпена	1.7 ± 0.1 $n = 9$	2.4 ± 0.2 $n = 9$	3.2 ± 0.3 $n = 9$	84.3 ± 3.9* $n = 8$	100.0 ± 0.0* $n = 12$	64.0 ± 2.8 $n = 5$	2.4 ± 0.2 $n = 9$	3.6 ± 0.1 $n = 9$	4.5 ± 0.4 $n = 9$	72.6 ± 2.9 *(**) $n = 8$	0.5 ± 0.1** $n = 9$	1.6 ± 0.2 $n = 9$	2.4 ± 0.6 $n = 9$	73.0 ± 1.1* $n =9$
Морская лисица	2.3 ± 0.3 $N = 6$	3.3 ± 0.4 $n = 6$	10.7 ± 1.7 $n = 6$	75.2 ± 0.5* $n = 6$	100.0 ± 0.0* $n = 6$	62.5 ± 4.4 $n = 5$	2.0 ± 0.2 $n = 4$	3.5 ± 0.3 $n = 4$	8.6 ± 0.8 $n = 4$	72.9 ± 1.5* $n = 4$	2.0 ± 0.3 $n= 5$	2.8 ± 0.1 $n = 5$	8.9 ± 0.4 $n = 5$	70.6 ± 0.4* $n = 5$

Примечание. $C_{50\%}$ – степень разведения физиологического раствора (в %), при котором происходит гемолиз 50% инкубированных эритроцитов рыб; n – число повторных опытов; * – достоверные различия по сравнению с распадом клеток в контрольных средах собственных серий опытов с $p < 0.05$; ** – достоверные различия по сравнению с распадом клеток в средах без добавления детергента с $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты по влиянию гипоосмотических растворов разной концентрации и действия неионных детергентов на устойчивость эритроцитов рыб представлены в таблице.

Как видно из таблицы, часть эритроцитов в изотонических для рыб растворах подвергалась распаду. В ряду костистых рыб самыми стойкими были эритроциты скорпены, которые имели самый низкий показатель гемолиза, равный 1.7%. Затем следовали эритроциты ласкиря – 3.5%, эритроциты ставриды были самыми хрупкими – их показатель гемолиза равнялся 4.5%. Эритроциты морской лисицы по устойчивости немного уступали клеткам скорпены, их показатель гемолиза составлял 2.3%. В слабо гипотоничных средах, в которых физиологический раствор был разбавлен дистиллированной водой на 30%, разрушение клеток у рыб увеличивалось незначительно: у скорпены – до 2.4%, у ласкиря – до 3.8%, у морской лисицы – до 3.3% и у ставриды – до 7.2%. В 50%-й гипотоничной среде клетки скорпены сохраняли определенную устойчивость (до 3.2%), тогда как у других рыб гемолиз клеток был более выражен и составлял у ласкиря 5.6%, у морской лисицы – 10.7%. Эритроциты ставриды в этих условиях демонстрировали самую высокую гемолитическую способность (75.5%). При повышении гипотоничности среды до 70% от исходной практически все клетки ставриды и ласкиря гемолизировались, тогда как часть клеток морской лисицы и скорпены (25 и 15% соответственно) сохраняли свою устойчивость в этих средах (см. таблицу). В дистиллированной воде эритроциты рыб должны были бы демонстрировать 100%-й гемолиз, но у ставриды и ласкиря показатели экстинкции растворенного гемоглобина были меньше, чем в гипоосмотической среде с

70%-м разведением (на 15 и 5% соответственно, см. таблицу).

Устойчивость эритроцитов к гипоосмии хорошо демонстрировала величина $C_{50\%}$. Эти данные свидетельствовали о том, что самыми устойчивыми из исследованных рыб были эритроциты скорпены и морской лисицы, а самыми хрупкими – эритроциты ласкиря и ставриды. Кроме того, эритроциты исследованных костистых рыб демонстрировали по $C_{50\%}$ четкую зависимость от подвижности, которая возрастала в ряду рыб с уменьшением их двигательной активности (см. таблицу).

Внесение в физиологический раствор 0.01% Тритона X-100 приводило к стимуляции гемолиза эритроцитов костистых рыб и не вызывало изменений гемолитической активности эритроцитов морской лисицы (таблица, контроли № 1 и № 2). При гипоосмии действие тритона X-100 на гемолиз эритроцитов рыб был индивидуален для каждого исследованного вида. У ставриды при 30% разведении тритон X-100 не изменял гемолитической активности эритроцитов, в то время как при 50% гипоосмии тритон X-100 в 4.7 раза тормозил гемолиз и тем самым выполнял стабилизирующую роль для плазматической мембраны эритроцитов ставриды. Стабилизация мембраны эритроцитов (на 16%) в присутствии тритона X-100 отмечена и у скорпены, но при 70%-м разведении среды. У ласкиря и морской лисицы эффекта стабилизация плазматической мембраны эритроцитов тритоном-X100 не была отмечена. У этих видов рыб при гипоосмии тритон X-100 умеренно стимулировал гемолиз, его действие соответствовало природе этого неионного детергента. Такая же тенденция воздействия тритона X-100 в эритроцитах этих рыб сохранялась при сравнении влияния гипоосмии в присутствии детергента с их собственным контролем (контроль № 2).

Добавление в инкубационную среду другого неионного детергента – твин-20 – вызывало повышение резистентной способности эритроцитов скорпены Как видно из данных таблицы, в изотоничных средах (контроли № 1 и № 3) гемолиз эритроцитов скорпены в присутствии твин-20 уменьшался в три раза. В гипотоничных средах с твин-20 гемолитическая активность клеток скорпены относительно гипоосмии без детергента, снижалась с меньшей интенсивностью – от 13 до 34%. При сравнении действия твин-20 при гипоосмии с собственным контролем (контроль № 3) видно, что детергент закономерно стимулировал гемолиз эритроцитов с уменьшением осмотичности среды. У морской лисицы в изотонических средах твин-20 не вызывал изменений в гемолитической активности эритроцитов, а в гипотонических средах действовал, как и у скорпены, аналогичным образом – тормозил гемолиз в клетках этого вида на 7–20%, а относительно собственного контроля вызывал рост гемолиза по мере увеличения разведения инкубационной среды.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что эритроциты разных черноморских рыб имели существенные различия по осмотической резистентности. Факт различной резистентности эритроцитов рыб к действию гипотоничных растворов известен достаточно давно [6], в настоящее время основные исследования направлены на выяснение причин такой гетерогенности. Мы исследовали резистентность эритроцитов у трех видов костистых рыб (ставрида, ласкирь, скорпена), различающихся по двигательной активности, и одного хрящевого вида – морской лисицы. Принципиальным отличием между хрящевыми и костистыми рыбами является наличие в плазме скатов высокой концентрации мочевины (300 ммолей), обеспечивающей высокое осмотическое давление крови. Высокое осмотическое давление крови, по мнению ряда авторов [6, 7], существенным образом снижает осмотическую резистентность эритроцитов у селяхий (*Selachimorpha*). Наши данные не подтверждают эту закономерность. Эритроциты морской лисицы обладали существенно большей резистентностью к гипоосмии по сравнению с эритроцитами ставриды и ласкиря. Более того, эритроциты ската совсем немного уступали по этому показателю эритроцитам скорпены, показавшей самый высокий уровень гипоосмотической устойчивости среди исследованных рыб (см. таблицу). В отношении морских костистых рыб одни авторы считают, что их эритроциты имеют меньшую гипоосмотическую резистентность, чем у проходных и пресноводных видов. Более того, резистентность эритроцитов у молоди кеты (*Oncorhynchus keta*) может значительно ухудшаться в процессе смолтификации мальков, как бы подтверждая факт большей устойчивости эритроцитов у рыб, находящихся в пресноводной среде [7]. Напротив, другие авторы [8] показали, что эритроциты морских рыб имели более высокую резистентность, чем пресноводные рыбы. Известно, что снижение солености водной среды в целом коррелировало со снижением устойчивости эритроцитов рыб к гемолизу.

У исследованных нами рыб можно отметить более высокую резистентность эритроцитов у менее активных (скорпена) и холодоустойчивых (морская лисица) видов. Кроме того, в ряду костистых рыб прослеживается четкая зависимость резистентности эритроцитов рыб от их подвижности, которая закономерно возрастает с уменьшением двигательной активности. Причины этой закономерности неизвестны. Возможно, высокая

резистентность клеток обусловлена особенностями фосфолипидного состава плазматических мембран эритроцитов скорпены и морской лисицы. Липидный состав играет центральную роль в функции клеточных мембран и определяет ее физические свойства, такие как проницаемость, текучесть, резистентность к внешним и внутренним факторам среды. Важным фактором стабильности плазматической мембраны являются особенности структурной упаковки ее фосфолипидного бислоя [9]. При определении фосфолипидного состава мембран эритроцитов морских рыб нами ранее было показано [10], что плазматические мембраны морской лисицы и скорпены имели самые высокие индексы насыщенности жирных кислот, входящих в состав их фосфолипидов. Этот факт является подтверждением более упорядоченной упаковки плазматических мембран у этих видов в сравнении с другими рыбами, что может играть решающую роль в их высокой гипоосмотической резистентности. Хорошим дополнением к установленным закономерностям явилось определение концентрации физиологического раствора, при котором происходит 50%-й гемолиз инкубированных эритроцитов рыб ($C_{50\%}$). В соответствии с определенными нами величинами $C_{50\%}$ осмотическая устойчивость эритроцитов исследованных рыб распределялась следующим образом: самыми устойчивыми были эритроциты скорпены, затем следовали эритроциты морской лисицы, ласкиря и самыми осмотически хрупкими оказались эритроциты ставриды.

При глубокой гипоосмии, когда разведение физиологического раствора достигало 70%, эритроциты рыб гемолизировались либо на 100% (ставрида, ласкирь), либо в подавляющей своей массе: у скорпены – на 85%, а у морской лисицы – на 75%. Можно было бы ожидать, что в чистой дистиллированной воде все эритроциты должны показать 100%-й гемолиз. Однако у некоторых видов рыб (ставрида, ласкирь) оптическая плотность растворов была меньше 100%. Как мы полагаем, возможны две причины этой «аномальной» оптической плотности. Первая причина состоит в том, что часть эритроцитов остается негемолизированной в дистиллированной воде и, таким образом, не происходит выделение части гемоглобина в надосадочную жидкость. Вторая причина, возможно, связана с тем, что полный гемолиз эритроцитов осуществляется, но в дистиллированной воде часть высвобожденного клетками гемоглобина, связанного с водой, как бы образует пересыщенный раствор и осаждается в процессе центрифугирования вместе с другими фрагментами разрушенных клеток или же часть гемоглобина сорбируется этими фрагментами. Для проверки второй причины в пробирки добавляли немного физиологического раствора до концентрации 1–2‰ и проверяли оптическую плотность супернатантов. Результаты показали, что в присутствии низкоосмотичного солевого раствора оптическая плотность супернатанта возрастала до 90–95%, что указывало на переход части агрегированного гемоглобина в раствор. Таким образом, отсутствие 100%-го гемолиза эритроцитов у ставриды и ласкиря в дистилляте является артефактом, вызванным либо осаждением макромолекулярного гемоглобина, либо частичной адсорбций гемоглобина нерастворимым в воде клеточным материалом.

Детергенты по своим свойствам относятся к амфифильным молекулам и, следовательно, благодаря этому могут встраиваться в мембрану, вызывать перегруппировки ее компонентов и в конечном итоге экстрагировать липиды и белки в мицеллярные структуры. По этой причине детергенты играют важную роль в изучении состава и свойств мембран [11]. Уже достаточно давно было установлено, что неионные детергенты (тритон X-100, твины-20-40-80) в малых концентрациях способны стабилизировать мембрану эритроцитов от гипотонического гемолиза, тогда как в больших концентрациях они вызывали солюбилизацию мембран и гемолиз эритроцитов [12, 13]. Установлено, что для эритроцитов протекторные свойства тритона X-100 и твин-20 максимальны при их концентрации, равной 0.01% [14]. В наших исследованиях мы использовали такие же концентрации детергентов для выяснения их воздействия на мембраны эритроцитов рыб. Как видно из таблицы, тритон X-100 не защищал мембраны эритроцитов ласкиря и морской лисицы от гипоосмотического воздействия среды. При этом у ласкиря присутствие тритона X-100 стимулировало гемолиз, а в эритроцитах морской лисицы этот эффект не проявлялся. Действие тритона X-100 на эритроциты скорпены при низких разведениях среды (на 30–50%) не изменяло гемолитической активности клеток, тогда как при более высоких разведениях отмечался слабый протекторный эффект детергента. Наибольшие протекторные свойства тритона X-100 были отмечены для эритроцитов ставриды в гипоосмотических средах с 50%-м разведением. В этих условиях в присутствии детергента торможение гемолиза было значительным и в 4.7 раза увеличивало резистентность клеток в сравнении с контролем. Причины столь различного отношения клеток к действию тритона X-100 скорее всего обусловлены структурной организацией плазматической мембраны эритроцитов этих рыб. Мы уже указывали на то, что плазматические мембраны скорпены и морской лисицы имели самые высокие индексы насыщенности жирных кислот, т.е. имели самые жесткие ацильные цепи их фосфолипидов. Авторы работы [9] с помощью ЭПР-спектроскопии

показали, что устойчивость к детергентам у мембран выше, когда ацильные цепи более насыщены. При этом наблюдается более плотная упаковка бислоя, что и является определяющим фактором устойчивости таких мембран к действию тритона Х-100 и других детергентов.

Протекторные свойства к гипоосмотическому воздействию среды на эритроциты рыб кроме тритона Х-100 демонстрировал и твин-20 (см. таблицу). Это выражалось в уменьшении гемолитической активности эритроцитов рыб как в контроле (физиологический раствор), так и при гипоосмотической нагрузке. В основе такого протекторного действия твина-20 и тритона Х-100 лежит способность неионных детергентов в малых концентрациях интеркалировать (встраиваться) в мембрану и увеличивать ее площадь.

Считается, что наиболее важным параметром эритроцита является отношение площади поверхности клетки к ее объему. В нормальном эритроците человека это соотношение равно 1.9. Это означает, что эритроциты человека могут почти в два раза увеличить свой объем без изменения площади мембраны. Плазматическая мембрана эритроцитов сопротивляется трем видам деформации: растяжению – сжатию, сопровождающемуся изменением площади мембраны; деформации сдвига, без изменения площади; деформации изгиба [15]. Увеличение площади поверхности мембраны эритроцита за счет растяжения на 3% приводит к ее разрыву [16]. Твин-20 и тритон Х-100 благодаря тому, что они могут встраиваться в мембрану и увеличивать площадь ее поверхности, тем самым уменьшают отношение площади поверхности к объему в эритроцитах некоторых рыб. Поэтому чтобы осуществить разрыв мембраны при гипоосмотической нагрузке клетки нужно помещать в более разбавленный солевой раствор, чем до воздействия детергентов. Таким образом, исследованные неионные детергенты по-разному воздействовали на устойчивость мембран эритроцитов рыб. Тритон Х-100 почти не оказывал протекторных свойств и вызывал усиление гемолиза в эритроцитах ласкиря и морской лисицы, но кратно (в 4.7 раза) понижал осмотическую хрупкость эритроцитов ставриды в инкубационных средах с 50%-м разведением инкубационной среды, а в эритроцитах скорпены – на 16% даже в 70%-х гипоосмотических средах. Твин-20 характеризовался выраженным протекторным эффектом в эритроцитах всех исследуемых рыб в изо- и гипотонических средах. Поэтому твин-20 может быть использован для поддержания стабильности суспензий эритроцитов рыб при проведении экспериментальных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания № АААА-А19-119012490045-0 «Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63 EU) и положении ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Я. Потапенко, А. А. Кягова и А. М. Тихомиров, *Осмотическая устойчивость эритроцитов*. Учебное пособие (ГОУ ВПО ГРМУ, 2006).
2. С. И. Головко, Автореф. дисс. ... канд. биол. наук (Ярославль, 2010).
3. A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, Biochim. Biophys. Acta **1666**, 105 (2004).
4. А. Н. Световидов, *Рыбы Черного моря*. (Наука, М., 1964).
5. М. А. М. Аль-Рабии, Ш. И. Чалабов, М. Д. Астаева и Н. К. Кличханов, Современные проблемы науки и образования **2015** (3), 17364 (2015). URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17364.
6. Г. Н. Калашников, Уч. записки МГУ **33**, 65 (1939).
7. Е. Е. Изергина и И. Л. Изергин, Исследование водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана **23**, 18 (2011).
8. А. М. Андреева, И. П. Рябцева, И. И. Руднева и др., Вестн. СПбГУ **3** (4), 3 (2013).
9. P. V. Rodi, V. M. Trucco, and A. M. Gennaro, Biophys. Chem. **135** (1–3), 14 (2008).
10. Yu. A. Silkin, E. N. Slkina, and S. A. Zabelenskii, J. Evol. Biochim. and Physiol. **48** (1), 43 (2012).
11. D. Linke, Methods Enzymol. **463**, 603 (2009).
12. P. Seeman, Biochem. Pharmacol. **15**, 1753 (1966).
13. H. Hägerstrand and B. Isomaa, Chem. Biol. Interact. **79** (3), 335 (1991).
14. K. A. Riske, C. C. Domingues, B. R. Casadei, et al., Biophys. Rev. **9**, 649 (2017).
15. М. К. Боровская, Э. Э. Кузнецова, В. Г. Горохова и др., Бюл. ВСНЦ СО РАМН **3** (73), 334 (2010).
16. Э. С. Бабаев, Гематология и трансфузиология **43** (1), 34 (2001).

Resistance of Erythrocytes in Some Black Sea Hyposmic Fishes Exposed to Non-Ionic Detergents Triton-X100 and Tween-20

Yu.A. Silkin, E.N. Silkina, and M.Yu. Silkin

Karadag Scientific Station named after T.I. Vyazemsky – nature reserve of the Russian Academy of Sciences, ul. Nauki 24, Kurortnoe, Feodosia, Crimea, 298188 Russia

The osmotic resistance of erythrocytes and the hemolytic effect of non-ionic detergents, Triton X-100 and Tween-20, on red blood cells were analyzed using 4 hyposmic Black Sea fish species such as horse mackerel (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev), gilthead (*Diplodus annularis* L.), black scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) and thornback ray (*Raja clavata* L.). It was shown that in physiological solutions, red blood cells from hyposmic thornback ray and black scorpionfish were highly resistant to hypotonic environment. Determination of the concentration of physiological solution, in which, during incubation, 50% of fish erythrocytes ($C_{50\%}$) were hemolyzed, it was possible to rank fish erythrocytes according to the degree of osmotic resistance in the following order: black scorpionfish > thornback ray > gilthead > horse mackerel. The erythrocytes of the investigated teleost fishes exhibited a clear dependence on the mobility by $C_{50\%}$, which increased in some fishes with a decrease in their motor activity. Triton X-100 did not induce an increase in resistance or even weakly stimulated an increase in the hemolytic activity of erythrocytes in gilthead and thornback ray. In the presence of Triton X-100 in horse mackerel erythrocytes, cell resistance increased by a factor of 4.7 in an incubation medium with 50% dilution. Protective properties of Triton X-100 were seen during incubation of black scorpionfish erythrocytes in media with 70% dilution. Tween-20 also increased the resistance of fish erythrocytes to hemolysis. The results of this study showed that Tween-20 and, in some cases, Triton X-100 are useful in maintaining stability of fish erythrocyte suspensions during experimental studies.

Keywords: resistance, erythrocytes, plasma membrane, hyposmia, detergents, fish

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1144–1163

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 595.76, 51.76, 532.22

МОДЕЛИРОВАНИЕ СЦЕНАРИЕВ ГЛУБОКОГО ПОПУЛЯЦИОННОГО КРИЗИСА БЫСТРО РАСТУЩЕЙ ПОПУЛЯЦИИ

© 2021 г. А.Ю. Переварюха

Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр РАН, 199178, Санкт-Петербург, 14-я линия, 39

E-mail: temp_elf@mail.ru

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.
После доработки 23.04.2021 г.
Принята к публикации 26.04.2021 г.

Статья посвящена моделированию кризисного и порогового развития популяционного процесса при образовании новой популяции в конкурентной среде. В процессе расселения резкое включение факторов биотического противодействия до момента исчерпания ресурсов для дальнейшего роста численности способно вызвать глубокий популяционный кризис. Многие популяции проходили через этап «бутылочного горлышка», включая человеческие в момент неолитического краха. Вселенцы с высокой репродуктивной активностью нередко агрессивно воздействуют на биосистемы. Появление эффективной конкуренции может не только вызвать классические циклические флуктуации, но и привести к полному вымиранию популяции после ряда высоких пиков численности. Классическими примерами ситуаций индуцированного кризиса являются два альтернативных сценария – опыты Г. Гаузе с интродукцией инфузории-хищника и гибелью двух видов и эксперименты с внесением бактериофагов в колонии активно делящихся бактерий, но обладающих динамически адаптирующимся противовирусным механизмом. Нами предложены модификации модели для актуальных сценариев кризисных эффектов в популяционной динамике. В уравнениях с запаздыванием учтен пороговый уровень для воздействия биотической среды на размножение инвазивного вида и агрегированный характер запаздывающей регуляции с двумя временными факторами. Вычислительные сценарии описали как эффект завершения процесса после повторного пика, так и успешного прохождения популяционного кризиса за счет быстрой адаптации. Глубокие кризисные явления свойственны динамике локальных популяций при столкновении с новыми для них вирусами.

Ключевые слова: сценарии инвазий, моделирование экстремальной динамики популяций, биотическое сопротивление, пороговая регуляция с запаздыванием, исчезновение видов, неолитический крах, биологический контроль вредителей, иммунный ответ, CRISPR-Cas9.

DOI: 10.31857/S0006302921060107

В данной работе мы продолжаем совершенствование методов математической биологии для анализа волатильных и стремительных переходных процессов. Большинство изложенных в предыдущей работе [1] идей о моделировании сценариев распространения вирусной инфекции получили в настоящее время подтверждение в исследованиях. Многие неочевидные факторы, выделенные нами как значимые на момент написания статьи [1] в начале пандемии в форме гипотез, были установлены при детальном изучении новой болезни или обоснованы экспериментально к апрелю 2021 г. Ответы на возникшие в начале пандемии некоторые другие вопросы остаются неясными. Пока не получено достоверного объяснения, например, почему жители Дальнего Востока оказались в среднем устойчивее к вирусу, чем люди на Юге Европы, где доля смертельных исходов очень высока. Полностью не выяснен фактор инфекционного потенциала переболевших COVID пациентов, но с длительно положительными тестами ПЦР, взятыми после выздоровления. В объяснении важных свойств динамики и перспектив современной эпидемической ситуации успешно участвуют российские специалисты, опубликовавшие ряд интересных работ [2–4].

Целью данной работы является математическое описание сценариев популяционного кризиса, который способен спонтанно последовать за фазой быстрого роста еще до момента заполнения видом доступной экологической ниши. Анализ вариабельности явления актуален для практических задач – обоснования методов биологического контроля опасных вселенцев.

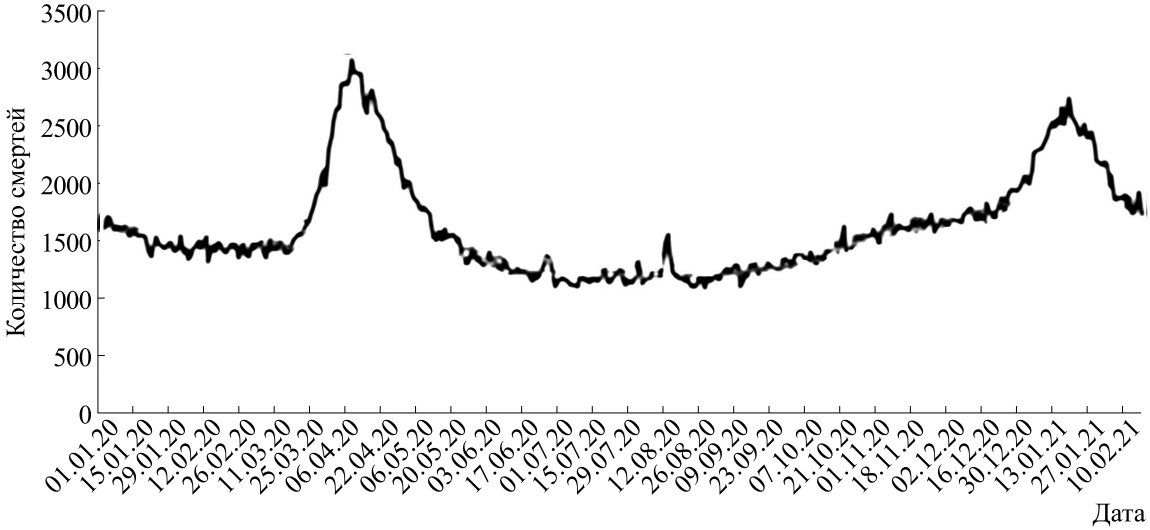


Рис. 1. Динамика общей смертности в Англии с января 2020 г. по февраль 2021 г. (данные правительственного отчета, https://www.gov.uk/government/statistics).

ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СОВРЕМЕННОЙ ПАНДЕМИИ

В апреле 2020 г. мы отметили принципы дивергенции протекания эпидемического процесса COVID-19 и неизбежность его вариабельности, основываясь на аналогиях. Особенностью современной пандемии стала роль суперраспространителей в запуске эпидемического процесса у COVID, что подтверждалось многократно в разных странах. Проблема для моделирования здесь состоит в том, что многие больные не заражают совсем никого, но отдельные заражают очень многих. Эффект от действия массовых разносчиков известен давно, описан на примере начала эпидемии ВИЧ в 1980 г. ВИЧ проник в США еще в 1950-е гг., но одного гиперактивного распространителя оказалось достаточно, чтобы в 1979–1980 гг. стремительно ускорить динамику эпидемического процесса. Установленные в работе [5] актуальные отличия состоят том, что суперраспространители характерны именно для коронавируса в большей степени, чем для сезонного гриппа, пик вирусной нагрузки и пик симптоматики COVID могут чаще не совпадать. В результате число «COVID superspreaders» оказывается в локальном случае на *раннем этапе* важнее, чем среднее по популяции значение R_0 базового репродуктивного числа передачи вируса. Динамика первых этапов региональных эпидемий в Европе сильно различалась в начале 2020 г. во многом из-за наличия активных групп таких распространителей – трудно предсказуемый для прогнозирования сценариев эффект.

Вторая фаза роста заболеваемости COIVID зимой 2021 г. в эпидемическом цикле в Великобритании (предположительно виновен «британский штамм») стала существенно больше первой по числу случаев, но отмечено заметное снижение статистики смертности по сравнению с весной 2020 г. (рис. 1). Это значимое явление для прогноза характера эпидемии.

Затухающая динамика волн эпидемии оказывается качественно схожей с импульсной «пилообразной» вспышкой насекомых вредителей леса, для которой в работе [6] нами было предложено сложно настраиваемое уравнение с четырьмя включениями разных значений запаздывания:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t-\tau)\exp(-bN(t-\tau)) - q\frac{N(t-2\tau)}{A-N(t-\tau_1)}, \tau > \tau_1. \quad (1)$$

Уравнение (1) генерирует затухающие ряды пиков, где второй пик в «серии волн» способен стать больше первого в зависимости от $N(0)$. Ранее нами было отмечено, что осцилляционный характер эпидемии COVID-19 следует отличать от сценария повторного запуска Λ-образной вспышки, и в Иране, Нью-Йорке, Великобритании, ЮАР это отличие действительно подтвердилось. Гораздо реже в регионах локально отмечался на графиках вместо двух «волн» вариант достаточно длительного эпидемического «плато». Единичная эпидемическая быстрая Λ-образная

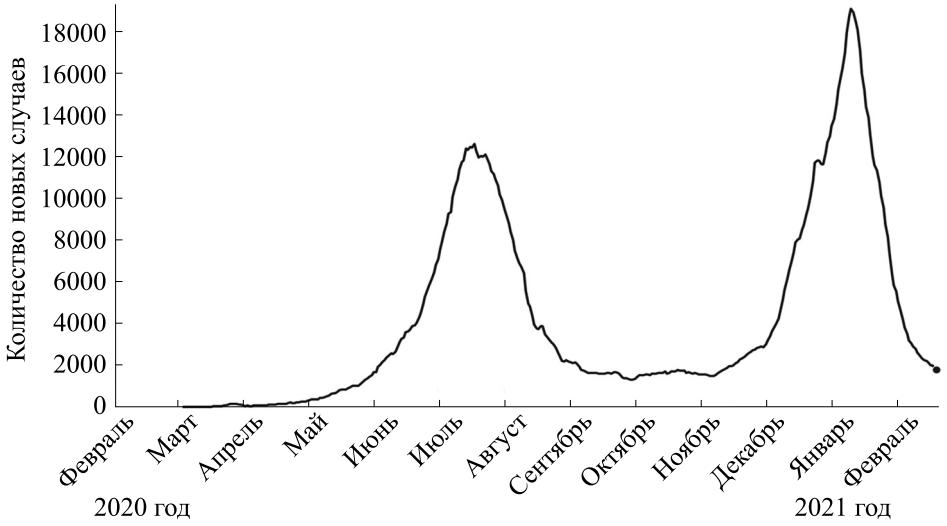


Рис. 2. Осциллирующая динамика эпидемии COVID в Южной Африке с марта 2020 г. по март 2021 г. (данные New-York Times).

вспышка, как с гриппом H1N1 в 1918 г. в Филадельфии, отмечена в 2020 г. в Шри-Ланке. Эволюция COVID оказалась сложнее гриппа «испанки».

Хрестоматийный пример двухпиковой осциллирующей эпидемии наблюдался в 2020 г. в ЮАР (рис. 2). Появление нового штамма не поменяло динамический режим колебаний, поэтому третий пик заболеваемости можно прогнозировать на уровне, не превосходящем заболеваемость первого пика. Все масштабные пандемии даже изменчивых ОРВИ вирусов когда-то завершаются. За счет Т-лимфоцитов CD4 и CD8 иммунный ответ

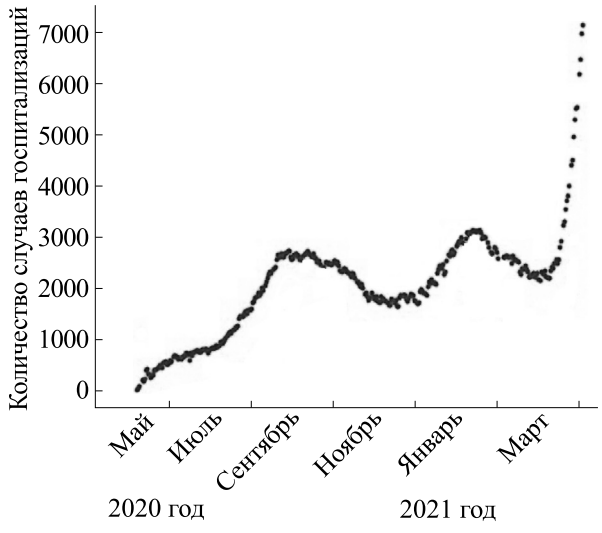


Рис. 3. Динамика экстремального роста случаев госпитализаций с COVID-19 в штате Риу-Гранди-ду-Сул в начале марта 2021 г. (по данным отчета на сайте www.setorsaude.com.br).

за время между пиками не успеет потерять свою эффективность и устойчивость накопится в популяции, значит, и амплитуда колебаний заболеваемости в ЮАР стабилизируется. В работе [7] было подтверждено, что Т-клеточная память и эффекторная функция CD8-клеток способна работать против множества эпитопов коронавируса. Более того, перекрестно-реактивные Т-клетки найдены в исследовании [7] у людей без подтвержденной инфекции SARS-CoV-2.

Безусловно, не все появляющиеся новые вариации Spike-белка вируса будут способны вызывать скачкообразные режимы всплесков тяжелых случаев COVID. У переболевших без иммуносупрессии с вероятностью, большей 0.5, их Т-клетки смогут распознавать эпитопы у новых штаммов, как B.1.351 из ЮАР. Важно выявлять ситуации, когда резко меняется *качественный* ход эпидемии, и анализировать лучше статистику случаев госпитализации.

Гораздо опаснее сценарий эпидемии с интервалом экстремального роста заболеваемости в марте 2021 г. мы видим в Бразилии. Обратим внимание на быстроту, с которой фаза затухания с уменьшением амплитуды колебаний с пиками в августе и в январе (как и в ЮАР), вдруг резко в марте сменилась другим режимом – Λ-образной вспышкой с экспоненциальным ростом. Новый всплеск, очевидно, превосходит первоначальную скорость распространения болезни. На рис. 3 представлена динамика волн госпитализаций с COVID в южном бразильском штате Риу-Гранди-ду-Сул. С запаздыванием на две недели в середине марта 2021 г. аналогичный эпидемический всплеск начался после затишья в городах Чили. Вероятно, бразильский штамм B.1.1.248 в

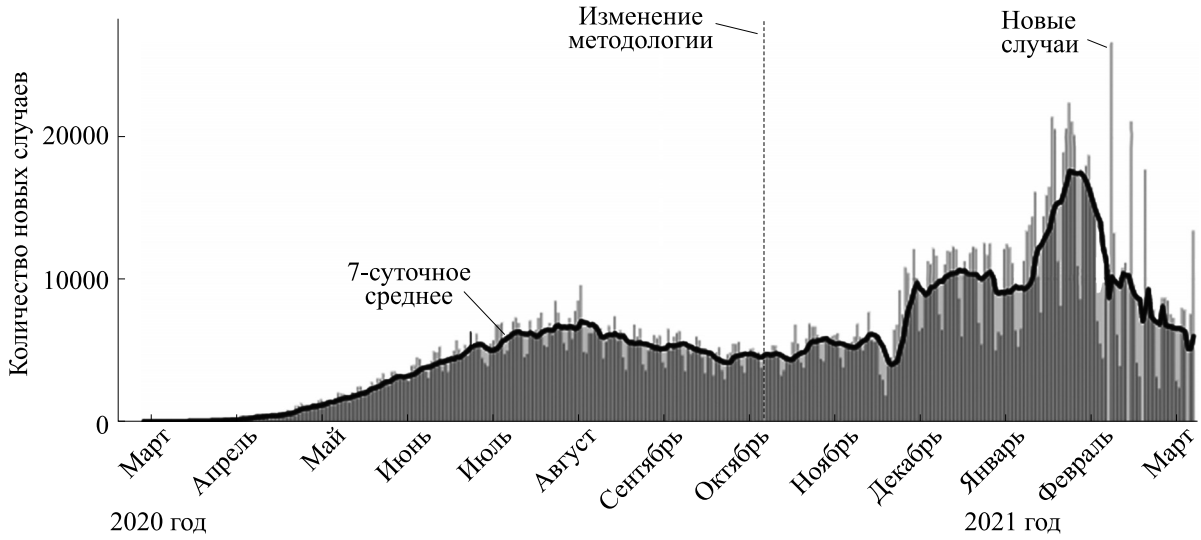


Рис. 4. Статистика динамики заболеваемости COVID-19 обобщенная по всем штатам Мексики (данные с сайта New-York Times: www.nytimes.com/interactive/2020/world/coronavirus-maps.html).

2021/22 г. будет наиболее проблемным в так называемой «эпохе войны вакцин и штаммов» [8]. Ситуация в Южной Америке предполагает триггерное событие, которое смогло резко изменить характеристики эпидемического процесса вируса спустя год после его начала, и это явление требует внимания исследователей. Интересно выяснение доли повторных заражений среди случаев марта 2021.

Сценарий изменения динамики эпидемии на рис. 3 бифуркационный. Более того, здесь мы видим признаки скачкообразной потери установившегося режима. Такая трансформация качественной картины процесса на юге Бразилии подразумевает резкое увеличение базового r-параметра вируса, которое произошло из-за мутации, но не в начале марта, а раньше – это процесс инерционный. Статистика учета госпитализаций реагирует с задержкой. Модель сценария с таким разрушением образовавшегося цикла после бифуркации Андронова–Хопфа $N_*(t < t_*; r\tau)$ и появлением вместо цикла при значении $r \geq r_*$ траектории $\lim_{t\to\infty} N(t; r_*\tau) = +\infty$ получена в работе [9] в расширенной модификации логистического уравнения с запаздыванием:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\left(1 - \frac{N(t-\tau)}{K}\right)(\Upsilon - N(t-\tau)), \Upsilon < K. \quad (2)$$

Разрушение цикла в недиссипативном решении уравнения (2) описывает момент трансформации процесса из-за резкого увеличения r-параметра, но не варианты его завершения. Сценарий с бифуркацией фактически непредсказуем и отражает *независимое* случайное событие. Эпидемия гриппа H1N1 «swine flu» в 2009 г. проходила в этих регионах с двумя пиками в июле и в ноябре. Таким образом, интервал менее двух месяцев между прошедшим пиком и началом новой фазы роста заболеваемости – признак появления (накопления нескольких) опасных изменений у вируса. В Исландии наблюдается типичная динамика шестимесячных интервалов между пиками: апрель, октябрь, апрель. Для Бразилии или Индии неактуальна сезонность вспышек ОРВИ, но это важный фактор для регионов севера Европы и, безусловно, для России.

Обобщенные данные случаев по странам с высокой численностью населения (США, Индонезия, Индия, Бразилия), но неравномерной плотностью мало пригодны для анализа. Графики складываются из непохожих групп локальных сценариев. По обобщенным данным заболеваемости в США прослеживается динамика эпидемии из трех возрастающих волн, но в Нью-Йорке и Мичигане динамка качественно иная. В Мексике улучшали методику учета статистики, но при этом график заболеваемости в Мексике качественно не похож по динамике на Нью-Йорк, ЮАР и Бразилию (рис. 4). Эпидемический процесс развивался в Мексике сравнительно медленнее сопредельных стран при очень высокой плотности населения в столице страны.

Сравнение сценариев подтвердило, что меры «локдауна» не способны остановить уже начавшуюся фазу стремительного роста заболеваемости, если губительный для экономики «локдаун» вводят только по факту риска исчерпания больничных мест, – пример попытки управления процессом на основе данных, которые отражают его динамику с отставанием.

ВАРИАТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЦЕНАРИЕВ ИММУННОЙ АКТИВАЦИИ

Помимо ограничительных мер «локдаунов», социальных норм и традиций общения на динамику региональных эпидемий оказывают влияние отдельные варианты иммунного ответа, которые у локальных групп иногда действительно имеют особенности. Подтвердилось [10], что наборы перекрестно-реактивных В-клеток, образованные в организме в результате предыдущих контактов с другим эндемическим бета-коронавирусом, встречаются у некоторых пациентов с сильными симптомами. Такие клетки памяти (MBC) представляют небольшую, но стабильную часть среди встречающихся исследователям репертуаров клеточных рецепторов лимфоцитов, и данные клетки «не способствуют нейтрализующей реакции антител» согласно работе [10]. Активация В-клеток иммунной памяти не помогала справиться с новым вирусом. В различных регионах циркулировал отличающийся состав ранее известных четырех коронавирусов. По нашей гипотезе из-за явления «слепого пятна» или «первородного антигенного греха» [11] в иммунном ответе это повлияло весной 2020 г. на явные *локальные* различия процентного количества тяжелых случаев COVID и доли смертельных исходов. Свойства эффекта таковы, что при повторных волнах эпидемии в 2021 г. этот эффект перестанет быть значим, но позднее может вновь активироваться из-за накопления мутаций в РНК вируса. Возникает «антителозависимое усиление инфекции», когда комплекс «вирус–антитело» непрочен и вирус избегает уничтожения в эндосомах лейкоцитов и заражает их [12]. ADE в 2020 г. мог быть локальным и эпизодическим, но в перспективе эффект ADE способен стать массовым и *циклическим* региональным эффектом для ранее переболевших COVID. Клетки иммунной памяти MBC, ранее реагировавшие на неактуальный теперь эпитоп, через сезон заболеваемости ОРВИ становятся уже помехой – с субоптимальными антителами при столкновении с немного изменившими антигеном. Примером служит ситуация с неудачей массовой вакцинации от вируса Денге из-за его четырех разных серотипов, после вакцинации некоторые привитые переболели лихорадкой Денге серьезнее, чем в среднем в контрольной группе [13]. Эффект ADE для заразившихся вирусом Денге явление вероятностное, но 10% неудачных случаев после прививки уже серьезная проблема.

Фактор накопления генетических отличий и появление новых штаммов SARS-CoV-*x* был очевиден сразу после объявления ВОЗ о пандемии. У коронавирусов есть механизм, отвечающий за точность репликации их РНК, такой вирус может оставаться стабильным долгие годы, циркулируя в локальной популяции. Однако при распространении вируса по всем континентам закон больших чисел будет играть против нас. Вирус начал меняться и путем делеций – потерь участков в его большом геноме. Достаточно предсказуемо мутации затрагивают *Spike*-белок, но отмечено, что у данного сложного трансмембранного белка есть и консервативные участки [14]. Автор статьи решил вакцинироваться, понимая, что отлична от нуля вероятность ситуации, когда январе 2022 гг. будет циркулировать иной штамм, и выработанные после вакцины IgG антитела могут оказаться недостаточно аффинными к новому варианту RBD-домена шипа-мутанта. Однако чем больше людей и как можно быстрее в мире станут устойчивыми к вирусу, тем меньше вероятность опасных событий – появления у вируса новых значимых мутаций. Большинство действий при иммунном ответе в организме не полностью детерминировано и вероятность успеха все-таки превосходит. Популяционный «стадный» иммунитет после массовой вакцинации не должен пропадать стремительно при появлении новых штаммов, но уменьшаться линейно, по аналогичным вероятностным причинам, которые сопутствуют процессу презентации антигена. У большой группы вакцинированных иммунодоминатные пептиды и В- и Т-клеток будут различаться, образуя сложное распределение. Иммунитет «весь и сразу» эффективности не потеряет. Многие авторы обосновали важность изучения клеточного иммунного ответа от Т-киллеров с рецептором CD8 на спектр антигенов – участков консервативных структурных вирусных белков и нуклеопротеинов, но такой ответ формируется с непостоянным запаздыванием.

Особая роль NK-лимфоцитов натуральных киллеров в иммунном ответе действительно оказалось высока, что следовало согласно гипотезе задержки в сценарии активации Т-клеток. У пациентов с серьезными воспалительными осложнениями было отмечено снижение эффекторных функций NK-клеток [15]. Теперь, сопоставив между собой новые результаты нескольких исследований, мы можем обосновать причину важности этой группы клеток. Каждое звено иммунитета нацелено решать свой круг задач, но допускается дублирование их функций. NK-клетки обеспечивают антителозависимую цитотоксичность, а виновниками осложнений оказались альвеолярные макрофаги. Антитела IgG против *S*-белка SARS-CoV-2, не содержащие в своей Fc-области сахара фукозы («афукозилированные» иммуноглобулины), из-за их повышенной связывающей способности с Fc-рецептором у макрофагов запускают высвобождение этими клетками уже излишних сигнальных молекул – провоспалительных цитокинов [16]. Из-за поло-

жительной обратной связи это усиливает системное воспаление.

Наиболее проблемным остается подтверждение нашей модельной гипотезы об эффекте зависимости от дозы в сценарии развития инфекционного процесса, когда начальный уровень заражения $N(0)$ сильно определяет быстроту и качество клеточного иммунного ответа. В вычислительной модели сценария мы можем использовать только количественную величину – дозу, но не относительную оценку ее вирулентности. Прямые опыты на людях с высокими дозами невозможны по понятным причинам. Ряд результатов позволяют более уверенно говорить о факторе порогового уровня той начальной дозы заражения, которая может вызывать тяжелое течение заболевания COVID из-за активации каскада воспалительных цитокинов, включая IL-1β, запускающих как местное, так и системное воспаление. В работе [17] описаны эксперименты с *повторным* заражением вирусом макак-резусов, отмечено, что антитела могут защищать от заражения SARS-CoV-2 дозозависимым образом, но только если ранее полученные IgG будут выше порогового титра, необходимого для защиты. Необходимы экспериментальные работы с оценкой качества всего спектра иммунного ответа на разные дозы коронавируса, подобные опытам, описанным в работе [18] для разных доз гриппа H3N2. Разработчики классической вакцины VLA2001 с инактивированным коронавирусом подтвердили выраженную дозозависимую иммунную реакцию на их препарат. В контексте зависимости развития осложненного течения COVID от исходной дозы введенного вируса, по нашему мнению, недооценены методы усиления вакцинами иммунного комплекса слизистых оболочек – первого защитного барьера и важного для группы людей с ослабленным Т-клеточным иммунитетом и, как следствие, длительным течением COVID.

Множество отдельных, иногда разрозненных и кажущихся далеких друг от друга результатов исследований постепенно складываются общую мозаику – вариантов действия иммунного ответа, которые интересно классифицировать и с математической теоретизацией.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНВАЗИИ И АКТИВАЦИЯ ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ СРЕДЫ

Рассмотрим математически не менее интересную другую проблему экодинамики переходных процессов, которой ранее уделяли мало внимания. Спонтанные вселения стали регулярными и даже неизбежными явлениями для экологии биосистем. Практически важны и интересны для математического описания экстремальные формы процессов при нарушении выравненности сложившегося биологического разнообразия. Мы рассмотрим моделирование нескольких альтернативных сценариев развития инвазионных процессов у активных вселенцев, но которые сопровождаются стремительным усилением конкурентного противоборства. От борьбы иммунной системы и вируса сценарии при инвазиях отличаются большими возможностями совместной адаптации видов, когда вселенец может победить в борьбе за экологическую нишу, стать доминирующим видом. У вируса нет устойчивой «ниши», но только уровень минимального неразрушающего среду воздействия. Длительное состояние при высокой вирусной нагрузке для организма хозяина невозможно, что отражено в нашем модельном сценарии инфекционного процесса для гепатита С из [1]. Безусловно, заражение всех доступных клеток печени означает летальный вариант исхода болезни.

Представим, что инвазивный вид с высокой плодовитостью «r-параметром» активно распространяется в новом ареале, на первом этапе это возможно с динамикой, близкой к экспоненциальному закону роста $N(t) = N(0)e^{rt} - qN(t)$, $q < r < 1$. В некоторый момент времени $t = T$ вид начинает встречать активное противоборство со стороны автохтонного (или специально интродуцированного) биотического окружения. Ситуации, когда вид-вселенец, интенсивно размножаясь, разрушает свою среду обитания полностью, как завезенные на остров Беринга олени или люди на острове Пасхи, остаются редкими примерами. Триггерный фактор выступает как механизм регуляции численности с запаздывающей реакцией. Известны несколько вариантов для развития подобных событий и интересных реальных примеров.

Человеческие популяции за приделами Африки вполне можно считать инвазивными, им приходилось отвоевывать свою «нишу». Как установили археологи, после проникновения в Европу и активного расселения в северных регионах, поселения *Homo sapiens* испытали резкий кризис, известный как неолитический крах (Neolithic crash) около 6 тыс. лет до н.э. [19]. Затяжной кризис продолжался полтысячелетия (рис. 5) [19]. Историки дискутируют о причинах и последствиях настигшего наших предков длительного демографического спада.

После кризиса в неолите образовалось длительное равновесие, сменившиеся новым трендом повышения численности населения Европы только около 4 тыс. лет до н.э. По масштабам исторической шкалы пример продолжительного, но не самого глубокого кризиса.

Подобный тип резких изменений численности в экодинамике называется «boom-and-bust», что можно перевести как «взлет и крушение». Мате-

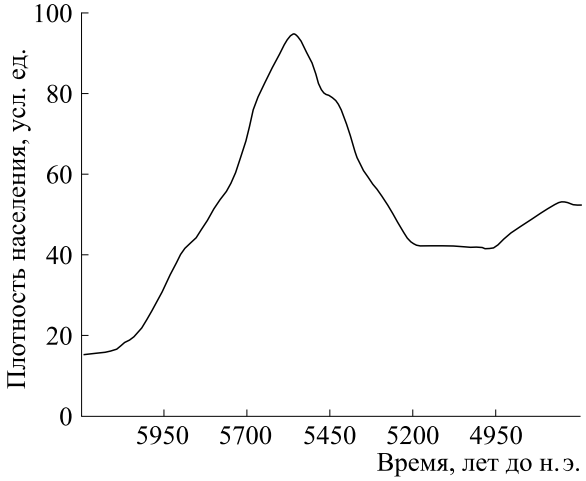


Рис. 5. Динамика плотности населения Севера Европы при неолитическом крахе (по работе [19]).

матический сценарий в работе [20] с однократной краткой вспышкой – только его частный случай. Изменения с пиками и кризисами достаточно характерны и важны, так как сопровождаются эффектом «бутылочного горла». Этот эффект связан с генетическими изменениями, так как после прохождения «горлышка бутылки» продолжающаяся развиваться популяция оказывается потомками малой группы. Число вариантов у аллельных генов может резко снижаться, и подобные явления кризисов могут рассматриваться как факторы эволюции и причины внутривидовой дифференциации. Генетики по мтДНК определили ряд видов, переживших в прошлом этап малой группы.

Для других вселенцев резкие колебания численности, наоборот, нормальны и не мешают приспособленности. Так, вредоносный вселенец гребневик *Mnemiopsis leidyi* после массового размножения поддерживает популяцию при истощении кормовой базы за счет каннибализма [21], что как раз позволяет ему вытеснять конкурентов, проходя минимумы численности. Для многих видов существует минимальный уровень численности L, хотя для других видов его нет.

На примере наших неолитических предков мы видим благополучный сценарий успешного преодоления затяжного минимума $N(t) \to L$, $L > \delta \in \mathbb{N}$ и низкой эффективности воспроизводства. Существует много видов, не преодолевших внезапный кризис, в том числе среди инвазивных популяций после начала активного освоения нового ареала. Обзор случаев краха популяций приведен в работе [22]. Многие из них имели высокий репродуктивный потенциал, как вселенный в Ставропольском крае американский жук-листоед *Zygoramma suturalis* [23].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ ДВУХ ЯВЛЕНИЙ КРИЗИСА

В экспериментах получено наглядное подтверждение различных вариантов кризисной динамики. Классические серии экспериментов Г. Гаузе 1934 г. с двумя видами инфузорий можно интерпретировать и как внезапное включение запаздывающего сопротивления, но и как лабораторную модель поведения агрессивного вселенца в новой среде. В пробирку с логистически ($N(t) \to K$) растущей колонией *Paramecium caudatum* добавлялись ($t = t_D$) естественные враги, агрессивные хищники *Didinium nasutum*. Взаимодействие инфузорий в опытах без убежищ заканчивалось уничтожением инфузории-жертвы, и следом после второго максимума численности погибал лишенный пищи хищник (рис. 6) [24]. Второй максимум у *Didinium* оказывался выше первого и совпадал с минимумом у жертвы.

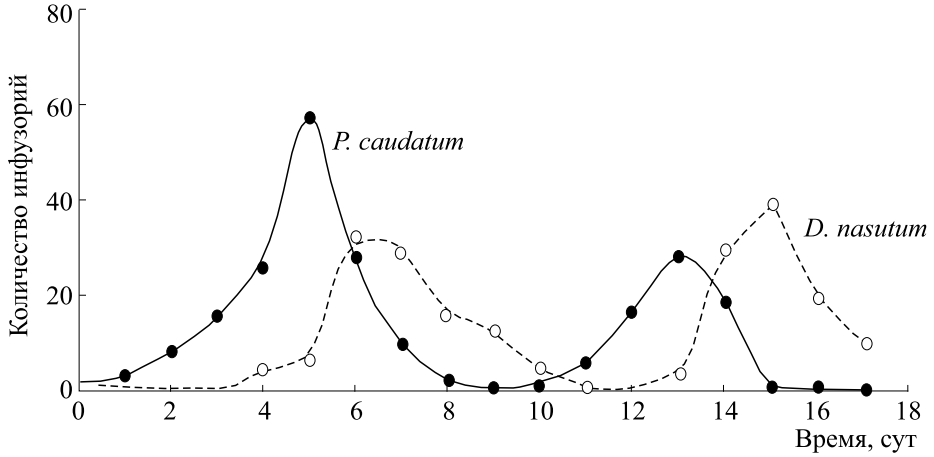


Рис. 6. Динамика двух видов инфузорий с гибелью после второго пика в опытах Гаузе [24].

Опыты описаны в некоторых книгах как экспериментальное опровержение модели В. Вольтерра и теории об устойчивой цикличности видов в двухуровневом трофическом взаимодействии, но их трактовка в работах самого Гаузе несколько отличается. Гаузе писал о неполной обусловленности лабораторных опытов в работе [24]: «когда имеется большое число особей *Paramecium* и *Didinium*, оказывается возможным по известным уравнениям предсказать течение процесса борьбы за существование. Однако в критические моменты смены одного цикла следующим, когда число особей невелико, различные «случайные моменты» приобретают большое значение. В результате оказывается невозможным определить развитие в каждом отдельном случае, и мы вынуждены снова иметь дело с вероятностными изменениями». Так Гаузе предвидел не изученное тогда явление, что математически называется стохастическим размыванием сепаратрисы. Некоторое возмущение начальных условий при $N(0) \pm \varepsilon$ [25] необязательно приведет к иному асимптотическому положению траектории при существовании альтернативных аттракторов. Границу областей притяжения аттракторов вместо L-порога составит область рассеянного множества точек. Данное свойство наблюдается в нашей модели (3), где H – предпороговая величина вирусной нагрузки для организма при условии $N(0) < H < K$ для данной инфекции:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right)(H - N(t-h)), H < K, h > \tau. \quad (3)$$

Эффект размывания сепаратрисы не противоречит опытам и наблюдениям, ведь повышение начальной дозы на $n + 1$ вирион не обязательно приводит к летальному исходу. Известно из опытов, приведенных в работе [18], что существуют шансы выживания у мышей и при огромной дозе гриппа. Уравнение (3) – наглядный, но не единственный пример стохастических свойств у детерминированной модели, но вычислительные эксперименты с уравнением (3) не могут описать спонтанное разрушение колебаний у возникшего популяционного цикла.

В первой фазе для $t \in [0, t_K]$ в безбифуркационном сценарии наблюдаются затухающие осцилляции и $\lim_{t\to tK} N(t) = K$, но равновесие K становится неустойчивым. В момент $t \to t_K$, $N'(t) \to 0$ и $N(t) \to K$ знак правой части выражения (3) будет зависеть от значения $E_h = (H - N(t-h))$, выполняющего роль возмущающего воздействия в зависимости от состояния траектории в момент $t_K - h$, которое может быть положительным или отрицательным, что определяется при задании $N(0)$. В вычислительных сценариях получено два варианта: $\lim_{t\to\infty} N(t) = +\infty$ при $E_h > 0$ и $\lim_{t\to\infty} N(t) = H$ при $E_h < 0$. Немонотонный характер приближения траектории $N(t) \to K$ к промежуточному равновесию K определяет дихотомию сценариев. При малом r-параметре формула (3) покажет просто затухающие осцилляции, в нелинейных моделях параметры неравноправны, не все из них меняют фазовый портрет.

Сценарий с вселением хищной инфузории не подразумевает совместной адаптации видов. Главным противником хищника-вселенца в таком сценарии стали собственные пищевые потребности и *некомпенсируемая* репродуктивная активность. Отмеченные у Гаузе «случайные моменты» связаны с чувствительностью его лабораторной системы относительно возмущения ее начального состояния в моменты $t = 0$ и в $t = t_D$. Математически интересны эксперименты, где свободная динамика жертвы не логистическая, а циклическая. Такие эксперименты можно провести, добавив к инфузориям их паразита *Holospora undulata*.

Рассматриваемый нами сценарий кризиса в активной фазе инвазии часто связан с началом эпизоотии. Известна другая лабораторная система, где взаимная адаптация происходит достаточно быстро. В колонию кишечной палочки, растущей по логистическому закону $\forall N(0)$, $N(t) \to K$ с небольшим «овершутом» $N(t) > K$, добавляли вирус-бактериофаг и наблюдали необычную динамику [26]. Бактериофаг активно подавлял бактерии, но потом внезапно выживаемость у оставшихся микроорганизмов резко увеличивалась. Система с вирусом проходила минимум и стабилизировалась, как показано на рис. 7. Искусственно созданное противоборство *E. coli*/бактериофаг служит лабораторной постановкой для вполне реальной ситуации при инвазии. Например, активность разрушительного вредителя вселенца непарного шелкопряда *Lymantria dispar* в лесах Северной Америки начал резко снижать патогенный для бабочек грибок-интродуцент *Entomophaga maimaiga*, но для эффективной адаптации грибка к новой бабочке потребовались годы [27].

Для исследователей прохождения кризиса из-за адаптаций *E. coli* был неутешительный результат. В 1930-е гг. вирусы планировали использовать в клинической практике как антимикробные средства [28]. Только много десятилетий спустя смогли понять истинную причину происходящих

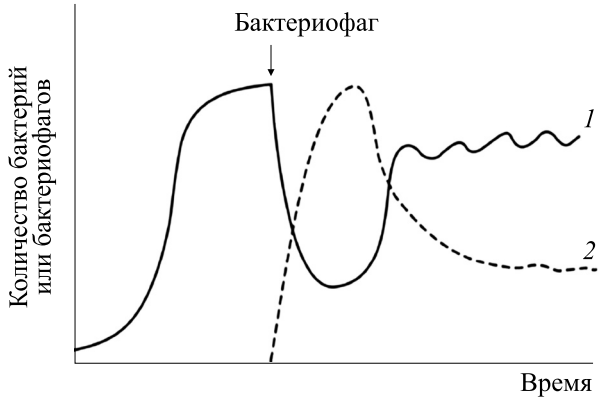


Рис. 7. Динамика колонии бактерии *Escherichia coli* с адаптивной антивирусной системой CRISPR-Cas после заражения вирусом-фагом: *1* – численность бактерий, *2* – вирионов [26].

в пробирке с вирусом и кишечной палочкой процессов. В 2020 г. была присуждена Нобелевская премия за исследование механизма действия CRISPR-Cas9, но в области геномного редактирования, а не бактериологии. Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами CRISPR в геноме многих бактерий, представляли вирусные «сигнатуры» для внутриклеточного антивируса, действующего по принципу молекулярных ножниц, средствами для опознавания и разрезания чужой ДНК эндонуклеазой Cas. Как знает любой пользователь персонального компьютера, сигнатуры для антивирусов нужно обновлять регулярно. Горизонтальный перенос генов среди бактерий [29] позволяет быстро преодолеть острый кризис и создать новое равновесие. Сейчас возможности геномного редактирования кажутся нам безграничными – от создания устойчивых сортов картофеля до решения проблем онкологии [30], но когда-то CRISPR у *E. coli* сократил перспективы бактериофагов в лечении.

Таким образом, мы рассмотрели два динамически схожих случая прохождения кризиса «бутылочного горлышка», вызванного различными биологическими причинами, но имеющими общий принцип запаздывающей регуляции и адаптации. Сценарии у Гаузе не предполагали эволюционной адаптации, только создание пространственной неоднородности. Однако для многих вселений насекомых и рыб адаптация – важнейший фактор [31]. По описанному сценарию с кризисом развиваются отдельные нежелательные для нас процессы, потому интересно получить и сравнить математические модели обоих вариантов динамики.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СЦЕНАРИЕВ ЗАПАЗДЫВАЮЩЕГО ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ

Предложим модели, которые будут способны феноменологически описывать экстремальные ситуации после первой фазы активной инвазии. Инвазии делают поведение биосистем менее предсказуемым [32]. В водоемах безобидные донные вселенцы на самом деле могут запускать цепочку изменений в потоке переноса органических веществ [33]. В работе [6] подробно изложена история появления идеи моделирования с учетом эффекта проявления запаздывания в биологических системах и «эредитарности» по [34], – зависимости функционала *регуляции* процесса от ряда предшествующих состояний системы [35]. Методик вычислительного описания временного последействия известно четыре. Наиболее обосновано и часто применяемыми являются дифференциальные уравнения с отклоняющимся аргументом. Метод В. Вольтерра с интегро-дифференциальными системами и дискретные функциональные итерации [36], включающие рекурсионное звено вычислений $x_{n+1} = \Psi(x_n, x_{n-1}) - Q(x_{n-i})$, применяются реже. В работе [37] предложено непрерывно-событийное представление модельного времени для гибридных моделей с учетом влияния стадийности онтогенеза и задержки развития при малой скорости роста особей на их выживаемость.

Современный обзор результатов в области разработки модификаций непрерывных эредитарных моделей математической биологии проведен в работе [38]. Важно понимать несколько особенностей применения уравнений с запаздыванием при сущностной биологической интерпретации результатов вычислений, часто в форме релаксационных колебаний [39]. При выборе методики моделирования необходимо представить заранее, что, усложняя модель, мы сужаем диапазон значений в пространстве ее параметров, при котором поведение траектории будет для нас интересно и биологически обосновано. Популяционные модели с большим числом бифуркационных параметров часто демонстрируют нелинейные явления, которые оказываются за рамками сущностной экологической интерпретации. Подобные эффекты с метаморфозами аттракторов, возникновением «окон периодичности» и удвоением периода цикла связаны с переходом к хаотическому поведению траектории, что трудно предвидеть.

Уравнения с запаздыванием появились в математической биологии для описания флуктуаций численности – возникающих циклических режимов различной формы [40]. Как известно [41], популяционные циклы образуются у изолированных популяций с большим репродуктивным потенциалом даже при постоянстве лабораторных условий. На амплитуду колебаний в лабораторных опытах может оказывать влияние скорость

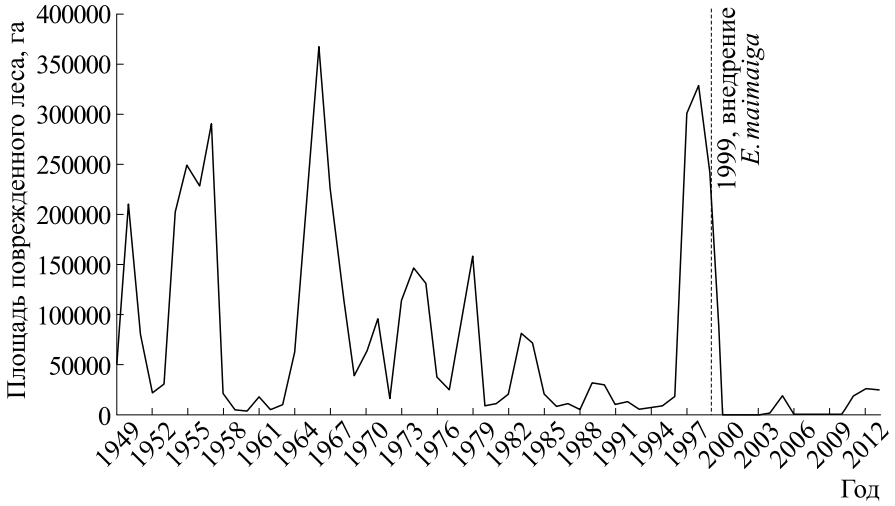


Рис. 8. Динамика серии затухающих вспышек непарного шелкопряда *Lymantria dispar* в Болгарии по величине площади пораженного леса с 1949 по 2013 г. [52].

восполнения питательных веществ [42], как в известных опытах Николсона с мухами *Lucilia cuprina* [43].

Наиболее известны в популяционном моделировании три уравнения с запаздыванием, способные генерировать колебания, в том числе сложной формы [44], – модели Хатчинсона, Николсона и Гополсами, имеющие ряд модификаций [45]. Появлению устойчивого цикла $N_*(t)$ вокруг теряющей устойчивость стационарной точки отвечает наиболее распространенная бифуркация Андронова–Хопфа, отражающая мягкую потерю устойчивого режима [46]. Для моделирования установившихся гармонических колебаний у изолированной популяции без внешних факторов воздействия, или явления «овершута» – краткого превышения при инвазии быстро растущей популяцией K-емкости ниши $\exists t_m < t_c$, $\forall N(0) < K: N(t_m) > K$, $N(t_c) < K$, используются модификации модели Хатчинсона. Предложенное в работе [47] Райтом уравнение (4) на основе идей Г. Хатчинсона в свою очередь является расширением модели Ферхюлста с запаздыванием τ при регуляции размножения:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\left(1 - \frac{N(t-\tau)}{K}\right). \qquad (4)$$

Режим затухающих осцилляций $\lim_{t\to\infty} N_*(t) = K$ можно получить в (4) при $1 < r\tau < \pi/2$, $N(0) < K$, но мы не сможем получить в (4) сценарий остановки колебаний со снижением до минимальной стабильной группы особей $\lim_{t\to\infty} N_*(t) = L$, даже с независимой убылью. При $r\tau = \pi/2 + \varepsilon$ точка-фокус потеряет устойчивость и реализуется бифуркация рождения цикла [48]. Гармонические колебания с равномерным затуханием редко встречаются в экологической реальности. Известные циклы у мелких грызунов в северных широтах представляют собой череду увеличивающихся годовых значений численности поколений с резким максимумом в конце периода. После максимума популяция снова приходит к минимальному L-уровню [49].

Пилообразные вспышки у насекомых-вредителей представляют собой отдельные серии спорадических Λ-образных пиков с тенденцией уменьшения амплитуды, где максимальным часто оказывается второй пик [50]. Нами показано, что сценарий, известный в динамике насекомых-вредителей как «sawtooth-like oscillation» – пилообразная вспышка численности с разновеликими затухающими пиками, отличается от иных вариантов развития вспышек [51]. Для нарушения равновесия и для запуска очередного переходного режима колебаний сценарий требует внешнего воздействия. На рис. 8 представлена динамика серии затухающих вспышек непарного шелкопряда *Lymantria dispar* в лесах Болгарии. Очередная серия в 2000 г. резко завершилась на десятилетие из-за активности энтомапатогенного грибка *Entomophaga maimaiga,* нового паразита для гусениц [52]. Со временем при совместной эволюции некоторые насекомые, как, например, уже приспособившиеся термиты, приобретают способность чувствовать и избегать опасные грибки.

Сценарий кратких вспышек, характерных для динамики псиллид на юге Австралии, представляет особое явление в биокибернетике с другим механизмом регуляции – пороговым развитием фаз процесса [53]. Порог численности для начала вспышки у Psyllidae достижим из состояния стохастических колебаний. Наличие порога связано с активностью ос-сверхпаразитов. Вспышка у псиллид завершается переходом к долгому аперио-

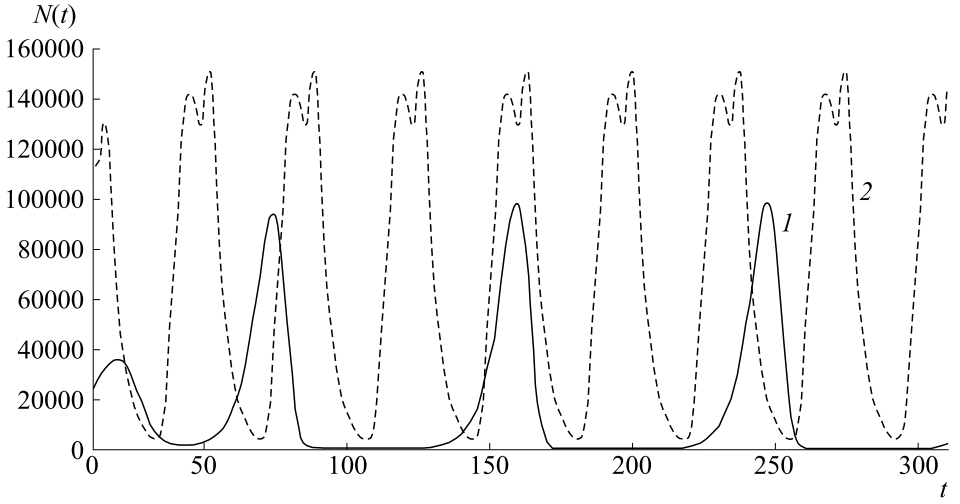


Рис. 9. Сравнение динамики колебательных режимов (4) и (7) при одинаковых τ: *1* – релаксационный цикл в модели Хатчинсона (4), *2* – флуктуации в уравнении Николсона (7).

одическому режиму. Пороговые эффекты важны для промысловых популяций как причина коллапса запасов [54].

Известной проблемой модели (4) при практическом применении уравнения становится свойство, когда при увеличении значения $r\tau$ образующийся цикл негармонической формы с увеличением амплитуды получает минимумы в окрестности нуля: $\lim_{t\to\infty} \min N_*(t,r\tau) = 0 + \varepsilon$. Продолжительные глубокие «околонулевые» минимумы не соответствуют наблюдениям о популяционной динамике видов, для которых отмечены эруптивные фазы при стремительном развитии вспышек численности. Масштабы вспышек численности вредителей отражают размеры пораженных ими лесных площадей. Отсутствие погибшего леса в графиках отчетов лесного хозяйства означает, что локальная популяция находится в состоянии со стабильной разреженной плотностью, но совсем не близка к вымиранию. Таким образом, при увеличении значения $r\tau > 3\pi$ модель Хатчинсона теряет возможности популяционной интерпретации колебаний, так как в длительном малочисленном состоянии велика роль любых случайных возмущений даже для популяции без действия эффекта Олли.

Для преодоления недостатков циклического решения уравнения (4) была предложена модель Гополсэми [55], где действующая емкость экологической ниши уже не статична:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\left(\frac{K - N(t-\tau)}{K + jN(t-\tau)}\right). \qquad (5)$$

Модель (5) мы модифицировали, неравномерно увеличив нелинейности в числителе и в знаменателе, чтобы следующий пик колебаний начинался от положения $\min N_*(t,r)$ выше стабильного L-порога численности, а $\Psi(N^k(t-h))$ нормирует скорость затухания колебаний:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\left(\frac{C - N^2(t-\tau)}{K + \gamma N^3(t-\tau)}\right) - \Psi[N^k(t-h)], C < K. \qquad (6)$$

Для разрушающих среду видов вредителей емкость ниши здесь не остается статичной. Альтернативными модификациями для моделей (4) и (5) можно считать уравнения без явной фиксации уровней, как достижимого оптимального значения численности C или использования предела емкости экологической ниши K. Уравнение blowflies equation было предложено для описания данных (подсчета личинок и имаго) экспериментов с лабораторной популяцией мух при большой амплитуде колебаний [56]:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t-\tau)\exp(-bN(t-\tau)) - \delta N(t), \qquad (7)$$

где δ – показатель независимой смертности. Модель (7) допускает апериодический режим флуктуаций при увеличении τ (рис. 9). Эксперименты, описанные в работе [56], подразумевали конкуренцию между личинками и имаго. Модель blowflies equation только феноменологически описывает релаксационные колебания общей численности, используя свойства функции Рикера.

Обобщение моделей (4) и (7) в модель (8) для возрастной структуры не получило широкого применения:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = r\left(1 - \frac{1}{K}\int_{-\tau_1}^{-\tau_2} dv(s)N(t+s)\right)N(t)\,e^{-bN(t-\tau)}. \quad (8)$$

Вместо экспоненциальной функции регуляции Рикера $f(x) = axe^{-bx}$ при модификации модели (7) можно использовать неунимодальную функцию $f(x)$ для формализации внутривидовой конкуренции без использования фиксированных значений численности порогов конкуренции или насыщения ниши. Унимодальные варианты $f(x)$ рассмотрены в работе [57]. Отдельно можно рассмотреть модификации с использованием идеи модели Базыкина о влиянии критически низкой численности L в виде $(N - L)$, но с введением запаздывания, как в модели Хатчинсона:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\left(1 - \frac{N(t-\tau)}{K}\right)(N(t) - L)^{\nu}. \quad (9)$$

Наблюдаемая нами цикличность численности вида в реальности может быть связана с существованием репродуктивно изолированных субпопуляций. Такие группы промысловая статистика не имеет возможности различать в отчетах, как отмечено для волжской севрюги [58]. Общие данные статистики о популяциях со сложной структурой вводят в заблуждение.

Для моделирования кризисных эффектов при быстрой инвазии необходимо расширить применяемые методы описания динамики с запаздыванием не только для внутривидовой регуляции, но и оказываемого противодействия, которое в свою очередь может изменяться пороговым образом, например, из-за разной начальной дозы заражения гриппом [15].

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ЗАПАЗДЫВАНИЯ В РЕГУЛИРУЮЩЕМ ФУНКЦИОНАЛЕ

В развиваемой нами методике моделирования параметр запаздывания для динамики размножающихся в конкурентной среде популяций нужно трактовать как агрегированную характеристику, появляющуюся при наложении нескольких биосистемных факторов и частных сопутствующих процессов. Временное последействие в составе *регуляторных* функций разрабатываемых уравнений относится не к характеристикам отдельного биологического вида, а к системному взаимодействию с участием окружения вида, часто не явному, а опосредованному. В модели протекания вирусной инфекции при разной силе иммунного ответа (3) мы выделили отдельно репликационный и адаптационный временные показатели для явлений запаздывания при активации разных компонентов иммунитета.

Онтогенетическая задержка развития половозрелого организма – только один из временных факторов и значимый далеко не для всех ситуаций. Важнее те показатели задержки, что регулируют репродуктивную активность. Величину τ в модели разрушения осцилляций (2) мы полагаем результатом *взаимодействия* вида и конкретной биотической среды, формирующегося в данном ареале. Величину действующего запаздывания популяционных моделей могут составлять онтогенетические свойства, интервалы времени этапов развития, скорость восстановления необходимых для жизни вида ресурсов, время миграции и др. При инвазиях значимо время выработки ответа со стороны паразитов или патогенов. Для борьбы иммунитета и вируса в организме запаздывание – индивидуально зависимая характеристика всех реакций активации, среднее значение может варьироваться в локальных субпопуляциях.

В работе [59] показано, что репродуктивную составляющую популяционной модели $rN(t)$ адекватнее представлять без запаздывания, но для пространственной компоненты величина τ будет значима. Уравнения с запаздыванием $N(t-\tau)$ широко применяются не только для описания колебательной динамики популяций [60] или при моделировании иммунных реакций (в современном развитии работ Г.И. Марчука [61],) но и для анализа внутриклеточных процессов, например, для синтеза белков, репликации нуклеиновых кислот и др. В работе [62] при моделировании альтернативного сплайсинга РНК параметр запаздывания аналогично трактовался как агрегированная величина из двух основных составляющих, суммарного времени сплайсинга пре-мРНК в мРНК и транспорта мРНК из клеточного ядра в цитоплазму клетки. При построении моделей жестко контролируемых процессов важно сохранять поведение траектории предсказуемым в вычислительных экспериментах, так как решение может стать чувствительным по отношению к малому возмущению начальных условий $N(0) \pm \varepsilon$ и выбору функции-предыстории ϕ_0 на интервале времени $\phi_0(\zeta), -\tau \le \zeta < 0$.

Исходя из изложенных принципов о роли регуляции с последействием, модификации наших уравнений будут включать внутреннюю регуляцию репродуктивной активности с τ (возможно, с использованием пороговых состояний численности вида) и отдельно функционал запаздывающего внешнего противодействия среды. Используем логарифмическую функцию регуляции $\ln(K/N)$ в модели как базовую для дальнейших специальных модификаций при стационарной емкости ниши, какая существовала в опытах с инфузориями и бактериофагами:

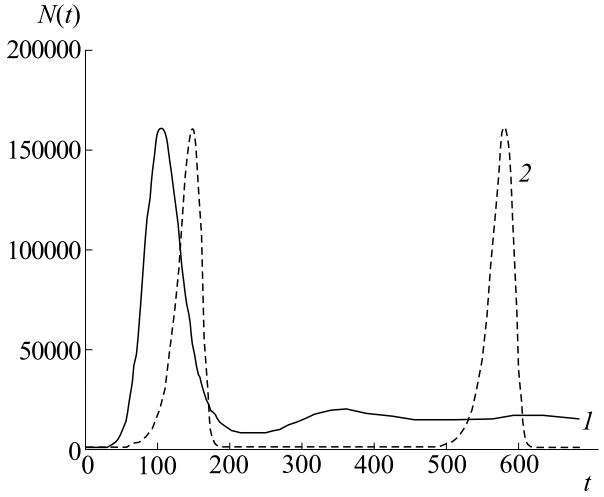


Рис. 10. Сравнение динамики моделей при одинаковых K = 15000, τ = 48, $N(0)$ = 15: *1* – единичная вспышка в нашем уравнении (10) при r = 0.0175; *2* – релаксационный цикл в модели (4) при r = 0.07.

$$\frac{dN}{dt} = r\ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right)N(t). \qquad (10)$$

В модели (10) можно получить затухающие и циклические колебания, но экологически более интересным представляется другой вариант поведения решения уравнения. Данный сценарий осцилляционного достижения балансового равновесия в решении уравнения (10) отличается от сценариев известных моделей и возможен, когда $N(0)$ мало, но τ достаточно велико (рис. 10). Параметры в сравнительном вычислительном эксперименте подобраны для совпадения значений максимумов у решений уравнения Хатчинсона (4) и нашей базовой модели (10).

При стремительной инвазии изначально малая группа вида-вселенца за некоторое, но ограниченное короткое время после вселения может быстро достичь огромной численности ($N(t_K) >> K$), на порядок превосходящей итоговое равновесие со средой. Стремительный рост сменяется аналогичным резким сокращением популяции и осцилляциями вокруг равновесия, и такой слабо колеблющийся диапазон численности не оказывает давления на среду. Динамика концентрации бактериофага в экспериментах после внесения вируса укладывается в полученный сценарий, но антагонисты бактерии демонстрируют качественно иной путь.

К вспышке по сценарию (10) способна исходная группа с $N(0)$ значительно меньше K. Известны другие опытные примеры остановки вспышки. Так, после начала искусственного выращивания деликатесного гребешка *Chlamys farreri* в морских садках удалось быстро увеличить его продукцию (рис. 11). Потом вирусная инфекция в 1997 г. в шесть раз сократила производство гребешка, и никакими мерами не получилось восстановить производство до объемов 1996 г. [63]. Неоднократно попытки борьбы с вредителями путем создания стабильных популяций выпускаемых паразитических наездников заканчивались неудачей. Сокращение численности отмечалось недавно, например, даже для инвазионных моллюсков из семейства Dreissenidae, заполонивших водоемы в Северной Америке и ставших в США большой экономической проблемой. Инвазивные виды моллюсков *Dreissena polymorpha* и *D. rostriformis bugensis* начали так конкурировать между собой [64], что их совокупная плотность биомас-

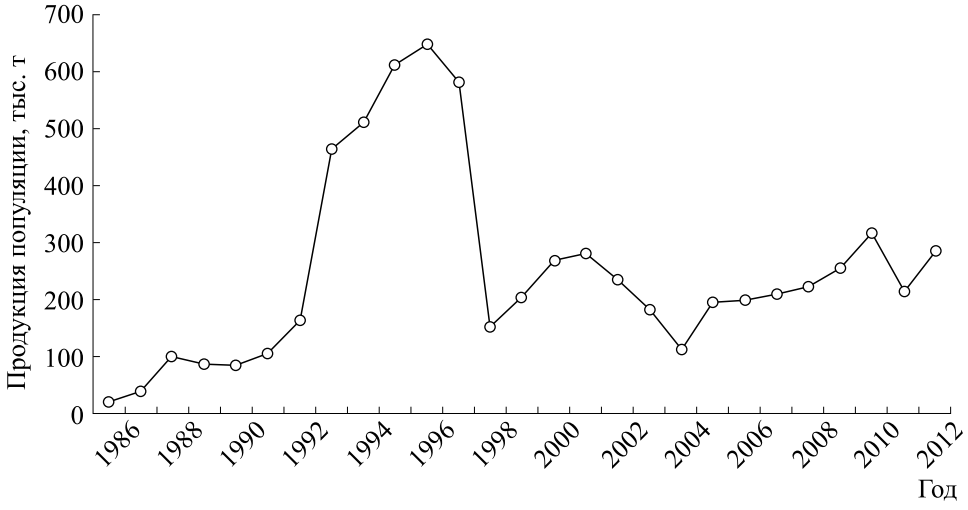


Рис. 11. Продукция в тыс. тонн искусственной популяции морского гребешка *Chlamys farreri* с кризисом в 1997 г. из-за эпизоотии, вызванной вирусом герпеса устриц [63].

сы будет меньше, чем когда нишу захватывает один из видов.

Модель описывает единичный всплеск численности инвазивного вида. Повторные пики численности [65] после первичной вспышки характерны для насекомых, повреждающих лес. Вредители переходят к пилообразным колебаниям, о которых писали выше. Сценарий развития с Λ-образных кратких вспышек у тлей и псиллид требует других метаморфоз аттракторов [66]. Динамика модели (10) не описывает случай перетекания острой вирусной инфекции в хроническую болезнь, так как в таком сценарии высокая вирусная нагрузка фиксируется продолжительное время около *неустойчивого* равновесия – предела развития.

МОДЕЛЬ «СЦЕНАРИЯ ГАУЗЕ» С РАЗРУШЕНИЕМ КОЛЕБАНИЙ

Давление со стороны среды может линейно зависеть от предшествующего состояния вселенца. Учтем теперь в модификации с фактором противоборства модели (10) отложенную реакцию биотической среды, но пожертвуем удобным свойством $\forall t$, $N(0) > 0$, $N(t) \geq 0$:

$$\frac{dN}{dt} = r\ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right)N(t) - \delta N(t-\tau_1), \qquad (11)$$

где δ – показатель фактора убыли, обусловленного действием паразитов или вирусных инфекций. Поведение модели (11) в вычислительном эксперименте показывает прекращение существования популяции только после повторной вспышки. Второй максимум решения превосходит первый пик активности (рис. 12), но вторая точка минимума находится вне допустимых значений, и в расчетах модели при $N(t > \tau) < -\varepsilon$ вычислительный эксперимент завершается алгоритмом инструментальной среды с фиксацией гибели популяции.

Модель (11) феноменологически воспроизводит динамику эксперимента Гаузе с инфузориями, но это лабораторный и искусственный сценарий *in vitro,* где гибель хищника-вселенца определена нехваткой быстро истраченных пищевых ресурсов. Момент t_0 времени исчезновения $N(t_0) = 0$ для (11) зависит от $N(0)$, при начальных условиях $N(0) = 100$ максимум будет единственным. Сценарий с исчезновением наблюдается в решении (11) для больших значений *r*-параметра, при уменьшении *r* можно увидеть регулярные колебания $\min N_*(t) > \varepsilon$. Наиболее известный нежелательный инвазивный вид, для которого неоднократно описано спонтанное исчезновение после вспышки – аргентинский муравей *Linepithema humile.* В Новой Зеландии агрессивный вселенец создал крупные колонии, но потом

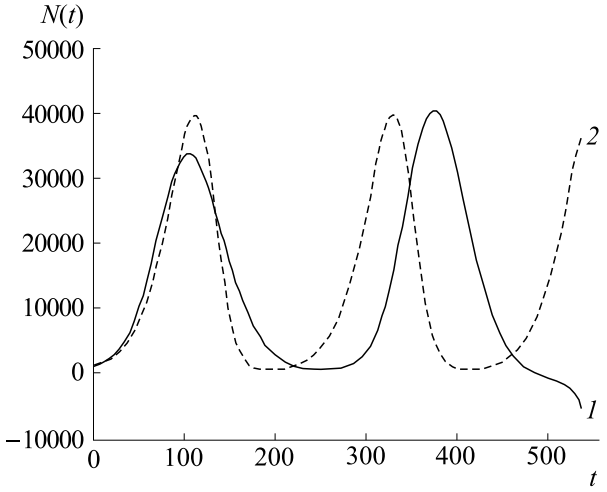


Рис. 12. Сценарий гибели популяции после второго максимума колебаний: *1* – решение модели (11) при $r = 0.0175$, $\delta = = 0.007$, $N(0) = 10^3$, $\tau = \tau_1 = 48$, $K = 15000$; *2* – поведение уравнения (4) с аналогичной модификацией с δ при $r = 0.05$.

произошел их внезапный коллапс, а вытесненные им автохтонные виды муравьев восстановили ареал [67].

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ КРИЗИСА «БУТЫЛОЧНОГО ГОРЛЫШКА»

Сценарий гибели инвазивных популяций, активно истощающих необходимые им ресурсы и столкнувшихся с линейно заданным противодействием с запаздыванием, является актуальным для ситуации мер искусственного подавления нежелательных вселенцев. В современной практике все чаще одни виды-интродуценты (например, паразитические перепончатокрылые) используются для борьбы с другими вселенцами в качестве средств биологического контроля [68], но полного подавления удается добиться редко. Интересен опыт Южной Кореи по длительной систематической борьбе с карантинным вредителем американской белой бабочкой *Hyphantria cunea* [69]. В моделируемом сценарии вырабатываемое средой (или интродуцентом) противодействие может определяться состоянием инвазивной популяции на пике численности и в момент времени, когда численность популяции по независимым причинам прошла свой максимум.

Внешнее давление может быть организовано сложнее, чем пропорциональное изъятие $-\delta N(t-\tau)$. Реакция выпускаемых паразитических ос определена кучностью их жертв, а патогенные вирусы начинают быстрее распространяться в плотных скоплениях. Часто активно размножающегося вселенца настигает эпизоотия при повышении

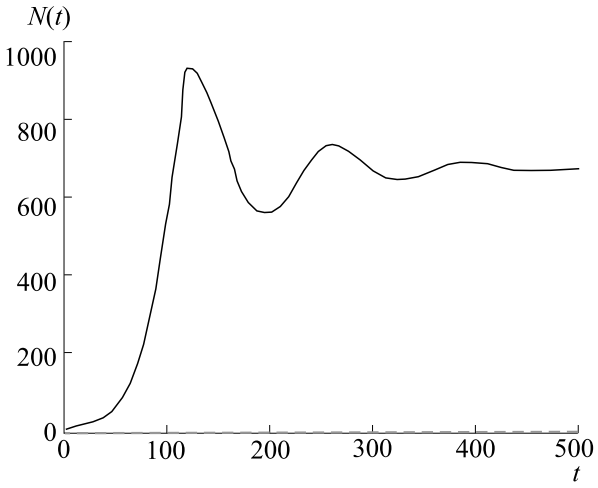


Рис. 13. Сценарий кризиса быстрорастущей популяции в модели (12) при $r = 0.0717$, $K = 15000$, $\tau = 48$, $\delta = 10$, $J = 10^3$, $q = 0.0042$, $m = 2$, $N(0) = 10$.

численности задолго до уровня, когда опасный вселенец сможет сам разрушительно воздействовать на среду, при приближении к некоторому порогу численности $J < K$. Рассмотрим третью модификацию модели для наиболее интересной ситуации, когда запаздывающее противодействие быстро растущей популяции задается нелинейно и пороговым образом:

$$\frac{dN}{dt} = r\ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right)N(t) - \delta\frac{N^m(t-\tau)}{(J-N(t))^2} - qN(t), N(0) < J \ll K, \quad (12)$$

где J – пороговый уровень для усиления агрессии биотического окружения, m – показатель силы реакции среды на плотность вселенца. Усложненный с точки зрения биологической кибернетики механизм регуляции неожиданно ведет к более пластичному сценарию эволюции. Увеличение численности от исходной малой группы $N(0) < J$ в первой стадии процесса идет по обычному логистическому закону, но вместо $N(t) \to K$ оказывается в переходном режиме колебаний гораздо раньше, чем в моделях (4) или (7). В новой модели (12) вместо плавного замедления роста после точки перегиба или остановки в стадии с превышающим «овершутом» $N(t_K) > K$ начинается этап резкого кризиса при $t > 2\tau$ (рис. 13). Обобщенно модель с постоянными факторами запаздывания τ, h представляется балансом функции регуляции эффективности воспроизводства Φ и функции противодействия биотической среды Ψ, где важнейшим является соотношения показателей m и d:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\Phi[N^d(t-\tau)] - \Psi[N^m(t-h)].$$

При приближении к порогу $N(t) \to J$ убыль резко превосходит рождаемость, и популяция проходит состояние «бутылочного горлышка». В результате прохождения кризиса траектория решения стремится к равновесию на уровне меньше J, показатель m определяет глубину кризиса. При $q = 0$ сохраняется колебательная динамика. Модель применима для сценария инвазии малочисленных групп, при приближении начальных условий к порогу J кризис становится критическим V-образным, при $N(0) > J$ решение уравнения (12) продемонстрирует одну из форм логистического роста. Значительная величина τ в модели не приводит здесь к устойчивому циклу. Величина порога J по своей сути в нашей модели зеркальна величине L в модели (9) как нижней пороговой численности особей из модели Базыкина, предложенной им для описания действия эффекта Олли. Причины возникновения пороговых состояний для популяций и переходных барьеров в экодинамике рассмотрены в [70]. Пример возникновения порога сверху, который создается из-за активности сверхпаразита, приведен в работе [71] о механизмах регуляции размножения эвкалиптовых псиллид. Порог, который преодолевает популяция в дискретной модели с бифуркационным завершением вспышки, возник не у самих вредителей, а у их естественных врагов из-за атак сверхпаразитов [72]. В работе [73] отмечено, что удельная эффективность паразитизма специально выпускаемых наездников семейства Trichogrammatidae возрастает с увеличением плотности яиц бабочек.

В результате образующаяся инвазивная популяция с большим репродуктивным потенциалом может продемонстрировать опасную вспышку численности, только если выполнится условие $N(t) > J$, но при этом оказываемое сильное сопротивление не приводит к критическому минимуму численности. Популяция успешно проходит «бутылочное горлышко», так как давление среды на популяцию, зависящее от предшествующего ее состояния, ослабляется, если *текущая* численность становится значительно меньше порога.

Модель с усложненной регуляцией противодействия среды оказывается примером адаптационной динамики при прохождении глубокого кризиса, подобного ситуации колонии бактерий с противовирусным механизмом CRISPR после интродукции вируса-бактериофага. Полученный в новой модели сценарий актуален не только для коэволюции паразита/хозяина. Насекомые вредители аналогично приспосабливаются к выводимым устойчивым сортам генетически модифицированных растений [74]. Бактерии и миксомицеты ведут химическую войну, в результате которой был открыт пенициллин, но со временем первые антибиотики потеряли эффективность.

Инвазионные виды часто нарушают баланс в трофической цепи [75], запуская эффект домино и вызывая резкие колебания у других видов. Предложенные уравнения пригодны для использования в составе систем для моделирования непосредственного трофического взаимодействия. В уравнение (12) вместо q можно ввести явное влияние вида-антагониста P:

$$\frac{dN}{dt} = r\ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right)N(t) - \delta\frac{P^m(t-\xi)}{(J-N(t))^2}. \qquad (13)$$

Для описания эффекта убежища (рефугиума) с возможностью исчезновения реликтовой малочисленной популяции можно использовать степень 1/3 для действия нижнего L-порога:

$$\frac{dN}{dt} = r\ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right)N(t)\sqrt[3]{N(t-\kappa)-L} - \Psi[P(t-\xi)],\ 0 < \kappa < \tau. \qquad (14)$$

Динамику конкурирующего при взаимодействии вида $P(t)$ интересно описывать с колебаниями по другому механизму регуляции, что мы обсудим в следующей статье. Предложенные модели (12) и (14) объясняют многочисленные примеры неудачных целенаправленных интродукций.

Дальнейшее усложнение поведения траектории решения, например, с введением в балансовое уравнение для $\Phi[N^d(t-\tau)]$ и $\Phi[N^d(t-\tau)]$ функций Бивертона–Холта или Рикера, как было выполнено в работе [76], не представляется биологически обоснованным. В работе [77] показано, в каких случаях при вычислительном анализе лучше избегать излишней нелинейности в моделях биосистем, как хаотизации по сценарию Фейгенбаума с бесконечным каскадом бифуркаций периода $p = 2^i$, $i \to \infty$ цикла $\varphi(x^*)^n = \varphi(x^*)^{n+p}$ у итераций $x_{n+1} = \varphi(x_n)$. В итерационных моделях избыточных эффектов может быть несколько, например, разрушение странных аттракторов, образование фрактальных границ областей притяжения, появление окон периодичности с переходами «хаос ↔ цикл», где циклы подчиняются порядку теоремы А.Н. Шарковского [78], но не экологическим принципам. Для каждого математического эффекта, возникающего в предложенной модели, необходима сущностная биологическая интерпретация. Для ситуации при управляемом антропогенном воздействии или модели сценария кризиса, вызванного эксплуатацией биоресурсов, целесообразно разрабатывать гибридные модели с событийным преставлением времени [79], так как необходимо формализовать логику управления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В предложенных четырех моделях (10), (11), (12) и (14) для специфических случаев популяционных процессов мы рассмотрели варианты резких изменений численности, которые некоторыми авторами относились к типу «эруптивных» экологических процессов или, по терминологии современных работ, динамике формы «Boom and bust» [80]. Для каждой из моделей мы указали примеры экологических ситуаций, наиболее соответствующие полученному поведению решения уравнения. Согласно классификации в работе [81], процессы изменений в биологических сообществах различаются по формам как «градиентные» или «эруптивные». Градиентные случаи легко объяснимы, например, сукцессия. Ситуация изменилась в пользу одного из видов независимо от него, что можно отразить увеличением K, и последующим монотонным, хоть и быстрым, ростом численности. Эруптивная и немонотонная динамика на самом деле многообразна, не ограничивается цикличностью фаз роста и снижения у видов-конкурентов и представляет отдельную проблему для методики моделирования биосистем.

В работе [82] отмечено 16 ситуаций, когда наблюдалось стремительное распространение инвазионного вида, но затем следовал аналогичный

стремительный коллапс. Явление коллапса авторами трактуется как снижение численности на 90% от оптимума, и такое снижение длится не менее трех лет. Мы рассмотрели варианты в моделях (10) и (12), когда фазы стремительного увеличения перемежаются с глубокими кризисами, вплоть до риска внезапного исчезновения в модели (14). Удалось продемонстрировать на примерах графиков из опытов Гаузе и экспериментов с бактериофагами, что можно эффективно использовать уравнения с запаздыванием не только для классической задачи моделирования эндогенных долговременных и устойчивых осцилляций численности [83] или затухающей серии пилообразных вспышек бабочек. Включение в модели с $N(t-\tau)$ порогового регулирующего функционала $\Psi[N(t-h)]$ актуально и для описания свойств экстремальных форм инвазивной динамики и для сценариев с быстрой адаптацией. Анализировать запаздывание при регуляции актуально для процессов различной природы [84], имеющих несколько выраженных отдельных стадий развития и условий переходов между стадиями.

Линейное и зависимое от предшествующего состояния внешнее воздействие $\Psi = -\delta N(t-\tau)$ в модели (11) способно привести к гибели популяции. В модификации (12) в момент быстрого роста моделируемая популяция попадает в глубокий кризис раньше, чем достигает теоретически возможного уровня экологической ниши. Однако регуляция в этом сценарии сложнее, и это дополнение позволяет успешно миновать стадию бутылочного горлышка, что демонстрирует в опытах колония *E. coli*. Разработанные нами модели описывают сценарии смены динамических режимов без бифуркаций, такие переходы в сценариях не требуют изменений значений параметров по ходу модельного эксперимента. При моделировании процессов важно понимать, какие из наблюдаемых изменений допустимо представлять бифуркациями аттракторов – возникновением топологически неэквивалентных фазовых портретов у траектории при возмущении внутреннего параметра. Параметры в нелинейных моделях неравноправны по своему влиянию на топологию фазовых портретов. Сдвиг вектора параметров уравнения – это самый простой способ, но не всегда биологически обоснованный. Внутренние характеристики биосистем меняются эволюционно согласованно. В большинстве случаев скачкообразное изменение характеристик выглядит нереалистично (исключая быстрые мутации у вирусов и прокариотов), потому мы в серии работ развиваем иные математические средства.

Рассмотренная в модели (12) сложная пороговая регуляция, обоснованная тем, что вид-регулятор сам имеет ограничивающий фактор, не является уникальным явлением. Ситуация, когда один вид разрушает порог (или, наоборот, создает порог) без непосредственного взаимодействия встречается в нашей жизни. Из-за вирусной инфекции может начинаться бактериальная пневмония, если популяция альвеолярных макрофагов истощается [85]. Многоуровневые схемы регуляции для контроля размножения видов с высоким репродуктивным потенциалом интересны для биологической кибернетики, но сложны для непосредственного математического описания их звеньев. Скорость размножения видов и длина их жизненного цикла может оказаться в разных и даже в несравнимых временных масштабах. Упрощение до замкнутой системы «хищник–жертва» приводит к результату $N = 0$ из экспериментов Гаузе. Процесс эволюционной адаптации создает иногда неожиданные барьеры, которые препятствуют тотальному доминированию даже эффективного хищника или паразита [86]. Например, субвирусные паразиты вирофаги используют для своего размножения крупные вирусы, заражающие амеб, и так невольно повышают выживаемость самих амеб [87]. Бактерии рода Bdellovibrio паразитируют в других бактериях и могут в перспективе использоваться в клинической практике [88]. Самая сложная известная нам система обнаружена у плесневых грибков в тропиках [89], где борются десятки конкурирующих видов и химически подавляют друг друга. Острая конкуренция за ограниченный ресурс становится фактором активного видообразования, появления множества видов-эндемиков из одного семейства не только у микроорганизмов, как, например, в случае 35 видов рыб семейства Gobiidae в Каспийском море [90]. При изучении эволюционной борьбы в микромире предстоит еще много интересных для практики открытий, так, по-видимому [91], археи получили независимо от CRISPR-Cas бактерий отдельный антивирусный механизм.

При разработке систем уравнений согласно нашему принципу целесообразно разделять типы эффектов запаздывания. Мы выделили репродуктивное запаздывание, регуляционное запаздывание как фактор отложенной реакции среды и адаптационное запаздывание. Популяции (или организму) на выработку приспособительных реакций необходимо некоторое время, и такая величина задержки может изменяться в процессе инвазии. В интересных случаях развития инвазии происходит динамическая корректировка оказываемого воздействия со стороны биотической среды. Воздействию подвергается не просто численность популяции, как было в случае коллапса запасов трески Северной Атлантики из-за незначительной, но системной ошибки при определении допустимого промыслового изъятия *половозрелых* особей рыб [92]. Трансформируется функция регуляции эффективности воспроизводства, и показатель m в модели (12) может зави-

сеть от *t*. Существуют процессы, где все три фактора запаздывания могут конкурировать – различные средства иммунного ответа имеют разное время активации и ингибирования, как и циклы создания копий вируса. Дисрегуляция иммунного ответа, в том числе и особенно его гиперактивация, только усиливают патогенез инфекции COVID и ВИЧ [93]. Циклические решения при моделировании борьбы вирус/иммунитет неактуальны.

Отметим, что логико-алгоритмические методы способны учесть еще больше факторов событийных изменений при моделировании противоборства пространственно неоднородных популяций [94]. При распространении инвазивных видов в новом ареале часто возникают фронты повышенной плотности, что наблюдается и в обычных микробных сообществах [95]. В алгоритмы клеточных автоматов можно включать факторы запаздывания [96], но по специальным правилам [97]. В настоящее время перспективно развивать программные реализации интеллектуальных клеточных автоматов с вариабельной плотностью решеток клеток и со стохастической составляющей алгоритма, которые могут применяться для прогнозирования пространственно неоднородных процессов в биосистемах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-07-00125) и за счет бюджетной темы № 0073-2019-0003 Санкт-Петербургского Федерального исследовательского центра РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ю. Переварюха, Биофизика **66** (2), 384 (2021).
2. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., Биофизика **66** (1), 183 (2021).
3. Б. И. Кузник, В. Х. Хавинсон и В. С. Смирнов, Успехи геронтологии **33** (6), 1032 (2020).
4. А. Ф. Ванин, Биофизика **65** (4), 818 (2020).
5. A. Goyal, D. B. Reeves, and E. Cardozo-Ojeda, eLife **10**, e63537 (2021).
6. А. Ю. Переварюха, Биофизика **65** (1), 138 (2020).
7. M. Shrotri, M. van Schalkwyk, N. Post, and D. Eddy, PLoS One **16** (1), e0245532 (2021).
8. S. Fung, K. Yuen, Z. Ye, et al., Emerging Microbes & Infections **9** (1), 558 (2020).
9. A. Y. Perevaryukha, Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Prikladnaya Nelineynaya Dinamika **25** (2), 51 (2017).
10. M. Sakharkar, G. Rappazzo, and W. Wieland-Alter, Science Immunol. **6** (56), eabg6916 (2021).
11. F. Tavasolian, M. Rashidi, and G. R. Hatam, Front. Immunol. **11** 601886 (2021).
12. Ю. Д. Нечипуренко, А. А. Анашкина и О. В. Матвеева, Биофизика **65** (4), 824 (2020).
13. R. Shukla, V. Ramasamy, R. Shanmugam, et al., Front. Cell. Infection Microbiol. **10**, 572681 (2020).
14. N. Suryadevara, S. Shrihari, P. Gilchuk, and L. A. Van Blargan, Cell **184**, 1 (2021).
15. C. van Eeden, L .Khan, and M. S. Osman, Int. J. Mol. Sci. **21** (17), 6351 (2020).
16. M. Larsen, L. de Graaf, and E. Sonneveld, Science **371** (6532), eabc8378 (2021).
17. K. McMahan, J. Yu, N. Mercado, et al., Nature **590**, 630 (2021).
18. I. Marois, A. Cloutier, E. Garneau, and V. Richter, J. Leukocyte Biol. **92** (1), 107 (2012).
19. 19. S. Colledge, J. Conolly, and E. Crema, Quaternary Res. **93** (3), 1 (2019).
20. А. Ю. Переварюха, Биофизика **61** (2), 395 (2016).
21. J. Javidpour, C. Molinero, and E. Ramírez-Romero, Commun. Biol. **3** 212 (2020).
22. D. Simberloff and L. Gibbons, Biol. Invasions **6** (2), 161 (2004).
23. C. V. Pushkin, Rus. J. Biol. Invasions 1, 42 (2008).
24. G. F. Gause, *The Struggle for Existence* (Williams & Wilkins, Baltimore, 1934).
25. Г. М. Заславский, *Стохастичность динамических систем* (Наука, М., 1984).
26. R. E. Lenski, Adv. Microb. Ecol. **10**, 1 (1988).
27. T. Andreadis and R. Weseloh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (7), 2461 (1990).
28. C. Diez-Villasenor, C. Almendros, and J. Garcia-Martinez, Microbiology **156** 1351 (2010).
29. К. С. Пугач, А. В. Лопатина и К. В. Северинов, Молекуляр. биология **46** (2), 195 (2012).
30. Н. А. Жигалова, С. В. Женило, А. В. Артемов и Е. Б. Прохорчук, Молекуляр. биология **51** (5), 836 (2017).
31. В. Г. Ильичев, Биофизика **57** (2), 356 (2012).
32. А. Б. Медвинский, Биофизика **51** (6), 1033 (2006).
33. А. Е. Бобырев, В. А. Бурменский, Е. А. Криксунов и др., Биофизика **55** (6), 1138 (2010).
34. G. E. Hutchinson, Ann. N. Y. Acad. Sci. **50**, 221 (1948).

35. V. V. Mikhailov and Yu. S. Reshetnikov, Informatsionno-Upravliaiushchie Sistemy, No 4, 31 (2018).
36. А. И. Михайлов, А. Е. Бобырев, Т. И. Булгакова и А. Д. Шереметьев, Журн. общ. биологии **80** (6), 418 (2019).
37. А. Ю. Переварюха, Журн. общ. биологии **81** (3), 174 (2020).
38. S. Ruan, in *Delay Differential Equations and Applications* (Springer, Berlin, 2006), pp. 477–517.
39. A. Y. Perevaryukha, Cybernetics and Systems Analysis **52** (4), 623 (2016).
40. R. M. May, *Stability and Complexity of Ecosystems* (Princeton University Press, 1974).
41. J. Van Dyken, J. Theor. Biol. **460** (1), 115 (2019).
42. W. S. Gurney, S. P. Blythe, and R. M. Nisbet, Nature **287**, 17 (1980).
43. A. J. Nicholson, Aust. J. Zool. **2** (1), 9 (1954).
44. А. Ю. Колесов и Н. Х. Розов, Тр. мат. института им. Стеклова **277** 101 (2012).
45. А. Ю. Колесов и Н. Х. Розов, Мат. сб. **202** (6), 51 (2011).
46. G. Oster and J. Guckenheimer, in *The Hopf Bifurcation*, Ed. by J. Marsden and M. McCracken (Springer-Verlag, Berlin, 1976), pp. 327–345.
47. E. M. Wright, J. für die Reine und Angewandte Mathematik **194** (1), 66 (1955).
48. S. A. Kashchenko, Automat. Control Comput. Sci. **47** (3), 470 (2013).
49. C. J. Krebs and J. H. Myers, Adv. Ecol. Res. **8** (2), 267 (1974).
50. T. Royama, W. E. Mackinnon, and E. G. Kettela, Ecology **86** (5), 1212 (2005).
51. A. Y. Perevaryukha, Cybernetics and Systems Analysis **55** (1), 141 (2019).
52. M. Zubrik, A. Hajek, and D. Pilarska, J. Appl. Entomol. **140** (8), 565 (2016).
53. L. R. Clark, Austral. J. Zool. **12** (3), 362 (1964).
54. T. N. Solov'eva, Information and Control Systems **4**, 60 (2016).
55. K. Gopalsamy, *Stability and Oscillations in Delay Differential Equations of Population Dynamics* (Springer, Netherlands, 1992).
56. С. Д. Глызин, Моделирование и анализ информационных систем **3**, 365 (2017).
57. T. L. Kaplan and T. A. Yorke, J. Math. Analysis and Applications **48** (2), 317 (1974).
58. V. A. Dubrovskaya and I. V. Trofimova, J. Belarus. State University. Biology **3**, 76 (2017).
59. G. Bocharov and F. Rihan, J. Comput. Appl. Math. **125** (2), 183 (2000).
60. K. P. Hadeler and G. Bocharov, Canad. Appl. Math. Quarterly **11** (2), 159 (2003).
61. Г. И. Марчук, А. А. Романюха и Г. А. Бочаров, в сб. *Математические вопросы кибернетики* (Наука, М., 1989), вып. 2, сс. 5–70.
62. В. В. Когай, Т. М. Хлебодарова, С. И. Фадеев и В. А. Лихошвай, Вычисл. технологии **20** (1), 38 (2015).
63. G. Ximing and S. E. Ford, Philos. Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sci. **371** (1689), 206 (2016).
64. A. Y. Karatayev, L. E. Burlakova, and D. K. Padilla, Hydrobiologia **746**, 97 (2015).
65. A. N. Frolov, Entomol. Rev. **95** (2), 147 (2015).
66. A. Y. Perevaryukha, Entomol. Rev. **95** (3), 397 (2015).
67. N. Hanley and M. Roberts, People and Nature **1**, 124 (2019).
68. M. Cooling, S. Hartley, D. A. Sim, P. J. Lester, Biol. Lett. **8** (2), 430 (2012).
69. W. I. Choi and Y.-S. Park, Insect Sci. **19** (5), 535 (2012).
70. T. Andersen, J. Carstensen, E. Hernández-Garcia, and C. M. Duarte, Trends Ecol. Evol. **24** (1), 49 (2009).
71. L. R. Clark, Austral. J. Zool. **12** (2), 150 (1964).
72. A. Y. Perevaryukha, J. Comput. Systems Sci. Int. **60** (1), 87 (2021).
73. M. J. Grieshop, P. W. Flinn, and J. R. Nechols, J. Insect Science **10** (1), 99 (2010).
74. А. В. Русаков, А. Б. Медвинский, Б. Л. Ли и М. М. Гоник, Биофизика **54** (4), 733 (2009).
75. Б. В. Адамович, Р. З. Ковалевская, Н. П. Радчикова и др., Биофизика **60** (4), 769 (2015).
76. H. Wan and H. P. Zhu, Math. Biosci. Engineer. **11**, 1395 (2014).
77. Т. Ю. Борисова и И. В. Соловьева, Мат. машины и системы, № 1, 71 (2017).
78. О. А. Иванов, Вестн. СПбГУ. Математика. Механика. Астрономия **6** (3), 422 (2019).
79. V. V. Mikhailov and A. V. Spesivtsev, Studies Comput. Intelligence **868**, 449 (2020).
80. D. L. Strayer, M. D'Antonio, M. S. Fowler, and J. Geist, Ecol. Lett. **20**, 1337 (2017).
81. A. A. Berryman, in *Encyclopedia of Entomology* (Springer, Dordrecht, 2008).
82. K. Aagaard and J. L. Lockwood, Biol. Invasions **18**, 1667 (2016).
83. А. Е. Бобырев, В. А. Бурменский, Е. А. Криксунов и др., Биофизика **58** (2), 334 (2013).
84. И. В. Арженовский и А. В. Дахин, Регионология **28** (3), 470 (2020).
85. A. Smith and A. P. Smith, Sci. Rep. **6**, 38703 (2016).
86. Ю. С. Букин, Вавиловский журн. генетики и селекции **18** (2), 320 (2014).
87. B. La Scola, C. Desnues, and I. Pagnier, Nature **455**, 100 (2008).

88. D. Raghunathan, P. M. Radford, and C. Gell, Sci. Rep. **9** 4293 (2019).
89. P. T. H. Nguyen, O. V. Pettersson, and P. Olsson, Eur. J. Plant Pathol. **127**, 73 (2010).
90. В. В. Кузик, Т. Ю. Борисова и П. П. Гераскин, Журн. эволюц. биохимии и физиологии **56** (7), 623 (2020).
91. M. Pohlschroder and S. V. Albers, FEMS Microbiol. Rev. **42** (6), 719 (2018).
92. W. E. Schrank and N. Roy, Marine Resource Economics **28** 397 (2013).
93. Г. Р. Хасанова, И. Г. Мустафин и В. А. Анохин, Эпидемиология и инфекционные болезни, № 3, 47 (2012).
94. А. В. Яцишин, А. Ю. Переварюха и В. В. Михайлов, Мат. машины и системы, № 2, 90 (2019).
95. М. А. Цыганов и Г. Р. Иваницкий, Биофизика **51** (6), 1008 (2006).
96. А. Ю. Переварюха, Динамические системы **7** (2), 157 (2017).
97. A. V. Nikitina, V. M. Kozlov, and A. A. Filina, Comput. Math. Information Technol. **1** (1), 35 (2019).

Simulation of Scenarios of the Deep Population Crisis of the Rapidly Growing Population

A.Yu. Perevaryukha

St. Petersburg Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 14-ya Linia 39, St. Petersburg, 199178 Russia

The article is devoted to the modeling of threshold development of the population process during the formation of a new population in a competitive environment. Invaders with high reproductive activity often aggressively affect autochthonous biosystems. In the process of settling invaders in the area, a sharp turn on of biotic countermeasures until the exhaustion of resources for further growth in numbers can cause a deep population crisis for a new species. Many populations went through the bottleneck stage, including humans at the time of the Neolithic crash in Europe. Invaders with high reproductive potential in many cases have deleterious effects on biosystems. The emergence of effective competition can not only cause classical cyclical fluctuations, but also lead to the complete extinction of the population after a series of high peaks in its abundance. Two alternative scenarios are classical samples of situations of an induced population crisis. First, G. Gause conducted experiments with an introduction of predatory ciliates and two ciliates species were driven to extinction. Second, a series of experiments were carried out with bacteriophages that were introduced into colonies of actively dividing bacteria with a dynamically adapting antiviral mechanism. We have proposed modifications of the model for scenarios which are enough to constitute a crisis in population dynamics. In equations with deviating arguments in the time variable, a threshold level for activating the impact of biotic conditions on the reproduction of invasive species and an aggregated nature of the lagging regulation with two time factors are taken into account. The computational scenarios described both the effect of the completion of the process after a repeated outbreak, and the successful passage of the population crisis due to rapid adaptation. Deep crisis phenomena are characteristic of local population dynamics when organisms interact with viruses that are new to them.

Keywords: invasion scenarios, modeling of extreme population dynamics, biotic resistance, lagged threshold regulation, species extinction, Neolithic crash, biological pest control, immune response, CRISPR-Cas9

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1164–1170

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 528.88

РАННЕЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УРОЖАЙНОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР НА ОСНОВЕ СПУТНИКОВЫХ ДАННЫХ DOVE (PlanetScope)

© 2021 г. А.П. Шевырногов*, Д.В. Емельянов*, Н.О. Мальчиков*, Т.Н. Демьяненко, В.К. Ивченко**, И.Ю. Ботвич***

**Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50*

E-mail: irina.pugacheva@mail.ru

***Красноярский государственный аграрный университет, 660049, Красноярск, просп. Мира, 90*

E-mail: v.f.ivchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2020 г.
После доработки 29.09.2020 г.
Принята к публикации 07.07.2021 г.

Представлены результаты раннего прогнозирования урожайности яровой пшеницы на основе данных Dove (PlanetScope) компании Planet Labs с пространственным разрешением 3 м. Выполнено прогнозирование урожайности яровой пшеницы в начале июля в фазу колошения – начало цветения на основании линейной регрессионной модели, в качестве параметров использованы значения интеграла под кривой NDVI в разные периоды времени. Установлен вид множественной линейной модели для прогноза урожайности яровой пшеницы при восьми переменных (коэффициент детерминации – 0.86; среднеквадратичная ошибка прогноза – 3.77). Построена карта урожайности яровой пшеницы по спутниковым данным PlanetScope с пространственным разрешением 3 м. Полученная карта позволила выявить неоднородность уровня урожайности в пределах опытного поля. Проведенные исследования показали хорошую связь между интегралом NDVI и фактической урожайностью, полученной в конце вегетационного периода. Следовательно, промежуточные результаты внутрисезонных измерений могут быть использованы для коррекции дозы внесения удобрений.

Ключевые слова: точное земледелие, урожайность, вегетационный период, яровая пшеница, PlanetScope.

DOI: 10.31857/S0006302921060119

Технология дистанционного зондирования Земли широко используется во многих областях экономики из-за быстрого отображения широкого спектра различных показателей. Сельское хозяйство является одной из перспективных областей внедрения технологий дистанционного зондирования. С его помощью можно своевременно получать информацию об условиях роста и развития сельскохозяйственных культур, вносить необходимые коррективы при использовании удобрений, что дает возможность получать запланированные результаты. Это позволяет обеспечить устойчивость и стабильность сельскохозяйственного производства.

Важно использование методов дистанционного зондирования Земли для оптимизации производства продукции растениеводства. Прогнозирование урожайности сельскохозяйственных культур представляет прямой интерес для:

– отдельных фермеров для оптимизации качества и количества продукции;

– национальных сельскохозяйственных министерств;

– для обеспечения продовольственной безопасности, особенно в развивающихся странах;

– частных компаний, таких как страховщики урожая или трейдеры [1–3].

Спутниковые данные с различным пространственным, временным и спектральным разрешением используются для прогнозирования урожайности в широком диапазоне географических условий и масштабов (от небольших фермерских хозяйств до глобального уровня) [4–7]. Однако применение спутниковых данных для прогнозирования урожайности затрудняется низким пространственным разрешением и, как правило, неоптимальной временной выборкой [8, 9].

Для осуществления прогноза урожайности в Российской Федерации в основном используются не всегда эффективные традиционные приемы оценки агроклиматических ресурсов райониро-

вания территорий с помощью комплексных агроклиматических показателей. Для выхода из этой ситуации В.М. Брыксиным и др. была предложена модифицированная модель биопродуктивности EPIC [10]. Однако данная система очень сложна в применении, так как в вычислениях используется большое количество входных параметров. Стоит отметить, что уже сегодня возможно использование систем для мониторинга посевных площадей агропромышленного комплекса, которые позволяют обеспечить объективную оценку состояния посевов как на уровне регионов, так и на уровне отдельных хозяйств [11, 12]. В настоящее время для мониторинга сельскохозяйственных полей в Институте космических исследований РАН разработан специализированный спутниковый сервис «ВЕГА», который обеспечивает возможность работы с архивами данных, накопленных за период с 2000 г. по настоящее время [13]. Но все эти системы большей своей частью служат в качестве инструментов для научных исследований и в меньшей степени – для актуального, своевременного прикладного использования.

Идея объединения спутниковых и наземных данных в моделях для улучшения регионального и глобального прогнозирования урожайности существует давно [14–17], однако на практике этот подход по-прежнему в основном используется в научных исследованиях, а не в сельскохозяйственном производстве. При этом основное количество исследований сосредоточено на более простых однородных ландшафтах [18, 19].

Использование спектральной информации высокого пространственного и временного разрешения (в том числе данных Dove (PlanetScope) компании PlanetLabs с пространственным разрешением 3 м) дает возможность осуществлять мониторинг, в том числе прогнозирование урожайности, для решения задач «точного земледелия». Основой научной концепции точного земледелия являются представления о существовании неоднородностей различных параметров в пределах одного поля. Преимущество предлагаемой технологии состоит в том, что она позволяет производить анализ внутрипольной вариабельности различных характеристик: почвенных, температурных, влажностных и др., а следовательно, и урожайности посевов сельскохозяйственных культур.

Работы по раннему прогнозированию урожайности посредством применения методов дистанционного зондирования Земли единичны. Причиной этого является тот факт, что не до конца разработаны общие подходы и методология оценки продуктивности растений по данным дистанционного зондирования. Поэтому необходимы исследования, раскрывающие специфику взаимосвязи урожайности сельскохозяйственных культур с данными дистанционного зондирования Земли различного уровня.

Цель данного исследования – разработка метода точного земледелия для раннего прогнозирования урожайности зерновых культур на основе данных дистанционного зондирования (спутниковых) и геоботанических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на землях ООО «Учебно-опытное хозяйство «Миндерлинское» Сухобузимского района Красноярского края в течение вегетационного периода 2019 г. На рис. 1 представлено месторасположение опытного поля и его структура. Опытное поле состоит из пяти полос со средней протяженностью 650 м. Направленность полос с запада на восток, ширина каждой полосы 20 м. Внесение удобрений проводили по северной части каждой полосы (шириной 10 м), южная оставалась без удобрений. Каждая полоса была засеяна определенным видом сельскохозяйственных культур. В работе представлен анализ результатов обработки данных по полосе № 2, засеянной пшеницей «Новосибирская-15» (рис. 2). Посев пшеницы проведен 29 мая. В предыдущем 2018 г. на данной полосе проводили посев кукурузы. В полевом опыте применяли минеральное азотное удобрение – аммиачную селитру. Доза внесения составляла 34.7 кг/га д.в. Удобрения вносили одновременно с посевом яровой пшеницы сеялкой «Агратор-4.8». Все полосы разделены на четыре тестовых участка в соответствии с четырьмя способами обработки почв:

способ 1 – прямой посев при нулевой обработке почвы (сеялка «Агратор 4.8»).

способ 2 – поверхностная обработка (дискатор БДШ-5.6 на 8–10 см);

способ 3 – плоскорезная обработка (культиватор КПШК-3.8 на 20–22 см);

способ 4 – вспашка (плуг ПН-5-35 на 20–22 см);

Для чистоты эксперимента все тестовые участки отделены друг от друга защитными полосами шириной 5 м.

Учет урожайности зерна пшеницы проводили сплошным методом с помощью комбайна в шестикратной повторности для каждого способа обработки почв. Урожайность зерна рассчитывали в

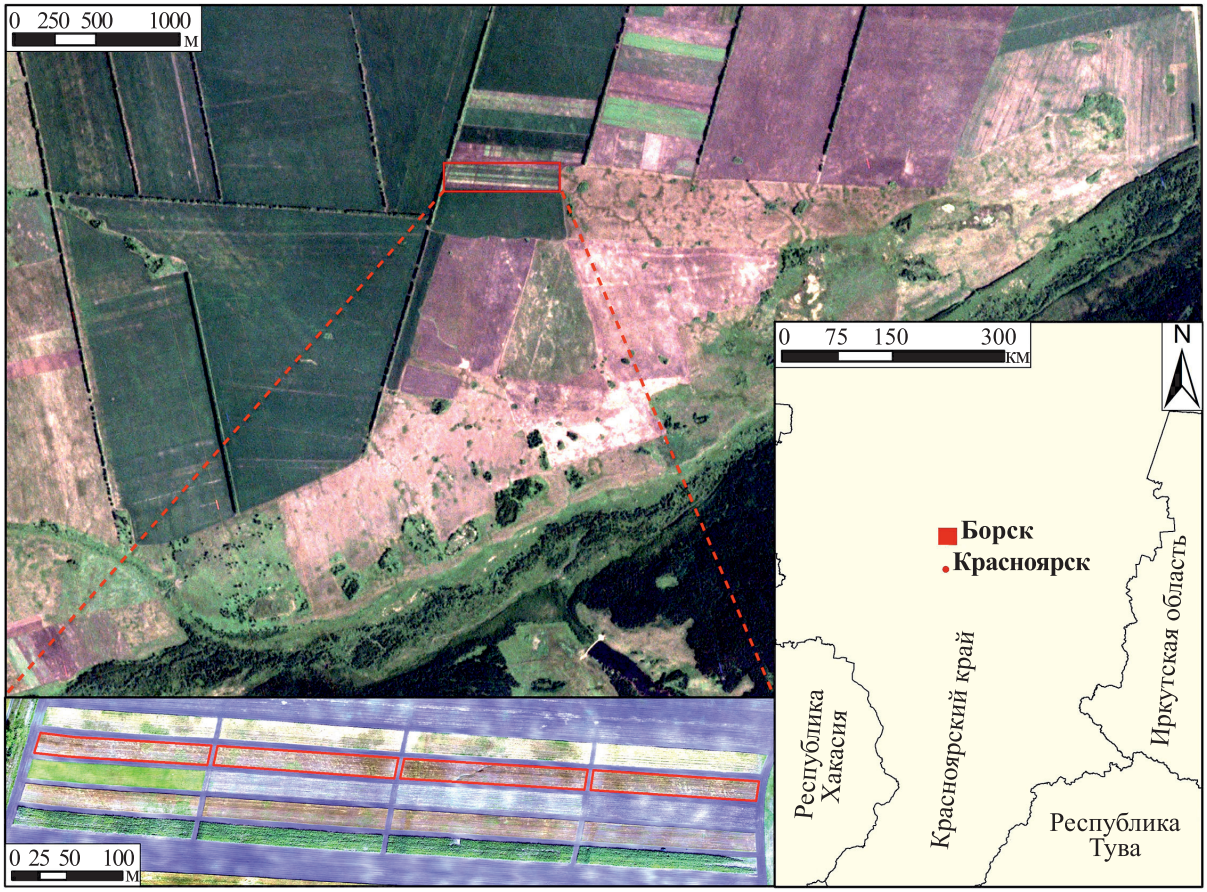


Рис. 1. Месторасположение опытного поля учебного хозяйства «Миндерлинское» и его структура по видам обработки и культурам. Полоса № 2 засеяна яровой пшеницей. Выделены границы разных видов обработки почвы (способы 1–4) – в направлении слева направо.

центнерах с 1 га с учетом пересчета на 14%-ю влажность и 100%-ю чистоту.

Исследование основывается на спутниковых данных PlanetScope с пространственным разрешением 3 м. На этапе предварительной обработки проводили атмосферную коррекцию данных PlanetScope. Корректирующие коэффициенты для каждого канала присутствуют в метаданных каждой сцены. Каждая сцена имела небольшие пространственные расхождения по отношению к

Рис. 2. Фотоизображения посева яровой пшеницы в разные фазы вегетации.

другим сценам по осям *X* или *Y*, или же одновременно по обеим осям. Поэтому для выравнивания снимков применяли инструмент «Сдвиг» в приложении ArcMap программного пакета ESRI ArcGIS.

В ходе тематической обработки спутниковой информации проводили расчет значений индекса *NDVI* (Normalized Difference Vegetation Index) [20]. Расчет *NDVI* базируется на данных красного (RED) и ближнего инфракрасного (NIR) диапазонов оптического спектра: $NDVI = \frac{NIR - RED}{NIR + RED}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ранее проведенных исследованиях [21] было установлено, что использование интегральных показателей вегетационных индексов в модельных прогнозах урожайности ячменя позволяет выполнять прогноз с максимальной вероятностью в фазе цветения – молочной спелости. Из четырех исследуемых вегетационных индексов (*MSAVI2*, *NDVI*, *VARI*, *ClGreen*) только индекс *VARI* показал достаточно низкую корреляционную связь с урожайностью (до 0.48). Коэффициенты корреляции между урожайностью и величиной интеграла индексов *MSAVI2*, *NDVI* и *ClGreen* достигают значений 0.8–0.9, начиная с фазы цветения.

Расчет криволинейного интеграла исследуемых индексов (I) проводили по следующей формуле:

$$I = \sum_{k=1}^{n} \left(\left(\frac{V_k + V_{k+1}}{2} \right) \cdot (d_{k+1} - d_k) \right),$$

где V_k – значение вегетационного индекса, d_k – время (день съемки), n – количество измерений.

На рис. 3 представлены картограммы значений интеграла *NDVI* посевов пшеницы в течение периода вегетации с 29 мая по 7 сентября 2019 г., полученные по данным PlanetScope.

Для прогнозирования урожайности яровой пшеницы в начале июля (фаза колошения – начало цветения) построена линейная регрессионная модель, в которой в качестве параметров использованы значения интеграла под кривой *NDVI* в разные периоды времени. Для построения регрессионной модели использовали массив значений *NDVI* и величин урожайности отдельных участков размером 180 м^2. Величину урожайности на данных участках определяли в ходе уборки урожая с помощью зерноуборочного комбайна «TERRION», значения *NDVI* брали из данных PlanetScope. Усреднение *NDVI* проводили по группе пикселей, попадающих в анализируемый участок. Множественная линейная модель для прогноза урожайности яровой пшеницы имеет следующий вид при восьми переменных (коэффициент детерминации 0.86, среднеквадратичная ошибка прогноза 3.77):

$$Y = 44.14 - 131.73 \cdot I_{NDVI1} + 133.79 \cdot I_{NDVI2} - 32.99 \cdot I_{NDVI3} - 118.47\, I_{NDVI4} + 104.66 \cdot I_{NDVI5} + 12.58 \cdot I_{NDVI6} + 43.19 \cdot I_{NDVI7} - 40.78 \cdot I_{NDVI8},$$

где Y – урожайность, $I_{NDVI\,i}$ – значения интеграла *NDVI* в отдельные периоды времени (i).

Проведенные расчеты позволили построить картограмму урожайности исследуемого участка. На рис. 4 в строке I показано фактическое распределение урожайности. Карта урожайности построена для каждого участка с учетом вида обработки и фона (удобренные/не удобренные), посредством интерполяции прямых измерений (четыре точки), полученных в ходе уборки. На рис. 4 в строке II показано пространственное распределение урожайности исследуемого участка, полученное по результатам модельного расчета.

Полученная спутниковая карта позволила выявить неоднородность уровня урожайности в пределах поля. Отчетливо выделены зоны с повышенной урожайностью зерна яровой пшеницы, на которых проведено внесение удобрений (красный цвет соответствует наибольшим значениям урожайности). При обработке «вспашка» урожайность на удобренном фоне была на 36.4% больше, чем на фоне без удобрений, при плоскорезной обработке – на 26.5%, при поверхностной обработке – на 28.8%; в случае прямого посева при нулевой обработке почвы – на 25.9%.

Картирование урожайности является неотъемлемой частью дифференцированного применения удобрений и других агрохимических средств. Использование модельных карт урожайности позволяет определить проблемные участки, для дальнейшего определения причин снижения урожайности и принятия соответствующих мер. Это позволит увеличить валовые сборы продукции и улучшить качество урожая.

ВЫВОДЫ

Проведено изучение пространственного изменения значений индекса *NDVI* посевов яровой пшеницы с 29 мая по 7 сентября 2019 г. по спутниковым данным PlanetScope. Получены данные пространственного изменения интеграла *NDVI* яровой пшеницы в течение периода вегетации по данным PlanetScope.

Дата		Способ 1	Способ 2	Способ 3	Способ 4		
Начало	Конец					Мин.	Макс.
29.05.2019	04.06.2019					0.62	0.97
29.05.2019	06.06.2019					0.90	1.35
29.05.2019	08.06.2019					1.26	1.84
29.05.2019	21.06.2019					4.46	5.82
29.05.2019	22.06.2019					4.80	6.26
29.05.2019	29.06.2019					7.69	10.02
29.05.2019	02.07.2019					9.11	11.84
29.05.2019	07.07.2019					11.70	15.15
29.05.2019	12.07.2019					13.72	18.41
29.05.2019	30.07.2019					20.43	29.00
29.05.2019	02.08.2019					21.60	30.56
29.05.2019	03.08.2019					21.95	31.01
29.05.2019	04.08.2019					22.24	31.39
29.05.2019	22.08.2019					26.95	37.00
29.05.2019	26.08.2019					28.01	38.08
29.05.2019	27.08.2019					28.29	38.34
29.05.2019	02.09.2019					29.99	39.93
29.05.2019	07.09.2019					31.30	41.21

Рис. 3. Картограммы значений интеграла *NDVI* посевов пшеницы в течение периода вегетации (с 29 мая по 7 сентября 2019 г.), полученные по данным PlanetScope. Белыми линиями обозначено разделение на виды обработки (способы 1–4). Раскраска картограмм выполнена с использованием одной цветовой шкалы для всех дат исследований. Минимальные и максимальные значения цветовых шкал представлены в таблице – напротив соответствующей картограммы.

Выполнено раннее прогнозирование урожайности яровой пшеницы по данным дистанционного зондирования с помощью PlanetScope в начале июля в фазу колошения – начало цветения пшеницы на основании линейной регрессионной модели. В качестве параметров использованы значения интеграла под кривой *NDVI* в разные периоды времени. Определен вид множественной линейной модели для прогноза урожайности яровой пшеницы при восьми переменных (коэффициент детерминации 0.86, среднеквадратичная ошибка прогноза 3.77).

Построена карта урожайности яровой пшеницы по спутниковым данным PlanetScope с про-

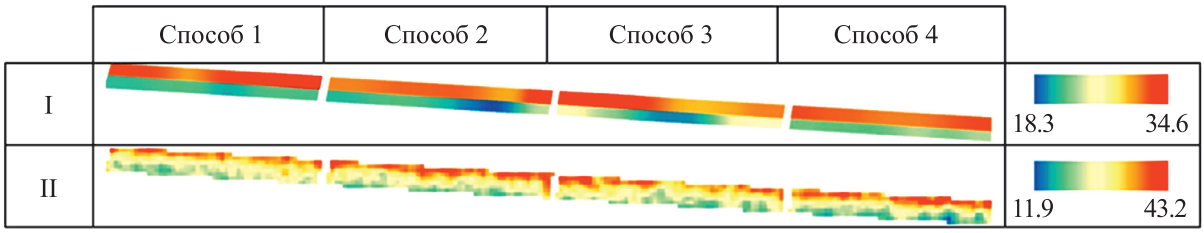


Рис. 4. Карта урожайности поля яровой пшеницы, полученная по наземным данным (I) и результатам модельного расчета (II).

странственным разрешением 3 м. Полученная карта позволила выявить неоднородность уровня урожайности в пределах опытного поля.

Проведенные исследования показали хорошую связь между интегралом *NDVI* и фактической урожайностью, полученной в конце вегетационного периода. Следовательно, промежуточные результаты внутрисезонных измерений могут быть использованы для коррекции дозы внесения удобрений.

Отсюда следует важный вывод, что использование и применение полученных результатов также позволит существенно оптимизировать дозы внесения минеральных удобрений с учетом пестроты почвенного плодородия за счет снижения их на относительно плодородных внутрипольных участках и увеличения на менее плодородных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Красноярского краевого фонда науки в рамках реализации проекта: «Разработка и внедрение метода раннего прогнозирования урожайности зерновых культур в Сибирском регионе по данным дистанционного зондирования Земли».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Filippi, E. J. Jones, N. S. Wimalathunge, et al., Precis. Agric. **20** (5), 1015 (2019).
2. F. Kogan, in *Remote Sensing for Food Security*, ed. by F. Kogan (Springer, Cham, 2019), pp. 163–173.
3. F. Kogan, W. Guo, and W. Yang, Geomatics, Nat. Hazards Risk **10**, 651 (2019).
4. M. Battude, A. Al Bitar, D. Morin, et al., Remote Sens. Environ. **184**, 668 (2016).
5. D. M. Johnson, Remote Sens. Environ. **141**, 116 (2014).
6. I. Mariotto, P. S. Thenkabail, A. Huete, et al., Remote Sens. Environ. **139**, 291 (2013).
7. L. Wall, D. Larocque, and P. M. Leger, Int. J. Remote Sens. **29**, 2211 (2008).
8. K. Wang, S. E. Franklin, X. Guo, and M. Cattet, Sensors **10**, 9647 (2010).
9. M. Zaman-Allah, O. Vergara, J. Araus, et al., Plant Methods **11**, 35 (2015).
10. В. М. Брыксин, А. В. Евтюшкин и Н. В. Рычкова, Изв. Алтайского гос. ун-та **1–2** (65), 89 (2010).
11. В. А. Толпин, С. А. Барталев, В. Ю. Ефремов и др., Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса **2** (7), 221 (2010).
12. И. Ю. Савин, Е. А. Лупян и С. А. Барталев, Геоматика **2**, 69 (2011).
13. Е. А. Лупян, И. Ю. Савин, С. А. Барталев и др., Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса **1** (8), 190 (2011).
14. R. Delecolle, S. J. Maas, M. Guerif, and F. Baret, ISPRS J. Photogrammetry Remote Sens. **47**, 145 (1992).
15. S. Moulin, A. Bondeau, and R. Delecolle, Int. J. Remote Sens. **19**, 1021 (1998).
16. P. C. Doraiswamy, T. R. Sinclair, S. Hollinger, et al., Remote Sens. Environ. **97**, 192 (2005).
17. W. A. Dorigo, R. Zurita-Milla, A. J. W. de Wit, et al., Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf. **9**, 169 (2007).
18. A. V. M. Ines, N. N. Das, J. W. Hansen, and E. G. Njoku, Remote Sens. Environ. **138**, 149 (2013).
19. Y. Xie, P. Wang, X. Bai, et al., Agric. For. Meteorol. **246** (2017).
20. C. F. Jordan, Ecology **50**, 663 (1969).
21. И. Ю. Ботвич, Д. В. Емельянов, А. А. Ларько и др., Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса **5** (16), 183 (2019).

Early Forecast of Crop Yields Based on PlanetScope Dove Satellite Data

A.P. Shevyrnogov*, D.V. Emelyanov*, N.O. Malchikov*, T.N. Demyanenko, V.K. Ivchenko**, and I.Yu. Botvich***

**Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

***Krasnoyarsk State Agrarian University, prosp. Mira 90, Krasnoyarsk, 660049 Russia*

The paper presents the results of early forecast of spring wheat yields based on data from PlanetScope Dove satellite with spatial (3 m) resolution operated by Planet Labs. Prediction of spring wheat yield was made in early July in the heading stage – the beginning of flowering through linear regression analysis; the values of the integral under the NDVI curve in different periods of time were used as parameters. A multiple linear regression equation was constructed to predict the yield of spring wheat using eight variables (determination coefficient 0.86; mean square error 3.77). Grain yield map of spring wheat was created using satellite data from PlanetScope with spatial (3 m) resolution. The resulting map made it possible to reveal the heterogeneity of the yield within the experimental field. Studies have shown a good relationship between the NDVI integral and the actual yield obtained at the end of the growing season. Therefore, the intermediate results of intraseasonal measurements can be used to adjust the ratio of fertilizers.

Keywords: precision farming, yield, growing season, spring wheat, PlanetScope

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1171–1177

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 58.057

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЕ ПРОРОСТКОВ САЛАТА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ СЕМЯН БЫСТРЫМИ НЕЙТРОНАМИ В ДОЗЕ 10 Гр И ИХ МОДИФИКАЦИЯ ГИПОМАГНИТНЫМИ УСЛОВИЯМИ ПРОРАЩИВАНИЯ

© 2021 г. Н.Г. Платова*, В.М. Лебедев, А.В. Спасский**, К.А. Труханов***

**ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а*

***НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2*

E-mail: nataliaspl@inbox.ru

Поступила в редакцию 24.12.2019 г.
После доработки 24.12.2019 г.
Принята к публикации 19.08.2021 г.

Семена салата посевного *Lactuca sativa* L. облучали нейтронами со средней энергией 1.6 МэВ в дозе 10 Гр. Облучение производилось в конце предельного срока сохранения кондиционной свежести семян. Семена проращивали в гипомагнитной камере при величинах магнитной индукции $1{\cdot}10^3$ нТл, $1.4{\cdot}10^2$ нТл, $2{\cdot}10^1$ нТл, что соответствует ослаблению геомагнитного поля в $5{\cdot}10^1$, $3.6{\cdot}10^2$ и до $2.5{\cdot}10^3$ раз, а также в лабораторных условиях ($5{\cdot}10^1$ мкТл). При прорастании в гипомагнитных условиях происходит увеличение процента клеток с хромосомными аберрациями в корневой меристеме проростков, выросших из облученных семян, при всех рассматриваемых величинах ослабления геомагнитного поля. Отмечено синергическое взаимодействие факторов по критерию клеток с хромосомными аберрациями и антагонистическое взаимодействие для среднего количества делящихся клеток в стадиях ана-телофазы.

Ключевые слова: гипомагнитные условия, облучение быстрыми нейтронами, Lactuca sativa, семена салата, хромосомные аберрации, долговечность семян.

DOI: 10.31857/S0006302921060120

В связи с перспективами дальних и длительных космических полетов встает проблема безопасности экипажа за пределами магнитосферы Земли. Одним из малоизученных факторов являются гипомагнитные условия космоса (ГМУ). При полетах в околоземном пространстве на орбитальных станциях геомагнитное поле (ГМП) снижено незначительно. На лунных и марсианских базах, при межпланетных полетах снижение ГМП составит несколько порядков величины.

Имеются данные о негативном влиянии ГМУ на различные биологические объекты. Так, экспонирование крыс в течение десяти суток в ГМУ при около 100 нТл приводило к повышению внутривидовой агрессии и нарушению памяти [1]. Инкубирование яиц японского перепела *Coturnix coturnix japonica* в условиях сниженного в 80–100 раз ГМП вызвало у эмбрионов нарушения в формировании сердечно-сосудистой системы и других систем [2]. При воздействии сверхслабого статического магнитного поля в экранирующей камере из магнитомягкого материала с величиной магнитной индукции в центре камеры 0.2 мкТл фибробласты здорового донора демонстрировали картину, подобную той, которая возникает при повреждении ДНК – повышение количества белков P53 и P21, формирование фокусов 53BP1 [3]. В ГМУ повышается частота хромосомных аберраций в клетках эмбрионов плотвы *Rutilus rutilus* [4]

Радиационная обстановка в космическом полете формируется галактическими и солнечными космическими лучами, а также вторичным излучением в веществе корабля, в особенности, нейтронным, возникающим вследствие ядерных реакций под действием высокоэнергетических протонов галактических космических лучей. Среднесуточная мощность эквивалентной дозы нейтронного излучения в каналах тканеэквивалентного фантома, расположенного внутри Малого исследовательского модуля (МИМ1), в период основных экспедиций на Международной

Сокращения: ГМУ – гипомагнитные условия, ГМП – геомагнитное поле, ОБЭ – относительная биологическая эффективность.

Таблица 1. Варианты проращивания семян салата

Облучение семян	Величина магнитной индукции			
	$5\cdot10^1$ мкТл, магнитное поле Земли	$2\cdot10^1$ нТл, ослабление в $2.5\cdot10^3$ раз	$1.4\cdot10^2$ нТл, ослабление в $3.6\cdot10^2$ раз	$1\cdot10^3$ нТл, ослабление в $5.0\cdot10^1$ раз
необлученные семена	К-К	К-1	К-2	К-3
облученные семена	10-К	10-1	10-2	10-3

космической станции (МКС-35/36 и МКС-41/42) составила от 77 ± 13 до 157 ± 25 мкЗв/сут, что соответствует от 17 до 28% полной дозы [5]. С увеличением толщины пассивной радиационной защиты космического корабля возрастает вклад вторичных нейтронов. Определенную опасность представляют также альбедные быстрые нейтроны от поверхности Луны. Для быстрых нейтронов с энергией около 0.45 МэВ уточненные максимальные коэффициенты относительной биологической эффективности (ОБЭ) для доз 0.01–0.05 Гр при рассмотрении начальных стадий помутнения хрусталика составили 41 [6]. При тотальном облучении мышей нейтронами с энергией 1.5 МэВ в дозах 2.5–25 Гр коэффициенты ОБЭ через 24 и 72 ч после облучения по критериям снижения митотического индекса, а также образования аберрантных митозов оказались в пределах от 4.1 ± 0.1 до 7.3 ± 0.1 [7].

Имеются единичные работы, посвященные комбинированному действию ГМУ и радиации. Так, при проращивании в ГМУ семян салата, облученных ионами аргона с энергией 290 МэВ/нуклон и углерода с энергией 400 МэВ/нуклон в дозе 1 Гр, получено увеличение тяжести радиационного поражения по тесту хромосомных аберраций [8, 9]. Семена салата были многократно использованы в ряде космических экспериментов. В силу биологических особенностей их можно экспонировать в условиях космоса от нескольких суток до года и более [10]. Предельные сроки сохранения кондиционной свежести семян салата – 3–4 года [11]. Радиационное старение возможно частично смоделировать использованием длительно хранившихся семян. В гипомагнитных условиях (ГМУ) будут прорастать семена в космических оранжереях, подвергаясь одновременно действию космической радиации, в том числе и действию нейтронов вторичного излучения.

Целью данной работы было изучение реакции семян в конце периода хранения, сохраняющего кондиционную свежесть, на комбинированное воздействие облучения нейтронами и ГМУ.

МЕТОДИКА

В эксперименте использовали семена салата посевного *Lactuca sativa* L. сорта Московский парниковый урожая 2012 г. Семена были получены в условиях защищенного грунта в Московской области на Опытно-производственной базе Федерального научного центра овощеводства. Семена облучали нейтронами со средней энергией 1.6 МэВ на биологическом оборудовании Будапештского исследовательского реактора в июле 2016 г. Мощность дозы составила 14.2 мГр/с, доля γ-излучения – 10%, неопределенность – не менее 5%. Семена россыпью упаковывали в пакетики из кальки размером 2 × 2 см. Неоднородность внутри одной упаковки была менее 3%. Воздушно-сухие семена хранили в холодильнике при температуре 4°С.

Семена проращивали в октябре 2016 г. в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, при температуре 21.0 ± 0.5°С. Варианты проращивания семян салата представлены в табл. 1. Количество семян, поставленных на проращивание, составило 100 штук на вариант.

Проращивание происходило в гипомагнитной камере с рабочим объемом 35 л, изготовленной из рулонного магнитомягкого материала [12]. При открытой крышке в камере создается градиент ослабления ГМП, что позволяет разместить семена в местах с разной кратностью ослабления ГМП. Семена прорастали при величинах магнитной индукции $1.0\cdot10^3$ нТл, $1.4\cdot10^2$ нТл, $2.0\cdot10^1$ нТл, что соответствует ослаблению геомагнитного поля в $5.0\cdot10^1$, $3.6\cdot10^2$ и до $2.5\cdot10^3$ раз, а также в лабораторных условиях при $5.0\cdot10^1$ мкТл. Величину магнитной индукции измеряли трехкомпонентным магнитометром типа НВ0204.4А (ООО «НПО ЭНТ», Санкт-Петербург) с диапазоном от 10 нТл до 100 мкТл и точностью измерений 10 нТл.

Учитывали энергию прорастания как процент проросших семян на третьи сутки и всхожесть как процент проросших на седьмые сутки. Проросшими считались семена с длиной корня 2–4 мм, что соответствует первому митозу в корневой меристеме. Проростки фиксировали, окрашивали

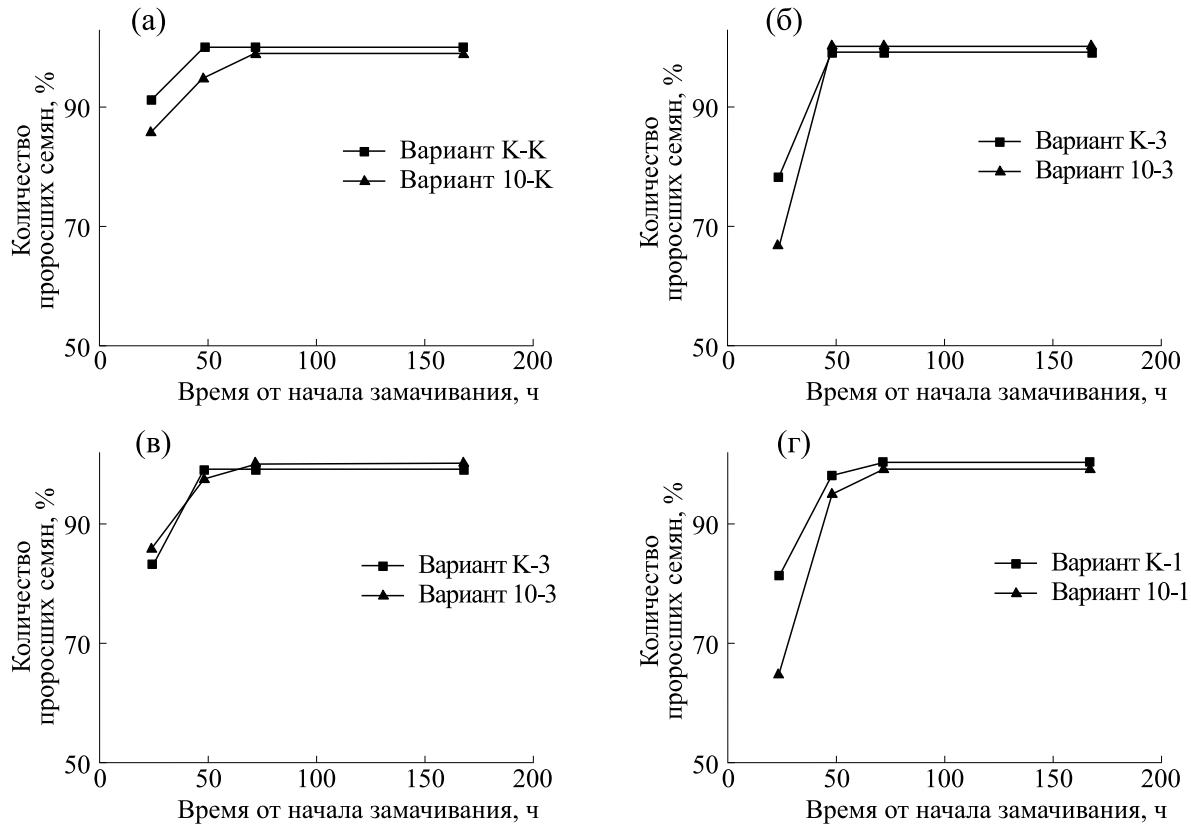


Рис. 1. Прорастание семян салата при величине магнитной индукции $5{\cdot}10^1$ мкТл (а), $1{\cdot}10^3$ нТл (б), $1.4{\cdot}10^2$ нТл (в) и $2{\cdot}10^1$ нТл (г).

ацет-орцеином и приготавливали временные препараты по стандартной методике. Для дальнейшего цитогенетического анализа брали семена, проросшие на первые сутки. Препараты просматривали под микроскопом с увеличением в 945 раз по 30–31 корешку на вариант. Использовали ана-телофазный метод анализа, учитывали хромосомные и хроматидные мосты и фрагменты, рассчитывали среднее количество делящихся клеток на корешок, количество аберраций на одну аберрантную клетку, процент клеток с хромосомными аберрациями и клеток с множественными аберрациями.

Статистический анализ результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Коэффициент синергического усиления рассчитывали, как описано в работе [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные по прорастанию семян в различных условиях. Рисунок демонстрирует, что количество необлученных семян, проросших в ГМУ, на первые сутки оказалось сниженным на 9–14% по вариантам, ко вторым суткам эти различия нивелируются и количество проросших семян составляет 98–100%. Необлученные семена этой же партии при проращивании двумя годами ранее также демонстрировали задержку прорастания в ГМУ [9]. При прорастании в обычных условиях количество проросших облученных семян (вариант 10-К) на первые сутки снижено на 5% по сравнению с необлученными, проросшими в этих же условиях, при этом энергия прорастания и всхожесть находятся на уровне контроля. Такую же высокую энергию прорастания и всхожесть необлученные семена демонстрировали при проращивании двумя годами ранее. Тогда при проращивании семян, облученных ионами углерода с энергией 400 МэВ/нуклон в дозе 1 Гр, снижение количества проросших семян на первые сутки составило 14% от контрольных необлученных семян [9]. В ГМУ при $2.0{\cdot}10^1$ нТл и $1.0{\cdot}10^3$ нТл количество облученных нейтронами проросших семян на первые сутки снижено более чем на 20% по сравнению с теми же семенами, проросшими при обычных условиях, а при $1.4{\cdot}10^2$ нТл процент проросших семян на первые сутки не изменяется. При этом энергия прорастания и всхожесть всех вариантов составляет 99–100%. Следует отме-

Таблица 2. Результаты цитогенетических исследований проростков салата при прорастании в обычных и гипомагнитных условиях

Вариант	Количество просмотренных делящихся клеток (анателофаз)	Доля аберрантных клеток, %	Доля клеток с множественными аберрациями, %	Количество аберраций на одну аберрантную клетку	Среднее количество ана- и телофаз на 1 корешок
К-К	3403	1.09 ± 0.18	0.15 ± 0.07	1.14	130.9 ± 4.5
К-3	2215	0.90 ± 0.20	-	1.00	71.5 ± 3.2***
К-2	2334	0.30 ± 0.11***	0.04 ± 0.04	1.14	77.8 ± 2.6***
К-1	3108	1.00 ± 0.18	0.10 ± 0.06	1.10	103.6 ± 4.7***
10-К	1387	17.81 ± 1.03***	4.04 ± 0.53***	1.26	46.2 ± 2.8***
10-3	1274	26.96 ± 1.23*** ^^^	5.57 ± 0.64***	1.23	42.5 ± 2.5***
10-2	1785	22.97 ± 1.00*** ^^^	3.59 ± 0.44**	1.18	59.5 ± 3.1*** ^^^
10-1	2137	23.54 ± 0.92*** ^^^	3.79 ± 0.41***	1.18	71.2 ± 1.3*** ^^^

Примечание. ** – Различия варианта от лабораторного контроля достоверны при уровне значимости $p \le 0.01$; *** – различия варианта от лабораторного контроля достоверны при уровне значимости $p \le 0.001$; ^^^ – различия варианта от семян, облученных нейтронами и проросших в лабораторных условиях (вариант 10-К) достоверны при уровне значимости $p \le 0.001$.

тить, что речь идёт о лабораторной, а не полевой всхожести.

Максимальное количество делящихся клеток в стадиях ана-телофазы отмечено у необлученных семян варианта К-К, проросших в обычных условиях (табл. 2). При прорастании необлученных семян в ГМУ происходит уменьшение числа делящихся клеток на 45% при $1.0 \cdot 10^3$ нТл, на 41% при $1.4 \cdot 10^2$ нТл и на 21% – при $2.0 \cdot 10^1$ нТл. Снижение количества делящихся клеток отмечено в ГМУ при прорастании необлученных семян в начале срока хранения [8]. Облученные семена, проросшие в обычных условиях (вариант 10-К), также показывают снижение количества делящихся клеток на 65%. Уменьшение количества клеток в стадиях анателофазы было продемонстрировано и в корневой меристеме проростков, полученных из семян салата, облученных ионами аргона [8] и углерода [9]. При облучении семян этой же партии тремя годами ранее нейтронами с теми же параметрами пучка в дозе 10 Гр было зафиксировано снижение количества делящихся клеток в два раза [13]. Таким образом, обнаружено более сильное подавление клеточного деления в проростках, полученных из облученных семян в конце срока кондиционной годности. При прорастании в ГМУ облученных семян происходит увеличение количества делящихся клеток в корневой меристеме проростков при $1.4 \cdot 10^2$ нТл и при $2.0 \cdot 10^1$ нТл. Это, возможно, связано с компенсаторным увеличением при данных условиях ослабления ГМП.

В проростках, полученных из необлученных семян, отмечено значимое уменьшение процента клеток с хромосомными аберрациями при $1.4 \cdot 10^2$ нТл (табл. 2), уменьшается процент хромосомных мостов и не наблюдаются хроматидные фрагменты (табл. 3), при этом количество аберраций на одну аберрантную клетку остается неизменным. Отсутствуют клетки с множественными аберрациями при $1.0 \cdot 10^3$ нТл. В проведенных нами ранее экспериментах [9, 14] наблюдалось увеличение процентной доли клеток с хромосомными аберрациями в корневой меристеме проростков, полученных из необлученных семян, при прорастании в аналогичных условиях ослабления ГМП. Рассматриваемое в данной статье облучение было проведено через два года с семенами той же партии, и полученные результаты, видимо, связаны со старением семян и изменениями, произошедшими в результате хранения.

Проростки, полученные из облученных семян, проросшие в обычных условиях (вариант 10-К), имели повышенный процент клеток с хромосомными аберрациями и множественными хромосомными аберрациями (табл. 2). Это объяс-

Таблица 3. Типы хромосомных аберраций

Вариант	Доля хромосомных мостов, %	Доля хромосомных фрагментов, %	Доля хроматидных мостов, %	Доля хроматидных фрагментов, %
К-К	0.88 ± 0.16	0.15 ± 0.07	0.18 ± 0.07	0.03 ± 0.03
К-3	0.86 ± 0.20	–	0.05 ± 0.05	–
К-2	0.30 ± 0.11**	–	0.04 ± 0.04	–
К-1	0.97 ± 0.18	–	0.13 ± 0.06	–
10-К	13.63 ± 0.92***	6.56 ± 0.66***	1.80 ± 0.36***	0.36 ± 0.16*
10-3	23.63 ± 1.19*** ^^^	3.77 ± 0.53*** ^^^	4.71 ± 0.59*** ^^^	0.08 ± 0.08
10-2	18.04 ± 0.91*** ^^^	4.93 ± 0.51***	3.81 ± 0.45*** ^^^	0.22 ± 0.11
10-1	21.24 ± 0.88*** ^^^	2.71 ± 0.35*** ^^^	3.79 ± 0.41*** ^^^	0.09 ± 0.06

Примечание. * – различия варианта от лабораторного контроля достоверны при уровне значимости $p \le 0.05$; ** – различия варианта от лабораторного контроля достоверны при уровне значимости $p \le 0.01$; *** – различия варианта от лабораторного контроля достоверны при уровне значимости $p \le 0.001$; ^^^ – различия варианта от семян, облученных нейтронами и проративших в лабораторных условиях (вариант 10-К), достоверны при уровне значимости $p \le 0.001$.

няется серьезным повреждающим воздействием облучения нейтронами в такой дозе. Близкий процент аберрантных клеток (17.1 ± 1.0) был получен при γ-облучении семян салата в дозе 150 Гр при мощности дозы 90.9 сГр/с [15]. Таким образом, коэффициент ОБЭ нейтронов при данной дозе составляет 15. Усредненное значение ОБЭ для быстрых нейтронов равно 10 [16]. В то же время ОБЭ зависит от дозы, критерия оценки эффекта и вида биообъекта.

Проростки, полученные из семян, облученных ионами аргона [8], а также из семян, экспонированных в течение 231 суток на Международной космической станции [17], демонстрировали увеличение процента клеток с хромосомными аберрациями и клеток с множественными аберрациями только при прорастании при $2 \cdot 10^1$ нТл. При прорастании в ГМУ семян, облученных ионами углерода, происходит увеличение процентной доли клеток с хромосомными аберрациями при $1.4 \cdot 10^2$ нТл и $2.0 \cdot 10^1$ нТл [9]. При прорастании в ГМУ семян, облученных нейтронами в дозе 10 Гр, происходит увеличение процента клеток с хромосомными аберрациями ($p \leqslant 0.001$) при всех рассматриваемых ослаблениях ГМП, при этом процентная доля клеток с множественными аберрациями существенно не изменяется (табл. 2). Это, видимо, связано с большим повреждением меристемы при облучении в большей дозе. Увеличение процентной доли клеток с хромосомными аберрациями идет за счет увеличения доли хромосомных мостов и доли хроматидных мостов, при этом доля хроматидных фрагментов существенно не изменяется, а доля хромосомных фрагментов – уменьшается при величине магнитной индукции $1.0 \cdot 10^3$ нТл и $2.0 \cdot 10^1$ нТл (табл. 3).

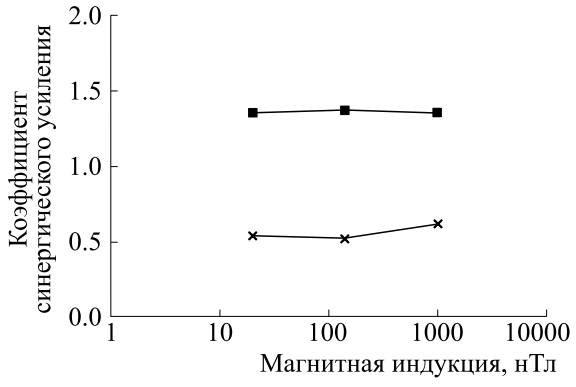


Рис. 2. Синергическое усиление комбинированного воздействия на семена салата: квадраты – доля клеток с хромосомными аберрациями; крестики – среднее количество (на корешок) делящихся клеток в стадиях ана-телофазы.

Для оценки взаимного влияния ГМУ и радиации был рассчитан коэффициент синергического усиления k, показывающий, во сколько раз эффект комбинированного воздействия превышает эффект при сложении действия независимых факторов (рис. 2). Для процентной доли клеток с

хромосомными аберрациями при всех режимах ослабления ГМП отмечено синергическое взаимодействие ($k > 1$), тогда как для семян, облученных ионами углерода в дозе 1 Гр, – только при среднем и максимальном ослаблении [8]. Это, видимо, связано со степенью радиационного поражения клеток. Для среднего количества делящихся клеток в стадиях ана-телофазы отмечено антагонистическое действие факторов ($k < 1$). Такая же направленность эффекта по этому критерию была отмечена при облучении семян салата ионами углерода.

Наблюдаемые эффекты могут быть связаны с затруднением репарационных процессов в ГМУ. В работе [18] на основании анализа литературных данных было высказано предположение о полиэкстремальной зависимости биологического эффекта от величины ослабления ГМП. В эту концепцию укладываются и данные по интенсивности деления планарий при различных ослаблениях ГМП [19]. Полуторачасовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в ГМУ при остаточном постоянном магнитном поле 20 нТл вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода [20, 21]. Эритроциты крыс, подвергавшиеся воздействию ослабленным магнитным полем 0.192 мкТл, продуцировали больше кислородных радикалов, чем экспонировавшиеся в магнитном поле Земли [22, 23]. Магнитные поля могут индуцировать спиновые триплет-синглетные переходы в паре радикалов и ион-радикалов, изменять их спиновое состояние и реакционную способность. Имеются данные о возможности магнитозависимого синтеза АТФ и ДНК [24]. ГМУ могут вносить изменения в сложившуюся систему магнитных взаимодействий, с чем может быть связана полиэкстремальная зависимость наблюдаемых эффектов.

ВЫВОДЫ

При облучении семян салата нейтронами со средней энергией 1.6 МэВ в дозе 10 Гр в конце периода предельного срока сохранения кондиционной свежести можно отметить следующее:

1. Энергия прорастания и всхожесть при совместном и раздельном воздействии облучения и ГМУ остается на уровне 99–100%.

2. Отмечена задержка прорастания на первые сутки под действием облучения на 5%. Количество проросших на первые сутки необлученных семян в ГМУ уменьшается при всех рассмотренных ослаблениях по сравнению с прорастанием в обычных условиях, облученных семян – при $2.0 \cdot 10^1$ нТл и $1.0 \cdot 10^3$ нТл.

3. Происходит снижение среднего количества делящихся клеток в стадии ана-телофазы на корешок при проращивании необлученных семян в ГМУ.

4. ГМУ способствуют увеличению митотической активности облученных семян. Наблюдается антагонистическое взаимодействие ГМУ и облучения по данному параметру, коэффициент синергического усиления меньше единицы.

5. Процент клеток с хромосомными аберрациями уменьшается при проращивании необлученных семян при $1.4 \cdot 10^2$ нТл, что не наблюдалось при проращивании свежих семян.

6. Процентная доля клеток с хромосомными аберрациями увеличивается при проращивании в ГМУ облученных семян при всех режимах ослабления ГМП. Наблюдается синергическое взаимодействие ГМУ и облучения по данному параметру, коэффициент синергического усиления больше единицы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность J.K. Pálfalvi (Hungarian Academy of Sciences, Centre for Energy Research (MTAEK), Budapest, Hungary) за помощь и облучение семян.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН, при использовании оборудования, приобретенного НИИЯФ МГУ за счет Программы развития Московского университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. А. Кривова, К. А. Труханов, Т. А. Замощина и др., Авиакосмическая и экологическая медицина **42** (6/1), 30 (2008).
2. К. А. Труханов, Т. С. Гурьева, О. А. Дадашева и др. Радиационная биология. Радиоэкология **54** (2), 179 (2014).
3. И. М. Спивак, М. Л. Куранова, Г. Р. Мавропуло-Столяренко и др., Биофизика **61** (3), 516 (2016).
4. М. Г. Таликина, Ю. Г. Изюмов и В. В. Крылов, Биология внутренних вод **2**, 121 (2017).

5. С. В. Хулапко, В. И. Лягушин, В. В. Архангельский и др., Авиакосмическая и экологическая медицина **50** (2), 47 (2016).
6. А. В. Шафиркин, Ю. Г. Григорьев и И. Б. Ушаков, Авиакосмическая и экологическая медицина **53** (1), 23 (2019). DOI: 10.21687/0233-528X-2019-53-1-23-32
7. С. В. Ворожцова, Т. М. Булынина и А. А. Иванов, Авиакосмическая и экологическая медицина **50** (1), 55 (2016).
8. Н. Г. Платова, В. М. Лебедев, А. В. Спасский и др., Авиакосмическая и экологическая медицина **50** (3), 35 (2016).
9. Н. Г. Платова, В. М. Лебедев, А. В. Спасский и К. А. Труханов, Авиакосмическая и экологическая медицина **53** (4), 93 (2019). DOI: 10.21687/0233-528X-2019-53-4-93-100
10. Е. В. Каминская, Л. В. Невзгодина и Н. Г. Платова, Авиакосмическая и экологическая медицина **43** (5), 8 (2009).
11. В. А. Лудилов, *Семеноведение овощных и бахчевых культур* (ФГНУ «Росинформагротех», М., 2005).
12. С. А. Гудошников, С. Н. Венедиктов, Ю. Б. Гребенщиков и др., Измерительная техника, № 3, 58 (2012).
13. Н.Г. Платова, в кн. *Тезисы докладов VII съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)* (М., РУДН, 2014), с. 192.
14. В. М. Лебедев, Н. Г. Платова, А. В. Спасский и К. А. Труханов, Изв. РАН. Сер. физич. **80** (3), 378, (2016).
15. Н. М. Папьян и Л. В. Невзгодина, Радиобиология **10** (5), 770 (1970).
16. И. Н. Гудков, А. Г. Кудяшева и А. А. Москалёв, *Радиобиология с основами радиоэкологии* (Издательство СыктГУ, Сыктывкар, 2015).
17. Н. Г. Платова, В. М. Лебедев, А. В. Спасский и др., в кн. *Матер. XI междунар. науч.-практич. конф.* (Звездный городок, 2015), с. 193.
18. К. А. Труханов, в кн. *Труды Междунар. конф. «Влияние космической погоды на человека: в космосе и на Земле»* (ИКИ РАН, М., 2012), с. 249.
19. В. В. Новиков, Л. М. Шейман и Е. Е. Фесенко, Биофизика **52** (5), 912 (2007).
20. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Н. И. Новикова, Актуальные вопросы биологической физики и химии **3** (1), 23, (2018).
21. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **63** (3), 484 (2018).
22. М. А. Терпиловский, Д. А. Хмелевской, А. Д. Надеев и др., в кн. *Научные труды VIII Междунар. конгр. «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»* (СПб., 2018), с. 85.
23. М. А. Терпиловский, Д. А. Хмелевской, Б. Ф. Щеголев и др., Биофизика **64** (3), 486 (2019). DOI: 10.1134/S0006302919030086
24. А. Л. Бучаченко, Успехи химии **83** (1), 1 (2014).

Cytogenetic Effects of Fast Neutron Seed Irradiation (10 Gy) on the Root Meristem Cells of *Lactuca sativa* L. Seedlings and Modification of Seed Germination in Hypomagnetic Environment

N.G. Platova*, V.M. Lebedev, A.V. Spassky**, and K.A. Trukhanov***

**Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia*

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

The lettuce seeds of *Lactuca sativa* L. were exposed to10 Gy of fast neutrons (mean energy 1.6 MeV). Seeds close to the end of limiting time of conditioned freshness were used for irradiation. Seeds were germinated inside the hypomagnetic chamber with different values of the magnetic induction ($1\cdot10^3$ nT, $1.4\cdot10^2$ nT, and $2\cdot10^1$ nT). The chamber was able to weaken the geomagnetic fields (by $5\cdot10^1$, $3.6\cdot10^2$ and up to $2.5\cdot10^3$ times, respectively). Seeds also germinated in laboratory environment ($5\cdot10^1$ μT). During germination of seeds exposed to hypomagnetic conditions, the percentage of cells with chromosome aberration increase in the root meristem of seedlings grown from irradiated seeds was seen under all above-mentioned values of the magnetic induction. It was shown that there is a synergistic relationship between factors as criteria for cells with chromosome aberrations and antagonistic interdependence for the test of mean amount of dividing cell in anatelophase stage.

Keywords: hypomagnetic conditions, fast neutron irradiation, Lactuca sativa, lettuce seeds, chromosome aberration, durability of seeds

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1178–1185

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.125.3:577.115.3

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МИОКАРДЕ И m. longissimus dorsi ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *Urocitellus undulatus*

© 2021 г. Т.П. Кулагина*, С.С. Попова, А.В. Ариповский*****

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

E-mail: tpkulagina@rambler.ru

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

E-mail: sp-fh@mail.ru

****Научно-производственная компания «А-БИО», 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 4*

E-mail: aripovsky@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.07.2021 г.
После доработки 18.08.2021 г.
Принята к публикации 19.08.2021 г.

Определены изменения сезонного содержания жирных кислот в миокарде и скелетной мышце (m. longissimus dorsi) у летних, осенних активных, зимних спящих и зимних активных якутских сусликов *Urocitellus undulatus*. В сердечной мышце зимних спящих животных обнаружено снижение количества докозагексаеновой кислоты при возрастании количества α-линоленовой, а также снижение количества дигомо-гамма-линоленовой кислоты по отношению к осенним активным животным. Суммарное количество полиненасыщенных жирных кислот снижалось у зимних спящих и зимних активных сусликов по отношению к летним и осенним активным животным. В скелетной мышце зимних спящих и зимних активных животных наблюдалось снижение количества пальмитиновой кислоты по отношению к летним и осенним активным сусликам. При этом у зимних спящих сусликов увеличивалось количество пальмитолеиновой кислоты по отношению к летним и осенним животным. Количество дигомо-гамма-линоленовой кислоты снижалось у зимних спящих животных по отношению к осенним активным сусликам. В скелетной мышце осенних активных, зимних спящих и зимних активных сусликов возрастало количество стеариновой кислоты по сравнению с летними животными. В эти сезоны наблюдалось увеличение суммарного количества насыщенных жирных кислот по отношению к летнему периоду. Обсуждается возможная роль сезонных изменений жирнокислотного состава в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика.

Ключевые слова: гибернация, поперечнополосатые мышцы, жирные кислоты.

DOI: 10.31857/S0006302921060132

Зимняя спячка (гибернация) – это эволюционно закрепленная способность некоторых теплокровных животных снижать уровень метаболизма и температуру тела в зимний период с целью экономии энергии и выживания при низких температурах и отсутствии пищи [1]. В период спячки, несмотря на пониженное потребление кислорода и сниженный уровень метаболизма, функционирование жизненно важных органов (сердца, легких, головного мозга) не ингибировано полностью [2, 3]. Изучение регуляторных механизмов, которые контролируют снижение скорости метаболизма, а также сохранение клеток, которые поддерживают жизнеспособность в гипометаболическом состоянии, важно для теоретической и практической медицины, в том числе для лучшего понимания развития и лечения сердечной недостаточности и мышечной атрофии [4]. Способность к длительному голоданию гибернантов связана с переключением метабо-

Сокращения: ЖК – жирные кислоты, ДГК – докозагексаеновая кислота, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ДГЛК – дигомо-гамма-линоленовая кислота, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты.

лизма с глюкозы на липиды в период зимней спячки [5]. В частности, происходит гидролиз триглицеридов жировой ткани с высвобождением жирных кислот (ЖК), которые попадают в кровоток [6]. Исследование метаболизма ЖК при гибернации представляет особый интерес, поскольку помимо своей главной роли в качестве структурных компонентов мембран они служат источниками топлива для производства энергии, а также являются важными вторичными мессенджерами, участвующими в физиологических реакциях, связанных с гомеостазом и процессами воспаления и выздоровления после инфекционных заболеваний человека [7–9].

Исследование сезонных изменений содержания ЖК важно для понимания молекулярных механизмов адаптации мышечной ткани и организма в целом к условиям гибернации. Цель данного исследования – выявление сезонных изменений содержания ЖК в поперечнополосатых мышцах (миокарде левого желудочка сердца и скелетной мышце m. longissimus dorsi) истинного гибернанта длиннохвостого якутского суслика *Urocitellus undulatus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на якутских сусликах *Urocitellus undulatus* обоих полов, отловленных в местах их природного обитания (долина реки Лена, Якутия). Животных отлавливали в июле-августе и доставляли в г. Пущино Московской области. До начала спячки их содержали индивидуально в специальном помещении, с соблюдением естественного фотопериода при достаточном количестве пищи и воды. В период гибернации сусликов содержали в темном помещении при температуре от 0 до 2°C. Регистрацию температуры тела у животных проводили с помощью специализированного датчика RET-2 (Physitemp, США; точность ± 0.1°C). В экспериментах использовали четыре группы животных: группа 1 – летние активные суслики, которых брали в июне-июле ($n = 7$), группа 2 – осенние активные суслики (октябрь-ноябрь) ($n = 7$); группа 3 – зимние спящие животные (находящиеся в состоянии глубокого оцепенения), которых использовали в январе-феврале в середине цикла спячки (баута) при температуре тела от 1.0 до 7.0°C (средняя температура тела 4.2°C) ($n = 7$); группа 4 – зимние активные суслики, которых провоцировали к пробуждению в январе-феврале перемещением в лабораторную комнату с температурой воздуха 19.0 ± 1.0°C ($n = 7$). Животных декапитировали с помощью гильотины; активных зимних животных – через 12–13 ч после пробуждения при температуре тела 37ºC. Отбирали миокард левого желудочка сердца и часть длиннейшей мышцы спины m. longissimus dorsi (в области пояснично-крестцового отдела позвоночника). Образцы замораживали и хранили при –70°C. Состав и содержание жирных кислот в образцах миокарда и спинной мышцы определяли на аналитическом газовом хроматографе, как описано ранее [10]. Общее количество ЖК в тканях определяли суммированием количества всех индивидуальных ЖК в каждом образце и выражали в мкг/мг ткани. Содержание каждой индивидуальной кислоты выражали в процентах от общего количества ЖК в ткани. Для статистического анализа по критерию Манна–Уитни использовали программу GraphPad.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состав и количество индивидуальных ЖК в миокарде левого желудочка сердца животных представлены в табл. 1. Не обнаружено достоверных изменений суммарного количества ЖК (в мкг/мг ткани) в сердечной мышце ни в одной из исследуемых групп животных. Однако при этом содержание дигомо-гамма-линоленовой кислоты (ДГЛК) в миокарде зимних спящих сусликов достоверно снижалось по отношению к осенним активным животным. Количество α-линоленовой кислоты достоверно увеличивалось в сердце зимних спящих сусликов по отношению к осенним активным животным. Содержание докозагексаеновой кислоты (ДГК) достоверно снижалось в миокарде зимних спящих сусликов по отношению к летним активным и осенним активным животным. У зимних спящих и зимних активных сусликов также наблюдалось достоверное снижение суммарного содержания полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Отношение линолевая кислота/ДГК достоверно резко возрастало у зимних спящих животных по отношению к летним, осенним и зимним активным сусликам.

Состав и количество ЖК в спинной мышце представлены в табл. 2. Наблюдалась выраженная тенденция снижения количества ЖК (выраженного в мкг/мг ткани) в скелетной мышце у осенних животных по отношению к летним, зимним спящим и зимним активным сусликам. Количество пальмитиновой кислоты уменьшалось у зимних спящих и зимних активных сусликов по сравнению с летними и осенними животными. Возрастало количество пальмитолеиновой кислоты у зимних спящих животных по отношению к летним и осенним. По сравнению с летними животными возрастало количество стеариновой кислоты у осенних, зимних спящих и зимних активных животных. У зимних спящих сусликов достоверно снижалось количество ДГЛК по отношению к осенним животным. По отношению к летнему периоду достоверно увеличивалось суммарное

Таблица 1. Содержание жирных кислот в миокарде левого желудочка сердца сусликов

Жирная кислота	Сезонное состояние животных			
	Летние	Осенние активные	Зимние спящие	Зимние активные
Миристиновая (14:0)	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.1	0.51 ± 0.07	0.33 ± 0.16
Пальмитиновая (16:0)	12.79 ± 0.63	13.18 ± 0.64	9.77 ± 0.67	10.39 ± 0.4
Пальмитолеиновая (16:1, n-7)	1.85 ± 0.23	1.74 ± 0.48	1.98 ± 0.38	1.64 ± 0.34
Стеариновая (18:0)	11.72 ± 1.3	14.28 ± 1.7	14.41 ± 1.18	16.45 ± 1.45
Олеиновая (18:1, n-9)	19.09 ± 1.84	15.75 ± 2.64	21.81 ± 1.59	20.78 ± 1.91
Вакценовая (18:1, n-7)	2.27 ± 0.53	3.08 ± 0.11	2.84 ± 0.12	3.03 ± 0.18
Линолевая (18:2, n-6)	37.15 ± 1.45	37.20 ± 1.35	34.29 ± 1.89	32.90 ± 1.51
γ-Линоленовая (18:3, n-6)	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.17 ± 0.08
α-Линоленовая (18:3, n-3)	1.48 ± 0.25	0.47 ± 0.13	2.09 ± 0.74*	0.69 ± 0.50
Дигомо-γ-линоленовая (20:3, n-6)	0.37 ± 0.14	0.50 ± 0.05	0.20 ± 0.04*	0.29 ± 0.04
Арахидоновая (20:4, n-6)	8.17 ± 1.50	10.91 ± 1.81	9.77 ± 0.90	12.93 ± 1.84
Докозагексаеновая (22:6, n-3)	0.53 ± 0.08	0.66 ± 0.09	0.23 ± 0.04§	0.33 ± 0.08
Нервоновая (24:1, n-9)	0.62 ± 0.25	0.68 ± 0.13	0.37 ± 0.09	0.48 ± 0.12
Линолевая /ДГК	67.70 ± 20.44	55.67 ± 20.08	165.90 ± 18.40^	52.40 ± 21.62
Сумма насыщенных ЖК, %	24.90 ± 1.87	26.76 ± 1.30	24.95 ± 0.61	26.40 ± 1.12
Сумма МНЖК, %	24.43 ± 2.17	20.36 ± 3.06	28.68 ± 1.72	26.02 ± 2.02
Сумма ПНЖК, %	51.13 ± 0.89	51.97 ± 1.35	43.80 ± 1.32##	46.93 ± 0.74#
Количество ЖК, мкг/мг ткани	27.87 ± 3.25	24.16 ± 6.43	23.82 ± 4.4	32.55 ± 4.00

Примечание. Содержание жирных кислот дано в % от их общего содержания в ткани; * – $p < 0.05$, различия достоверны по отношению к осенним животным; § – $p < 0.05$, различие достоверно по отношению к летним и осенним животным; ^ – $p < 0.05$, различие достоверно по отношению к летним, осенним и зимним активным животным; # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, различия достоверны по отношению к летним и осенним животным.

количество насыщенных ЖК у осенних, зимних спящих и зимних активных животных. Отношение линолевая кислота/ДГК достоверно не изменялось в скелетной мышце у всех исследованных групп животных (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сердечная и скелетные мышцы относятся к поперечнополосатой мышечной ткани. Это две сократительные ткани, 99% генов которых экспрессируются и в той, и в другой мышце, что подчеркивает гомологию между ними [11]. Однако во время гибернации к этим мышцам предъявляются совершенно разные функциональные требования. Несмотря на пониженное потребление кислорода и пониженную температуру тела сердце должно поддерживать кровообращение путем регулярных сокращений, чтобы гарантировать достаточную перфузию организма. Функциональная активность сердечной мышцы зависит от различных источников энергии для поддержания ее целостности и сократимости в течение всего сезона гибернации, а также от экспрессии профиля сердечных генов для кардиозащиты. Скелетные мышцы остаются в основном неподвижными в течение пяти-шести месяцев, но должны возобновить свою сократительную способность во время межбаутной зимней активности и во время заключительного пробуждения весной. Сократительная способность скелетных мышц зависит от типа мышечных волокон («медленные» или «быстрые»), а также от уникального контроля за оборотом белков для поддержания их функциональности и тонуса [11]. В связи с различиями в функционировании миокарда и скелетных мышц при спячке обнаруженные в них изменения содержания ЖК, вероятно, имеют разное функцио-

Таблица 2. Содержание жирных кислот в скелетной мышце сусликов

Жирная кислота	Сезонное состояние животных			
	летние	осенние активные	зимние спящие	зимние активные
Миристиновая (14:0)	0.62 ± 0.03	0.68 ± 0.06	0.57 ± 0.1	0.58 ± 0.06
Пальмитиновая (16:0)	13.58 ± 0.58	14.25 ± 0.37	11.07 ± 0.51*	10.93 ± 0.38*
Пальмитолеиновая (16:1, n-7)	3.74 ± 0.43	3.26 ± 0.35	5.38 ± 0.45*	4.63 ± 0.56
Стеариновая (18:0)	4.63 ± 0.56	11.52 ± 0.76###	10.06 ± 1.26###	11.76 ± 1.46###
Олеиновая (18:1, n-9)	23.21 ± 3.3	23.79 ± 1.55	29.62 ± 2.45	28.86 ± 2.71
Вакценовая (18:1, n-7	2.74 ± 0.34	3.22 ± 0.13	3.31 ± 0.19	2.92 ± 0.22
Линолевая (18:2, n-6)	32.26 ± 2.52	36.23 ± 1.45	28.91 ± 1.46	31.71 ± 1.56
γ-Линоленовая (18:3, n-6)	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02
α-Линоленовая (18:3, n-3)	1.14 ± 0.24	1.25 ± 0.39	0.82 ± 0.51	2.1 ± 0.74
Дигомо-γ-линоленовая (20:3, n-6)	0.33 ± 0.02	0.42 ± 0.05	0.26 ± 0.03^	0.29 ± 0.03
Арахидоновая (20:4, n-6)	7.0 ± 1.44	7.49 ± 0.62	7.79 ± 1.16	6.77 ± 1.03
Докозагексаеновая (22:6, n-3)	0.48 ± 0.11	0.78 ± 0.3	0.56 ± 0.07	0.54 ± 0.1
Нервоновая (24:1, n-9)	0.91 ± 0.18	0.33 ± 0.09	0.29 ± 0.1	0.2 ± 0.14
Линолевая/ДГК	78.68 ± 20.96	58.79 ± 9.58	63.11 ± 7.45	70.00 ± 10.57
Сумма насыщенных ЖК, %	18.17 ± 0.91	26.6 ± 1.0###	22.33 ± 0.86##	23.56 ± 1.51#
Сумма МНЖК (%)	31.59 ± 3.59	28,43 ± 1.81	39.21 ± 2.83	41.23 ± 3.28
Сумма ПНЖК (%)	46.26 ± 2.54	45.66 ± 1.25	37.41 ± 2.12	40.51 ± 2.26
Количество ЖК (мкг/мг ткани)	20.85 ± 2.94	11.09 ± 1.86	22.78 ± 3.61	22.17 ± 2.32

Примечание. Содержание жирных кислот дано в % от их общего содержания в ткани; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, различия достоверны по отношению к летним и осенним животным; # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$, различия достоверны по отношению к летним животным; ^ – $p < 0.05$, различие достоверно по отношению к осенним активным животным.

нальное значение для адаптации в различные сезоны.

Миокард левого желудочка сердца. Сниженное количество ДГЛК в сердечной мышце зимних спящих животных по отношению к осенним активным сусликам может быть связано с тем, что эта кислота является субстратом для ферментов эйкозаноидного каскада в большинстве тканей [12] и под действием циклоксигеназы превращается в противовоспалительные простагландины серии 1 [13]. Полагают, что воспаление является важным и центральным процессом, регулируемым несколькими соединениями во время зимней спячки [14]. Кроме того, оксилипин, образующийся из этой кислоты под влиянием 12-липоксигеназы, обладает кардиозащитным действием. Он регулирует функцию тромбоцитов, препятствуя их агрегации, что может иметь значение при спячке животных [15].

Значительное снижение количества ДГК в ткани левого желудочка якутских зимних спящих сусликов согласуется с исследованиями на малых гибернаторах, у которых резко снижен уровень n-3 (омега-3) ЖК в мембранных фосфолипидах ключевых органов, таких как сердце или мышцы [16–19]. Спящие млекопитающие сохраняют синусовый ритм, даже если температура тела приближается к 0°C [20]. Эта уникальная способность сердца гибернаторов обусловлена поддержанием достаточно быстрого удаления кальция из цитоплазмы в саркоплазматический ретикулум после сокращения, несмотря на низкую температуру тела [21, 22]. Данный процесс находится под контролем кальциевой АТФазы саркоплазматического ретикулума (SERCA2). Это ключевой фермент, экспрессия гена и концентрация белка которого увеличиваются при подготовке к гибернации [23]. Обнаружено, что активность

SERCA в сердечной мышце сирийского хомячка сильно возрастала по мере увеличения доли линолевой кислоты в фосфолипидах саркоплазматического ретикулума, а увеличение содержания ДГК снижало активность SERCA. У подгруппы хомячков, которые никогда не впадали в оцепенение, но оставались эутермными в течение зимы, в мембранах саркоплазматического ретикулума наблюдалось более низкое содержание линолевой кислоты и повышенное содержание ДГК, как и в мембранах у животных в летний период [18]. Полагают, что жирнокислотный состав мембран саркоплазматического ретикулума сердца модулирует активность SERCA, тем самым определяя минимальную температуру тела, переносимую гибернаторами, а высокие уровни ДГК предотвращают впадение гибернаторов в оцепенение, подтверждая ремоделирование мембран во время гибернации с определенным удалением и/или окислением ДГК и сохранением линолевой кислоты в тканях и мембранах [24]. В ткани сердца зимних спящих якутских сусликов количество линолевой кислоты значительно превосходит содержание любой другой ЖК, но достоверно не различается во все сезоны. Поддержание активности кальциевой АТФазы саркоплазматического ретикулума у сусликов, вероятно, обусловлено значительным снижением содержания ДГК в сердечной мышце. Об этом свидетельствует увеличение в этот период количества α-линоленовой кислоты, являющейся предшественником синтеза ДГК, а также резкое возрастание отношения линолевая кислота/ДГК у зимних спящих животных. Точные биохимические механизмы, с помощью которых линолевая кислота влияет на активность SERCA, пока неизвестны. Наиболее вероятными считаются конформационные изменения мембран под влиянием физических свойств некоторых ненасыщенных ЖК, связанных с трансмембранными белками [25].

Хотя содержание индивидуальных ЖК в сердечной мышце животных за исключением ДГЛК и ДГК достоверно не изменяется, суммарное количество ПНЖК достоверно снижается у зимних спящих и зимних активных якутских сусликов. Уровень насыщенности ЖК мембран напрямую влияет на их текучесть и проницаемость. В целом у гибернирующих видов мембраны тканей тела содержат более высокие уровни ненасыщенных жирных кислот перед зимой по сравнению с летом [26]. Однако в наших экспериментах в миокарде якутских сусликов количество моно- и полиненасыщенных жирных кислот (МНЖК + ПНЖК) практически не изменялось во все исследованные сезоны. Снижение количества ПНЖК у зимних спящих и зимних активных животных по отношению к летним и осенним, вероятно, компенсировалось увеличением количества МНЖК. В период зимней спячки ПНЖК не подвергаются окислению, а сохраняются в тканях и мембранах, чтобы обеспечить нормальное функционирование организма при низкой температуре тела. ПНЖК, особенно n-6, накапливаются в белой жировой ткани многих гибернаторов. Избирательное использование ЖК, вероятно, свидетельствует о физиологической роли ПНЖК, отличной от использования только в качестве источника энергии [13]. ПНЖК являются важным фактором в функционировании ионных каналов, активности мембраносвязанных ферментов, регуляции экспрессии генов, эндоцитоза/экзоцитоза, выживаемости при низких температурах окружающей среды [27, 28]. Повышенное потребление с пищей n-6 ПНЖК, особенно линолевой кислоты, удлиняет продолжительность приступа оцепенения. Полагают, что именно высокая доля линолевой кислоты в мембранах саркоплазматического ретикулума, а не общее высокое содержание n-6 ПНЖК, определяет минимальный уровень температуры тела, который гибернаторы могут переносить во время оцепенения [18].

Из-за своих двойных связей ПНЖК менее устойчивы к перекисному окислению и могут образовывать соединения, нарушающие структуру биологических мембран [29, 30]. Наиболее разрушительным и реактивным продуктом перекисного окисления липидов является альдегид 4-гидрокси-2-ноненал, преимущественно образующийся из гидропероксидов линолевой и арахидоновой кислот [31]. Возможно, достоверное снижение зимой содержания суммарных ПНЖК по сравнению с суммарным количеством насыщенных ЖК + МНЖК в сердечной мышце сусликов связано с ограничением перекисного окисления жирных кислот для сохранения жизненно важных функций во время оцепенения. Эти данные частично согласуются с результатами определения жирных кислот у бурых медведей, количество МНЖК в мембранах которых было выше, чем ПНЖК во время гибернации [32].

Скелетная мышца. В отличие от сердца, где отсутствуют достоверные изменения в суммарном содержании ЖК на мг ткани во всех исследованных группах сусликов, в скелетной мышце сусликов в осенний период обнаружена выраженная тенденция снижения их количества. Вероятно, это связано с тем, что осенью запасание ЖК происходит в основном в виде триглицеридов в белом жире, из которых они высвобождаются под действием липаз и поступают в мышцы в период гибернации. Общим для сердечной и спинной мышцы является достоверное снижение количества ДГЛК у зимних спящих животных по отношению к осенним, что, как упоминалось выше, может быть обусловлено превращением ее в противовоспалительные простагландины. Однако в плазме бурых медведей был обнаружен повышенный уровень ДГЛК во время зимней спячки по сравнению с летним активным сезоном, тогда как в мышечной ткани изменения не наблюдались ни

в одном из сезонов. Авторы работы [13] полагают, что поддержание относительно высоких уровней простагландинов зимой способствует поддержанию целостности мышц медведей во время спячки. Вероятно, сезонные изменения количества ДГЛК могут отличаться у крупных и малых гибернаторов.

Снижение количества пальмитиновой кислоты у зимних спящих и зимних активных сусликов может быть связано с использованием ее для получения энергии в результате окисления. Показана избирательная мобилизация пальмитиновой кислоты из белого жира для окисления зимой у серых мышиных лемуров [33]. На изолированных сердцах сусликов Ричардсона показано, что потребление пальмитиновой кислоты как источника ацетил-КоА в цикле лимонной кислоты было более чем в два раза выше в сердцах спящих животных по сравнению с сердцами животных, не находящихся в спячке [34]. Не исключено, что в качестве энергетического субстрата пальмитиновая кислота может использоваться и в спинной мышце. Кроме того, пальмитиновая кислота является субстратом для образования пальмитолеиновой кислоты под действием Δ9-десатуразы. Количество пальмитолеиновой кислоты повышено у зимних спящих животных по отношению к летним и осенним. Уровень пальмитолеиновой кислоты, участвующей в регуляции многих биологических функций *in vitro* и *in vivo*, определяется активностью сигнального пути mTOR, который является центральным регулятором липогенеза на уровне транскрипции. Эта кислота участвует в метаболических процессах подавления экспрессии провоспалительных генов, в первую очередь за счет инактивации главного провоспалительного фактора транскрипции NF-$\varkappa$B, и, таким образом, в снижении продукции цитокинов и предотвращении воспаления тканей [35, 36]. Было показано, что пальмитолеиновая кислота также является положительным модулятором липолиза белого жира посредством механизма, который включает увеличение содержания липазы триглицеридов жировой ткани и требует активации ядерного рецептора PPARα [37]. Пальмитолеат, высвобождаемый из белой жировой ткани, является «липокином», который может способствовать системному метаболическому гомеостазу [38]. Положительная корреляция между уровнем пальмитолеиновой кислоты и активацией сигнального пути mTOR, возможно, связана с сигнальными путями, регулирующими мышечную массу.

Исследования экспрессии генов: транскрипции и синтеза белков, а также фосфорилирования белков предполагают важность сигнального пути mTOR для предотвращения атрофии мышц во время спячки [39–43].

Увеличение суммарного количества насыщенных ЖК в мышечной ткани у осенних, зимних спящих и зимних активных сусликов, вероятно, происходит в основном за счет возрастания содержания стеариновой кислоты в результате ее мобилизации из белого жира. На адипоцитах белого жира тринадцатиполосного суслика показана преимущественная мобилизация насыщенных пальмитиновой и стеариновой кислот [44]. Причины увеличения стеариновой кислоты и суммарного количества насыщенных ЖК в мышечной ткани неясны. С одной стороны, насыщенные ЖК в отличие от МНЖК и ПНЖК обладают более высоким патогенным потенциалом. Они участвуют в патогенезе метаболических заболеваний, включая ожирение, сахарный диабет 2-го типа и сердечно-сосудистые заболевания [45–48]. С другой стороны, насыщенные ЖК более устойчивы к перекисному окислению, так же как и МНЖК. Выраженная тенденция к увеличению суммарного количества МНЖК в мышечной ткани зимних спящих и зимних активных якутских сусликов совпадает с данными об увеличении количества МНЖК у находящихся в спячке бурых медведей [32]. Вероятно, увеличение суммарного количества насыщенных ЖК + МНЖК связано с ограничением генерации окислительного стресса, для сохранения жизненно важных функций во время оцепенения.

Таким образом, снижение количества ДГЛК в миокарде и спинной мышце может свидетельствовать об общем механизме предотвращения воспалительного процесса в этих тканях. В отличие от сердечной мышцы, функционирование которой у спящих животных обеспечивается снижением количества ДГК для нормальной работы кальциевой АТФазы саркоплазматического ретикулума (SERCA), в спинной мышце для сохранения ее сократительной способности, вероятно, играет важную роль пальмитолеиновая кислота. Обнаруженные изменения количества ЖК, вероятно, важны для поддержания жизненно важных функций животных в различные сезоны и могут быть полезны для понимания механизмов гибернации, а также, в будущем, для практической медицины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась на базе Центра коллективного пользования ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена рамках Государственного задания № 075-00381-21-00 ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проводили с соблюдением правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609)EEC) и в соответствии с требованиями комиссии по этике ИБК РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Ануфриев, *Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии* (Изд-во СО РАН, Новосибирск, 2008).
2. W. K. Milsom, M. B. Zimmer, and M. B. Harris, Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. **124** (4) 383 (1999).
3. H. V. Carey, M. T. Andrews, and S. L. Martin, Physiol. Rev. **83**, 1153 (2003).
4. J. F. Staples and J. C. L. Brown, J. Comp. Physiol. B. **178** (7) 811 (2008).
5. M. T. Andrews, K. P. Russeth, L. R. Drewes, and P. Henry, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **296** (2), R383 (2009).
6. A. R. Graesli, A. L. Evans, A. Fahlman, et al., BMC Vet. Res. **11** 301 (2015).
7. J. U. An, S. E. Kim, and D. K. Oh, Prog. Lipid. Res. **83**, 101110 (2021). DOI: 10.1016/j.plipres.2021.101110
8. K. Sánchez-Alegría, C. E. Bastián-Eugenio, L. Vaca, and C. Arias, FASEB J. **35** (7), e21712 (2021). DOI: 10.1096/fj.202100243R
9. P. C. Calder, JPEN J. Parenter .Enteral. Nutr. **39** (Suppl. 1), 18S (2015).
10. Т. П. Кулагина, Ю. В. Грицына, А. В. Ариповский и др., Биофизика **63** (5), 1004 (2018).
11. K. L. Vermillion, K. J. Anderson, M. Hampton, and M. T. Andrews, Physiol. Genomics **47** (3), 58 (2015).
12. G. Schmitz and J. Ecker, Prog. Lipid. Res. **47**, 147 (2008).
13. S. Giroud, A. L. Evans, I. Chery, et al., Naturwissenschaften **105** (9–10), 58 (2018).
14. K. Mominoki, M. Morimatsu, M. Karjalainen, et al., Comp. Biochem. Physiol. A **142**, 472 (2005).
15. J. Yeung, B. E. Tourdot, R. Adili, et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **36** (10), 2068 (2016).
16. F. Geiser, B. M. McAllan, G. J. Kenagy, and S. M. Hiebert, Naturwissenschaften **94**, 319 (2007).
17. W. Arnold, T. Ruf, F. Frey-Roos, and U. Bruns, PLoS One **6**, e18641 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0018641
18. S. Giroud, C. Frare, A. Strijkstra, et al., PLoS One **8**, e63111 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0063111
19. W. Arnold, S. Giroud, T. G. Valencak, and T. Ruf, Physiology **30**, 232 (2015).
20. B. W. Johansson, Cardiovasc. Res. **31**, 826 (1996).
21. S. Q. Wang, E. G. Lakatta, H. Cheng, and Z. Q. Zhou, J. Exp. Biol. **205**, 2957 (2002).
22. M. T. Andrews, BioEssays **29**, 431 (2007).
23. A. Yatani, S. J. Kim, R. K. Kudej, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **286**, 2219 (2004).
24. S. Giroud, G. Stalder, H. Gerritsmann, et al., Front. Physiol. **9**, 1235 (2018).
25. R. Phillips, T. Ursell, P. Wiggins, and P. Sens, Nature **459**, 379 (2009).
26. J. Dark, Annu. Rev. Nutr. **25**, 469 (2005).
27. R. Pamplona, Biochim. Biophys. Acta **1777** (10), 1249 (2008).
28. J. G. Wallis, J. L.Watts, and J. Browse, Trends Biochem. Sci. **27**(9), 467 (2002).
29. A. J. Hulbert, R. Pamplona, R. Buffenstein, and W. A. Buttemer, Physiol. Rev. **87**, 1175 (2007).
30. J. C. L. Brown, D. J. Chung, K. R. Belgraveand, and J. F. Staples, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **302** (1), 15 (2012).
31. T. Ruf and W. Arnold, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **294** (3), 1044 (2008).
32. S. Giroud, I. Chery, F. Bertile, et al., Front. Physiol. **10**, 389 (2019).
33. S. Giroud, M. Perret, C. Gilbert, et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **297** (4), 950 (2009).
34. D. D. Belke, L. C. H. Wang, and G. D. Lopaschuk, Biochim. Biophys. Acta **1391** (1), 25 (1998).
35. C. O. Souza, A. A. Teixeira, L. A. Biondo, et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **44** (5), 566 (2017).
36. G. Yin, Y. Wang, X. M. Cen, et al., J. Immunol. Res. **2017**, 3262384 (2017). DOI: 10.1155/2017/3262384
37. A. Bolsoni-Lopes, W. T. Festuccia, T. S. Farias, et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. **305** (9), 1093 (2013).
38. H. Cao, K. Gerhold, J. R. Mayers, et al., Cell. **134** (6), 933 (2008).
39. A. V. Goropashnaya, B. M. Barnes, and V. B. Fedorov, Sci Rep. **10** (1), 9010 (2020).
40. K. L. Vermillion, K. J. Anderson, M. Hampton, and M. T. Andrews, Physiol. Genom. **47** (3), 58 (2015).
41. E. Andres-Mateos, H. Brinkmeier , T. N. Burks, et al., EMBO Mol. Med. **5** (1), 80 (2013).
42. C. X. Yang, Y. He, Y. F. Gao, et al., Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. **176**, 26 (2014).
43. R. Xu, E. Andres-Mateos, R. Mejias, et al., Exp. Neurol. **247**, 392 (2013).
44. E. R. Price, C. Armstrong, C. G. Guglielmo, and J. F. Staples, Physiol. Biochem. Zool. **86** (2), 205 (2013).
45. G. M. Stuttgen and D. Sahoo, Endocrinology **162** (8), bqab111 2021. DOI: 10.1210/endocr/bqab111
46. K. Sánchez-Alegría, C. E. Bastián-Eugenio, L. Vaca, and C. Arias, FASEB J. **35** (7), e21712 (2021). DOI: 10.1096/fj.202100243R
47. J. S. Lee, S. K. Pinnamaneni, S. J. Eo, et al., J. Appl. Physiol. **100** (5), 1467 (2006).
48. A. Kadotani, Y. Tsuchiya, H. Hatakeyama, et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. **297** (6), 1291 (2009).

Seasonal Changes in the Fatty Acid Content of Myocardial and Longissimus Dorsi Muscles of Long-Tailed Ground Squirrel *Urocitellus undulatus*

T.P. Kulagina*, S.S. Popova, and A.V. Aripovsky*****

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

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

****Research and Production Company "A-BIO", Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Seasonal changes in the fatty acid content of myocardial and skeletal muscles (m. longissimus dorsi) of Yakutian ground squirrels *Urocitellus undulatus* were determined. Muscle samples were collected from ground squirrels during summer, autumn active, winter torpid, and winter active states. Compared with autumn active ground squirrels, in the cardiac muscle of winter active animals, docosahexaenoic acid levels tended to fall due to elevated α-linoleic acid contents as well as dihomo-gamma-linoleic acid levels decreased. Total polyunsaturated fatty acid was seen to decrease in muscle samples of winter torpid and winter active ground squirrels as compared to those of summer and autumn active animals. In skeletal muscles of winter torpid and winter active animals, the palmitic acid decreased as opposed to that observed in summer and autumn active ground squirrels. However, the palmitoleic acid level was higher during winter torpor compared to the summer and autumn active states. In winter torpid animals, the level of dihomo-gamma-linoleic acid was lower than that in autumn active ground squirrels. A proportion of stearic acid were greater in autumn active, winter torpid and winter active ground squirrels than in summer animals. It was shown that the total saturated fatty acid was greater in autumn active, winter torpid and winter active ground squirrels than in summer animals. The possible role of temperature conditions in seasonal variations in the fatty acid content in the striated muscle of the long-tailed ground squirrel is under discussion.

Keywords: hibernation, striated muscles, fatty acids

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1186–1191

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 576.5

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} НА ЗАВИСИМОСТЬ «ЧАСТОТА–СИЛА»: ЭФФЕКТ ПОТЕНЦИАЦИИ ПАУЗОЙ В УСЛОВИЯХ ВЫРАЖЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ В МИОКАРДЕ МОРСКОЙ СВИНКИ

© 2021 г. А.С. Аверин, Н.М. Захарова, Д.А. Игнатьев

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

E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 06.09.2021 г.
После доработки 06.09.2021 г.
Принята к публикации 17.09.2021 г.

Исследовано влияние четырехкратного снижения концентрации Ca^{2+} в перфузирующей среде в условиях выраженной гипотермии на сократительные ответы папиллярных мышц правого желудочка морской свинки – зависимости «частота–сила» в интервале частот 0.1–1.0 Гц и эффекта потенциации паузой при частоте стимуляции 0.3 и 0.8 Гц при температуре 20°C. Показано, что при снижении концентрации внеклеточного Ca^{2+} происходило значительное снижение силы сокращения папиллярных мышц от 40 до 70%, достигающее максимума в 72 ± 3% при частоте 0.4 Гц; при этом сохранялся положительный характер зависимости «частота–сила». Абсолютные значения эффекта потенциации паузой снижались, причем наиболее выраженно при более низкой частоте стимуляции (79 ± 6% и 40 ± 19% при 0.3 и 0.8 Гц соответственно). Таким образом, показано, что в условиях выраженной гипотермии в миокарде морской свинки сохраняется преимущественная зависимость сокращения от внеклеточных источников Ca^{2+}, вместе с тем увеличение частоты стимуляции ведет к увеличению содержания Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме.

Ключевые слова: миокард, гипотермия, зависимость «частота–сила», потенциация паузой, морская свинка, внеклеточный Ca^{2+}.

DOI: 10.31857/S0006302921060144

Частота сокращений сердца является одним из важнейших показателей работы миокарда. Помимо этого, показано, что частота сокращений сердца является также важным внутренним регулятором, позволяющим адаптировать производительность сердца согласно потребностям организма. В миокарде большинства млекопитающих ее рост ведет к увеличению силы сокращения (положительный инотропный эффект) [1]. Исключение составляет миокард крыс и мышей, для которых описан двухфазный тип зависимости «частота–сила» (ЧС) [2, 3]. Еще одним важным показателем работы миокарда является эффект потенциации паузой, который может служить не только качественным показателем содержания Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме (СР) [4], но и важным диагностическим признаком [5, 6].

Из данных литературы известно, что при изменении концентрации внеклеточного Ca^{2+} может происходить изменение характера ЧС [7, 8] и выраженности эффекта потенциации паузой [9].

Помимо трансформации ритмоинотропных эффектов изменение уровня внеклеточного Ca^{2+} оказывает влияние на большое число физиологических параметров в сердце: чувствительность к адренергической стимуляции [10], сократительный ответ миокарда [11] и его пассивные механические свойства [12]. Снижение концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе может использоваться как дополнительный кардиопротекторный фактор при холодовой кардиоплегии [13–15].

В настоящее время отсутствует полная картина изменений ритмоинотропных характеристик при снижении концентрации внеклеточного Ca^{2+} в миокарде морской свинки в условиях выраженной гипотермии. Данное исследование посвящено исследованию влияния снижения Ca^{2+} до 0.45 мМ в перфузирующей среде в условиях выраженной гипотермии (20°C) на сократитель-

Сокращения: ЧС – зависимость «частота–сила», СР – саркоплазматической ретикулум.

ные ответы папиллярной мышцы правого желудочка морской свинки, а именно зависимости «частота–сила» (диапазон частот стимуляции 0.1–1.0 Гц) и эффекта потенциации паузой при частоте стимуляции 0.3 и 0.8 Гц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на папиллярных мышцах правого желудочка морских свинок. В экспериментах использовали морских свинок породы Агути (самцы массой 200–250 г). Животных содержали в виварии ИБК РАН в стандартных условиях в соответствии с правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев): в проветриваемых помещениях, исключающих возникновение сквозняков и резких перепадов температур. Световой режим составлял 12 ч света и 12 ч темноты, режим кормления – *ad libitum*. Температуру воздуха поддерживали в пределах 18–21°C.

Всех морских свинок, отобранных для эксперимента, доставляли в экспериментальное помещение из вивария не менее чем за час до его начала. Животных предварительно наркотизировали диэтиловым эфиром. Выделенное сердце помещали в раствор Тироде (20°C) следующего состава (в мМ): NaCl – 135, KCl – 4, $MgCl_2$ – 1, $CaCl_2$ – 1.8, $NaHCO_3$ – 13.2, NaH_2PO_4 – 1.8, глюкоза – 11, pH 7.4. Раствор аэрировали газовой смесью, содержащей 95% O_2 + 5% CO_2. Выделение папиллярных мышц, стимуляцию и измерение амплитуды сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [16] при температуре перфузирующего раствора 20 ± 0.1°C. Диаметр папиллярных мышц варьировал от 0.6 до 1.0 мм, а длина – от 1.0 до 3.0 мм. Для исследования их механической активности использовали автоматизированную установку на основе персонального компьютера и плат АЦП–ЦАП (L-Card 154 и L-Card E14-440). Механическую активность мышц регистрировали с помощью механотрона 6Х-2М. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными импульсами (напряжение 5 В; длительность 5 мс; сила тока, в два раза превышающая пороговую) частотой 0.3 Гц в течение часа для стабилизации силы сокращения.

Зависимость «частота–сила» в изометрическом режиме регистрировали в интервале частот стимуляции от 0.1 до 1.0 Гц. При построении зависимости ЧС величину силы сокращения для каждой из частот стимуляции в исследуемом диапазоне выражали в процентах по отношению к ее величине на частоте стимуляции 0.1 Гц, принимаемой за 100% [17, 18].

Регистрация эффекта паузы. На фоне постоянной стимуляции с заданной частотой, при которой сила сокращения находится на стабильном уровне (базовое сокращение), вносится пауза в стимуляции, что приводит к потенциации первого после паузы сокращения (тестового). Величину эффекта выражали в процентах по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции (0.3 и 0.8 Гц). Данные проверяли на нормальность распределения при помощи теста Шапиро–Уилка. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (one way ANOVA) (по уровню значимости $p < 0.05$). Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость «частота–сила». При температуре 20°C в диапазоне 0.1–1.0 Гц снижение уровня Ca^{2+} с 1.8 мМ до 0.45 мМ вызывало значительное (от 40 до 70%) снижение силы сокращения папиллярных мышц, достигающее максимума в 72 ± 3% при частоте 0.4 Гц (рис. 1). Данный факт еще раз иллюстрирует одну из фундаментальных особенностей миокарда – значительную зависимость силы сокращения от входа внеклеточного Ca^{2+}. Вместе с тем следует отметить, что полученное нами снижение сократимости в миокарде морской свинки было значительно более выражено, чем описано для миокарда крысы [10]. Данное различие может объясняться большим вкладом СР в активацию сокращения в миокарде крысы в условиях гипотермии [19]. В литературе встречаются данные о том, что высокие концентрации Ca^{2+} могут видоизменять характер ЧС, маскируя ее отдельные фазы [7, 8]. Следует отметить, что в нашем случае сохраняется однофазная положительная зависимость ЧС, которая характерна для здорового миокарда большинства млекопитающих [1] и морских свинок, в частности [20]; в том числе, как было показано нами ранее, и в условиях гипотермии [21]. При этом в литературе имеются данные, согласно которым увеличение частоты стимуляции в кардиомиоцитах морской свинки ведет преимущественно к снижению Ca^{2+}-тока [22, 23], однако при исследовании сократительного ответа в условиях блокирования Ca^{2+}-тока L-типа происходит подавление положительной зависимости ЧС [3, 21], что свидетельствует о возрастании роли данного механизма с увеличением частоты стимуляции. Гипотермия также может снижать пиковые значения Ca^{2+}-то-

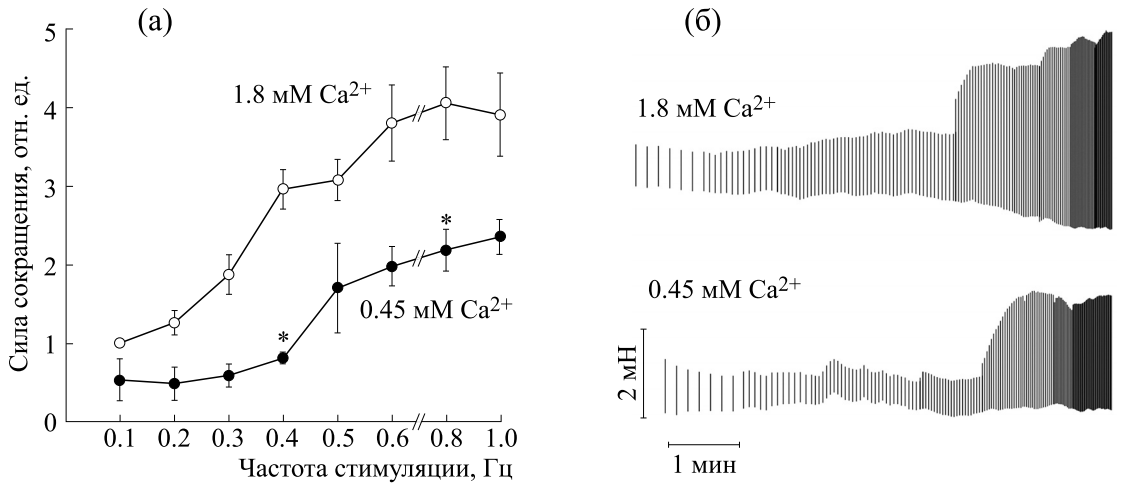


Рис. 1. Влияние концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе на зависимость «частота–сила» в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки ($n = 5$). (а) – Кривые зависимости силы сокращения от частоты стимуляции. По оси абсцисс – частота стимуляции, Гц; по оси ординат – сила изометрического сокращения по отношению к частоте стимуляции на 0.1 Гц, принимаемая за единицу. Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего (* – достоверное отличие от начальной частоты, $p < 0.05$). (б) – Оригинальные записи сокращений папиллярной мышцы при концентрации Ca^{2+} 1.8 мМ и 0.45 мМ.

ка, однако замедляется его инактивация и общее количество Ca^{2+}, вошедшего в клетку, остается на уровне, близком к исходному [24], что приводит в итоге к росту сократимости в ответ на гипотермию [25, 26], значительную роль в котором играет Ca^{2+}-ток L-типа [19, 27]. Повышение диастолического уровня кальция может само по себе оказывать положительное инотропное действие [28].

Таким образом, снижение уровня Ca^{2+} до 0.45 мМ в условиях гипотермии не вызывает заметных изменений в характере зависимости «частота–сила», и ведущую роль в активации сокращения играют внеклеточные источники Ca^{2+}, что косвенно подтверждается положительным характером ЧС.

Потенциация паузой. В контроле при частоте стимуляции 0.3 Гц эффект потенциации паузой достигал максимума при длительности паузы 15 с и составлял 25 ± 7%, постепенно снижаясь при дальнейшем увеличении длительности паузы и переходя в спад при длительности паузы 60 с (рис. 2). При снижении концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе происходило значительное снижение как силы базового сокращения на 0.3 Гц, так и сокращения после паузы, которое, как и в контрольных условиях, прогрессивно падало с увеличением продолжительности паузы, достигая минимума при 60 с, при этом уровень падения составляет 64 ± 11 и 79 ± 6% при паузах 5 и 60 с соответственно. Выраженность эффекта паузы при этом сама по себе практически не меняется.

При частоте стимуляции 0.8 Гц наблюдалась несколько иная картина: исходно внесение паузы приводило к снижению тестового сокращения относительно базового; при этом снижение содержания Ca^{2+} в растворе до 0.45 мМ приводило к тому, что вместо спада проявлялось потенцирование тестового сокращения. Абсолютная величина тестового сокращения при этом, так же, как и при частоте стимуляции 0.3 Гц, снижалась, однако спад этот был значительно менее выражен и составлял в минимуме от 18 ± 9% при паузе 10 с до 40 ± 19 при 60 с (рис. 3), ни при одной из исследованных длительностей паузы это снижение не было достоверным. Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературы, согласно которым содержание Ca^{2+} в СР морской свинки прогрессивно падает с увеличением длительности паузы [29, 30]. Неожиданным представляется тот факт, что при более высокой частоте стимуляции снижение эффекта потенциации менее выражено (рис. 2 и 3), хотя из литературных данных известно что сократимость на более высоких частотах связана преимущественно с внеклеточными источниками Ca^{2+} [3]. Это может объясняться тем, что при низкой частоте сокращений в условиях гипотермии СР со-

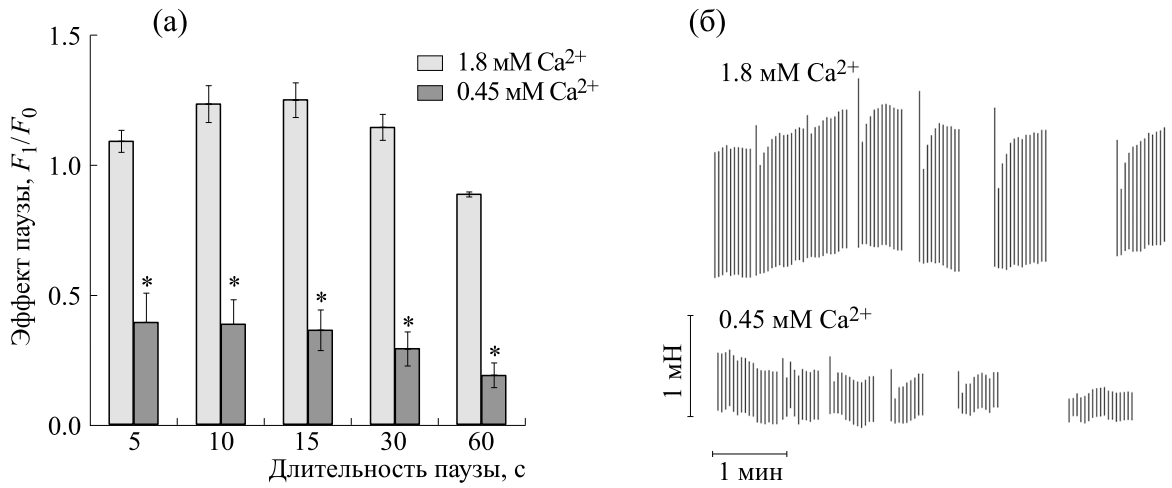


Рис. 2. (а) – Влияние концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе на эффект паузы при частоте стимуляции 0.3 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки при 20°C (n = 5). По оси абсцисс – длительность паузы; по оси ординат – сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращений при базовой частоте стимуляции (0.3 Гц), принимаемой за единицу. Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего (* – достоверное отличие от начальной частоты, $p < 0.05$). (б) – Оригинальные записи сокращений папиллярной мышцы.

держит сравнительно небольшое количество Ca^{2+}, и эффект потенциации паузой будет сильно зависеть от входа внеклеточного Ca^{2+} [31]. В то же время повышение частоты стимуляции будет способствовать заполнению СР [30] и снижать зависимость эффекта потенциации паузой от внеклеточного Ca^{2+}, при этом зависимость от внеклеточного Ca^{2+} проявляется более ярко при больших длительностях паузы, что сходно с литературными данными [32]. Таким образом, в условиях выраженной гипотермии снижение внеклеточной концентрации Ca^{2+} способствует более яркому проявлению эффекта потенциации паузой. Также меньшее влияние на абсолютные показатели первого после внесения паузы сокраще-

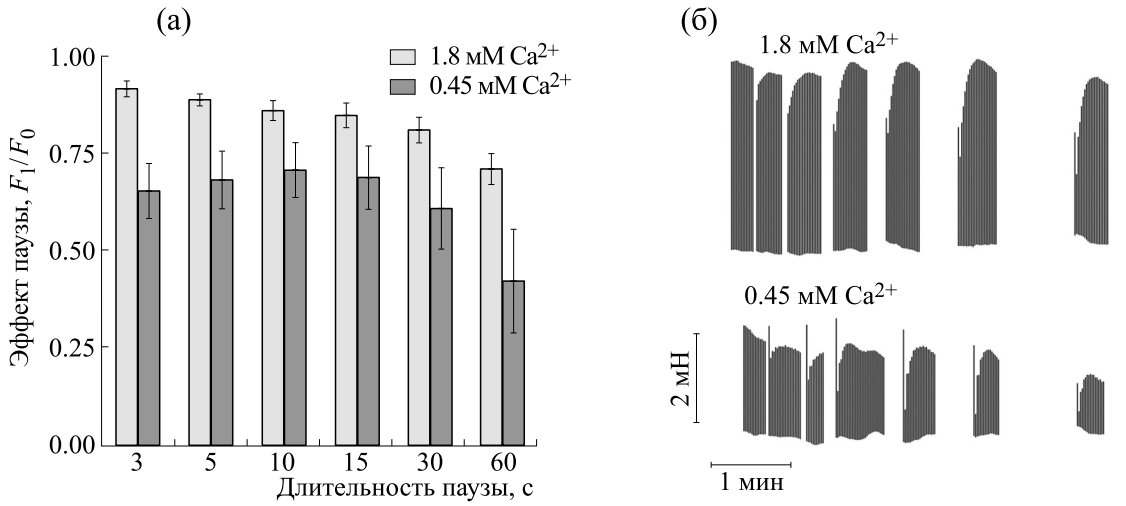


Рис. 3. (а) – Влияние концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе на эффект паузы при частоте стимуляции 0.8 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки при 20°C (n = 5). По оси абсцисс – длительность паузы; по оси ординат – сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращений при базовой частоте стимуляции (0.8 Гц), принимаемой за единицу. Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего. (б) – Оригинальные записи сокращений папиллярной мышцы.

ния при частоте стимуляции 0.8 Гц может свидетельствовать о повышении содержания Ca^{2+} в СР при увеличении частоты стимуляции.

ВЫВОДЫ

Впервые было показано, что в условиях выраженной гипотермии (20°C) при снижении концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе с 1.8 мМ до 0.45 мМ для папиллярных мышц правого желудочка морской свинки характерны следующие закономерности: сохраняется положительная зависимость «частота–сила», что может свидетельствовать о преобладании внеклеточных источников Ca^{2+} в активации сокращения; абсолютное значение эффекта потенциации паузой снижается, причем выраженность этого снижения уменьшается с увеличением частоты стимуляции, что может свидетельствовать о повышении содержании Ca^{2+} в СР с увеличением частоты стимуляции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Государственного задания «Механизмы криоустойчивости и гипобиоза у животных» (НИОКТР: АААА-А20-120101390069-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проводили с соблюдением правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609)EEC) и в соответствии с требованиями комиссии по этике ИБК РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Endoh, Eur. J. Pharmacol. **500**, 73 (2004).
2. Z. Kassiri, R. Myers, R. Kaprielian, et al., J. Physiol. **524** (Pt 1), 221 (2000).
3. B. D. Stuyvers, A. D. McCulloch, J. Guo, et al., J. Physiol. **544**, 817 (2002).
4. A. Lukas and R. Bose, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. **334**, 480 (1986).
5. S. E. Ahlberg, R. C. Hamlen, D. L. Ewert, et al., Cardiovasc. Eng. **7**, 32 (2007).
6. W. Schillinger, S. E. Lehnart, J. Prestle, et al., Basic Res. Cardiol. **93** (Suppl. 1), 38 (1998).
7. K. Li and J. L. Rouleau, J. Mol. Cell Cardiol. **27**, 1251 (1995).
8. A. Redel, W. Baumgartner, K. Golenhofen, et al., Eur. J. Physiol. **445**, 297 (2002).
9. J. G. Mill, D. V. Vassallo, and C. M. Leite, Braz. J. Med. Biol. Res. **25**, 399 (1992).
10. D. V. Vassallo, E. Q. Lima, P. Campagnaro, et al., Pharmacol. Res. **29**, 251 (1994).
11. E. Holt and G. Christensen, Am. J. Physiol. **273**, H573 (1997).
12. R. S. Kirton, A. J. Taberner, P. M. F. Nielsen, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **288**, H1662 (2005).
13. J. An, A. K. S. Camaraa, Q. Chena, and D. F. Stowea, Eur J. Cardiothorac. Surg. **24** (6), 974 (2003).
14. S. M. Minasian, M. M. Galagudza, Y. V. Dmitriev, et al., J. Cardiothorac. Surg. **8**, 60 (2013).
15. L. A. Robinson and D. L. Harwood, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. **101**, 314 (1991).
16. O. V. Nakipova, A. S. Averin, E. V. Evdokimovskii, et al., PLoS One **12**, e0177469 (2017).
17. O. V. Nakipova, A. S. Averin, L. S. Kosarsky et al., Biophysics **64** (5), 786 (2019).
18. N. M. Zakharova, O. V. Nakipova, A. S. Averin, et al., Dokl. Biol. Sci. **424**, 21 (2009).
19. M. J. Shattock, D. M. Bers, Circ. Res. **61**, 761 (1987).
20. 20. K. Mubagwa, W. Lin, K. Sipido et al., J Mol Cell Cardiol, **29**, 977 (1997).
21. А. С. Аверин, Н. М. Захарова и С. В. Тарлачков, Журн. эволюц. биохимии и физиологии **57** (4), 289 (2021).
22. S. P. Kaspar and D. J. Pelzer, J. Gen. Physiol. **106**, 175 (1995).
23. S. E. Bates and A. M. Gurney, Cardiovasc. Res. **44**, 381 (1999).
24. J. L. Puglisi, W. Yuan, J. W. Bassani, et al., Circ. Res. **85**, e7 (1999).
25. J. C. Herve, K. Yamaoka, V. W. Twist, et al., Am. J. Physiol. **263**, R177 (1992).
26. R. H. Shutt and S. E. Howlett, Am. J. Physiol. Cell Physiol. **295**, C692 (2008).
27. S. Q. Wang, Y. H. Huang, K. S. Liu, et al., Cryobiology **35**, 193 (1997).
28. R. H. Shutt, G. R. Ferrier, and S. E. Howlett, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol **291**, H1623 (2006).
29. C. M. Terracciano, R. U. Naqvi, and K. T. MacLeod, Circ. Res. **77**, 354 (1995).
30. B. M. Wolska and B. Lewartowski, J. Mol. Cell. Cardiol. **25**, 75 (1993).
31. E. R. Migliaro, M. Michelini, and H. N. Durán, Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam. **47**, 107 (1997).
32. H. Bjørnstad, P. M. Tande, and H. Refsum, Acta Physiol. Scand. **148**, 253 (1993).

Influence of Extracellular Ca^{2+} Concentration on Force-Frequency Relationship and Rest Effect under Conditions of Pronounced Hypothermia in the Myocardium of Guinea Pig

A.S. Averin, N.M. Zakharova, and D.A. Ignatiev

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

The effects of a 4-fold decrease in Ca^{2+}concentration in the perfusing medium during pronounced hypothermia on the contractile responses in right ventricle papillary muscles of the guinea pig were studied. For instance, the force-frequency relationship was analyzed between 0.1and 1.0 Hz, the rest effect was assessed at stimulation frequencies of 0.3 and 0.8 Hz at 20°C. It was shown that a decrease in the concentration of extracellular Ca^{2+} led to a significant decrease in the force of contraction of the papillary muscles from 40 to 70%, reaching a maximum value of 72 ± 3% at the frequency of 0.4 Hz, though the force-frequency relationship remained positive. The absolute values of the rest effect were decreased, it was more clearly seen at the lower stimulation frequencies (79 ± 6% and 40 ± 19% at 0.3 and 0.8 Hz, respectively). In summary, the results suggest that during pronounced hypothermia for the guinea pig myocardium, contraction primarily depends on extracellular sources of Ca^{2+}, meanwhile an increase in the stimulation frequency promotes an increase in the content of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum.

Keywords: myocardium, hypothermia, force-frequency relationship, rest effect, guinea pig, extracellular Ca^{2+}

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1192–1202

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 574.24

МЕТААНАЛИЗ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ НОРМОТЕНЗИВНЫХ КРЫС ПРИ КОЛЕБАНИЯХ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2021 г. Н.В. Кузьменко*, **, Н.С. Щербак, М.Г. Плисс*, **, В.А. Цырлин*, М.М. Галагудза***

**Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова МЗ РФ, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2*

***Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8*

E-mail: nat.kuzmencko2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2020 г.
После доработки 11.02.2021 г.
Принята к публикации 31.08.2021 г.

Представлен метаанализ результатов проведенных на крысах исследований влияния гипо- и гипертермии на функционирование сердечно-сосудистой системы. Для метаанализа были отобраны 25 публикаций из базы PubMed, в которых исследовалось влияние нагревания и охлаждения всего тела бодрствующих нормотензивных взрослых крыс на параметры гемодинамики (артериальное давление и частоту сердечных сокращений). Было исследовано влияние кратковременной существенной гипертермии (40–43°C), продолжительной умеренной гипертермии (32–34°C), кратковременной и продолжительной гипотермии (4–9°C, внезапной и постепенной, с изменением и без изменения фотопериода). Показано, что характер изменения артериального давления и частоты сердечных сокращений у нормотензивных бодрствующих крыс при колебаниях температуры окружающей среды будет определяться не только вектором изменения температуры, но также амплитудой, внезапностью, продолжительностью и сопутствующими условиями (например, длительностью фотопериода).

Ключевые слова: гипертермия, гипотермия, акклиматизация, артериальное давление, сердечный ритм.

DOI: 10.31857/S0006302921060156

Теплокровные животные (птицы и млекопитающие) способны сохранять постоянную температуру тела независимо от колебаний температуры окружающей среды, что дает им возможность поддерживать высокий уровень метаболизма в широком температурном диапазоне. Морфофизиологическую основу гомойотермии обеспечило эволюционное развитие систем, связанных с циркуляцией крови, дыханием и с развитием термоизоляции покровов тела. Важное значение в процессах терморегуляции имеют вазомоторная, дыхательная, пиломоторная реакции, а также термогенез с использованием бурого жира. Терморегуляторную стратегию животных определяют такие факторы, как размер/масса тела, густота меха, наличие безволосых участков кожи, модуляция кровотока которых играет основную роль при колебаниях температуры, а также характер диеты и доступность пищи [1–6].

Известно, что колебания температуры окружающей среды возбуждают кожные и внутренние терморецепторы, сигналы с которых направляются к термочувствительной преоптической области гипоталамуса, где определяется величина и характер физиологических реакций [7, 8]. Отсюда вегетативная нервная система обеспечивает серию терморегуляторных и сердечно-сосудистых реакций, направленных на уменьшение скорости изменения температуры тела. Эти реакции сопровождаются изменениями активности симпатической нервной системы, параметров гемодинамики, сосудистого сопротивления во внутренних органах и коже.

Показано, что как нагревание, так и охлаждение тела крысы сопровождаются увеличением активности симпатической нервной системы и уровня норадреналина в плазме и в гипоталамусе [9–12], а также адреналина в плазме [9–11] и мас-

Сокращения: AT_1 – ангиотензиновые рецепторы первого типа, АД – артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений.

сы надпочечников [13, 14]. Известно, что симпатическая нервная система способна вызывать неоднородные изменения в активности периферических симпатических нервов, чтобы избирательно контролировать регионарное кровообращение [15]. Повышение активности симпатической нервной системы обеспечивает снижение кровотока во внутренних органах в условиях гипертермии и сужение сосудов кожи в условиях гипотермии. Повышение активности симпатической нервной системы при гипертермии (41°C) было установлено при регистрации на почечных, надпочечниковых, селезеночных и поясничных симпатических нервах крыс [16], в то же время активность симпатических нервов, иннервирующих хвост, уменьшалась [17]. Воздействие холода повышает у крыс активность симпатических нервов, иннервирующих сосуды хвоста и межлопаточную бурую жировую ткань, опосредуя вазоконстрикцию и теплопродукцию [3, 18]. Было установлено, что при гипотермии наблюдается повышение активности тирозингидроксилазы в норадренергических нейронах locus coeruleus (на 164%), а также в надпочечниках (на 167–330%) [19], в то время как длительное воздействие умеренного тепла (34°C) вызывает снижение на 20–37% активности этого фермента в различных регионах ствола головного мозга (в locus coeruleus, в черной субстанции, в дорсомедиальной области продолговатого мозга) и увеличение в надпочечниках (на 31%) [20]. В экспериментах показано, что как гипертермия, так и гипотермия уменьшают вазоконстрикторную реакцию аорты на агонисты адренорецепторов [21–23] и барорефлекторную чувствительность [11, 24].

Нейропептид Y, как и норадреналин, является важным симпатическим нейротрансмиттером, участвующим в нейроваскулярной регуляции [25]. Эксперименты на крысах показали, что при воздействии холода уровень нейропептида Y значительно увеличивается в плазме, надпочечниках и гипоталамусе (в медиальной преоптической области, паравентрикулярном ядре, вентромедиальном ядре, дорсомедиальном ядре и латеральной области) [26–28]. Кроме того, обнаружено, что прессорный ответ на холод частично опосредуется данным пептидом [26].

Установлено, что температурный стресс активирует ренин-ангиотензиновую систему. Так у крыс, содержащихся при низкой температуре (4–5°C), увеличивается концентрация ангиотензина II в плазме, а также уровень мРНК ангиотензиногена и ангиотензиновых рецепторов первого типа (AT_1) в крови и в головном мозге [29, 30]. Ангиотензин II способствует прессорной реакции на гипотермию, которая предотвращается или существенно ослабляется генетической делецией ангиотензиногена или гена AT_1-рецепторов [31, 32], ингибиторами синтеза ренина [33] и ангиотензинпревращающего фермента [34], а также блокаторами AT_1-рецепторов [35, 36]. Эксперименты с антагонистом AT_1 рецепторов (лозартаном) показали, что ангиотензин II участвует в прессорной реакции и на гипертермический стресс (42°C) [37]. Кроме того, при гипертермии (41.5°C) снижается сосудистая реактивность на экзогенный ангиотензин II [21].

Показано, что у крыс, содержащихся в холодных условиях, повышен уровень эндотелина-1 в сердце, почках, артериальной стенке, но не в плазме [38]. Кроме того, при гипотермии у крыс плотность рецепторов эндотелина типа А в сердце и почках увеличивается, а плотность рецепторов эндотелина типа В – уменьшается [38]. Сосудосуживающий эффект эндотелина-1 в основном обусловлен активацией рецепторов эндотелина типа А [39]. Также установлено, что активация рецепторов эндотелина типа А играет важную роль в патогенезе гипертрофии миокарда [40].

Оксид азота (NO) является важным сосудорасширяющим агентом, который участвует в регуляции артериального давления и функции эндотелия. Исследования показали, что уровни содержания нитритов и нитратов в плазме и моче были снижены у животных, подвергшихся воздействию холода [41]. В условиях гипертермии (41–42°C), напротив, наблюдали увеличение концентрации NO в сердце и сосудах [42, 43]. При этом предварительная адаптация к гипертермии существенно снижала рост уровня NO на тепловой стресс [44].

После острой гипертермии (42°C) наблюдали увеличение релаксации аорты, брыжеечной и коронарной артерий на обработку ацетилхолином [45]. В экспериментах было показано значительное увеличение в плазме у крыс в условиях теплового стресса такого вазодилататора, как пептид, генетически родственный кальцитонину, а также вазорелаксация на его введение [46].

Таким образом, как гипертермия, так и гипотермия сопровождаются изменением активности симпатической нервной системы, концентраций различных вазоактивных веществ, что не может не внести существенные изменения в функционирование сердечно-сосудистой системы. Установлено, что при воздействии холода увеличивается минутный объем кровообращения и ударный объем [47], а также кровоток в висцеральных органах, скелетных мышцах и бурой жировой ткани, в то же время кровоток в коже уменьшается [48]. При гипертермии уменьшается кровоток в висцеральных органах и увеличивается в диафрагме и на участках повышенной теплоотдачи (непокрытые шерстью участки) без существенного изменения минутного объема кровообращения [49]. Основная цель сердечно-сосудистого ответа

Рис. 1. Стратегия и критерии при отборе публикаций, блок-схема в соответствии с Рекомендационными предписаниями для системных обзоров и метаанализов (http://prisma-statement.org/).

при колебаниях температуры окружающей среды – это поддержание постоянной температуры ядра, которое реализуется через отдачу тепла во вне при гипертермии и через повышение скорости обмена веществ при гипотермии. В данной работе мы провели метаанализ результатов экспериментальных работ, посвященных изучению изменения артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) при гипер- и гипотермии у бодрствующих нормотензивных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск работ осуществляли в базе PubMed без ограничения по году публикации. Были использованы следующие ключевые слова: «cooling», «heating», «blood pressure», «heart rate», «rats». Всего было найдено 253 публикации, из них 3 обзора. Для метаанализа были отобраны 25 публикаций из PubMed, в которых исследовалось влияние нагревания (6 работ) и охлаждения (19 работ) всего тела крысы на параметры гемодинамики (рис. 1, табл. 1). Обязательным условием было проведение эксперимента на здоровых (нормотензивные линии), интактных (ложнооперированных), молодых или зрелых (но не старых) крысах. Для исследования кратковременного высоко- и низкотемпературного стресса отбирали работы, выполненные только на бодрствующих крысах.

В большинстве работ (за исключением работы [57]), посвященных исследованию кратковременного температурного воздействия, авторы не использовали контрольных животных, а сравнивали результаты воздействия с исходными параметрами. Также в двух работах [26, 60], изучающих влияние длительной гипотермии, оценка изменений при низкотемпературной экспозиции осуществлялась относительно исходных параметров. В остальных работах, исследующих влияние длительного температурного воздействия, животные были разделены на контрольную и опытную группы, но о рандомизации при выделении групп сообщается только в пяти публикациях [11, 25, 34, 57, 65].

Был проведен метаанализ исследований, посвященных влиянию на АД и ЧСС кратковременной гипертермии (амбиентная температура 40–43°C), а также продолжительной умеренной гипертермии (амбиентная температура 32–34°C)

Таблица 1. Публикации, отобранные для метаанализа

Публикация	ИФ	Воздействие	Линия крыс, пол, средняя масса	Способ регистрации параметров гемодинамики	Параметры	$n_о/n_к$
Кратковременная сильная гипертермия без акклиматизации						
K.C. Kregel et al., 1990 [50]	6.3	42°C, 100 мин	Sprague Dawley, самцы, 290 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС	12/12
M. Kuwahara et al., 1991 [51]	1.2	40°C, 20 мин	Wistar, самцы, 250 г	Хвостовая манжетка	АД, ЧСС	15/15
M.P. Massett et al., 2000 [24]	3.2	43°C, 60 мин	Sprague Dawley, самцы, 310 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС	6/6
C.B. Matthew, 1997 [52]	2.4	41.5°C, 30 мин	Sprague Dawley, самцы, 450 г	Телеметрия	АД, ЧСС	6/6
Длительная умеренная гипертермия без акклиматизации						
M. Horowitz and U. Meiri, 1993 [53]	3.0	34°C, 30 суток	Rattus norvegicus, самцы, 250 г	Электрокардиограф	ЧСС	25/25
C.B. Matthew, 1997 [52]	2.4	32.5°C, 14 суток	Sprague Dawley, самцы, 450 г	Телеметрия	АД, ЧСС, М	6/6
H. Nakagawa et al., 2016 [54]	2.4	33°C, 28 суток	Wistar, самцы, 345 г	Телеметрия	ЧСС	7/7
Кратковременная гипотермия без акклиматизации						
T. Ishiwata et al., 2017 [55]	2.3	5°C, 30 мин	Wistar, самцы, 330 г	Телеметрия	ЧСС	7/7
O. Kashimura, 1993 [56]	0.2	4°C, 20 мин	Wistar, самцы, 290 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС	7/7
Y.P. Liu et al., 2015 [57]	3.4	4°C, 30 мин	Sprague Dawley, самцы, 325 г	Телеметрия	АД, ЧСС	8/8
D.M. Vianna and P. Carrive, 2009 [58]	3.2	4°C, 30 мин	Wistar, самцы, 475 г	Телеметрия	АД, ЧСС	8/8
Длительная гипотермия без акклиматизации						
G.F. Chen and Z. Sun, 2006 [38]	3.3	7°C, 35 суток	Sprague Dawley, самцы, 190 г	Хвостовая манжетка	САД	7/7
M.J. Fregly et al., 1989 [59]	3.0	6°C, 28 суток	Sprague Dawley, самцы, 300 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС, М	22/24
S. Han et al., 1998 [26]	2.7	4°C, 28 суток	Sprague Dawley, самцы, 315 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС	8/8
P.E. Papanek et al., 1991 [11]	3.3	6°C, 40 суток	Sprague Dawley, самцы, 175 г	Артериальный катетер	АД, САД, ЧСС	10/10
N. Roukoyatkina et al., 1999 [60]	3.0	6°C, 56 суток	Wistar, самцы, 610 г	Хвостовая манжетка	САД, М	24/24
O. Shechtman et al., 1991 [34]	6.3	5°C, 112 суток	Sprague Dawley, самцы, 330 г	Хвостовая манжетка	САД, М	6/6
J.A. Straw and M.J. Fregly, 1967 [14]	3.0	6°C, 52 суток	Wistar, самцы, 215 г	Нет информации	ЧСС, М	7/7
Z. Sun et al., 1997 [25]	2.7	5°C, 112 суток	Sprague Dawley, самцы, 350 г	Хвостовая манжетка	САД, М	6/6
Z. Sun et al., 1999 [61]	2.7	5°C, 35 суток	Sprague Dawley, самцы, 285 г	Артериальный катетер	АД, САД	6/6
Z. Sun, 2006 [62]	3.2	5°C, 35 суток	Long-Evans, самцы, 220 г	Хвостовая манжетка	САД, М	6/6
Z. Zhu et al., 2002 [63]	3.0	5°C, 56 суток	Wistar, самцы, 225 г	Артериальный катетер	АД, САД, ЧСС	10/10
Длительная гипотермия с постепенным уменьшением температуры и длины дня						
Y. Cheng and D. Hauton, 2008 [64]	4.5	4°C, 28 суток	Wistar, самцы, 275 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС, М	6/6
D. Deveci and S. Egginton, 2007 [2]	2.5	9°C, 56 суток	Wistar, самцы, 302 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС, М	5/5
D. Hauton et al., 2011 [65]	3.0	4°C, 28 суток	Wistar, самцы, 325 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС, М	11/12
R. Sabharwal et al., 2004 [66]	2.7	5°C, 56 суток	Wistar, самцы, 300 г	Артериальный катетер	АД, ЧСС	12/14

Примечание. ИФ – импакт-фактор журнала (https://www.scimagojr.com/), АД – среднее артериальное давление, САД – систолическое артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений, М – масса тела, $n_о$ – количество животных в опытной группе, $n_к$ – количество животных в контрольной группе.

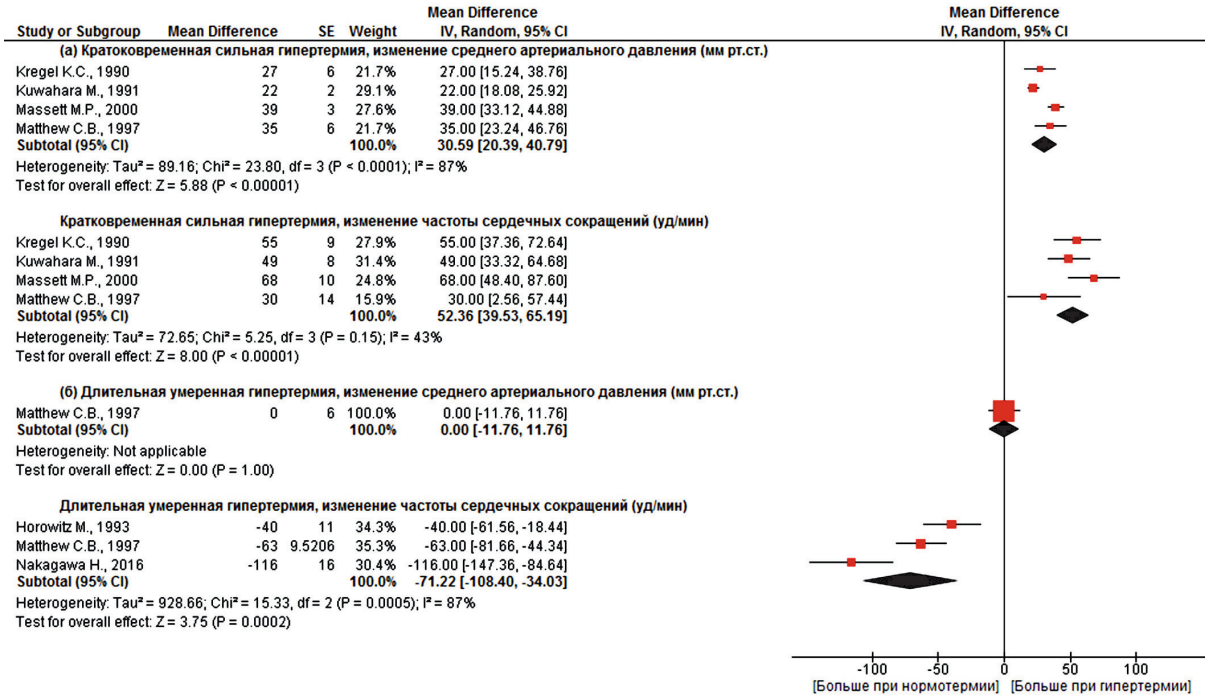


Рис. 2. Влияние гипертермии на параметры гемодинамики.

(табл. 1). Для создания гипертермии использовали инкубатор, инфракрасную лампу или климатическую камеру.

Также был проведен метаанализ экспериментальных работ, в которых изучалось кратковременное (20–30 мин) и продолжительное непрерывное воздействие (4–16 недель) охлаждения всего тела на параметры гемодинамики без предварительной акклиматизации и при постепенной, но непрерывной акклиматизации к холоду, сопровождающейся уменьшением длины дня. Гипотермические условия моделировали с помощью помещения животных в специальные климатические камеры или помещения, в которых постоянно поддерживалась температура 4–10°C. Из работ извлекали данные по АД (в мм рт. ст.) и ЧСС (уд/мин), регистрируемые в условиях нормотермии и при температурном воздействии. Также исследовалось изменение массы крыс (в граммах) после продолжительного воздействия холода в зависимости от наличия/отсутствия акклиматизации (табл. 1).

Метаанализ проводили при помощи статистической программы Review Manager 5.3 (Cochrane Library), результаты представлены в виде «forest»-диаграмм. Для анализа изменений был использован тест Inverse Variance. Гетерогенность включенных в метаанализ исследований устанавливали по критерию I^2. Выбор модели фиксированных или случайных эффектов осуществлялся согласно рекомендациям, данным в работе [67]. Для оценки статистической значимости суммарных результатов применяли Z-тест. Доверительный интервал составлял 95%. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. В тексте данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам метаанализа и нагревание, и охлаждение вызывают существенные сдвиги параметров гемодинамики у нормотензивных крыс.

При кратковременном нагревании до 40–43°C наблюдалось увеличение АД и ЧСС (рис. 2). При нормотермии АД и ЧСС составляли в среднем соответственно 110 мм рт. ст. и 370 уд/мин, при гипертермии – 139 мм рт. ст. и 421 уд/мин.

Непродолжительное умеренное нагревание (30–38°C) вызывало у крыс уменьшение АД и ЧСС [55, 68, 69], продолжительная экспозиция (несколько недель) при температуре 32–34°C не изменяла АД [52], но по результатам трех исследований уменьшала ЧСС в среднем с 380 до 307 уд/мин (рис. 2).

Установлено, что уже приблизительно через 30 мин после экспозиции при 41–43°C в миокарде повышается экспрессия мРНК белка теплового шока типа 72, несущего цитопротективную функцию. При длительном умеренном нагревании (34°C) уровень мРНК этого белка повышает-

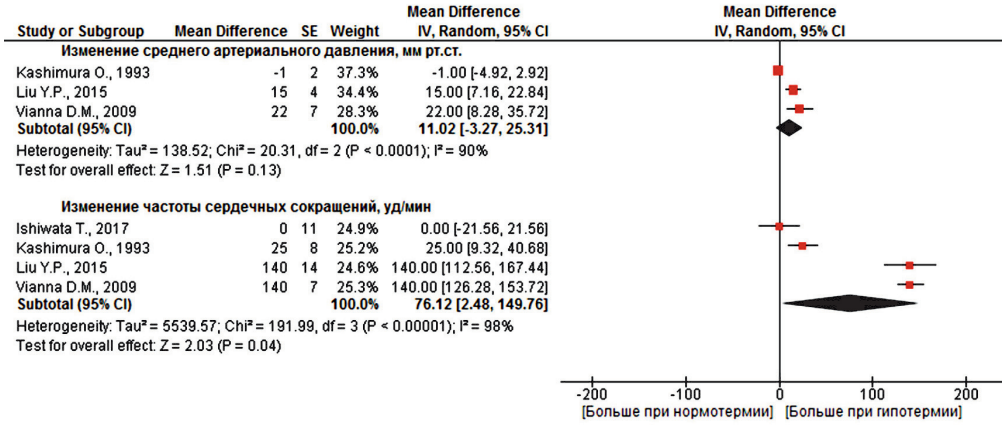


Рис. 3. Влияние кратковременной гипотермии на параметры гемодинамики.

ся в течение двух суток и затем снижается к 30-м суткам экспозиции [70]. Обширные исследования на крысах показывают, что акклиматизация к гипертермии является двухфазным процессом. Начальная фаза характеризуется усилением активности симпатической нервной системы для быстрого рассеивания тепла. В экспериментах на крысах увеличение концентрации норадреналина отмечалось не только на сильную [9], но и на умеренную гипертермию [54]. Затем возникает очевидное акклиматизированное состояние – снижение частоты сердечных сокращений, увеличение ударного объема сердца, усиление испарительного охлаждения (слюноотделение) и повышение термической выносливости, при этом симпатическая активность снижается [71]. При длительной тепловой адаптации (32–34°C) потребление пищи и масса тела уменьшались, добровольная локомоторная активность снижалась или не изменялась, а потребление воды увеличивалось [52, 54, 72].

Кратковременное охлаждение крыс (4–5°C, 20–30 мин) по результатам одних исследований не оказывало существенного влияния на уровень АД и ЧСС [61, 62], по результатам других – вызывало повышение АД и тахикардию [57, 58] (рис. 3). В работе [56] существенный подъем АД наблюдали только после понижения температуры до 0°C, а в работе [55] выраженная тахикардия развивалась только после 80 мин экспозиции при 5°C. Сдвиги параметров гемодинамики, вызванные кратковременным воздействием холода, нормализовались в течение часа после возвращения в нормотермические условия [58]. Ежедневное кратковременное охлаждение в течение продолжительного времени (четыре недели) не вызывало устойчивого изменения параметров гемодинамики, но способствовало увеличению массы тела крыс [73].

Продолжительная непрерывная экспозиция при низких температурах (без предварительной акклиматизации) сопровождалась значительным увеличением АД (в среднем с 103 до 128 мм рт. ст.) и ЧСС (в среднем с 374 до 419 уд/мин) (рис. 4, табл. 2), которые наблюдались уже через одну неделю после экспозиции, достигали максимальных значений к пятой неделе (систолическое АД – с 119 до 146 мм рт. ст.) и сохранялись в течение всего периода экспозиции (максимальный период наблюдений – один год при 15°C [6]), а также в течение по крайней мере четырех недель после окончания экспозиции [60, 74]. Если снижение температуры происходило постепенно (в течение нескольких недель) и сопровождалось постепенным уменьшением длины дня, гипертензивная реакция сохранялась, а выраженная тахикардия отсутствовала (табл. 2). Продолжительная гипотермия без предварительной акклиматизации вызывала развитие гипертрофии миокарда [25, 34, 59, 61]. В случае постепенного уменьшения температуры и фотопериода гипертрофия миокарда могла и не развиться [2].

При длительной гипотермической экспозиции без предварительной акклиматизации у животных существенно уменьшалась масса тела по сравнению с животными, находящимися в нормотермических условиях (табл. 2). Это, вероятно, связано с ускоренным метаболизмом, направленным на поддержание температуры ядра, которая при гипотермии может даже увеличиваться [60]. В работе [60] питание было нормировано, в исследовании [34] – не нормировано, а в работах [14, 25, 59] информация о питании отсутствовала. В противоположность этому, при постепенном уменьшении температуры и длины дня масса тела крыс не изменялась по сравнению с животными, содержащимися при нормальной температуре (табл. 2). При этом в работе [2] сообщалось о нормированном питании, в экспериментах, описан-

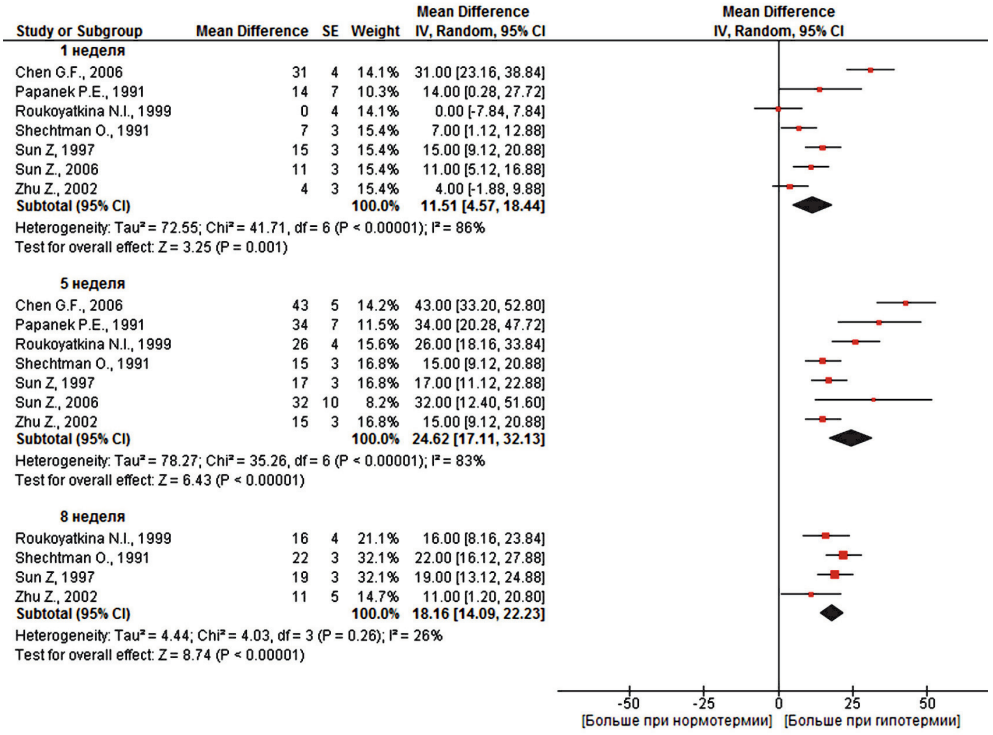


Рис. 4. Влияние длительной гипотермии без предварительной акклиматизации на уровень систолического артериального давления (мм рт. ст.).

ных в работах [64–66], питание было не ограничено. Воздействие холода вызывает у крыс повышенное потребление пищи, воды и кислорода, а также увеличивает диурез и локомоторную активность [5, 34, 62, 75]. Исследования показали, что у животных массой 100–500 г постепенная непрерывная акклиматизация к холодным условиям и короткой длине дня сопровождается увеличением массы бурого жира, общего метаболизма, недрожащего термогенеза, а также уменьшением теплопроводности [1, 2]. Длительная гипотермия без предварительной акклиматизации также вызывала у крыс увеличение массы бурого жира [34].

Адаптация к существенным колебаниям температуры окружающей среды является обычным явлением для животных, живущих в естественных условиях в климатических зонах с выраженной сезонной динамикой температуры воздуха. Эта адаптация ассоциирована с цирканнуальными колебаниями уровня тиреоидных гормонов, чувствительных к изменению концентрации мелатонина и метеорологическим условиям. Сезонные изменения длины дня и температуры воздуха являются двумя наиболее надежными сигналами для синхронизации цирканнуальных ритмов для всех живых организмов на Земле. В природе уменьшение длины дня сопровождается снижением температуры воздуха. Тем не менее действие этих двух факторов на уровень тиреоидных гормонов будет противоположным.

Так, низкие температуры стимулируют выработку тиролиберина нейросекреторными клетками гипоталамуса, что повышает синтез тиреотропного гормона передней долей гипофиза, который стимулирует секрецию тироксина щитовидной железой [76]. Тиреотропный гормон, связываясь со своими рецепторами в эпендимных клетках медиобазального гипоталамуса, стимулирует экспрессию гена DIO2 [77]. Эксперименты показали, что содержание крыс при низкой температуре (4°C кратковременное и длительное) вызывает повышение концентрации циркулирующего трийодтиронина [78, 79]. С другой стороны, уменьшение фотопериода ассоциировано с уменьшением уровня тиреотропного гормона и экспрессии DIO2, а также увеличением экспрессии DIO3, в результате чего активность тиреоидных гормонов снижается. Такая адаптационная стратегия позволяет животным снижать метаболизм для экономного использования ресурсов организма в условиях холода и дефицита кормов. В противоположность этому, увеличение фотопериода сопровождается повышением уровня тиреотропного гормона, экспрессии DIO2 и концентрации тиреоидных гормонов [80, 81]. В то же время продолжительное воздействие умеренного тепла сопряжено с уменьшени-

Таблица 2. Влияние длительной гипотермии (4–8 недель) без и с предварительной акклиматизацией на уровень среднего артериального давления, частоту сердечных сокращений и массу тела крыс

Субгруппы	Публикации	Среднее изменение при гипотермии 4–9°C	I^2, %	Z	P	Различия между субгруппами, P
Среднее артериальное давление (мм рт. ст.)						
Без акклиматизации	M.J. Fregly et al., 1989 [59]; S. Han et al., 1998 [26]; P.E. Papanek et al., 1991 [11]; Z. Sun et al., 1999 [61]; Z. Zhu et al., 2002 [63]	25.76 [12.84, 38.67]	94	3.91	< 0.0001	0.29
С акклиматизацией и уменьшением фотопериода	Y. Cheng and D. Hauton, 2008 [64]; D. Deveci and S. Egginton, 2007 [2]; D. Hauton et al., 2011 [65]; R. Sabharwal et al., 2004 [66]	15.62 [1.74, 29.51]	82	2.21	0.03	
Частота сердечных сокращений, уд/мин						
Без акклиматизации	M.J. Fregly et al., 1989 [59]; S. Han et al., 1998 [26]; P.E. Papanek et al., 1991 [11]; J.A. Straw and M.J. Fregly, 1967 [14]; Z. Zhu et al., 2002 [63]	45.71 [23.61, 67.81]	89	4.05	< 0.0001	0.01
С акклиматизацией и уменьшением фотопериода	Y. Cheng and D. Hauton, 2008 [64]; D. Deveci and S. Egginton, 2007 [2]; D. Hauton et al., 2011 [65]; R. Sabharwal et al., 2004 [66]	10.17 [–6.75, 27.10]	0	1.18	0.24	
Масса тела, г						
Без акклиматизации	M.J. Fregly et al., 1989 [59]; N. Roukoyatkina et al., 1999 [60]; O. Shechtman et al., 1991 [34]; J.A. Straw and M.J. Fregly, 1967 [14]; Z. Sun et al., 1997 [25]; Z. Sun, 2006 [62]	–40.88 [–47.41, –34.36]	31	12.28	< 0.00001	< 0.00001
С акклиматизацией и уменьшением фотопериода	Y. Cheng and D. Hauton, 2008 [64]; D. Deveci and S. Egginton, 2007 [2]; D. Hauton et al., 2011 [65];	–3.49 [–15.69, 8.70]	23	0.56	0.57	

ем концентраций циркулирующих тиреоидных гормонов [82, 83]. Следует отметить, что сильная кратковременная гипертермия (40–42°C) не оказывает существенного влияния на уровень гормонов щитовидной железы [84].

Хотя крысы обычных нормотензивных линий не проявляют выраженной сезонности, в экспериментах у крыс линии Wistar наблюдали увеличение трийодтиронина в условиях длинного дня и снижение тиреоидных гормонов, АД, ЧСС и локомоторной активности при содержании в условиях короткого дня [85, 86]. Следовательно, в то время как гипотермия повышает уровень гормонов щитовидной железы и увеличивает метаболизм, уменьшение фотопериода может нивелировать индуцированную холодом активность гормонов щитовидной железы. Это подтверждают результаты нашего метаанализа. При продолжительной непрерывной гипотермии без предварительной акклиматизации и изменения фотопериода наблюдается увеличение АД, тахикардия и снижение массы тела, а при постепенном уменьшении температуры и длины дня ЧСС и масса тела существенно не изменяются, однако гипертензивная реакция сохраняется.

Следует отметить, что в отдельных работах, в которых исследовалось влияние диеты на развитие вызванной холодом гипертензии, наблюдали

меньшее увеличение АД и ЧСС при содержании крыс на низкокалорийной диете [5, 6]. Результаты другого исследования показали, что воздействие холода приводит к повышению уровня ангиотензина II в плазме через механизмы, связанные с увеличением потребления пищи [29]. Кроме того, уменьшение калорийности питания ассоциировано со снижением уровня трийодтиронина [87].

Таким образом, проведенный нами анализ литературных данных показал, что характер изменения АД и ЧСС у нормотензивных бодрствующих крыс при колебаниях температуры окружающей среды будет определяться не только вектором изменения температуры, но также амплитудой, внезапностью, продолжительностью и сопутствующими условиями (например, фотопериодом, диетой).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Гипертермический стресс (40–43°C) сопровождается у крыс гипертензией и тахикардией; при длительном воздействии умеренного тепла (32–34°C) наблюдается брадикардия.

2. Воздействие холода (4–5C) в течение 20–30 мин может не вызвать изменения АД, но обычно вызывает тахикардию.

3. При длительном непрерывном воздействии низких температур (4–7°C) без предварительной акклиматизации наблюдается устойчивая гипертензия, тахикардия и уменьшение массы тела.

4. Постепенная непрерывная акклиматизация к гипотермии (4–9°C), сопровождающаяся уменьшением длины дня, не вызывает выраженной тахикардии и снижения массы тела.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. G. Lovegrove, J. Comp. Physiol. B **175** (4), 231 (2005).
2. D. Deveci and S. Egginton, J. Physiol. Sci. **57** (1), 73 (2007).
3. M. Tanaka, Y. Ootsuka, M. J. McKinley, and R. M. McAllen, J. Physiol. **582** (Pt 1), 421 (2007).
4. K.L. Marlatt and E. Ravussin, Curr. Obes. Rep. **6** (4), 389 (2017).
5. S. A. Evans, A. D. Parsons, and J. M. Overton, J. Appl. Physiol. **99** (4), 1336 (2005).
6. W. D. Knight, M. M. Witte, A. D. Parsons, et al., Mech. Ageing Dev. **132** (5), 220 (2011).
7. J. A. Boulant and K. E. Bignall, Am. J. Physiol. **225** (6), 1371 (1973).
8. M. J. Angilletta, J. P. Youngblood, L. K. Neel, and J. M. VandenBrooks, Neurosci. Lett. **692**, 127 (2019).
9. K. C. Kregel, J. M. Overton, D. G. Johnson, et al., J. Appl. Physiol. 71 (1), 192 (1991).
10. C.V. Gisolfi, R.D. Matthes, K.C. Kregel and R. Oppliger, J Appl Physiol 70 (4), 1821 (1991).
11. P. E. Papanek, C. E. Wood, and M. J. Fregly, J. Appl. Physiol. **71** (1), 300 (1991).
12. Z. Hahn and Z. Szelényi, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 54 (3), 245 (1979).
13. L. I. Wang, F. Liu, Y. Luo, et al., Biomed. Rep. 3 (3), 425 (2015).
14. J. A. Straw and M. J. Fregly, J. Appl. Physiol. 23 (6), 825 (1967).
15. S. M. Barman, G. L. Gebber, and F. R. Calaresu, Am. J. Physiol. **247** (3, Pt 2), R513 (1984).
16. M. J. Kenney, D. E. Claassen, M. R. Bishop, and R. J. Fels, Am. J. Physiol. **275** (6, Pt 2), R1992 (1998).
17. D. S. O'Leary, J. M. Johnson, and W. F. Taylor, J. Appl. Physiol. (1985). **59** (5), 1533 (1985).
18. Y. Ootsuka and R. M. McAllen, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **291** (3), R589 (2006).
19. F. Richard, N. Faucon-Biguet, R. Labatut, et al., J. Neurosci. Res. **20** (1), 32 (1988).
20. C. Garcia, P. Schmitt, P. D'Aléo, et al., J. Neurochem. **62** (3), 1172 (1994).
21. M. P. Massett, S. J. Lewis, and K. C. Kregel, Am. J. Physiol. **275** (3, Pt 2), R844 (1998).
22. B. A. Bryar, M. J. Fregly, and F. P. Field, J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol. 55 (3), 823 (1983).
23. Л. Н. Маслов и Н. В. Нарыжная, Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова **101** (5), 525 (2015).
24. M. P. Massett, S. J. Lewis, H. M. Stauss, and K. C. Kregel, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 279 (4), R1282 (2000).
25. Z. Sun, J. R. Cade, M. J. Fregly, and N. E. Rowland, Physiol. Behav. 62 (2), 379 (1997).
26. S. Han, X. Chen, B. Cox, et al., Peptides **19** (2), 351 (1998).
27. Z. Zukowska-Grojec and A. C. Vaz, Synapse 2 (3), 293 (1988).
28. H. D. McCarthy, A. P. Kilpatrick, P. Trayhurn, and G. Williams, Neuroscience **54** (1), 127 (1993).
29. L. Cassis, A. Laughter, M. Fettinger, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. **286** (2), 718 (1998).
30. J. F. Peng, B. Kimura, M. J. Fregly, and M. I. Phillips, Hypertension 31 (6), 1317 (1998).
31. Z. Sun, R. Cade, Z. Zhang, et al., Hypertension 41 (2), 322 (2003).

32. Z. Sun, X. Wang, C. E. Wood, and J. R. Cade, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **288** (2), R433 (2005).
33. X. Wang, Z. Sun, and R. Cade, Kidney Int. **68** (2), 680 (2005).
34. O. Shechtman, M. J. Fregly, P. van Bergen, and P. E. Papanek, Hypertension **17** (6, Pt 1),763 (1991).
35. M. J. Fregly, F. Rossi, Van Bergen, et al., Pharmacology **46** (4), 198 (1993).
36. Z. Sun., R. Cade, and C. Morales, Am. J. Hypertens. **15** (1, Pt 1), 85 (2002).
37. K. C. Kregel, H. Stauss, and T. Unger, Am. J. Physiol. **266** (6, Pt 2), R1985 (1994).
38. G. F. Chen and Z. Sun, J. Appl. Physiol. 100 (5), 1719 (2006).
39. A. Ortega Mateo and A. A. de Artiñano, Pharmacol. Res. 36 (5), 339 (1997).
40. Y. Matsumura, N. Hashimoto, S. Taira, et al., Hypertension 33 (2), 759 (1999).
41. Z. Sun, Front. Biosci. (Elite Ed.) 2, 495 (2010).
42. G. Ilievska, S. Dinevska-Kjovkarovska, and B. Miova, Cell Stress Chaperones 23 (4), 561 (2018).
43. M. B. Harris, M. A. Blackstone, H. Ju, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285 (1), H333 (2003).
44. E. B. Manukhina, D. A. Pokidyshev, I. I. Malyshev, et al., Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol. 2, 300 (1998).
45. V. Richard, K. Laude, C. Artigues, et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 29 (11), 956 (2002).
46. J. Li, Y. X. Cao, L. Cao, et al., Eur. J. Pharmacol. **588** (2–3), 280 (2008).
47. D. T. Chiu and K. K. Cheng, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 3 (5), 449 (1976).
48. C. Adán, A. Ardévol, X. Remesar, et al., Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. 102 (1), 55 (1994).
49. Г. Ф. Султанов, К. С. Аманнепесов, С. Ф. Дугин и др., Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова **77** (4), 34 (1991).
50. K. C. Kregel, D. G. Johnson, C. M. Tipton, and D. R. Seals, Hypertension **15** (5), 497 (1990).
51. M. Kuwahara, S. Sugano, K. Yayou, et al., Jikken Dobutsu **40** (3), 331 (1991).
52. C. B. Matthew, J. Therm. Biol. **22** (4–5), 275 (1997).
53. M. Horowitz and U. Meiri, Pflugers Arch. **422** (4), 386 (1993).
54. H. Nakagawa, T. Matsumura, K. Suzuki, et al., J. Therm. Biol. **58**, 15 (2016).
55. T. Ishiwata, H. Hasegawa, and B. N. Greenwood, Neurosci. Lett. 653, 71 (2017).
56. O. Kashimura, Nihon Eiseigaku Zasshi **48** (4), 859 (1993).
57. Y. P. Liu, Y. H. Lin, Y. C. Chen, et al., Life Sci. **136**, 19 (2015).
58. D. M. Vianna and P. Carrive, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **297** (2), R495 (2009).
59. M. J. Fregly, D. C. Kikta, R. M. Threatte, et al., J. Appl. Physiol. **66** (2), 741 (1989).
60. N. I. Roukoyatkina, S. I. Chefer, J. Rifkind, et al., Am. J. Hypertens. **12** (1, Pt 1), 54 (1999).
61. Z. Sun, R. Cade, M. J. Katovich, and M. J. Fregly, Physiol. Behav. 65 (4–5), 879 (1999).
62. Z. Sun, Am. J. Physiol. Renal Physiol. **290** (6), F1472 (2006).
63. Z. Zhu, S. Zhu, J. Zhu, et al., Am. J. Hypertens. **15** (2, Pt 1), 176 (2002).
64. Y. Cheng and D. Hauton, Biochim. Biophys. Acta 1781 (10), 618 (2008).
65. D. Hauton, S. May, R. Sabharwal, et al., J. Exp. Biol. **214** (Pt 18), 3021 (2011).
66. R. Sabharwal, E. J. Johns, and S. Egginton, Exp. Physiol. **89** (4), 455 (2004).
67. M. Borenstein, L. V. Hedges, J. P. T. Higgins, and H. R. Rothstein. Introduction to Meta-analysis (Wiley, Chichester, 2009).
68. H. S. Sharma, J. Westman, F. Nyberg, et al., Acta Neurochir. Suppl. (Wien) **60**, 65 (1994).
69. S. J. Swoap, J. M. Overton, and G. E. Garber, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **287** (2), R391 (2004).
70. A. Maloyan, A. Palmon, and M. Horowitz, Am. J. Physiol. **276** (5), R1506 (1999).
71. J. S. Kerr, R. L. Squibb, and H. M. Frankel, Int. J. Biochem. **6** (3), 191 (1975).
72. M. Horowitz, Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. **131** (3), 475 (2002).
73. С. Ю. Цибульнико, Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная и В. В. Иванов, Патол. физиол. и эксперим. терапия 62 (1), 17 (2018).
74. O. Shechtman, P. E. Papanek, and M. J. Fregly, Can. J. Physiol. Pharmacol. 68 (7), 830 (1990).
75. J. B. Chambers, T. D. Williams, A. Nakamura, et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **279** (4), R1486 (2000).
76. S. Arancibia, F. Rage, H. Astier, and L. Tapia-Arancibia, Neuroendocrinology **64** (4), 257 (1996).
77. Y. Nakane and T. Yoshimura, Front. Neurosci. **8**, 115 (2014).
78. R. A. Louzada, M. C. Santos, J. P. Cavalcanti-de-Albuquerque, et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 307 (11), E1020 (2014).
79. E. R. Kühn, K. Bellon, L. Huybrechts, and W. Heyns, Horm. Metab. Res. 15 (10), 491 (1983).
80. H. Dardente, C. A. Wyse, M. J. Birnie, et al., Curr. Biol. **20** (24), 2193 (2010).
81. H. Dardente, D. G. Hazlerigg, and F. J. Ebling, Front. Endocrinol. (Lausanne) **5**, 19 (2014).
82. M. Horowitz, Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. **131** (3), 475 (2002).
83. E. Mirit, A. Palmon, Y. Hasin, and M. Horowitz, Am. J. Physiol. **276** (2), R550 (1999).
84. С. В. Глинник, О. Н. Ринейская, И. В. Романовский и Т. П. Красненкова, Вестн. ВГМУ **2**, 13 (2007).
85. Z. Ostrowska, B. Kos-Kudla, B. Marek, and D. Kajdaniuk, Endocr. Regul. **37** (3), 163 (2003).
86. B. L. Zhang, E. Zannou, and F. Sannajust, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **279** (1), 169 (2000).
87. D. Sarne, Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–2016 Sep 27.

Meta-Analysis of Cardiovascular Adaptive Responses to Temperature Variations in Normotensive Rats

N.V. Kuzmenko*, **, N.S. Shcherbak, M.G. Pliss*, **, V.A. Tsyrlin*, and M.M. Galagudza***

**Almazov National Medical Research Centre, ul. Akkuratova 2, St.Petersburg, 197341 Russia*

***Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6-8, St. Petersburg, 197022 Russia*

In this paper, we focus on meta-analysis, in which data from studies using rat models are combined to evaluate the effects of hypothermia and hyperthermia on the cardiovascular function. For meta-analysis, 25 articles from the PubMed database were selected. The research aim of these reports was to investigate how whole-body hypothermia and hyperthermia in normotensive conscious adult rats affect hemodynamic parameters (systemic blood pressure and heart rate). The effects of short-term severe hyperthermia (40–43°C), prolonged moderate hyperthermia (32–34°C), and short-term and prolonged hypothermia (4–9°C, sudden and gradual, with and without any changes in photoperiod) were investigated. It is shown that the blood pressure and heart rate patterns in normotensive conscious rats in response to a change in the ambient temperature are determined according not only to the vector field showing the direction of the temperature change, but also to the amplitude, suddenness, duration of the change, and concomitant conditions (for instance, the duration of photoperiod).

Keywords: hyperthermia, hypothermia, acclimatization, blood pressure, heart rhythm

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1203–1209

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ КРЫС ПОСЛЕ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ПОГРУЖЕНИЕМ В ЛЕДЯНУЮ ВОДУ

© 2021 г. Е.Л. Гагаринский, А.С. Аверин

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

E-mail: E.L.Gagarinskiy@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.09.2021 г.
После доработки 13.09.2021 г.
Принята к публикации 17.09.2021 г.

Исследованы допустимые временные границы, при которых возможно самовосстановление жизненных функций крыс после нахождения в состоянии клинической смерти в условиях сверхглубокой гипотермии при температуре ниже 10°С. Показано, что превышение 35-минутного интервала времени в состоянии клинической смерти приводит к гибели животных в результате нарастающей гипоксии организма. Частичное купирование гипоксии с помощью постоянно проводимой сердечно-легочной реанимации в процессе нахождения животного в ледяной воде пролонгирует максимальный срок клинической смерти до 60 мин. Предельные цифры клинической смерти согласуются с литературными данными, полученными на лабораторных животных, а также коррелируют с наблюдениями по спасению людей, утонувших в холодный период года. Возможно, предельные показатели клинической смерти являются схожими для разных видов млекопитающих. В этом случае можно прогнозировать, что проведение реанимационных мероприятий при нахождении в состоянии клинической смерти свыше 70–75 мин при утоплении в ледяной воде будет нецелесообразным.

Ключевые слова: сверхглубокая гипотермия, массаж сердца, сердечно-легочная реанимация.

DOI: 10.31857/S0006302921060168

Согласно мировой статистике, утопление является второй ведущей причиной неестественной смерти после травм, вызванных дорожно-транспортными происшествиями. Большинство случаев приходится на теплый период времени в странах [1]. Погодные условия оказывают значительное влияние на шанс спасения пострадавших: если при утоплении в теплой воде счет идет на минуты, то в холодный период времени у пострадавших появляется шанс на спасение при длительной клинической смерти. В современной медицине одной из проблем реанимации людей, погибших на открытой воде в холодный период, остается поиск максимальной продолжительности клинической смерти, которая еще позволяет вернуться к нормальному функционированию организма и в течение которой имеет смысл проводить сердечно-легочную реанимацию (СЛР). Данные о максимальном времени от момента клинической смерти до начала проведения реанимационных мероприятий колеблются от 25 до 60 мин, так как при утоплении в холодной воде гипотермия позволяет защитить организм пострадавшего от гипоксических повреждений [2, 3]. При этом с постепенным понижением температуры тела увеличивается степень защиты от гипоксических повреждений. Однако области низких температур, соответствующих 20–30°С для глубокой [4] и <20°С для сверхглубокой гипотермии [5], могут индуцировать патологические процессы, приводящие к тяжелым нарушениям работы внутренних систем организма: повышению внутричерепного давления [6], сердечной патологии [7], повреждению почек [8]. Помимо данных осложнений избыточная пролонгация клинической смерти в конце концов приводит к возникновению гипоксических повреждений, которые сопровождаются серьезными неврологическими последствиями.

Целью настоящего исследования было определить максимальную продолжительность клинической смерти крыс в условиях сверхглубокой гипотермии, при которой еще возможно само-

Сокращения: СЛР – сердечно-легочная реанимация, ИВЛ – искусственная вентиляция легких, ЭКГ – электрокардиограмма.

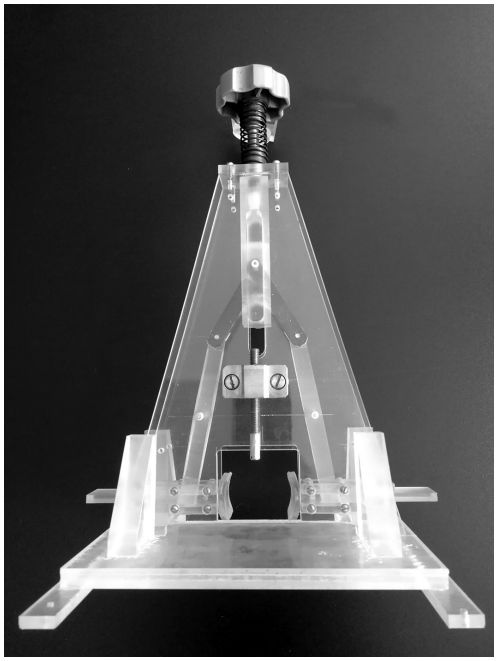


Рис. 1. Опытная установка для проведения непрямого массажа сердца у мелких грызунов с регулируемой глубиной сжатия грудной клетки.

восстановление жизненных функций, а также возможное пролонгирование этого периода в модельном эксперименте при сердечно-легочной реанимации с использованием аппарата непрямого массажа сердца и искусственной вентиляции легких, проводимой на протяжении всего периода утопления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 230 ± 25 г (n = 28).

После наркотизации эфиром крыс фиксировали на операционном столике и проводили интубацию трубками диаметром 1.8–2.2 мм с последующим подключением к аппарату искусственной вентиляции легких (ИВЛ) ЭПМ-2 (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Россия). Для отслеживания температуры тела животных использовали электронный термометр Актаком-АТТ (АТТ, Тайвань), датчик вводили ректально на глубину 4 см. Количество вдохов в минуту задавали в зависимости от текущей температуры тела животного, от 80 вд./мин при 37°С до 20 вд./мин при достижении температуры тела ниже 10°С, объем дыхания высчитывали из расчета 1 мл на 100 г. крысы. В процессе охлаждения регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) в первом стандартном отведении при помощи ветеринарного монитора IM-10 (ZooMed, Китай).

В исследовании для введения крыс в состояние сверхглубокой гипотермии использовали быстрое охлаждение поверхности тела путем погружения в ванну с циркулирующей холодной (+1°С) водой, для регуляции температуры воды на разных этапах эксперимента использовался криотермостат Ministat 230w (Huber, Германия).

Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии в нашем исследовании отсчитывали по достижении животными ректальной температуры, равной 10°С, при которой происходила естественная остановка сердца у контрольной группы животных. Исследование проводили на четырех группах крыс:

I группа – контроль (6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева 1.2°С/мин. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии – от 30 до 40 мин.

II группа – контроль (6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева 0.6°С/мин. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии – от 50 до 60 мин.

III группа – опыт (8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева 0.6°С/мин. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии – от 50 до 60 мин.

IV группа – опыт (8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева 0.6°С/мин. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии – от 70 до 80 мин.

В контрольной серии экспериментов после достижения температуры ниже 10°С и полной остановки сердечной активности на мониторе ЭКГ аппарат ИВЛ отключали. В опытной серии аппарат ИВЛ работал на протяжении всего времени эксперимента и осуществлялся непрямой массаж сердца. Для поддержания сердцебиения нами была изготовлена опытная установка для наружного массажа сердца и легких млекопитающих с учетом их анатомических особенностей (рис. 1). Массаж начинали проводить при достижении температуры тела крыс, равной 10°С, частота массажа соответствовала 6 ударам в минуту. Отогревание животного осуществляли путем контролируемого повышения температуры воды при помощи криотермостата (с учетом инерционности системы отогрев начинали при температуре 5 ± 0.5°С).

Крыс извлекали из воды на основании ряда показателей: подъем ректальной температуры выше 26°С, увеличение частоты сердечных сокращений выше 350 ударов в минуту, появление признаков двигательной активности. Одновременно с извлечением крысы проводили процедуру отключения от аппаратов ИВЛ, ЭКГ и удаляли ректальный термометр.

Окончательное согревание проводили путем обдувания животного горячим воздухом (t = 45°С)

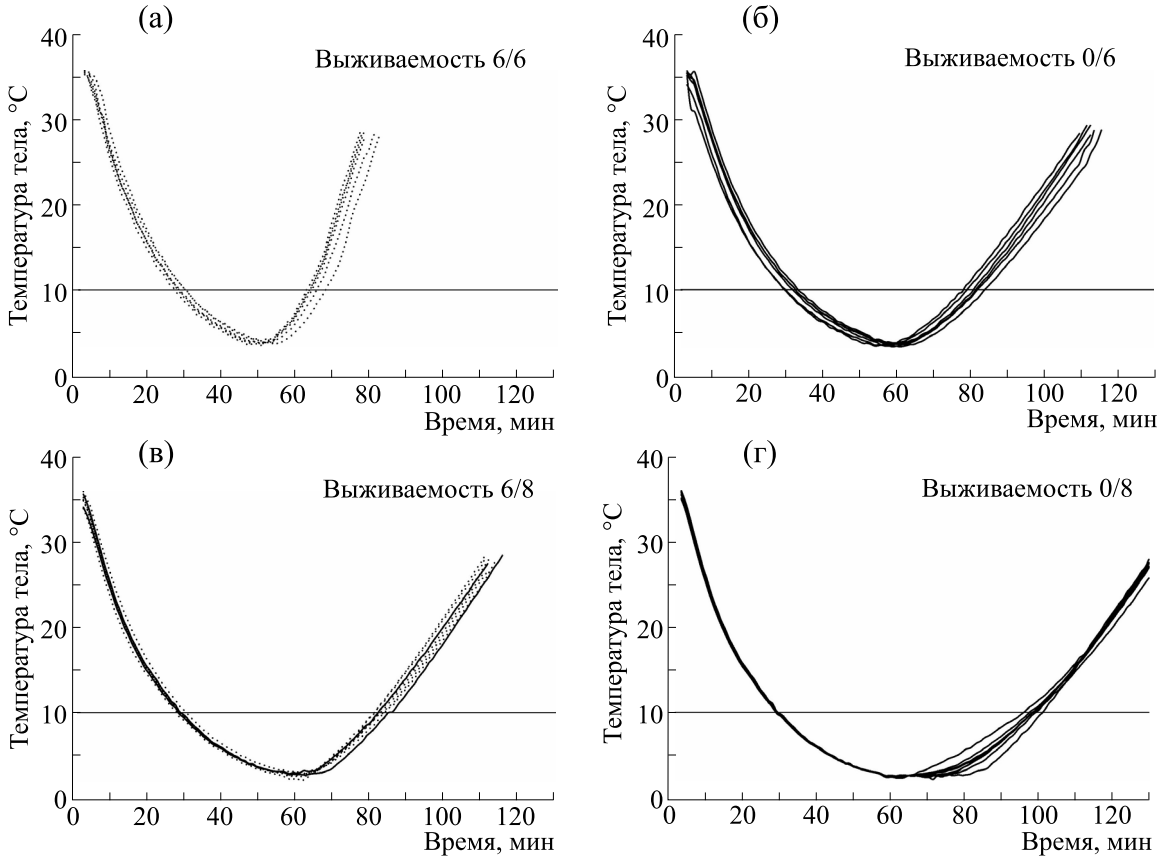


Рис. 2. Результаты измерения ректальной температуры крыс, подвергнутых сверхглубокой гипотермии: (а) – группа I (контроль, 6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева 1.2°С/мин, время гипотермии от 30 до 40 мин; (б) – группа II (контроль, 6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева 0.6°С/мин, время гипотермии от 50 до 60 мин; (в) – группа III (опыт, 8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева 0.6°С/мин, время гипотермии от 50 до 60 мин; (г) – группа IV (опыт, 8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева 0.6°С/мин, время гипотермии от 70 до 80 мин. Точечный пунктир – выжившие животные, сплошные линии – погибшие животные.

с использованием бытового фена. Полностью восстановивших жизнедеятельность животных возвращали в виварий и наблюдали за ними в течение месяца. Крыс содержали в стандартных клетках с кормом и водой *ad libitum* в условиях 12-часового цикла дня и ночи.

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., США); данные выражали в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продолжительность обратимой сверхглубокой гипотермии без использования сердечно-легочной реанимации. С целью определения максимально допустимого времени клинической смерти при утоплении в ледяной воде изучали три временных интервала: 1-й – 30–40 мин; 2-й – 50–60 мин и 3-й – 70–80 мин. Таким образом шаг между интервалами составлял 10 мин.

В экспериментах по обратимой сверхглубокой гипотермии без использования СЛР животных охлаждали до 3°С. Изменения ректальной температуры крыс во время охлаждения и последующего нагрева показаны на рис. 2. Скорость нагрева составляла 0.6°С/мин, за исключением временного интервала клинической смерти – от 30 до 40 мин, когда она была увеличена до 1.2°С/мин для достижения требуемой продолжительности.

Сердечная деятельность группы I крыс, охлажденных до температуры 3°С и находившихся в состоянии клинической смерти при сверхглубокой гипотермии в течение 34.8 ± 1.4 мин (рис. 2а), самопроизвольно восстановилась при повышении ректальной температуры выше 10°С. Сердечная деятельность группы II крыс, в которой животных подвергали воздействию температуры ниже 10°С в течение 50.8 ± 2.5 мин (рис. 2б), не восстановилась.

Продолжительность обратимой сверхглубокой гипотермии с использованием сердечно-легочной

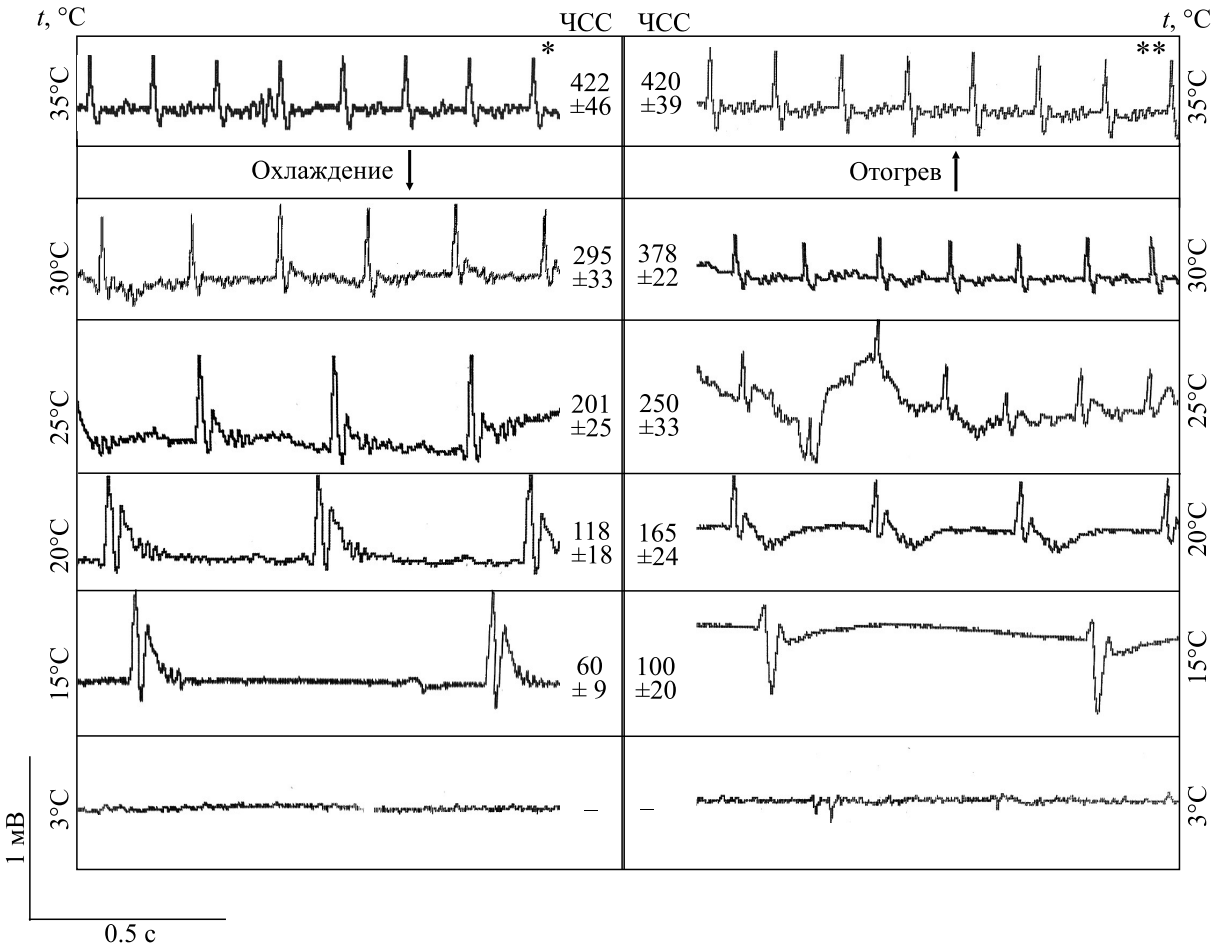


Рис. 3. Изменения электрокардиограммы и частоты сердечных сокращений (ЧСС) в процессе погружения животного в состояние сверхглубокой гипотермии и последующего отогревания. * – Электрокардиограмма, снятая за 10 мин до начала эксперимента; ** – электрокардиограмма, снятая спустя 24 ч после восстановления жизненных функций животного.

реанимации. На основании результатов, полученных в контрольных группах I и II, была предложена экспериментальная модель непрерывного использования СЛР в ходе утопления с целью определения основной причины гибели животных («холодовые» повреждения либо гипоксические повреждения), а также максимального предела клинической смерти в состоянии сверхглубокой гипотермии.

Сердечная деятельность группы III крыс, охлажденных до температуры 3°C и находившихся в состоянии клинической смерти при постоянно проводимой СЛР в течение 57.8 ± 1.3 мин (рис. 2в), самопроизвольно восстановилась при повышении ректальной температуры выше 10°C. Сердечная деятельность группы IV крыс, в которой животных подвергали воздействию температуры ниже 10°C в течение 71.9 ± 1.7 мин (рис. 2г) при проводимой СЛР, не восстановилась.

Электрокардиограмма и частота сердечных сокращений животных, подвергнутых обратимой сверхглубокой гипотермии. Изменения частоты сердечных сокращений во время охлаждения и последующего нагрева, а также пример характерной электрокардиограммы приведены на рис. 3. В ходе эксперимента при снижении температуры наблюдали выраженную брадикардию, вызванную снижением скорости спонтанной диастолической реполяризации в клетках водителя ритма. Также по мере снижения температуры тела на электрокардиограммах регистрировали характерную для состояния гипотермии волну Осборна, следующую за комплексом QRS, которая является маркером риска фибрилляции желудочков с последующей асистолией. В процессе отогревания наблюдали постепенное восстановление исходной картины электрокардиограммы.

Данные эксперименты показывают, что при превышении 35-минутного интервала времени в состоянии клинической смерти (группа II, 0

(6) животных) гибель животных наступает в результате необратимых гипоксических нарушений организма. Если частично купировать гипоксические нарушения с помощью постоянной СЛР, то максимальный срок клинической смерти пролонгируется примерно в два раза, до 60 мин (группа III, 6 (8) животных). После 70 минут клинической смерти животные также не выживают, по-видимому, в связи с необратимыми нарушениями, вследствие «холодового» воздействия. Полученные данные позволяют прогнозировать, что не имеет смысла продолжать реанимационные мероприятия при продолжительности клинической смерти свыше 70 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Продолжительность клинической смерти, предельная для успешного восстановления жизненных функций охлажденных крыс, была оценена в работе [9]. Было показано, что крысы, которых подвергали 60-минутной сверхглубокой гипотермии с использованием технологии EPR (технология EPR (Emergency Preservation and Resuscitation) позволяет вводить пациентов в состояние сверхглубокой гипотермии до температуры 10°C методом замены крови холодными плегическими растворами, что защищает органы от повреждающего действия, вызванного обширной ишемией на фоне серьезных травм), полностью восстанавливали свою жизнедеятельность. Схожие результаты по продолжительности клинической смерти были получены в работе [10]. В ней наибольшая продолжительность клинической смерти крыс в состоянии сверхглубокой гипотермии также не превышала 60 мин. Увеличение времени нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии свыше 60 мин приводило к гибели животных в обоих приведенных исследованиях.

В нашем исследовании в контрольных группах максимальная продолжительность обратимой клинической смерти составила 35 мин. Почти двукратная разница в длительности может быть объяснена, если принять во внимание использование в обоих исследованиях технологий защиты от гипоксии при охлаждении.

Гипоксия на фоне гипотермии приводит к непосредственному повреждению сердечной ткани и ткани мозга. Каскад патологических реакций включает нарушение работы Na^+/K^+-насоса, накопление внутриклеточного Ca^{2+}, отек, ацидоз, а также повышение образования активных форм кислорода, вызывающих дисфункцию липидов (перекисное окисление липидов), белков, углеводов и нуклеиновых кислот [11–13].

В работе [10] перед охлаждением животных применяли метод гиперкапнии, что повышало устойчивость крыс к гипоксии. Гиперкапния до или во время начальных стадий охлаждения у крыс активирует защитные механизмы, аналогичные тем, которые существуют у зимоспящих животных [12]. Данный метод в сочетании с гипотермией позволяет вызвать состояние холодового наркоза, что значительно снижает интенсивность метаболизма и приводит к нулевым значениям электрической активности мозга уже при достижении температур в интервале от 14 до 20°C [14]. Подавление нейронной активности, в свою очередь, повышает толерантность мозга к гипоксии на ранних стадиях охлаждения [15], что позволяет увеличить безопасное время обратимой сверхглубокой гипотермии. В работе [9] предельные границы обратимой клинической смерти пролонгировали за счет полной замены крови консервирующим раствором. Технология EPR, поддерживающая организм в состоянии сверхглубокой гипотермии, облегчает отслеживание гипоксических осложнений за счет постоянного мониторинга состояния сердечно-сосудистой системы и их купирование путем поддерживающей терапии [16].

В нашем исследовании максимальная продолжительность обратимой клинической смерти в условиях постоянной сердечно-легочной реанимации составила 60 мин. Использование метода СЛР при гипотермии позволяет сохранить приток кислорода к мозгу и сердцу. Сердце извлекает почти весь кислород из получаемой крови даже в условиях измененного коронарного кровотока на фоне гипотермии [17, 18]. Мозг имеет самые высокие метаболические потребности в организме. При массе всего 2% от общего веса тела на мозговой кровоток приходится примерно 15% процентов сердечного выброса, а потребление кислорода составляет до 20% от общего потребления организма [19]. Гипотермия в значительной мере снижает влияние гипоксии как на центральную нервную систему, так и на другие системы организма. Снижение температуры тела человека на 10°C уменьшает уровень ферментативной активности на 50% [20], потребление кислорода мозгом уменьшается в 1.8–3.5 раза [21, 22]. Вместе гипотермия и СЛР обеспечивают приемлемую защиту тканей мозга от гипоксии.

Однако при пролонгированной клинической смерти появляются дополнительные повреждающие факторы. Так, пролонгация клинической смерти сопровождается нарушением транспортной функции крови. Описаны такие явления, как повышение вязкости, коагулопатия, скопления эритроцитов, что в конечном итоге может приводить к образованию тромбов в капиллярах головного мозга [16]. В работе [23] было показано, что общее обескровливание организма, охлажденного до 5°C, приводит к лучшему результату выживаемости по сравнению с меньшей степенью гемоделюции. Но продолжительность клинической

смерти, по-видимому, не лимитируется только лишь нарушением функции крови. В работе [9] было отмечено, что преодоление 75-минутного интервала клинической смерти в состоянии сверхглубокой гипотермии при использовании EPR приводит к неизбежной гибели крыс в связи с повреждением почек и полиорганной недостаточностью. При этом данные явления наблюдали в условиях полной замены крови. Таким образом, экспериментальные и литературные данные подтверждают, что длительность клинической смерти в условиях сверхглубокой гипотермии не должна превышать 70–75 мин для возможности успешной реанимации. При этом генезис того, что мы условно обозначили как «холодовые» повреждения, не вполне понятен и требует дальнейших изысканий.

Можно ли экстраполировать полученные нами данные на человека? Ретроспективное исследование по реанимации утонувших в водоемах Нидерландов детей показало, что хороший неврологический исход более вероятен, когда возвращение спонтанного кровообращения происходит в течение 30 мин после начала реанимационных мероприятий. При этом утопление в холодный период повышало шансы благоприятного исхода [24] при общем времени клинической смерти до 25 мин. В уже упомянутых ранее ретроспективных работах по спасению людей, утонувших в холодный период года, максимально возможное время клинической смерти, после которого была осуществлена успешная реанимация, варьировало в пределах от 25 мин [3] до 60 мин [2]. Предельные цифры клинической смерти согласуются с нашими результатами и литературными данными, полученными на лабораторных животных. Возможно, предельные показатели клинической смерти являются схожими для разных видов млекопитающих. Если это так, то проведение реанимационных мероприятий сверх временного показателя 70–75 мин можно признать нецелесообразным.

Ограничением данной работы является отсутствие данных о восстановлении электрической активности мозга и оценки когнитивных функций у крыс, подвергнутых сверхглубокой гипотермии, что может стать предметом дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность В.К. Утешеву за помощь в постановке экспериментов и Е.Е. Фесенко (мл.) за ценные советы по содержанию статьи и редакторскую правку при подготовке текста рукописи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных (2010/63/EU) и в соответствии с требованиями комиссии по этике ИБК РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Carter and R. Sinclair, Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain **11** (6), 210 (2011).
2. J. Hilmo, T. Naesheim, and M. Gilbert, Resuscitation **85** (9), 1204 (2014).
3. P. Suominen, C. Baillie, et al., Resuscitation **52** (3), 247 (2002).
4. J. W. Fehrenbacher, H. Siderys, et al., J. Thoracic Cardiovasc. Surg. **140** (6S), 154 (2010).
5. S. A. Tisherman, H. B. Alam, et al., J. Trauma Acute Care Surg. **83**, 803 (2017).
6. В. К. Мазалов, О. В. Вязовская, С. Е. Овсянников и А. М. Компаниец, Вестн. Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия биология, № 7 (814), 161 (2008).
7. A. Chockalingam, A. Mehra, et al., Chest **138** (1), 198 (2010).
8. D. Lindenblatt, E. Fischer, et al., EJNMMI Res. **4** (1), 54 2014.
9. T. Drabek, J. Stezoski, et al., Resuscitation **75**, 114 (2007).
10. Р. Анджус и Н. Хозич. Бюл. эксперим. биологии и медицины **9**, 38 (1965).
11. Н. К. Кличханов, Ж. Г. Исмаилова и др., Бюл. ВСНЦ СО РАМН **1** (5), 104 (2016).
12. Д. А. Игнатьев, Л. А. Фиалковская и др., Радиоэкология **46** (6), 1 (2006).
13. N. Alva, T. Carbonell, et al., Resuscitation **81**, 609 (2010).
14. И. К. Коломийцева и Л. Н. Маркевич, Докл. РАН **427** (6), 844 (2009).
15. G. E. Nilsson and P. L. Lutz, Comp. Biochem. Physiol. Part C: Compar. Pharmacol. **105**, 329 (1993).
16. M. J. Taylor, in *Advances in Biopreservation*, Ed. by J. G. Baust, and J. M. Baust (CRC Press, Taylor and Francis Publ., N. Y., 2007), pp. 15–62.
17. P. Black, S. Devanter, et al., J. Surg. Res. **20**, 49 (1976).
18. N. Alva, D. Azuara, et al., Exp. Physiol. **98** (6), 1115 (2013).
19. X. Q. Niu and X. X. Zhao, Gen. Mol. Res. **14** (4), 12595 (2015).
20. D.F. Stowe, S. Fujita, et al., Anesth. Analg. **93** (4), 846 (2001).

21. S. A. Bernard and M. Buist, Crit. Care Med. **31**, 2041 (2003).
22. J. N. McCullough, N. Zhang, et al., Ann. Thorac. Surg. **67**, 1895 (1999).
23. P. Sekaran and M. Ehrlich, Anesth. Analg. **92**, 329 (2001).
24. J. K. Kieboom, H. J. Verkade, et al., BMJ Clin. Res. **350** (1), 418 (2015).

Restoration of Vital Functions in Rats after Clinical Death Caused by Cold Water Submersion

E.L. Gagarinsky and A.S. Averin

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

The potential interval times within which vital functions in rats can be self-restored after the state of clinical death from ultra-deep hypothermia at temperatures below 10°C have been optimized. It has been shown that the interval of longer than 35-minutes, when the rat is in the state of clinical death, causes the animal's death because of continued fall in the amount of oxygen in the rat body. Partial reversal of tissue hypoxia, which was achieved with the help of continuous cardiopulmonary resuscitation, when the animal was in cold water, extended the time period during which clinical death can be survived up to 60 minutes. The highest score values of clinical deaths in rats under study are consistent with the literature data obtained using laboratory animals, and also correlate with observations concerning cold-water survival of people who were rescued. Probably, the highest clinical death indices are similar for different species of mammals. In this case, it can be supposed that resuscitation measures are inappropriate when rats subjected to cold water immersion are in a state of clinical death for longer than 70–75 minutes.

Keywords: ultra-deep hypothermia, heart massage, cardiopulmonary resuscitation

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1210–1216

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 616-71

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ОБЪЕКТИВНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БОЛЕВОГО СИНДРОМА

© 2021 г. А.В. Кожевникова*, О.Л. Белянин, О.Л. Власова*, *****

**Институт биомедицинских систем и технологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29*

***Федеральный научный центр реабилитации инвалидов им. Г.А. Альбрехта, 195067, Санкт-Петербург, Бестужевская ул., 50*

****Институт физиологии РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6*

E-mail: alina-k-spb@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.08.2021 г.
После доработки 17.08.2021 г.
Принята к публикации 28.08.2021 г.

Представлены биофизические основы метода качественной и количественной опосредованной регистрации болевого синдрома и результаты его экспериментальной апробации. Предложенный метод на практике может быть использован для создания систем поддержки принятия врачебных решений, экспресс-диагностики.

Ключевые слова: боль, электрофизиология, объективная регистрация, биоимпеданс, диагностика.

DOI: 10.31857/S000630292106017X

Оценка боли затруднена в связи с высокой долей субъективности. Боль часто принимают за сопутствующий патологии симптом, но нередко она представляет собой комплексный синдром, состоящий как из физиологических, так и социально-психологических аспектов [1]. Так, хроническая боль – это состояние, которое не выделяется из-за сопутствующих ему заболеваний [2]. А миофасциальную боль часто упускают из виду при постановке диагноза, хотя именно она является широко распространенной причиной обращения за медицинской помощью, назначения инвалидности и обуславливает большой объем расходов в системе здравоохранения [3].

Современная диагностика болевых синдромов во многом основывается на субъективных оценках их места расположения и интенсивности, например с помощью визуальной аналоговой шкалы, опросника McGill. Однако как для корректной диагностики, так и для динамического наблюдения за течением патологического процесса необходимо осуществлять объективную качественную и количественную регистрацию параметров боли. Так, пациенты с расстройствами сознания не способны полноценно передавать свои ощущения, в том числе болевые [4]. Поэтому диагностика наличия боли у таких людей представляет собой важный медицинский и этический вопрос [5, 6] С появлением объективного биомаркера боли предоставится возможность усиления контроля за употреблением обезболивающих препаратов наркотического ряда, что позволит предотвратить их избыточное употребления и снизить уровень сопутствующей смертности [7].

Оценки нейронной активности и регионального мозгового кровотока позволяют выявлять области мозга, связанные с обработкой болевой стимуляции и модуляцией этих процессов фармакологическими агентами и нефармакологическими вмешательствами [8]. Современные методы магнитно-резонансной томографии и математически обработанные данные энцефалографии способны выявить повышение функциональной активности тех областей головного мозга, которые связаны с появлением ощущения боли, однако они не позволяют сделать количественных оценок. [9]. При этом большую информативность представляет анализ биопотенциалов таламической части мозга [10]. Однако этот метод демонстрирует лишь принципиальную возможность анализа наличия болевых симптомов, но не способен определить место их локализации и источник.

В Высшей школе биомедицинских систем и технологий Санкт-Петербургского Политехнического университета ранее был предложен метод изучения миофасциальной боли, основанный на регистрации изменения электрических характеристик в зоне болевых ощущений относительно

близлежащих тканей [11]. В качестве такой характеристики выбрана скорость затухания вызванных электрических колебаний в исследуемой зоне. В основе данного предложения была заложена гипотеза о связи болевого ощущения с локальным изменением физических характеристик биологических тканей. С применением такой методики стало возможным проводить опосредованное количественное измерение боли опорно-двигательного аппарата.

Считается, что объективные физиологические данные могут быть использованы для оценки боли. Используя такие данные, возможно косвенно оценить параметры боли у пациентов [12]. Существуют исследования, использующие местные физические характеристики тканей для анализа болевого синдрома. Так, польские ученые предлагают анализировать кожно-гальваническую реакцию, по возрастанию которой оценивается наличие и изменение послеоперационных болей [13]. В работе [14] также отмечается возможность анализа болевого синдрома относительно изменения перспирации кожи. Авторы предлагают осуществлять анализ, основываясь на сопоставлении данных характеристик на патологической и здоровой стороне тела. Недостатком подобных методов является необходимость стандартизации условий в виду неустойчивости показателей и обилия выбросов в результатах, а также отсутствие возможности регистрации локализации болевого синдрома и четкой градации величин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Несмотря на распространенность боли, ее первопричину часто трудно диагностировать [15]. В практической медицине продолжают предлагать мультимодальные методы определения наличия болевого синдрома, но на сегодняшний день нет убедительных доказательств того, что они превосходят унимодальное распознавание боли. [16] Авторами статьи предлагается еще одна возможность регистрации биофизических проявлений болевого синдрома, способная занять прочное место в его автоматизированном анализе.

В основе предлагаемого метода лежат биофизические предпосылки о том, что биологические ткани являются токопроводящими, а их электрические параметры зависят от функционального состояния ткани и изменяются при патологических процессах, что может быть использовано для диагностики и в научных целях. Обычно измерение электрических параметров биотканей производят путем пропускания через них переменного тока [17]. Также стоит отметить, что по современным представлениям биологические ткани не обладают значимой индуктивностью [18].

Импеданс тканей организма зависит от множества условий, основным из которых является кровенаполнение сосудов [19]. Высокочастотные переменные токи малой силы не являются патологическими раздражителями и пропускание их через живые ткани безвредно [17].

Ближайшим по сути способом измерения представляется биоэлектрический импедансный анализ – метод, при котором состав биологического объекта анализируется путем измерения его биоэлектрического импеданса [20]. К испытуемому подводится постоянный синусоидальный ток, развитое напряжение измеряется четырехэлектродным методом, затем рассчитывается электрическое сопротивление. Биоимпедансный анализ определяет биоэлектрическое сопротивление конкретной части тела, к которой приложены электроды [21, 22].

Предложенный авторами настоящей статьи метод отличается тем, что:

1. В качестве исследуемой величины используется изменение предварительно заданного сигнала, а именно короткого электрического импульса.

2. Предусмотрен индивидуальный подход в измерениях как для каждого испытуемого, так и для исследуемой зоны. Анализируемым параметром является отклонение исследуемой величины относительно снимаемого массива данных.

Таким образом, авторами статьи были созданы предпосылки для разработки методики регистрации боли, основанной на измерении конкретных физических характеристик. Данную методику в дальнейшем предполагается включить в систему поддержки принятия врачебных решений.

Биоэлектрический импеданс зависит от состава ткани и от частоты приложенного переменного сигнала, а в случае использования импульсного метода измерения импеданса биологических тканей его определяют по изменению крутизны фронта прямоугольного импульса и уменьшению его высоты [19]. Импеданс отличается в различных тканях, у разных субъектов, и реагирует на изменения в состоянии здоровья тканей [23]. В нашем случае как наиболее репрезентативный для анализа связи между субъективным болевым ощущением и измеряемой физической величиной использовался метод, при котором подавался затухающий электрический импульс в колебательном контуре. Биологический объект подсоединялся в цепь параллельно, чем вызывал отклонение смоделированного сигнала от заданных параметров.

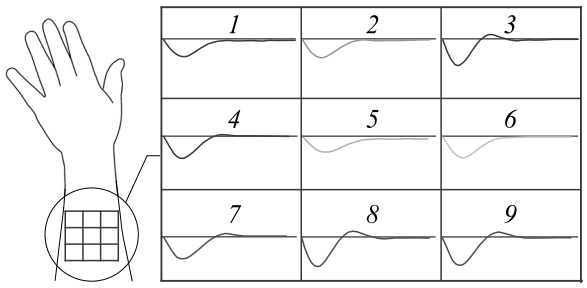


Рис. 1. Затухающие колебания в виде матрицы измерений в болевой зоне.

Исследования проводили на 76 испытуемых с жалобами на боли в различных зонах опорно-двигательного аппарата. Из них 30 человек проходили повторное обследование в определенных ранее болевых зонах, но уже при отсутствии жалоб на боль.

С помощью получаемого при подведении электродов к коже параллельного контура можно зафиксировать изменение предварительно заданного затухающего сигнала. Это изменение связано с влиянием емкостной и активной составляющих биологической ткани в новой ветке контура, в которую переходит часть протекающего тока. Частоту колебаний подбирали экспериментально с учетом простоты реализации, а также для попадания в окно поляризации на уровне ядер, внутриклеточных органелл, протеинов и макромолекул. [19] По нашей гипотезе степень отклонения от предварительно заданного идеального процесса наряду с отклонением от измеренных значений в соседних зонах и определяет наличие боли.

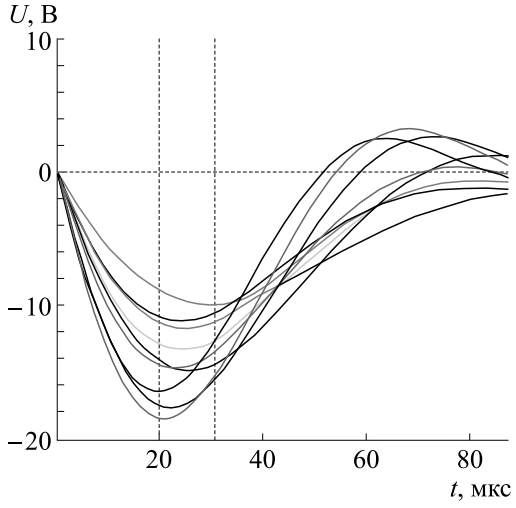


Рис. 2. Графики измерений в пределах одной болевой зоны.

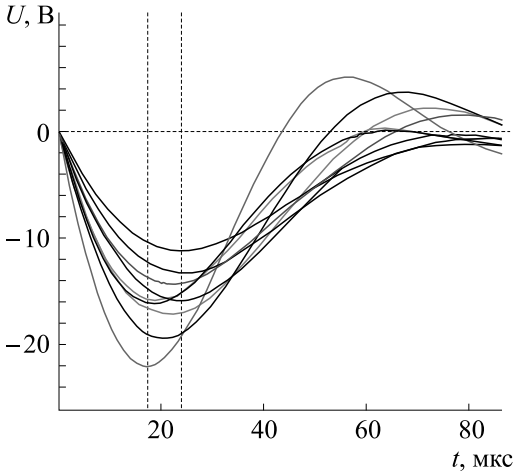


Рис. 3. Графики измерений через три недели после ушиба.

Определение болевого участка по предложенному методу происходило следующим образом:

1. Электроды прикладываются к болевой зоне.

2. Посылается смоделированный затухающий сигнал, регистрируется его изменение из-за включения в цепь биологической ткани.

3. Измерения повторяются на соседних зонах, чтобы получить набор данных в виде матрицы 3×3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе приведены данные по анализу связи исследуемого параметра и выраженности ряда болей опорно-двигательного аппарата. Для сравнения полученных данных боли также оценивались по цифровой рейтинговой шкале.

В качестве примера приведем данные объективизации болевых симптомов при ушибе поясницы. В результате каждого измерения был получен набор графиков (рис. 1). Для простоты анализа полученных результатов и их взаимных отклонений мы объединили группы по девять графиков (рис. 2). Выпадающие точки на полученных графиках связаны с погрешностью метода измерений.

Измерения были также повторно проведены через три недели после первого измерения. Результаты представлены на рис. 3.

При сравнении данных о наличии и исчезновении болевого синдрома было обнаружено, что ключевым показателем может являться максимальное отклонение времени наступления первых пиков в полученном массиве друг от друга.

Таблица 1. Интервал максимальной разницы между первыми пиками вызванных колебаний в болевой зоне

№	Интервал во время наличия болевых симптомов, мкс	Интервал после спадания болевых симптомов, мкс	Краткое описание болевых симптомов по цифровой рейтинговой шкале (ЦРШ)
1	14.2	4.7	М, 42 г., ушиб бедра, прошел за месяц; от 6/10 до 0/10
2	10.2	3.1	М, 28 л., синяк на ноге и измерения через месяц; от 4/10 до 0/10
3	16.8	10.0	М, 28 л., операция на колене, измерения сразу после операции и через полтора месяца; от 7/10 до 3/10
4	9.2	4.4	Ж, 29 л., боль неясной этиологии в районе лопатки; от 4/10 до 3/10
5	18.7	5.5	М, 23 г., вывих плеча (после вправки и через месяц); от 8/10 до 0/10
6	9.4	8.5	М, 25 л., жалобы на боль в шее и лопатке; от 4/10 до 3/10
7	16.5	9.1	Ж, 21 г., растяжение связок и через месяц после; от 7/10 до 2/10
8	7.6	3.9	Ж, 55 л., жалобы на боль в спине после сна; от 4/10 до 1/10
9	10.0	2.1	Ж, 29 л., боль в запястье после падения и через полтора месяца; от 5/10 до 0/10
10	10.9	8.3	М, 24 г., боль в шее после долгой сидячей работы; от 4/10 до 0/10
11	17.5	3.4	Ж, 79 л., боль после операции на шейке бедра и через два месяца; от 8/10 до 2/10
12	9.5	5.4	М, 25 л., жалобы на периодические боли в лопатке; сколиоз 2 ст.; от 4/10 до 2/10
13	16.8	3.6	Ж, 26 л., ушиб около поясницы и через полтора месяца; от 9/10 до 1/10
14	9.6	7.0	Ж, 29 л., жалобы на периодическую тяжесть и болевой синдром в икроножных мышцах; от 4/10 до 2/10
15	5.5	3.0	М, 18 л., периодический дискомфорт в лопатке; от 3/10 до 1/10
16	11.3	8.6	Ж, 55 л., синяк на бедре при ушибе; от 5/10 до 2/10
17	11.7	6.8	М, 22 г, ушиб плеча, месяц между измерениями; от 5/10 до 0/10
18	20.1	8.9	Ж, 29 л., ушиб поясницы, месяц между измерениями; от 9/10 до 2/10
19	16.6	7.9	М, 29, ушиб бедра, месяц между измерениями; от 5/10 до 0/10
20	11.4	8.2	Ж, 24 г., синяк на бедре, две недели между измерениями; от 4/10 до 0/10
21	10.9	5.9	Ж, 27 л., боль в спине (сколиоз 1 ст.), до и после курса ЛФК; от 3/10 до 0/10
22	8.2	5.7	М, 25, дискомфорт в плече неясной этиологии; от 2/10 до 0/10
23	12.3	6.4	М, 29 л, ушиб поясницы, месяц между измерениями; от 6/10 до 1/10
24	12.9	8.5	Ж, 30 л., ушиб колена; от 5/10 до 0/10
25	16.6	7.3	М, 24 г., боль в плече после спортивной травмы и измерения при спадении симптомов; от 5/10 до 0/10
26	12.1	9.2	М, 23 г., боль в колене после спортивной травмы, измерения во время боли и при спадении симптомов; от 4/10 до 1/10
27	6.4	4.3	Ж, 30 л., периодические боли в запястье (гигрома); от 4/10 до 1/10
28	7.2	2.8	М, 42 г., периодический дискомфорт в области шеи; от 3/10 до 0/10
29	8.1	4.9	Ж, 31 г., ноющая боль в локтевом суставе неясной этиологии; от 3/10 до 0/10
30	11.3	4.9	Ж, 27 л., периодическая боль в запястье (гигрома); от 4/10 до 0/10

Таблица 2. Интервалы между анализируемыми пиками при жалобах на боль

№ опыта	Интервалы между пиками, мкс	№ опыта	Интервалы между пиками, мкс
1	14.0	24	16.0
2	8.2	25	15.4
3	18.1	26	3.5
4	8.5	27	11.5
5	7.9	28	15.9
6	12.0	29	14.5
7	15.7	30	8.6
8	15.4	31	16.3
9	9.1	32	11.1
10	5.5	33	18.2
11	12.6	34	12.6
12	16.1	35	15.3
13	6.5	36	10.4
14	12.3	37	4.9
15	16.7	38	9.8
16	11.9	39	8.8
17	14.9	40	9.4
18	7.8	41	12.7
19	8.7	42	14.0
20	11.4	43	6.7
21	11.3	44	9.1
22	13.8	45	9.3
23	11.8	46	20.0

Как было замечено, разность между пиками в измерениях во время наличия болевого синдрома и при его исчезновении различается почти в два раза. Обозначим этот интервал с помощью коэффициента K, мкс. В табл. 1 приведены величины измеренных максимальных интервалов между первыми пиками и краткие описания оцениваемых случаев с указанием субъективной оценки по цифровой рейтинговой шкале.

На основании данных 30 парных измерений при наличии и при исчезновении болевого синдрома, нами замечено, что:

– лишь в двух случаях значение интервалов между пиками более 10 мкс было субъективно оценено как отсутствие болевого синдрома;

– в 29 случаях уменьшение или исчезновение болевого синдрома соответствовало уменьшению расстояния между пиками;

– боли величиной выше 5/10 по цифровой рейтинговой шкале имеют значения от 10 мкс;

– значения от 7.2 мкс до 10 мкс соответствуют по большей части отсутствию или незначительному наличию болевого синдрома.

Тем не менее часть значений ниже 10 мкс также расценивалась как присутствие болевого син-

дрома или дискомфорта, но не отмечалась как сильные боли. Это можно объяснить индивидуальными различиями пациентов, субъективной оценкой их симптомов, неточностями при измерении. На данный момент существуют всевозможные объяснения различий в болевой чувствительности, начиная от эмпирических и социокультурных различий в переживании боли до гормонально и генетически обусловленных половых различий в нейрохимии мозга [24].

Для проверки данной теории мы провели измерения еще на 46 участках, субъективно описываемых испытуемыми как болевые. Анализировались синяки, ушибы, растяжения, боль в стопе по причине плоскостопия, боли после операций, боли, связанные со сколиозами и боли опорно-двигательного аппарата неясной этиологии (табл. 2).

В 41 случае из 46 первичный вывод о характерном отклонении между пиками подтвердился. В 12 случаях значения попали в промежуток от 7.2 до 10 мкс, что по нашей теории соответствует наличию слабого болевого синдрома или отсутствие такового. В 29 случаях значения между пиками составляли выше 10.4 мкс, чем подтверждалось субъективное описание наличия боли.

Таким образом, из 76 случаев субъективного описания наличия боли опорно-двигательного аппарата 63% подтвердили присутствие болевого синдрома, 26% подтвердили возможность наличия не сильно выраженного болевого синдрома, 11% болевых синдромов не были идентифицированы с помощью предложенного метода.

Стоит отметить, что для анализа прочих разновидностей болевого синдрома необходимы дополнительные исследования.

ВЫВОДЫ

Высокий процент (89%) подтверждающих гипотезу результатов дает основания считать предложенный метод по опосредованному анализу наличия болевых ощущений в области опорно-двигательного аппарата пригодным для объективизации данных. Этот метод может использоваться для интеграции в системы поддержки принятия врачебных решений для оценки динамики лечения, дистанционной диагностики и верификации болевого синдрома.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. У всех участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. H. Wideman, R. R. Edwards, and D. M. Walton, Clin. J. Pain. 35 (3), 212 (2019).
2. A. N. Santana, C. N. de Santana, and P. Montoya, Basel **10** (11), 958 (2020).
3. J. Fricton, Oral Maxillofac Surg Clin North Am. **28** (3), 289 (2016).
4. A. May, Neurol. Sci. **28** (2), 101 (2007).
5. C. Schnakers, C. Chatelle, and S. Majerus, Expert Rev. Neurotherapeutics **10** (11), 1725 (2010).
6. J. Lovich-Sapola, C. E. Smith, and C. P. Brandt, Surg. Clin. North Am. **95** (2), 301 (2015).
7. K. D. Davis, N. Aghaeepour, and A. H. Ahn, Nat. Rev. Neurol. **16** (7), 381 (2020).
8. R. H. Gracely, Acta Anaesthesiol. Scand. **43** (9), 897 (1999).
9. M. Gram, C. Graversen, and A. E. Olesen, Eur. J. Pain. **19** (10), 155 (2015).
10. C.T. Yen and P. L. Lu, Acta Anaesthesiol. Taiwanica **51**, 73 (2013).
11. А. В. Кожевникова, Биофизика **63** (1), 163 (2018).
12. M. J. Panaggio, D. M. Abrams, and F. Yang, PLoS Comput. Biol. **17** (3), 11 (2021).
13. J. Karpe, A. Misiołek, A. Daszkiewicz, and H. Misiołek, Chair of Anaesthesiology, Intensive Therapy and Emergency Medicine in Zabrze **10** (1) 48 (2013).
14. А. А. Герасимов и Е. А. Дубовик, *Проблемы медицины в современных условиях* (Казань, 2014).
15. C. Curtin, Hand Clin. **32** (1), 21 (2016).
16. S. Frisch, P. Werner, and A. Al-Hamadi, Schmerz. **34** (5), 376 (2020).
17. Н. В. Нигей, *Измерение электрического сопротивления тканей организма и его изменения за цикл работы сердца* (АГМА, Благовещенск, 2011).
18. А. П. Баранов и М. Ф. Клименок, *Медицинская и биологическая физика: учебное пособие*, 2-е издание (ВГМУ, Витебск, 2010).
19. А. М. Тихомиров, *Импеданс биологических тканей и его применение в медицине* (РГМУ, 2006).
20. U. G. Kyle, I. Bosaeus, and A. D. De Lorenzo, Clin. Nutr. **23** (5), 1226 (2004).
21. T. K. Bera, J. Nagaraju, J. Electr. Bioimpedance **2**, 48 (2011).
22. Д. В. Николаев, А. В. Смирнов и И. Г. Бобринская, *Биоимпедансный анализ состава тела* (Наука, М., 2009).
23. T. K. Bera, J. Med. Engineer. **2014**, 381251 (2014).
24. J. S. Mogil, Nat. Rev. Neurosci. **13** (12), 859 (2012.

Experimental Approbation of the Method for Objective Registration of Pain Syndrome

A.V. Kozhevnikova*, O.L. Belyanin, and O.L. Vlasova*, *****

**Institute for Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, Saint Petersburg, 195251 Russia*

***Federal Scientific Center of Rehabilitation of the Disabled named after G.A. Albrecht, Bestuzhevskaya ul. 50, Saint Petersburg, 195067 Russia*

****Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, Saint Petersburg, 199034 Russia*

In this paper, we focus on the biohysical basis of the method for qualitative and quantitative registration of pain syndrome objectively and on the results obtained after experimental approbation of this method. The proposed method could be applied to create systems for support of medical decision-making and be used as an effective method for express-diagnostics.

Keywords: pain, electrophysiology, objective registration, bioimpedance, diagnostics

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1217–1222

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

КАТИОН НИТРОЗОНИЯ КАК КОМПОНЕНТ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ

© 2021 г. А.Ф. Ванин*, **, Л.А. Островская*, Д.Б. Корман***, Н.В. Блюхтерова***, В.А. Рыкова***, М.М. Фомина*****

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4*

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

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

E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 05.08.2021 г.
После доработки 16.09.2021 г.
Принята к публикации 17.09.2021 г.

Исследована противоопухолевая эффективность сочетанного применения экзогенного донора цитотоксических катионов нитрозония, биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и диэтилдитиокарбамата натрия на модели карциномы легких Льюис мышей. Установлено, что торможение роста опухоли под влиянием динитрозильных комплексов железа (2 мкМ/кг, внутривенно), диэтилдитиокарбамата натрия (250 мкМ/кг, внутрибрюшинно) и при их совместном применении составило 48, 76 и 57% соответственно. Предполагается, что этот эффект обусловлен способностью диэтилдитиокарбамата натрия разрушать в опухолях эндогенные динитрозильные комплексы железа с высвобождением из них катионов нитрозония, что и приводило к некоторому усилению противоопухолевого действия препаратов при их совместном применении.

Ключевые слова: биядерный динитрозильный комплекс железа с глутатионом, диэтилдитиокарбамат натрия, противоопухолевая активность in vivo, карцинома легких Льюис мышей.

DOI: 10.31857/S0006302921060181

Ранее нами было обнаружено, что генерирующие оксид азота моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа с различными тиолсодержащими лигандами (М- и Б-ДНКЖ, формулы их основных резонансных структур соответственно $([RS^-)_2Fe^{2+}(NO, NO^+)]$ и $[(RS^-)_2Fe^{2+}_2(NO^+)_2(NO)_2]$) обладают способностью задерживать развитие ряда солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Са-755). Противоопухолевый эффект изученных препаратов проявлялся при их введении как внутрибрюшинно (в/б), так и внутривенно (в/в) и колебался в пределах от 60 до 90% торможения роста опухоли, изменяясь в зависимости от дозового режима, схемы применения, времени оценки эффекта и природы опухолевого штамма [1–8]. Показан также определенный цитотоксический эффект некоторых из комплексов Б-ДНКЖ в отношении клеток опухоли человека (культура MCF7) [8, 9].

В принципе противоопухолевое и цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может определяться их способностью высвобождать при распаде как нейтральные молекулы NO, так и катионы нитрозония (NO^+) [10].

Нейтральные молекулы NO, связываясь с ионами супероксида, продуцируют анионы пероксинитрита, продукты распада протонированной формы которых – гидроксильные радикалы и диоксид азота – оказывают токсическое действие на клетки и ткани.

Катионы нитрозония NO^+ могут оказывать цитотоксическое действие, благодаря способности инициировать S-нитрозирование тиолсодержащих белков, нарушающее нормальное функционирование этих белков, что и приводит к негативным для клеток и тканей последствиям.

Сокращения: М- и Б-ДНКЖ – моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа, в/б – внутрибрюшинное введение, в/в – внутривенное введение, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, GS-NO – S-нитрозоглутатион.

Выяснение вопроса о том, какой из указанных компонентов ДНКЖ – молекулы оксида азота NO или катионы нитрозония NO^+ – может оказывать решающее цитотоксическое действие на опухолевые клетки, требует специальных исследований.

Как было показано в работах [9, 11], ответить на этот вопрос можно, проводя изучение влияния производных дитиокарбамата, в частности диэтилдитиокарбамата (ДЭТК, формула $[(C_2H_5)_2=N\text{-}CS_2]$), на цитотоксическое действие ДНКЖ.

При контакте с биядерными динитрозильными комплексами железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) ДЭТК перехватывает на себя из железо-динитрозильной группы комплекса железо-мононитрозильный фрагмент с образованием устойчивых ЭПР-регистрируемых мононитрозильных комплексов железа с ДЭТК, практически не высвобождающих нейтральные молекулы NO. Что касается судьбы второго нитрозильного лиганда в железо-динитрозильной группе – он высвобождается в форме катиона нитрозония NO^+, связывающегося с тиолами различного происхождения с образованием соответствующих S-нитрозотиолов, что и может определять цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в присутствии ДЭТК.

Именно таким путем было показано, что цитотоксическое действие Б-ДНКЖ-GSH или Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом на опухолевые клетки MCF7 [8, 9], а также цитотоксическое действие Б-ДНКЖ-GSH на бактерии *Escherichia coli* [11] определяется способностью этих комплексов выступать в качестве доноров катиона нитрозония NO^+.

Задача предпринятого нами исследования состояла в исследовании роли катионов нитрозония NO^+ (с использованием вышеописанного подхода) в реализации противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-GSH в условиях *in vivo*. С этой целью проведено изучение противоопухолевой эффективности сочетанного применения Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК на модели карциномы легких Льюис.

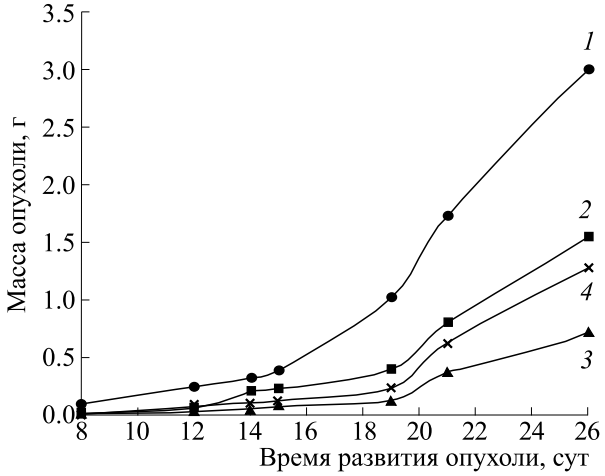
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали конвенциальный препарат диэтилкарбамата натрия (Sigma, США), ферросульфат железа ($FeSO_4{\cdot}7H_2O$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион и нитрит натрия (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М растворе HCl с последующим разделением NO и примесного диоксида азота (NO_2) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе [8, 9].

Синтез Б-ДНКЖ-GSH проводили согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лиганадами [8, 9, 12]. В соответствии с этим методом синтез 5 мМ раствора ДНКЖ с глутатионом проходил следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызывавшего подкисление раствора до pH 4.0, с последующим введением в него 28 мг (10 мМ) сернокислого железа, приводившего к дальнейшему снижению pH до 3.8. После этого в раствор добавляли 6.9 мг (10 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленного образованием S-нитрозоглутатиона (GS-NO). Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для GS-NO, реакция заканчивалась через 1.5 ч с образованием 10 мМ этого соединения. После этого pH раствора повышали до 7.2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования Б-ДНКЖ-GSH в растворе при участии GS-NO, Fe^{2+} и глутатиона [12]. Для полного превращения GS-NO в Б-ДНКЖ-GSH требовалось несколько часов. После удаления образовавшегося за это время осадка гидроокиси трехвалентного железа путем фильтрования раствора через фильтровальную бумагу полученный раствор замораживали в жидком азоте и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Оценку полученного количества Б-ДНКЖ-GSH (мол. масса 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции ε, равными соответственно 9200 и 7400 $M^{-1}см^{-1}$ [9]. Согласно этой оценке концентрация Б-ДНКЖ-GSH в растворе составляла ~2.5 мМ (или 5 мМ в пересчете на один атом железа в комплексе).

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 50 инбредных мышах линии BDF_1 – гибридах первого поколения $f_1(C_{57}Bl/_6 \times DBA_2)$, самках с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России». В качестве опухолевой тест-системы служила солидная опухоль мышей – карцинома легких Льюис, перевиваемая подкожно в соответствии со стандартной методикой [13].

Препараты Б-ДНКЖ-GSH вводили животным в виде водных растворов пятикратно в/в (в хвостовую вену мышей) на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки после перевивки опухоли в суточной дозе 2 мкМ/кг. Растворы ДЭТК вводили в суточной дозе 50 мг/кг в/б через один час после введения Б-ДНКЖ-GSH.



Влияние сочетанного применения Б-ДНКЖ и ДЭТК на кинетику развития карциномы легких Льюис: *1* – контроль; *2* – Б-ДНКЖ, 2 мкМ/ кг, в/в; *3* – ДЭТК, 50 мг/кг (250 мкМ/кг), в/б; *4* – ДНКЖ, 2 мкМ/кг, в/в + ДЭТК, 50 мг/кг, в/б с интервалом в 1 ч. Введение препаратов пятикратно на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена при сопоставлении кинетики роста опухолей в группах контрольных и леченых животных. Показателем ростингибирующего эффекта препарата служил коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %), который определялся из соотношения: $TPO = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T – объем (или масса) опухоли в группах контрольных и леченых животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a – длина, b – ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли использовали величину плотности опухолевой ткани, равную 1 г/см^3 [13].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шестивосьми мышей при 8–10 животных в контроле. Наблюдение за животными продолжалось в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных проведена путем оценки размеров опухолей (массы опухолей) у контрольных и леченых животных с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК на развитие карциномы легких Льюис при отдельном и сочетанном введении мышам характеризуют данные, представленные на рисунке и в таблице.

Как видно, Б-ДНКЖ-GSH при пятикратном (на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки после перевивки опухоли) введении, в/в, в суточной дозе 2 мкМ/кг вызывал 50%-е торможение роста по сравнению с контролем. ДТЭК, введенный пятикратно, в/б, в суточной дозе 50 мг/кг, вызывал торможение роста опухоли почти на 80% по сравнению с контролем. Эффект совместного применения Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК (через один час после введения Б-ДНКЖ-GSH) соответствовал 60%-му ингибированию опухолевого роста по сравнению с контролем (рисунок, таблица).

Таким образом, сочетанное применение ДЭТК и Б-ДНКЖ в условиях наших опытов приводило лишь к незначительному повышению противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ (с 50 до 60%). При этом введение одного ДЭТК оказалось

Влияние сочетанного применения ДНКЖ и ДЭТК на развитие карциномы легких Льюис

Препарат	Доза	Время оценки эффекта, сут	Средняя масса опухоли, г	Коэффициент торможения роста опухоли (*TPO*, %)
ДНКЖ	2 мкМ/ кг в/в	26	1.55 ± 0.1	48
ДЭТК	50 мг/кг в/б	26	0.72 ± 0.2	76
ДНКЖ + ДЭТК	2 мкМ/ кг в/в + + 50 мг/кг в/б	26	1.28 ± 0.3	57
Контроль	–	26	3.00 ± 0.3	–

наиболее эффективным (80%) по сравнению с влиянием других воздействий. Во всех этих случаях подавление роста опухоли наблюдалось в течение недели после окончания введения животным указанных агентов (тринадцатые сутки после перевивки опухоли), после чего начинался постепенный рост опухоли.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде чем перейти к обсуждению полученных результатов, следует отметить существенное различие в концентрации Б-ДНКЖ-GSH, при котором достигалось подавление роста опухоли на начальной его стадии в экспериментах, проводившихся *in vivo* (на мышах) в настоящей работе, а также в наших предыдущих исследованиях [5–8], с одной стороны, и в экспериментах *in vitro*, проводившихся нами на культуре опухолевых клеток MCF7, с другой стороны [8, 9].

В экспериментах *in vivo* рост карциномы Льюис полностью блокировался на несколько недель при пятикратном в/в введении Б-ДНКЖ-GSH в дозе 2 мкМ/кг, тогда как 50%-я гибель клеток в культуре (в экспериментах *in vitro*) достигалась при концентрации Б-ДНКЖ-GSH более 2 мМ. Очевидно, что это различие было обусловлено влиянием на противоопухолевое действие Б-ДНКЖ-GSH функционирующей в организме мышей иммунной системы – иммунокомпетентных клеток, опосредовавших действие Б-ДНКЖ-GSH на развитие перевиваемой опухоли. Эти клетки, поглощая вводившиеся комплексы, обеспечивали их концентрированное, избирательное поступление в опухоль, чем и достигалось ингибирующее действие Б-ДНКЖ-GSH на опухоль в сравнительно низких дозах.

Предположение о том, что иммунокомпетентные клетки способны эффективно поглощать ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, основывается на результатах исследования польских ученых, продемонстрировавших включение ДНКЖ в макрофаги RAW 264,7 [14]. Что касается передачи ДНКЖ в опухолевые клетки, этот эффект был продемонстрирован французскими исследователями, обнаружившими накопление этих комплексов при сокультивировании клеток лейкоза L1210 с макрофагами мышей, генерировавших ДНКЖ после их обработки бактериальными липополисахаридами [15].

Встает вопрос, почему примерно через неделю после окончания в/в введения мышам Б-ДНКЖ-GSH, как в отсутствие, так и при дополнительном введении животным ДЭТК, начинался рост опухоли? Ответ на этот вопрос очевиден: это означает только одно – в организме животных сохранялся клон опухолевых клеток, устойчивых к действию Б-ДНКЖ-GSH, как самих по себе, так и полностью распадающихся под действием ДЭТК. Такими клетками могли оказаться злокачественные клетки с делецией гена апоптоза, так что было бы интересно проверить, не приведет ли последующее введение животным Б-ДНКЖ-GSH, особенно в присутствии ДЭТК, к гибели и этих клеток. Тем самым будет получен ответ на вопрос, способны ли цитотоксические компоненты ДНКЖ – катионы нитрозония – полностью подавлять пролиферацию злокачественных опухолей.

Такого рода эксперимент можно было бы провести, исходя из обнаруженного в настоящей работе факта противоопухолевого действия ДЭТК на развитие опухоли *in vivo* при в/б введении мышам только одного этого агента (кривая *3* на рисунке).

Дело в том, что факт временного совпадения противоопухолевых эффектов Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК, с одной стороны, и ДЭТК, с другой стороны (кривые *2–4* на рисунке) дает основание предполагать, что при действии на животных только одного ДЭТК его цитотоксическое действие, так же как при введении и Б-ДНКЖ-GSH, и Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК, обусловлено катионами нитрозония.

Последнее, естественно, должно было бы обеспечиваться появлением в опухолях динитрозильных комплексов железа эндогенного происхождения. О том, что такое вполне возможно, свидетельствуют зарегистрированные многими исследователями [16–19], в том числе и нами в опытах с карциномой Льюис [2], факты обнаружения в образцах злокачественных опухолей сигналов ЭПР нитрозильных комплексов гемопротеинов. Появление последних свидетельствует об усиленной генерации оксида азота иммуннокомпетентными клетками как реакции организма на появление у мышей злокачественных клеток.

В работе американских исследователей [20] было показано, что при появлении NO в клетках макрофагов в них в первую очередь формируются ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как парамагнитные (ЭПР-регистрируемые, М-ДНКЖ), так и диамагнитные (ЭПР-нерегистрируемые, Б-ДНКЖ). Из макрофагов эти комплексы могут переходить в опухолевые клетки, в которых они способны прочно связываться с экспрессируемой в присутствии NO глутатион-S-трансферазой [21, 22]. Это связывание стабилизирует динитрозильные комплексы железа, предотвращая их распад и

тем самым высвобождение из этих комплексов катионов нитрозония NO^+, способных вызывать гибель опухолевых клеток. Такой распад могли инициировать молекулы ДЭТК, образующие, как об этом мы говорили во введении, прочно связанные мононитрозильные комплексы железа с ДЭТК, с одновременным высвобождением из ДНКЖ катионов нитрозония NO^+.

Таким образом, если в предполагаемых экспериментах при повторной серии введения ДЭТК мышам-опухоленосителям (например, на девятнадцатые-двадцатые сутки после перевивки опухоли, как это следует из данных, представленных рисунке) окажется, что рост опухоли будет заблокирован, это будет означать, что сохранившиеся после первой серии введения мышам ДЭТК клетки, в действительности, чувствительны к губительному действию на них катионов нитрозония NO^+. Исходя из этого, можно ожидать, что при таких последовательно повторяющихся сериях введения ДЭТК мышам-опухоленосителям, получившим ранее Б-ДНКЖ-GSH, опухоль может быть полностью ликвидирована.

Это ожидание подкрепляется еще и специфическим характером апоптотических процессов, вызываемых в клетках ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Как следует из работы российских и немецких исследователей [23], один из представителей таких комплексов – М-ДНКЖ с тиосульфатом – инициировал в клетках лейкоза человека (линия Jurkat) апоптоз по непонятному пока механизму. Инициированный этим комплексом апоптоз не подавлялся ни антиапоптотическим белком Bcl-2, ни ингибиторами каспазы-3, -6 или -8. Такое подавление характерно, как известно, для большинства индукторов апоптоза.

В заключение отметим, что обнаруженный в данной работе факт сохранения и даже некоторого повышения противоопухолевой активности Б-ДНКЖ-GSH при совместном применении с ДТЭК, являющимся «ловушкой» для молекул NO, можно рассматривать как свидетельство того, что эффект ингибирования роста опухоли обусловлен присутствием катионов нитрозония (NO^+).

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. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **59**, 508 (2014).
2. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60**, 152 (2015).
3. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60**, 1157 (2015).
4. A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, Austin J. Reprod. Medicine & Infertility **2**, 1109 (2015)
5. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **62**, 591 (2017).
6. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **64** (6), 1216 (2019).
7. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **65** (1), 1 (2020)
8. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **65** (5), 1009 (2020).
9. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys. **79** (1), 93 (2021)
10. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form"of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
11. A. F. Vanin, D. I. Telegina, V. D. Mikoyan, and S. V. Vasilieva, Cell Biochem. Biophys. (2021), in press.
12. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **35,** 110 (2013).
13. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., гл. 39 (2012), сс. 642–657.
14. H. Lewandowska, T. M. Stepkowski, S. Meszynska-Wielgosz, et al. J. Inorg. Biochem. **188**, 29 (2018)
15. J. C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, J. Biol. Chem. **266**, 10162 (1991).
16. N. M. Emanuel, A. N. Saprin, V. A. Shabalkin, et al., Nature **222**, 165 (1969).
17. T. Maruyama, N. Kataoka, S. Nagase, et al., Cancer Res. **31**, 179 (1971)
18. N. R. Bastian, C. Y. Yim, J. B. Hibbs, et al., J. Biol. Chem. **269**, 5127 (1994)
19. M. C. R. Symons and I. J. Rowland, Free Rad. Res. Comms. **21**, 197 (1994)
20. J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., Free Rad. Biol. Med. **51**, 1559 (2011)
21. H. C. Lok, Y. S. Rahmanto, C. L. Hawkins, et al., J. Biol. Chem. **287**, 507 (2012)
22. H. C. Lok, S. Sahni, P.J. Jansson, et al., J. Biol. Chem. **291**, 27042 (2016)
23. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., Free Rad. Biol. Med. **40**, 1340 (2006).

Nitrosonium Cation as a Component of Dinitrosyl Iron Complexes Acts as an Inducer of the Antitumor Effect

A.F Vanin*, **, L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman***, N.V. Bluhterova***, V.A. Rykova***, and M.M. Fomina*****

**Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

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

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

In this study, we explored the antitumor efficacy of combined use of an exogenous donor of cytotoxic nitrosonium cations of biuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione and sodium diethyldithiocarbamate in a mouse model with Lewis lung carcinoma cell lines. It was found that the inhibitory effect of dinitrosyl iron complex (2 μM/kg, i/v), sodium diethyldithiocarbamate (250 μM/kg, i/p) and their combination on tumor growth was 48%, 76% and 57%, respectively. These results suggest that the inhibitory effect was observed due to the ability of sodium diethyldithiocarbamate to decompose endogenous dinitrosyl iron complexes in tumors leading to a release of nitrosonium cations from these complexes, thereby enhancing to some extent the antitumor effect of drugs when they were given together.

Keywords: binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione, sodium diethyldithiocarbamate, in vivo antitumor activity, murine Lewis lung carcinoma

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1223–1228

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА – ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ БИЯДЕРНОГО ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ

© 2021 г. А.Ф. Ванин*, **, Л.А. Островская*, Д.Б. Корман***, Е.И. Некрасова***, О.О. Рябая****, Н.В. Блюхтерова***, В.А. Рыкова***, М.М. Фомина*****

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4*

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

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

*****Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24*

E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 05.08.2021 г.
После доработки 16.09.2021 г.
Принята к публикации 17.09.2021 г.

Исследована противоопухолевая активность и цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа с N-ацетилцистеином в условиях *in vivo* и *in vitro* на модели солидной опухоли мышей (аденокарцинома Акатол), на моделях клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549) и нормальных клеток человека (фибробласты кожи линии WI-26). Установлено, что препарат, содержащий эти комплексы, ингибирует развитие опухоли Акатол на 60% по сравнению с контролем как при внутривенном, так и при внутрибрюшинном введении. Препарат обладает слабо выраженным цитотоксическим эффектом как в отношении опухолевых, так и нормальных клеток. Показатель $ИК_{50}$ составляет 0.12 и 0.44 мкМ/мл для опухолевых клеток MCF-7 и A549 соответственно, а для фибробластов кожи человека – 0.28 мкМ/мл. Предполагается, что противоопухолевый эффект препаратов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлен не только их прямым цитотоксическим воздействием на опухолевые клетки, но и опосредованным влиянием доноров оксида азота на развитие опухоли, связанным с их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки организма, обеспечивающие направленную доставку комплексов к опухолям.

Ключевые слова: биядерный динитрозильный комплекс железа с N-ацетилцистеином, противоопухолевая активность, цитотоксический эффект.

DOI: 10.31857/S0006302921060193

Ранее нами было установлен противоопухолевый эффект ряда генерирующих оксид азота соединений, таких как моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа (Б-ДНКЖ), содержащих различные лиганды, а также S-нитрозоглутатиона, в отношении ряда солидных опухолей мышей (карциномы легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Са-755). Противоопухолевый эффект изученных препаратов колебался в пределах от 60 до 90% торможения роста опухоли, изменяясь в зависимости от дозового режима, схемы применения, времени оценки эффекта и природы опухолевого штамма [1–7].

С целью исследования роли лиганда в проявлении ростингибирующей и цитотоксической активности комплексов было проведено сравнительное изучение в условиях *in vivo* и *in vitro* двух соединений Б-ДНКЖ – содержащих глутатион (Б-ДНКЖ-Г) и меркаптосукцинат (Б-ДНКЖ-МС). Было обнаружено отсутствие корреляции между выраженностью противоопухолевого и цитотоксического эффектов препаратов. Так, Б-ДНКЖ-Г обладает преимущественной по сравнению с Б-ДНКЖ-МС активностью *in vivo*, что выражается в ингибировании развития солидной опухоли (карцинома легких Льюис) на 90 и 65% по сравнению с контролем соответственно.

Сокращения: Б-ДНКЖ-Г – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие глутатион, Б-ДНКЖ-МС – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие меркаптосукцинат, Б-ДНКЖ-АЦЦ – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие N-ацетилцистеин.

Наряду с этим Б-ДНКЖ-МС обладает более выраженным, чем Б-ДНКЖ-Г, цитотоксическим эффектом *in vitro* – значения $ИК_{50}$ составляют 0.8 и 2.0 мкмоль/мл соответственно (культура клеток опухоли человека MCF7).

Интерпретируя эти данные, можно предположить, что ростингибирующее действие препаратов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлено не только их прямым цитотоксическим воздействием на опухолевые клетки, но и опосредованным влиянием доноров оксида азота на развитие опухоли, связанным с их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки организма, обеспечивающие направленную доставку комплексов к опухолям [8].

В продолжение исследований, направленных на выяснение роли природы лиганда в реализации противоопухолевого действия доноров оксида азота, нами в данной работе проведено изучение ростингибирующего и цитотоксического эффекта нового биядерного динитрозильного комплекса железа, содержащего N-ацетилцистеин (Б-ДНКЖ-АЦЦ). Противоопухолевая активность и цитотоксический эффект Б-ДНКЖ-АЦЦ исследованы в условиях *in vivo* и *in vitro* на модели солидной опухоли мышей (аденокарцинома Акатол), на моделях клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549) и на нормальных клетках человека (фибробласты кожи линии WI-26).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали ферросульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Fluka, Швейцария), N-ацетилцистеин и нитрит натрия (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М растворе HCl с последующим разделением NO и примесного диоксида азота (NO_2) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе, как это было описано ранее [9–11].

Биядерная форма динитрозильных комплексов железа с N-ацетилцистеином. Синтез Б-ДНКЖ-АЦЦ проводили путем обработки газообразным NO (при давлении 150 мм рт. ст.) 1 мл раствора ферросульфата в дистиллированной воде и ацетилцистеина в 15 мМ HEPES-буфере (pH 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим смешиванием этих растворов в присутствии NO, как это описано ранее [8]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 мМ. После 5-минутного встряхивания смеси, приводившего к включению всего двухвалентного железа в ДНКЖ-АЦЦ, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного Б-ДНКЖ-АЦЦ замораживали и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм, принимая $\varepsilon = 6000\ М^{-1}см^{-1}$ (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ).

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 40 инбредных мышах линии Balb/c, самках с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевой тест-системы служила солидная опухоль мышей – аденокарцинома толстого кишечника Акатол, перевиваемая подкожно в соответствии со стандартной методикой [12].

Исследуемый препарат Б-ДНКЖ-АЦЦ вводили животным в виде водного раствора внутривенно в хвостовую вену мышей и внутрибрюшинно в суточной дозе 10 мкМ/кг десятикратно с первых по десятые сутки после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена при сопоставлении кинетики роста опухолей в группах контрольных и леченых животных. Показателем ростингибирующего эффекта препарата служил коэффициент торможения роста опухоли (*TPO*, %), который определяли из соотношения: $TPO = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T – объем (или масса) опухоли в группах контрольных и леченых животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a – длина, b – ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли использовали величину плотности опухолевой ткани, равную 1 г/см^3 [12].

Каждая группа животных состояла из восьмидесяти мышей. Наблюдение за животными продолжали в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных проведена путем оценки размеров опухолей (массы опухолей) у контрольных и леченых животных с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

Цитотоксический эффект *in vitro*. Изучение цитотоксичности Б-ДНКЖ-АЦЦ проведено на моделях клеточных культур опухолей человека (карцинома молочной железы MCF-7, эпителиоидный рак легкого A549) и на нормальных клетках человека (фибробласты кожи WI-26), полученных из банка опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

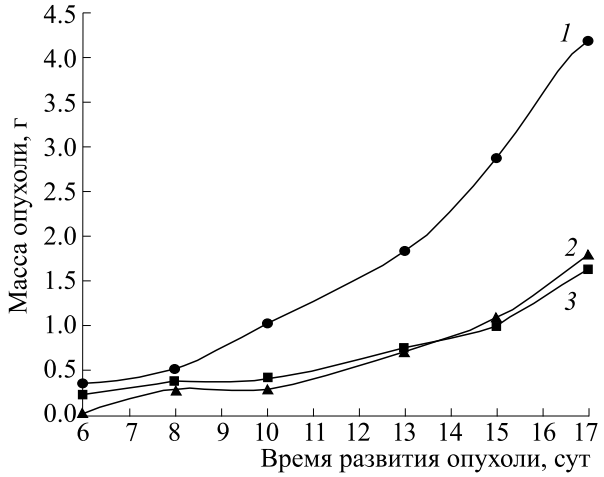


Рис. 1. Противоопухолевая активность препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ на модели аденокарциномы Акатол: *1* – контроль; *2* – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 10 мкМ/кг, внутрибрюшинно; *3* – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 10 мкМ/кг, внутривенно. Введение препарата с первых по десятые сутки после перевивки опухоли.

Действие препарата *in vitro* исследовано в широком диапазоне концентраций – от 0.001 до 0.5 мкмоль/мл.

Оценку цитотоксического эффекта осуществляли путем определения доли выживших клеток по отношению к контролю с использованием стандартного МТТ-теста. Выживаемость клеток в культуре оценивали спектрофотометрически по окрашиванию жизнеспособных клеток [8, 13].

Клетки ($8\cdot10^4$ клеток/лунку) вносили в 96-луночный планшет в полной среде DMEM (арт. 41965039, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия), в конечном объеме 200 мкл на лунку и помещали в CO_2-инкубатор.

Через 24 ч проводили замену среды, после чего добавляли исследуемый препарат в указанных концентрациях. В контрольную группу клеток препарат не вносили. Клетки инкубировали в CO_2-инкубаторе в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ-реагента (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолия бромид, AppliChem, Германия) в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 3 ч, затем среду отбирали и добавляли к ним по 200 мкл диметилсульфоксида до растворения кристаллов формазана (37°C, 10 мин при встряхивании).

Оптическую плотность раствора формазана определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе Multiscan FC (Thermo-Scientific, США), выживаемость клеток высчитывали по формуле: (ОП экспериментальной группы/ОП контрольной группы) 100%, где ОП – оптическая плотность раствора.

Результаты экспериментов представлены в виде зависимостей «доза–эффект», характеризующих цитотоксическое действие препарата и позволяющих определить показатель цитотоксичности Б-ДНКЖ-АЦЦ $ИК_{50}$ (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток) в отношении изучавшихся культур опухолевых клеток.

Статистическая обработка результатов проведена с помощью пакетов программ Statistica и Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено исследование противоопухолевой активности и цитотоксического эффекта препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ в условиях *in vivo* и *in vitro* на модели солидной опухоли мышей (аденокарциномы Акатол), на моделях клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549) и на фибробластах человека (линия WI-26).

Противоопухолевая активность *in vivo* биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих N-ацетилцистеин. Влияние Б-ДНКЖ-АЦЦ на развитие аденокарциномы Акатол характеризуют данные, представленные на рис. 1 и в табл. 1.

Как видно, препарат Б-ДНКЖ-АЦЦ проявляет определенную противоопухолевую активность

Таблица 1. Противоопухолевая активность препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ на модели аденокарциномы Акатол

Группа	Суточная доза, мкМ/кг, способ введения препарата	Средняя масса опухоли, г	Коэффициент торможения роста опухоли (*ТРО*, %)
Б-ДНКЖ-АЦЦ	10 мкМ/кг, внутривенно	1.66 ± 0.2	60
Б-ДНКЖ-АЦЦ	10 мкМ/кг, внутрибрюшинно	1.79 ± 0.3	57
Контроль	–	4.18 ± 0.4	–

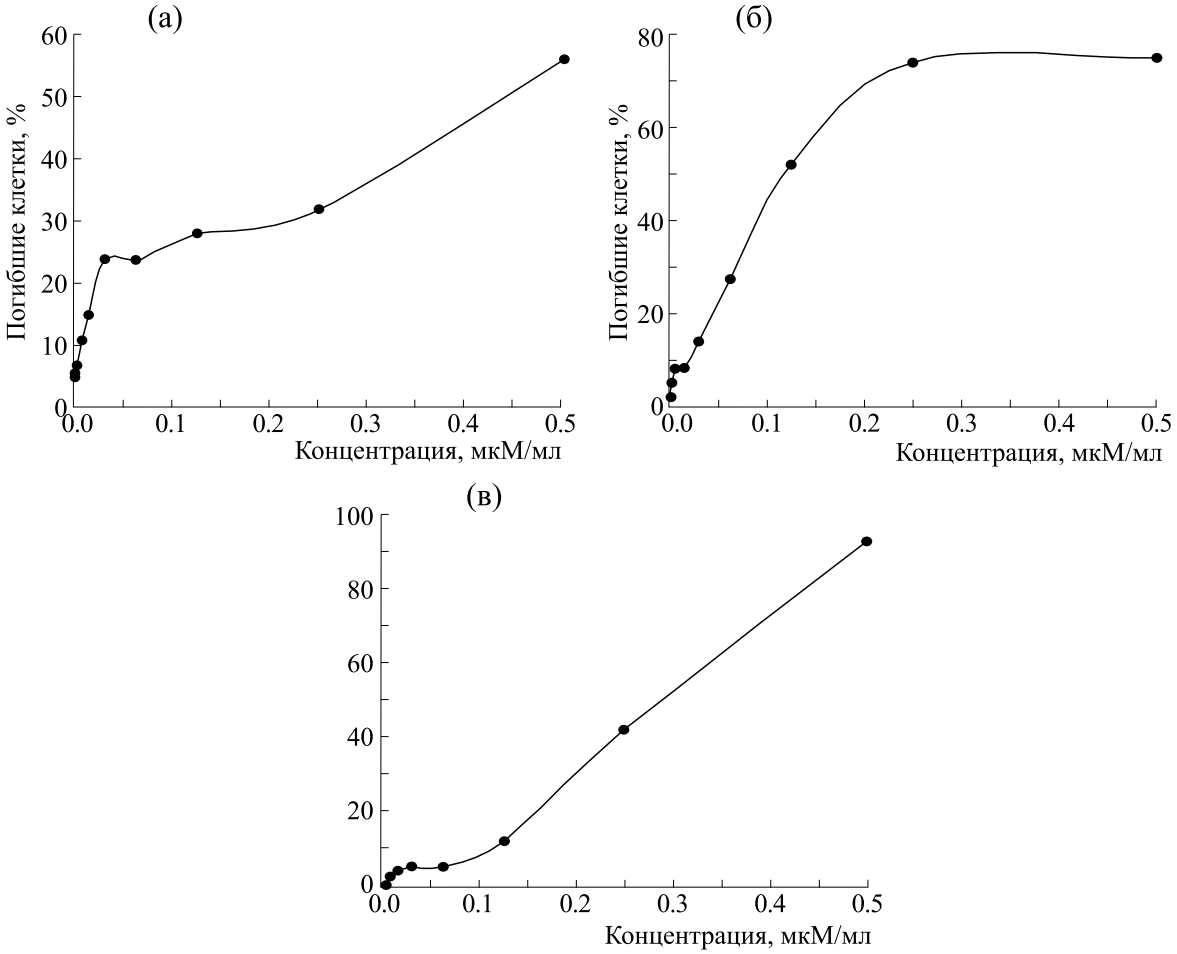


Рис. 2. Концентрационные зависимости цитотоксического эффекта препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ в отношении опухолевых и нормальных клеток человека: (а) – культура клеток рака молочной железы MCF-7, (б) – культура клеток рака легкого А 549, (в) – культура клеток фибробластов WI-26.

в отношении данной солидной опухоли, ингибируя ее развитие на 60% по сравнению с контролем как при внутривенном, так и при внутрибрюшинном введении.

Цитотоксический эффект *in vitro* биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих N-ацетилцистеин. Исследование эффектов Б-ДНКЖ-АЦЦ в условиях *in vitro* включало сравнительную оценку цитотоксического эффекта препарата в отношении клеток опухолей человека различного генеза (рак молочной железы MCF-7, рак легкого А549), а также изучение его влияния на нормальные клетки кожи человека (фибробласты линии WI-26).

Выживаемость опухолевых клеток в зависимости от концентрации Б-ДНКЖ-АЦЦ для исследовавшихся клеточных культур охарактеризована данными, представленными на рис. 2.

Полученные данные свидетельствуют о дозозависимом цитотоксическом эффекте препарата, возрастающем с увеличением концентрации Б-ДНКЖ-АЦЦ для всех изученных типов клеток. Сопоставление цитотоксической активности препарата в максимальной из исследованных концентраций (0.5 мкМ/мл) в отношении различных типов клеток свидетельствует о том, что фибробласты человека обладают более высокой чувствительностью к действию Б-ДНКЖ-АЦЦ по сравнению с опухолевыми клетками. Так, при воздействии указанной концентрации препарата на исследовавшиеся культуры клеток погибает 100% фибробластов линии WI-26, 75% клеток рака легкого А 549 и 56% клеток рака молочной железы MCF-7. При этом очевидно, что Б-ДНКЖ-АЦЦ проявляет большую активность в отношении клеток рака легкого А 549 по сравнению с клетками рака молочной железы MCF-7 (рис. 2).

При оценке цитотоксического эффекта препарата в соответствии с показателем $ИК_{50}$ также очевидно, что клетки рака легкого А549 более чувствительны, чем клетки рака молочной желе-

Таблица 2. Показатель цитотоксического эффекта $ИК_{50}$ препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ в отношении ряда культур опухолевых и нормальных клеток человека *in vitro*

Клеточная линия	$ИК_{50}$, мкМ/мл
Рак молочной железы MCF-7	0.44
Рак легкого A549	0.12
Фибробласты WI-26	0.28

зы MCF-7, к действию Б-ДНКЖ-АЦЦ – $ИК_{50}$ составляет 0.12 и 0.44 мкМ/мл соответственно. Наряду с этим необходимо отметить, что, согласно показателю $ИК_{50}$, опухолевые клетки A549 обладают более высокой чувствительностью к летальному действию препарата по сравнению с нормальными клетками человека WI-26, для которых $ИК_{50}$ составляет 0.28 мкМ/мл (табл. 2).

Согласно общепринятым критериям оценки цитотоксического эффекта, лекарственное средство из нового класса соединений считается цитотоксически активным при значениях $ИК_{50} \le 10^{-4}$ М (0.1 мкМ/мл) [8, 12, 13].

В соответствии с этим критерием Б-ДНКЖ-АЦЦ следует отнести к агентам, обладающим слабо выраженным цитотоксическим действием как на опухолевые (рак легкого A549, рак молочной железы MCF-7), так и на нормальные (фибробласты кожи WI-26) клетки человека.

Для оценки роли лиганда в проявлении цитотоксического эффекта различных комплексов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа представляется весьма информативным сопоставление показателя $ИК_{50}$ для препаратов, содержащих глутатион (Б-ДНКЖ-Г), меркаптосукцинат (Б-ДНКЖ-МС) и N-ацетилцистеин (Б-ДНКЖ-АЦЦ) в отношении культуры клеток опухоли человека MCF-7 (табл. 3).

Как видно, изученный в данной работе комплекс Б-ДНКЖ-АЦЦ, подобно ранее изученным в работе [8] соединениям Б-ДНКЖ-МС и Б-ДНКЖ-Г, обладает слабо выраженным цитотоксическим эффектом в отношении культуры опухолевых клеток человека MCF-7. Так, показатель $ИК_{50}$ составляет для Б-ДНКЖ-АЦЦ 0.44 мкМ/мл, для Б-ДНКЖ-МС – 0.80 мкМ/мл и для Б-ДНКЖ-Г – 2.00 мкМ/мл соответственно (табл. 3).

В то же время испытанные соединения весьма эффективно ингибируют развитие солидных опухолей мышей *in vivo*. Так, Б-ДНКЖ-АЦЦ тормозит развитие аденокарциномы Акатол на 60% по сравнению с контролем, а Б-ДНКЖ-МС и Б-ДНКЖ-Г ингибируют рост карциномы легких Льюис на 65 и 90% соответственно (табл. 3).

Сопоставление цитотоксической и противоопухолевой активности трех комплексов Б-ДНКЖ, содержащих различные лиганды, свидетельствует об отсутствии корреляции между эффектами препаратов в условиях *in vitro* и *in vivo* (табл. 3). Так, цитотоксический эффект препаратов, согласно показателю $ИК_{50}$, уменьшается в ряду Б-ДНКЖ-АЦЦ – Б-ДНКЖ-МС – Б-ДНКЖ-Г, в то время как противоопухолевый эффект, в соответствии с показателем *ТРО*, возрастает в этой же последовательности (табл. 3).

Таким образом, полученные в данной работе результаты подтверждают сделанное нами ранее предположение о том, что противоопухолевый эффект препаратов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлен не только их прямым цитотоксическим воздействием на опухолевые клетки, но и опосредованным влиянием доноров оксида азота на развитие опухоли, связанным с их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки организма, обеспечивающие направленную доставку комплексов к опухолям [8].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица 3. Показатель цитотоксического эффекта и противоопухолевой активности для ряда соединений на основе биядерных комплексов железа в отношении культуры опухолевых клеток человека MCF-7 *in vitro* и солидных опухолей мышей *in vivo*

Препарат	$ИК_{50}$, мкМ/мл	*ТРО*, %
Б-ДНКЖ-АЦЦ	0.44	60 (аденокарцинома Акатол)
Б-ДНКЖ-МС	0.80	65 (карцинома Льюис)
Б-ДНКЖ-Г	2.00	90 (карцинома Льюис)

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **59**, 508 (2014).
2. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60**, 152 (2015).
3. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60**, 1157 (2015).
4. A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, Austin J. Reprod. Medicine & Infertility **2**, 1109 (2015)
5. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **62**, 591 (2017).
6. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **64** (6), 1216 (2019).
7. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и А. Ф. Ванин, Биофизика **66** (2), 259 (2021).
8. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **65** (5), 1009 (2020).
9. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **23**, 1236 (2010).
10. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **35**, 110 (2013).
11. A. F. Vanin "*Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form"of Nitric Oxide in Living Organisms"*, Cambridge, UK, Cambridge Scholars Publishing (2019).
12. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., гл. 39 (2012), сс. 642–657.
13. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., Биофизика **64** (6), 1138 (2019).

Nitric Oxide Donors: Antitumor and Cytotoxic Effects of Binuclear Dinitrosyl Iron Complex with N-Acetylcysteine

A.F Vanin*, **, L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman***, E.I. Nekrasova***, O.O. Riabaya****, N.V. Bluhterova***, V.A. Rykova***, and M.M. Fomina*****

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

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

****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

*****Blokhin National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia*

The antitumor activity and cytotoxic effect of binuclear dinitrosyl iron complexes with N-acetylcysteine were investigated within *in vivo* and *in vitro* models using mouse solid tumor (Akatol adenocarcinoma), human tumor cell cultures (human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (A549)) and normal human cells (skin fibroblast cell line WI-26). It was found that after intravenous and intraperitoneal delivery, the drug with these complexes inhibits Akatol tumor growth by 60% as compared to the control. The drug has a mild cytotoxic effect on both tumor and normal cells. The IC_{50} values for tumor cells MCF-7 and A549, and human skin fibroblasts are 0.12, 0.44 and 0.28 μM/ml respectively. It is assumed that the antitumor effects of drugs with binuclear dinitrosil iron complexes occurs not only due to their direct cytotoxic effect on tumor cells, but also due to the indirect influence of nitric oxide donors on tumor growth associated with their ability to be included in the immunocompetent cells of the body, providing directed delivery of complexes to tumors.

Keywords: binuclear dinitrosyl iron complex with N-acetylcysteine, antitumor activity, cytotoxic effect

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1229–1245

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

© 2021 г. Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина

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

E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 16.08.2021 г.
После доработки 16.08.2021 г.
Принята к публикации 19.08.2021 г.

В обзоре представлены данные, связанные с изучением радиосенсибилизирующих свойств и цитотоксической активности наночастиц золота на экспериментальных моделях опухолей. Рассматриваются возможные механизмы наблюдающихся эффектов.

Ключевые слова: наночастицы золота, радиосенсибилизация, цитотоксичность, экспериментальные модели опухолей.

DOI: 10.31857/S000630292106020X

Возможности стандартных методов лучевой терапии опухолей ограничены отсутствием селективности действия ионизирующего излучения на опухоль ввиду того, что абсорбция энергии облучения одинакова для опухолевой и нормальной ткани. В связи с этим невозможно подвести к опухоли дозу ионизирующей радиации, необходимую для полной иррадиации опухоли, поскольку повышение дозы связано с высоким риском тяжелых постлучевых повреждений нормальных органов и тканей. Повышение эффекта облучения без увеличения дозы пытаются получить, комбинируя облучение с применением различных способов усиления радиочувствительности опухолевых клеток (гипербарическая оксигенация, локальная гипертермия, гипергликемия, использование электронно-акцепторных соединений, противоопухолевых препаратов).

Накопленный клинический опыт показывает, что усиления терапевтического эффекта облучения многих опухолей (мультиформная глиобластома, опухоли головы и шеи, рак пищевода, прямой кишки, легкого, шейки матки) в определенных ситуациях можно добиться с помощью химиолучевого лечения, т. е. сочетания облучения с применением некоторых противоопухолевых препаратов (5-фторурцила, цисплатины, митомицина С и др.). Усиление эффективности лечения в этих случаях обусловлено не только повышением радиочувствительности опухолевых клеток в зоне облучения, но и ингибирующим действием препаратов как на первичную опухоль, так и на отдаленные метастазы. В то же время при химиолучевой терапии возможно усиление токсичности в результате суммации токсических эффектов облучения и химиотерапии [1].

В последние десятилетия фиксируется возрастающий интерес к возможностям применения для биомедицинских целей наночастиц неорганических материалов с высоким *Z*-числом (атомный номер), обладающих рядом уникальных химических, физических и биологических свойств, которые определяются их размерами, формой, особыми поверхностными свойствами. Показано, что такими свойствами обладают наночастицы золота (НЧЗ), серебра, гадолиния, лантанида, оксида титана. Наибольшее внимание исследователей привлекают НЧЗ благодаря простоте их получения, высокому *Z*-числу, особым поверхностным свойствам и высокой биосовместимости [2–6].

О возрастающем интересе к исследованиям возможностей применения НЧЗ в онкологии свидетельствует экспоненциальный рост числа публикаций в этой области. Так, первая статья на эту тему появилась в 1999 г., в период 2000–2009 гг. было опубликовано уже 525 статей, а в период 2010–2019 гг. – 6565 статей [7].

Сокращения: НЧЗ – наночастицы золота, в/в – внутривенный, РМЖ – рак молочной железы, КРР – колоректальный рак, РПЖ – рак предстательной железы, ПКРГШ – плоскоклеточный рак головы-шеи, EPR – эффект повышенной проницаемости и удерживания (enhancement permeability and retention), ФУД – фактор усиления дозы, АФК – активные формы кислорода, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, ПНЧЗ – пегелированные наночастицы золота.

Первым сообщением о возможности усиления с помощью НЧЗ противоопухолевого эффекта облучения, вероятно, является работа [8]. Мышам с перевитым под кожу раком молочной железы EMT-6 однократно внутривенно (в/в) ввели сферические НЧЗ диаметром 1.9 нм с тиолом в качестве лиганда в дозах до 2.7 г Au/кг (концентрация в опухоли до 7 мг Au/грамм опухоли) в сочетании с рентгеновским облучением в дозе 30 Гр. В течение нескольких минут облучения концентрация золота в опухоли в восемь раз превосходила концентрацию в нормальных тканях. Годовая выживаемость мышей, получивших комбинированное лечение с дозой НЧЗ 2.7 г Au/кг, составила 86%, с дозой 1.35 г Au/кг – 50%, а мышей, получивших только облучение или только НЧЗ – 20 и 0% соответственно [8].

В последующие годы было проведено большое число исследований, связанных с оценкой возможности усиления противоопухолевого эффекта облучения НЧЗ в опытах *in vitro* и *in vivo* на разных опухолевых моделях (рак молочной железы (РМЖ), колоректальный рак (КРР), рак предстательной железы (РПЖ), плоскоклеточный рак головы-шеи (ПКРГШ), рак легкого, яичников, шейки матки, меланома, опухоли мозга, гепатокарцинома, лейкозы, лимфома). При этом были исследованы в широком диапазоне концентраций НЧЗ различного размера, соединенные с разными лигандами. Были использованы разные методы облучения, как киловольтного, так и мегавольтного диапазона (рентгеновские и гамма-установки, линейный ускоритель, протонный пучок, радиоактивные изотопы) [3, 8–17].

Перспективность применения НЧЗ в онкологии с теоретической точки зрения может быть обусловлена рядом их особых свойств:

– значительная фотоэлектрическая активность НЧЗ вследствие высокого Z-числа золота;

– хорошая биосовместимость и низкая токсичность НЧЗ вследствие того, что золото является инертным материалом:

– высокая реакционная способность НЧЗ вследствие оптимального (высокого) соотношения площади и объема наночастиц, что позволяет присоединять к ним различные молекулы;

– способность НЧЗ преимущественно накапливаться в опухолевой ткани;

– низкая проницаемость для НЧЗ капилляров различных нормальных тканей (легкие, сердце, кожа);

– возможность получать НЧЗ разного размера (1–150 нм) с уникальными химическими, электрическими и оптическими свойствами [3, 18].

Важной особенностью НЧЗ, отличающей их от наночастиц других тяжелых металлов, является их пластичность, что позволяет получать НЧЗ различного размера и разнообразной формы. В экспериментальных исследованиях используются НЧЗ различной формы – сфера, стержень, раковина, клетка [6, 7, 11, 12, 19, 20].

НЧЗ представляют собой коллоидальные или кластеризованные наночастицы диаметром от нескольких нм до сотен нм, состоящие из ядра, образованного атомами золота (десятки–сотня атомов).

НЧЗ обычно получают при восстановлении тетрахлороаурата водорода (золотохлористоводородная кислота). В результате действия различных восстанавливающих агентов ионы золота восстанавливаются до нейтральных атомов золота с образованием НЧЗ.

НЧЗ, не имеющие оболочки («голые»), после попадания в кровь быстро агрегируют с образованием более крупных частиц, связываются с разными белками плазмы и интернализуются макрофагами. Для преодоления этих процессов и с целью повышения времени циркуляции НЧЗ в крови к их поверхности обычно присоединяют стабилизирующие лиганды, препятствующие агрегации ядер, абсорбции белками плазмы, фагоцитозу макрофагами. Природа лигандов в значительной мере определяет заряд, полярность и химические свойства НЧЗ.

По сравнению с наночастицами других тяжелых металлов НЧЗ обеспечивают большую широту энергии фотонов, а также могут модифицироваться *in situ* с помощью тиолсодержащих молекул [3, 21, 22].

Немаловажное значение имеет низкая токсичность НЧЗ [13, 23, 24], а также их способность проникать и накапливаться в опухолевой ткани, благодаря эффекту повышенной проницаемости и удерживания (EPR – enhancement permeability and retention), характерному для опухолей и обусловленному дефектами сосудистой сети опухолей [25].

Широко исследуются различные аспекты медицинского применения НЧЗ – при диагностике разных заболеваний в качестве контрастирующего агента, в качестве носителей лекарственных препаратов. Наиболее перспективными для медицинского применения оказались наночастицы размерами 1–100 нм. Особые свойства НЧЗ обосновывают их применение для так называемой фототермальной терапии, т. е. терапии, связанной с выделением тепла в результате облучения НЧЗ светом определенной длины волны, в том числе с помощью лазерного облучения [4, 26].

РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА

В многочисленных экспериментальных исследованиях с культурами клеток разных опухолей *in vitro* и в опытах с трансплантируемыми опухолями мышей и ксенографтами опухолей человека *in vivo* показано, что сочетанное применение облучения с НЧЗ действительно позволяет повысить эффект лучевой терапии. По данным разных авторов эффективность такого рода воздействия колеблется от 10 до 100% (опыты *in vitro*) [3].

Рациональной основой для обоснования применения НЧЗ в лучевой терапии является способность НЧЗ к высокой абсорбции ионизирующего излучения, различие в способности поглощать энергию между золотом и мягкими тканями, что позволяет безопасно увеличивать дозу ионизирующего излучения при лучевой терапии опухолей вследствие увеличения поглощения энергии на единицу массы опухоли по сравнению с нормальной тканью и определенной селективности аккумуляции НЧЗ в опухоли [4, 11, 12],

Для оценки радиосенсибилизирующей эффективности НЧЗ рассчитываются 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): $ФУД = D_2/D_1$ [27].

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Физические механизмы радиосенсибилизации клеток НЧЗ, как и другими наночастицами тяжелых металлов, остаются до конца невыясненными. Выдвигались разные гипотезы для объяснения этого феномена, в том числе такие, как:

– усиление поглощения ионизирующего излучения;

– образование фотоэлектронов;

– эффект Оже, при котором происходит вылет электронов ядерной оболочки под влиянием рентгеновского или гамма-излучения;

– эффект Комптона, предполагающий рассеивание фотонов рентгеновского или гамма-излучения на свободных электронах с передачей энергии фотонов электронам и образованием вторичных низкоэнергетических электронов [3, 11, 12, 28, 29].

Считается, что критическая роль в способности НЧЗ повышать дозу поглощенного облучения принадлежит низкоэнергетическим вторичным электронам. В модельных экспериментах с ДНК показано, что такие электроны, генерируемые из НЧЗ, ведут к локальному накоплению энергии вокруг НЧЗ и усиливают повреждения ДНК [11, 30–32].

Количество низкоэнергетических электронов, образующихся при облучении в клетках, содержащих НЧЗ, зависит от параметров и глубины облучения. Показано, что при облучении клеток HeLa, культивируемых с НЧЗ диаметром 50 нм, степень радиосенсибилизации клеток, определяемая по количеству двухнитевых разрывов ДНК, коррелировала с условиями и глубиной облучения клеток [21]. Установлено также, что количество образующихся вторичных электронов зависит и от размеров лигандов, соединенных с НЧЗ, причем чем короче лиганды, тем значительнее радиосенсибилизирующий эффект НЧЗ [31].

Коэффициент абсорбции энергии фотонов при киловольтном рентгеновском облучении у золота в 100–150 раз больше, чем у мягких тканей [3, 12]. Специальными расчетами показано, что при насыщении опухоли золотом в достаточном количестве полученная локальная доза рентгеновского киловольтного облучения может быть по крайней мере удвоена. В то же время расчеты показывают, что при мегавольтном облучении, которое обычно применяется в клинике при лучевой терапии опухолей, эффекта радиосенсибилизации за счет разности в абсорбции энергии фотонов золота в опухоли и в мягких тканях быть не должно [32].

В модельном эксперименте с использованием полимерного гелиевого дозиметра (MAGAT) было показано, что увеличение полученной дозы гораздо больше при использовании киловольтного облучения (источник Иридиум-192) в присутствии НЧЗ по сравнению с мегавольтным облучением (источник Кобальт-60) с теми же НЧЗ – 15 и 5% соответственно [33].

Тем не менее в многочисленных экспериментальных исследованиях показано, что эффекты радиосенсибилизации регистрируются и при мегавольтном облучении. Установлено, что наблюдаемые эффекты радиосенсибилизации часто достоверно превосходят ожидаемые теоретически, на основании чего считается, что эти эффекты являются результатом сложного комплекса физических, химических и биологических взаимодействий НЧЗ с ионизирующим излучением. Показано, что НЧЗ способны сенсибилизировать опухолевые клетки к облучению клинически значимыми энергиями [34].

Предполагается, что в механизмах реализации радиосенсибилизирующего действия НЧЗ играют роль не только физические свойства НЧЗ, но и индуцируемые ими биологические эффекты [12, 28, 30].

ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Эффект радиосенсибилизации клеток под влиянием НЧЗ связывают, согласно одной из гипотез, с возможной химической сенсибилизацией ДНК к радиации в результате активации открытых участков хроматина при взаимодействии с НЧЗ, что повышает чувствительность ДНК к радиационному поражению. Однако этот предполагаемый механизм считается маловероятным, поскольку для того, чтобы обеспечить взаимодействие НЧЗ с ДНК, необходима локализация НЧЗ в ядре, а в большинстве исследований сообщается о локализации НЧЗ в основном в цитозоле клетки.

Другой и, как полагают, главный химический механизм реализации радиосенсибилизирующего действия НЧЗ связывают со способностью электронно-активной поверхности НЧЗ катализировать различные химические реакции, в первую очередь, в результате переноса электронов на O_2, что ведет к генерации активных форм кислорода (АФК). Этот эффект НЧЗ усиливается при сочетании с облучением [3].

Усиление оксидативного стресса в присутствии НЧЗ может быть связано с вызываемым НЧЗ нарушением внутриклеточного баланса тиолов, что вызывает разбалансировку восстановительного потенциала в клетке, способствующую развитию оксидативного стресса. Возможность такого механизма следует из экспериментов, в которых показано, что облучение опухолевых клеток в присутствии НЧЗ диаметром 1.9 нм ведет к взаимодействию НЧЗ с протеиновой дисульфидизомеразой, катализирующей реакции образования, распада и изомеризации дисульфидных связей в молекулах белков [35].

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Биологические механизмы радиосенсибилизирующего эффекта НЧЗ связывают в основном с такими факторами, как их влияние на оксидантный статус клеток, клеточный цикл и на способность клеток к репарации повреждений. Важная роль отводится при этом природе используемого в НЧЗ лиганда, размеру и заряду НЧЗ. Следует отметить, что эффекты радиосенсибилизации для экспериментов, проведенных в условиях *in vitro* и *in vivo*, различаются и во многом зависят от типа облученных клеток.

Оксидативный стресс. Предполагается, что эффект радиосенсибилизации клеток НЧЗ обусловлен усилением интенсивности окидативного стресса, индуцированного облучением [36].

Усиленная генерация АФК и индукция оксидативного стресса приводят к повреждениям ДНК, митохондрий, белков и липидов, подавлению способности ДНК к репарации, блокированию клеточного цикла, что в конечном итоге ведет к апоптозу или аутофагии клеток [3, 9, 11, 14, 24].

Радиосенсибилизирующее действие НЧЗ может быть связано с ингибированием фермента тиоредоксинредуктазы 1, ведущим к снижению антиоксидантной защиты клетки. Этот эффект зарегистрирован на клетках рака легкого линии A549, которые инкубировали с НЧЗ диаметром 10 нм в течение 6–24 ч до киловольтного рентгеновского и протонного облучения [37].

На облученных клетках глиомы U937 показано, что НЧЗ диаметром 2 нм достоверно снижают внутриклеточное содержание глютатиона, тогда как применение НЧЗ диаметром 40 и 100 нм не влияло на уровень глютатиона. Этот эффект объясняют тем, что реакция связывания НЧЗ с тиоловыми группами глютатиона максимальна при содержании в НЧЗ ~ 100 атомов золота, которое и имеется в НЧЗ диаметром 2 нм. Следует однако отметить, что, тем не менее, возрастания уровня АФК и связанных с окислительным стрессом повреждений в клетках при самостоятельном применении НЧЗ без облучения в этом исследовании не наблюдали [36].

Клеточный цикл. Повышение чувствительности опухоли к облучению с помощью НЧЗ может быть обусловлено способностью НЧЗ блокировать клеточный цикл с накоплением клеток в фазах, наиболее чувствительных к облучению, и подавлять репарацию повреждений ДНК, индуцированных облучением. Наиболее радиорезистентны клетки в поздней S-фазе, наиболее радиочувствительны – в G_2/M-фазах.

Зависимость радиосенсибилизирующего эффекта НЧЗ от фазы клеточного цикла была показана в опытах с синхронизированной (с помощью метода двойного тимидинового блока) и несинхронизированной культурой клеток РМЖ (MDA-MB-231). Сочетание мегавольтного облучения в дозе 2 Гр на линейном ускорителе с НЧЗ, соединенными с интегринсвязывающим пептидом, увеличило гибель клеток в синхронизированной культуре на 61% по сравнению с несинхронизированной культурой при использовании НЧЗ диаметром 17 нм и на 31% – при применении НЧЗ диаметром 46 нм. Отмечено, что в клетках синхронизированной культуры накопление НЧЗ было в полтора-два раза больше, чем в несинхронизированной [38].

Инкубация клеток РПЖ (DU-145) в течение 24 ч с НЧЗ диаметром 10.8 нм, покрытыми глюко-

зой, привела к ускорению прохождения клетками фазы G_0/G_1 и к аккумуляции клеток в фазе G_2/M. Одновременно зарегистрированы активация циклинов B1 и E и ингибирование белка p53 и циклина A. При облучении этих клеток дозой 2 Гр после 24-часового ингкубирования с НЧЗ ФУД составил 1.5–2.0 [14].

Аналогичные изменения клеточного цикла под влиянием НЧЗ, покрытых тиоглюкозой, приводящие к увеличению радиочувствительности, отмечены в клетках рака яичников (SKOV-3), РМЖ (MDA-MB-231), рака легкого (A549) и меланомы [9, 11, 39].

Усиление эффекта при сочетании радиации с применением НЧЗ может быть обусловлено и собственной цитостатической активностью НЧЗ, которая также ведет к индукции оксидативного стресса, повреждению ДНК, митохондрий, белков, липидов. Иными словами, отчасти усиление эффекта может носить аддитивный характер [3, 9, 11, 14, 24].

Гибель клеток при лучевой терапии с использованием НЧЗ может происходить в результате некроза, апоптоза или аутофагии в зависимости от типа клеток, характера и условий облучения, типа НЧЗ [40, 41].

Репарация повреждений. Известно, что одним из механизмов радиорезистентности опухолевых клеток является эффективная репарация повреждений ДНК, индуцируемых ионизирующей радиацией, поэтому подавление репарации ДНК рассматривается как один из путей повышения эффективности лучевой терапии.

Полученные в разных исследованиях данные о влиянии НЧЗ на репарацию радиационно-индуцируемых повреждений ДНК весьма противоречивы, что, вероятно, определяется различиями в использованных НЧЗ как по размерам и форме, так и по лигандам, а также по типу изученных клеток, источников и мощности облучения [11].

При инкубации клеток HeLa с НЧЗ диаметром 50 нм, покрытых цитратом, обнаружено, что через 4 и 24 ч после облучения в клетках регистрируется умеренное повышение уровня радиационно-индуцированных двухнитевых разрывов ДНК (определяли по содержанию в ядрах количества фокусов γ-H2AX и 53BP1 – маркеров двухнитевых разрывов ДНК) по сравнению с клетками, облученными без НЧЗ, что расценено как указание на подавление пострадиоционной репарации двухнитевых разрывов ДНК [34]. При облучении клеток РМЖ, инкубированных с НЧЗ диаметром 2.7 нм, покрытых тиопронином, также обнаружено увеличение уровня двухнитевых разрывов ДНК через 24 ч после облучения, хотя через 30 мин после облучения этот феномен не регистрировался. Высказано предположение, что НЧЗ не влияют на повреждения ДНК, возникающие сразу после облучения [42].

Однако на клетках глиобластомы U-87 было показано, что применение НЧЗ диаметром 18 нм, покрытых сывороточным альбумином, приводит к повышению количества двухнитевых разрывов ДНК уже через 0.5 и 2 ч после облучения по сравнению с клетками, получившими только облучение, Следует отметить, что инкубация клеток глиобластомы в течение 4–24 ч с этими НЧЗ без облучения не сопровождается изменением числа двухнитевых разрывов ДНК [43].

Увеличение числа двухнитевых разрывов ДНК обнаружено также в клетках гепатоцеллюлярного рака Hep2, облученных в присутствии НЧЗ [12].

В ряде исследований не обнаружено влияния НЧЗ на пострадиационную репарацию повреждений ДНК. Авторы работы [44] на клетках РМЖ MDA-MB-231 показали, что применение НЧЗ диаметром 1.9 нм (AuroVist)-контраст для микро-СТ)) не приводит ни к начальному (через 1 ч после облучения), ни к резидуальному (через 24 ч) повышению числа двухнитевых разрывов ДНК по сравнению с клетками, получившими только облучение.

Показано, что конъюгация НЧЗ с радиоактивными изотопами может существенно повысить эффективность брахиотерапии опухолей (разновидность лучевой терапии, при которой источник излучения вводится непосредственно в ткань опухоли). В работе [45] была изучена эффективность интратуморального введения НЧЗ диаметром 30 нм, конъюгированных с ^{177}Lu и панитумабом (моноклональные антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)) на мышах с трансплантированным подкожно РМЖ человека линии MDA-MB-468, гиперэкспрессирующей EGFR. Через 1 ч после инъекции в опухоли обнаружена высокая абсорбированная доза радиации (30–22 Гр), при этом в некоторых областях опухоли достигающая 250–1300 Гр и в 33–760 раз превышающая концентрацию радиоактивности в разных нормальных органах. Зарегистрировано прекращение роста опухолей в течение 90 суток после введения этих НЧЗ, при этом все мыши прожили более 120 суток. Введение ^{177}Lu без НЧЗ практически не повлияло на рост опухолей, медиана выживаемости мышей в этой группе составила 82 суток (в контроле – 75 суток). Следует отметить, что эффективность НЧЗ, конъюгированных только с ^{177}Lu без панитумаба, достоверно не отличалась от эффективности НЧЗ, включавших панитумаб.

Как уже отмечалось, важную роль в эффекте НЧЗ играют лиганды, присоединяемые к НЧЗ. Природа лигандов в значительной мере определяет заряд, полярность, химические и биологические свойства НЧЗ, их способность проникать и накапливаться в клетках [29].

Лиганды. Наиболее часто в экспериментальных исследованиях используются пегелированные НЧЗ (ПНЧЗ), в которых для покрытия поверхности наночастиц используется хорошо изученный биосовместимый полимер полиэтиленгликоль, создающий вокруг НЧЗ гидрофильный слой. Пегелирование предохраняет НЧЗ от агрегации и поглощения макрофагами, увеличивает время их циркуляции в крови в 10–100 раз, что влияет на их биораспределение [11, 24, 30, 46].

Так, показано, что в/в введение ПНЧЗ (в форме стержней) мышам с ксенографтами меланомы линии MDA-MD-435 сопровождается длительной циркуляцией золота в крови (до 72 ч, $t_{1/2}$ ~17 ч) с относительно длительным сохранением золота в ткани опухоли (~7% от введенной дозы спустя 72 ч после исчезновения НЧЗ из крови).

Очищение организма от ПНЧЗ происходит с помощью клеток ретикулоэндотелиальной системы печени и селезенки в течение длительного времени. Так, через два месяца после однократной в/в инъекции мышам суммарное содержание золота во всех органах уменьшилось более чем на 50%, а в мышцах, сердце, легких и почках – более чем на 80%, при этом никаких признаков токсичности у мышей в течение двухмесячного периода наблюдения не отмечалось [47].

Используются и другие лиганды – цитрат, альбумины сыворотки крови человека, аполипротеин Е, цистеин, тиоглюкоза, биотин, тиотропонин и прочие [10, 12, 13, 26].

К ядру НЧЗ могут быть присоединены также различные вещества с разными функциональными свойствами (лекарственные препараты, антитела, пептиды, радионуклиды и прочие).

Хорошо известно, что обычное металлическое золото химически инертно. При образовании наноструктур нейтральное золото приобретает необычные свойства, обусловленные их маленькими размерами и при этом большой площадью поверхности, которая электронно-активна, что ведет к высокой реакционной способности, в том числе при взаимодействии с биологическими структурами [12].

На клетках рака яичников человека (SKOV-3) с помощью атомной эмиссионной спектроскопии было показано, что культивирование клеток с НЧЗ, покрытыми тиоглюкозой, повысило интрацеллюлярное содержание НЧЗ на 31% по сравнению с «голыми» НЧЗ ($p < 0.005$) [9]. На клетках РМЖ MCF-7 показано, что комбинация рентгеновского или гамма-облучения с такими НЧЗ приводит к усилению гибели клеток по сравнению с применением «голых» НЧЗ [48].

Значительное усиление радиосенсибилизирующего действия ПНЧЗ может быть достигнуто при присоединении к ним пептидов, способствующих прохождению молекул и наночастиц сквозь плазматическую мембрану клетки. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что при использовании таких НЧЗ при рентгеновском облучения опухолевых клеток ФУД может достигать 2.3 [49].

Повышение эффективности облучения опухолей может быть получено при использовании в качестве лигандов веществ, для которых в опухолях имеются специфические мишени. Усиление противоопухолевого эффекта таких комбинаций может быть связано не только с усилением радиосенсибилизирующего действия НЧЗ вследствие повышения содержания НЧЗ в опухоли, но и со специфическим противоопухолевым действием лиганда.

На культуре клеток мышиной глиомы линии ALTS1C1 показано, что сочетание ПНЧЗ диаметром 1.8 нм, конъюгированных с селективным ингибитором интегрина $\alpha_v\beta_3$ (RGDfk), гиперэкспрессия которого зарегистрирована во многих опухолях, с киловольтным и мегавольтным облучением увеличило эффективность облучения с ФУД, составившим 1.14–1.33. При введении НЧЗ, связанных с интегринсвязывающим пептидом и с ^{177}Lu, мышам с перевитой глиомой С6, экспрессирующей интегрин $\alpha_v\beta_3$, в опухоли зарегистрированы высокая доза абсорбированной радиации (63.8 ± 7.9 Гр) и достоверное замедление роста опухоли, сопровождающееся снижением кровоснабжения опухоли и снижением экспрессии гена VEGF. При использовании НЧЗ, конъюгированных только с ^{177}Lu или только с интегрин-связывающим пептидом, эти эффекты были достоверно менее выраженными [50, 51].

При сравнении радиосенсибилизирующего эффекта НЧЗ, конъюгированных с цетуксимабом (моноклональные антитела к EGFR), при протонном обучении клеток эпидермоидного рака А431 (экспрессирует EGFR) и клеток меланомы MDA-MB-453 усиление эффекта облучения обнаружили только на клетках А431 [52].

Усиление радиочувствительности опухоли при использовании НЧЗ, ковалентно конъюгированными с цетуксимабом, отмечено и в опытах *in vivo* с ксенографтами ПКРГШ (экспрессирует EGFR). Комбинированное лечение привело к более выраженному раннему и позднему апоптозу, ин-

гибированию ангиогенеза, подавлению репарации и достоверному торможению роста опухоли по сравнению с применением только облучения или цетуксимаба [53].

Культивирование клеток РМЖ (MCF-7 и MDA-MB-231) с НЧЗ, конъюгированными с AS1411 (олигонуклеотид, специфически связывающийся с нуклеолиновым рецептором, гиперэкспрессия которого наблюдается в мембране опухолевых клеток при небольшой экспрессии на нормальных клетках), привело к достоверному увеличению аккумуляции НЧЗ в опухолевых клетках по сравнению с применением «голых» НЧЗ. Применение этого конъюгата в течение 24 ч до мегавольтного облучения клеток на линейном ускорителе привело к достоверному увеличению гибели клеток (оценка клоногенным тестом) по сравнению с использованием только НЧЗ [54].

На клетках ПКРГШ показано, что комбинация киловольтного облучения в дозе 4 Гр с применением НЧЗ диаметром 60 нм, конъюгированных с ингибитором тирозинкиназы AG14787, привела к более значительному цитотоксическому эффекту по сравнению с сочетанием облучения и «голых» НЧЗ, хотя внутриклеточное содержание золота при использовании конъюгированных НЧЗ не увеличилось [55]. Вероятно, эффект усиления цитотоксичности при таком сочетании обусловлен аддитивным цитотоксическим действием облучения и ингибитора тирозинкиназы.

В работе [56] был исследован радиосенсибилизирующий эффект препарата CYT-6091 (НЧЗ диаметром 2.7 нм, конъюгированные с фактором некроза опухолей TNF-α) в опытах *in vivo* с трансплантированными мышиными опухолями (РМЖ линии 4T1 и ПКРГШ линии SCCVII). При сочетании CYN-6091 с однократным киловольтным облучением в дозе 20 Гр рост 4T1 замедлился в 2.2–2.4 раза (при применении только облучения – в 1.8 раза), при этом эффект не зависел от последовательности применения облучения и CYT-6091 (за 30 мин до облучения, одновременно с облучением и через 24 ч после облучения). При сочетании CYN-6091 с фракционированным облучением (12 Гр через день трехкратно) рост 4T1 замедлился в 5.3 раза (только облучение – в два раза), рост SCCVII – в 8.5 раза (только облучение – в 3.5 раза), при этом у двух животных опухоли регрессировали полностью и не рецидивировали. Следует отметить, что применение только CYN-6091 было неэффективным. Считают, что синергетический эффект сочетания облучения и CYN-6901 обусловлен биологическими эффектами TNF-α, в частности, влиянием на кровоснабжение опухолей и их микроокружение, при этом конъюгация с НЧЗ привела к снижению токсичности TNF-α. Об этом свидетельствовала также проведенная фаза I клинических испытаний CYN-6901.

Авторы работы [57] исследовали радиосенсибилизиующий эффект ПНЧЗ в виде стержней, конъюгированных с гозерелином (аналог лютеинизирующего рилизинг-гормона гипофиза, применяемый для лечения РПЖ). Показано, что при инкубации клеток РПЖ линии PC-3 с конъюгированными НЧЗ пиковая концентрация НЧЗ в клетках после 24-часовой инкубации была в пять раз выше по сравнению с применением НЧЗ без гозерилина, при этом конъюгированные НЧЗ определялись преимущественно в эндосомах, распределенных по цитоплазме, неконъюгированные – в околомембранных областях. При мегавольтном облучении клеток в дозе 5 Гр на линейном ускорителе после 24-часовой инкубации с конъюгированными НЧЗ при оценке выживаемости клеток клоногенным методом ФУД составил 1.36 ± 0.06, при применении неконъюгированных НЧЗ – 1.19 ± 0.04. В опытах *in vivo* с ксенографтами PC-3 сочетание облучения с в/в введением конъюгированных НЧЗ в дозе 10 мг/Au/кг привело к замедлению роста опухолей на 17 ± 1 сутки, при применении одного облучения или сочетания с неконъюгированными НЧЗ в той же дозе – на 3 ± 2 суток.

Размер и заряд наночастиц золота. НЧЗ способны повышать эффективность облучения протонным пучком, при этом важное значение имеет размер НЧЗ и степень их проникновения в клетку.

Зависимость биологического, в том числе радиосенсибилизирующего действия НЧЗ, от их размера имеет сложный нелинейный характер. Например, в опытах *in vitro* и *in vivo* зарегистрировано, что использование ПНЧЗ диаметром 12.1 и 27.3 нм приводит к большему повышению эффективности гамма-облучения по сравнению с НЧЗ диаметром 4.8 и 46.6 нм. Этот результат связывают с большей аккумуляцией НЧЗ диаметром 12.1 и 27.3 нм в опухолевых клетках [58].

Показано, что при сочетании НЧЗ диаметром 50 нм с протонным пучком ФУД составляет 1.33, а в тех случаях, когда все введенные НЧЗ были интернализованы в клетки – 1.81. При применении НЧЗ диаметром 2 нм ФУД увеличился до 3.98, что было объяснено способностью НЧЗ такого размера проникать в ядро клетки [59].

Данные разных исследований существенно различаются по оптимальным для радиосенсибилизации размерам НЧЗ.

Показано в опытах *in vitro*, что сочетание рентгеновского облучения клеток с применением НЧЗ диаметром 50 нм приводит к более значительному усилению действия облучения (ФУД

составлял 1.43) по сравнению с использованием НЧЗ диаметром 14 и 74 нм (ФУД равнялся соответственно 1,20 и 1.26). При этом было установлено, что наибольшее накопление золота в клетках происходило при использовании НЧЗ диаметром 50 нм [34, 46].

При сравнении эффективности сочетания мегавольтного облучения клеток РМЖ (MDA-MB-231) с покрытыми тиоглюкозой НЧЗ диаметром 16 и 49 нм обнаружено, что усиление гибели клеток по сравнению с применением только облучения было более значительным при комбинации с НЧЗ диаметром 49 нм. Это связывают с более заметным блоком клеточного цикла в фазе G_2/M [39]. При сочетании киловольтного облучения в дозе 15 Гр с интратуморальным введением НЧЗ диаметром 4 и 14 нм, соединенных с меркаптосукцинатом, мышам с трансплантированным РМЖ линии MDA-MB-23, зарегистрировано достоверое замедление роста опухоли, практически одинаковое при использовании НЧЗ диаметром 4 и 14 нм, более выраженное по сравнению с применением только облучения на 19–30 сутки роста опухоли. Однако достоверное увеличение выживаемости мышей по сравнению с применением только облучения обнаружено лишь при сочетании облучения с НЧЗ диаметром 14 нм [60].

О роли внутриклеточного уровня НЧЗ в усилении действия облучения свидетельствуют данные работы [61], в которой был зарегистрирован существенно больший радиосенсибилизирующий эффект от сочетания протонного облучения с НЧЗ диаметром 10 нм по сравнению с НЧЗ диаметром 5 нм на клетках карциномы A431, при этом аккумуляция в клетках НЧЗ диаметром 10 нм была более чем в два раза выше.

Однако в ряде исследований показано, что маленькие НЧЗ, способные пассивно проникать в опухолевые клетки и накапливаться там в результате эффекта EPR, обладают более высокой цитотоксичностью и большим радиосенсибилизирующим действием по сравнению с более крупными НЧЗ [36].

Наиболее часто в исследовании радиосенсибилизирующих свойств НЧЗ использовались сферические НЧЗ, так как у них относительно легко изменять размер, характер поверхности и ее химические свойства, позволяющие соединять их с различными лигандами. Считается, что маленькие сферические НЧЗ имеют преимущества перед НЧЗ другой формы с точки зрения проникновения и аккумуляции в опухолях [3, 15].

Показано [49], что сферические НЧЗ оказывают более выраженный радиосенсибилизирующий эффект по сравнению с НЧЗ другой формы. Так, при рентгеновском облучении опухолевых клеток линии Kα, культивируемых в течение 24 ч с НЧЗ разной формы, установлено, что ФУД при использовании пегелированных сферических, шиповидных и стержневидных НЧЗ составлял 1.62, 1.37 и 1.21 соответственно. С этим коррелировала интенсивность проникновения в клетки НЧЗ разной формы. Наибольшее интрацеллюлярное содержание золота зарегистрировано при применении сферических НЧЗ.

На клетках HeLa показано [22], что сферические НЧЗ диаметром 14 или 75 нм на 350–500% эффективнее интернализируются опухолевыми клетками по сравнению с НЧЗ размерами 74 × 14 нм в форме стержня. Этот феномен объясняют более тесным контактом сферических НЧЗ с мембраной клеток благодаря особенностям их поверхности.

В то же время было показано [30], что в условиях *in vivo* ПНЧЗ в форме стержня имеют более длительное время циркуляции в крови и более интенсивно кумулируются в опухоли по сравнению со сферическими НЧЗ, что объясняют менее интенсивным фагоцитозом таких НЧЗ.

Для повышения концентрации НЧЗ в опухоли может быть использовано интратуморальное введение НЧЗ. На ксенографтах KPP линии HCT116 показано, что сочетание интратуморального введения НЧЗ средним диаметром 2.77 ± 0.69нм, покрытых тиотропонином, с киловольтным рентгеновским облучением в дозе 10 Гр, подавляет рост более значительно, чем в/в введение этих НЧЗ или использование только облучения. Время достижения четырехкратного увеличения начального объема опухоли в этом исследовании составило 54, 32 и 37 дней соответственно [10].

Важную роль в радиосенсибилизирующем эффекте НЧЗ играет не только их размер, но и заряд их поверхности, который определяет электростатические взаимодействия с белками сыворотки крови (в частности, с факторами комплемента, которые распознают инородные вещества и предъявляют их макрофагам) и с клеточными мембранами, которые обычно заряжены отрицательно. В результате заряд НЧЗ определяет время их циркуляции в крови после в/в введения и вероятность интернализации [30].

На модельных системах (комплексы ДНК-НЧЗ) показано, что облучение комплексов с положительно заряженными НЧЗ диаметром 5 нм, тесно связывающимися с PO_4 группами ДНК, ФУД составил 4.5, тогда как использование НЧЗ диаметром 15 нм, заряженных отрицательно (существенно слабее связывающихся с ДНК), приводит к значительному меньшему радиосенсибилизирующему эффекту [11, 16].

Очевидно, что вопрос об оптимальном размере и форме НЧЗ для реализации радиосенсибилизирующего эффекта остается открытым.

Радиосенсибилизирующие эффекты НЧЗ зарегистрированы в опытах *in vitro* и *in vivo*, при этом в ряде исследований обнаружены различия в радиосенсибилизирующем действии НЧЗ в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Эффекты *in vitro*. Показано, что на клетках меланомы B16F10 мышей применение покрытых цитратом сферических НЧЗ диаметром 18 нм приводит к небольшому (ФУД равен 1.08) повышению эффективности облучения клеток на линейном ускорителе, однако в опытах *in vivo* при сочетании этих НЧЗ с облучением (через 24 ч после в/в введения НЧЗ) мышей с перевитой меланомой B16F10 зарегистрировано достоверное замедление роста опухолей, при этом выживаемость мышей увеличилась с 55 суток при применении только облучения до 65 суток [13].

На клетках глиобластомы U-87 показано, что применение НЧЗ диаметром 18 нм, покрытых сывороточным альбумином, в сочетании с облучением приводит к увеличению числа апоптотических клеток через 48 ч после облучения по сравнению с клетками, подвергнутыми только облучению. Усиление противоопухолевого е эффекта при сочетании этих НЧЗ с облучением показано также на ксенографтах глиобластомы U-87 [62]. Повышение эффективности рентгеновского облучения при сочетании с НЧЗ показано на клетках ПКРГШ мышей линии SCCVII [63].

При комбинации *in vitro* мегавольтного облучения на линейном ускорителе клеток меланомы B16F10 и применения сферических ПНЧЗ диаметром 50 нм ФУД составил 1.22 при концентрации НЧЗ 30 мМ [64]. При сочетании киловольтного облучения дозой 1–4 Гр клеток КРР человека (HCT116) с применением НЧЗ диаметром 2.7 нм, покрытых тиотропонином, ФУД составлял 1.48–1.69 соответственно [10].

Применение *in vitro* НЧЗ диаметром 1.9 нм (AuroVist^{TM}, Nanoprobes, США) с рентегеновским облучением (225 кВ) в дозе 2 Гр привело к увеличению эффективности облучения с ФУД, равным 1.2 ± 0.1 для клеток РМЖ MDA-MD-231 и 1.9 ± 0.3 – для клеток глиомы T98G. Однако на клетках РПЖ DU-145 радиосенсибилизирующего эффекта не наблюдали [65].

На клетках MDA-MB-231 показано, что AuroVist^{TM} сенсибилизирует клетки также к мегавольному обучению (6 МВ и 15 МВ) с ФУД, равным 1.29 и 1.16 соответственно [44].

Сочетание сферических НЧЗ диаметром 25 нм с мегавольтным облучением на линейном ускорителе (18 МВ) в дозах 4–8 Гр клеток КРР линии HT-29 привело к достоверному снижению числа выживших клеток по сравнению с применением только облучения, однако при облучении дозой 2 Гр этого эффекта не наблюдали – ФУД составил 1.1 при дозе 2 Гр и 2.25 – при дозе 8 Гр [66]. Однако на клетках глиомы T98G не отмечено усиления эффекта при увеличении дозы облучения в сочетании с НЧЗ (AuroVist^{TM}) – при дозе рентгеновского облучения 2 Гр ФУД составил 1.9, при дозе 8 Гр – 1.35 [65].

Киловольтное облучение клеток РПЖ (DU-145), инкубированных с НЧЗ, покрытыми тиоглюкозой, привело к подавлению роста клеток на 45.7%, при использовании «голых» НЧЗ – на 30.6%, только облучения – на 15.9%. Отмечено, что внутриклеточная концентрация была в три раза больше при инкубации клеток с НЧЗ, соединенными с тиоглюкозой, по сравнению с «голыми» НЧЗ [67].

Эффекты *in vivo*. Установлено, что сочетание в/в введения покрытых тропонином НЧЗ диаметром 2.7 нм с рентгеновским облучением интрацеребрально перевитой глиомы мышей линии Tu-2449 увеличивает выживаемость мышей на 50% по сравнению с получившими только облучение. ФУД в этом эксперименте составлял ~300% [43].

Сочетание гамма-облучения (Cs137) (5Гр) с внутрибрюшинным введением мышам НЧЗ с ядром, содержащим 10–12 атомов золота, соединенным с глютатионом, на ксенографтах рака шейки матки человека линии U14 привело к выраженному усилению действия облучения *in vivo* – торможение роста опухоли составило 65% против 8% при применении только облучения. Практически такие же результаты получены в аналогичном эксперименте с использованием НЧЗ с ядром, содержащим 29–43 атома золота [6, 68, 69].

Авторы работы [70] в экспериментах *in vivo* с гепатокарциномой H22 использовали покрытые альбуминами бычьей сыворотки НЧЗ диаметром 8 и 50 нм. НЧЗ вводили в/в в дозе 4 мгAu/кг за 30 мин до рентгеновского облучения в дозе 5 Гр. Зарегистрировано усиление эффективности облучения с ФУД, равным 1.93 и 2.02 соответственно. Применение НЧЗ существенно усиливало апоптоз опухолевых клеток по сравнению с использованием только облучения. Следует отметить, что как в опытах *in vitro* (клетки HeLa, HepG2, HeCat), так и *in vivo* (H22) не обнаружено цитотоксичности и противоопухолевого эффекта при применении этих НЧЗ без облучения.

Определенный интерес может представлять изучение радиосенсибилизирующих свойств у зо-

лотосодержащих комплексных соединений, включающих одно- или трехвалентные ионы золота, которые уже применяются в клинической практике, в частности при лечении ревматоидного артрита (препарат Ауранофин) и некоторых паразитарных заболеваний и широко исследуются как противоопухолевые агенты [71, 72]. Обоснованием для такого предположения могут служить данные, согласно которым ионы золота могут восстанавливаться до нейтрального золота с образованием НЧЗ [73].

Тип облученных клеток. Радиосенсибилизирующее действие НЧЗ зависит от типа облученных клеток. В работе [40] была изучена возможность радиосенсибилизации клеток лейкоза человека (линии HL-60 II и Jurkart D1.1) с помощью ПНЧЗ диаметром 5 нм. Установлено, что рентгеновское облучение в дозах 1, 3 и 5 Гр клеток Jurkart (промиелоцитарный лейкоз), культивируемых с НЧЗ, не повысило чувствительность этих клеток к облучению, тогда как эти же НЧЗ достоверно снизили радиорезистентнось клеток HL-60 (Т-клеточный лейкоз), но только при облучении в наибольшей дозе (5 Гр). Относительное увеличение радиочувствительности клеток к облучению в дозе 5 Гр для клеток Jurkart составило 1.18, для клеток HL-60 – 1.39, и это коррелировало со снижением числа выживших клеток, зарегистрированным только у клеток HL-60. Облучение дозой 5 Гр клеток HL-60, культивируемых с НЧЗ, привело также к подавлению репродуктивного потенциала выживших клеток, что следовало из значительного (статистически достоверного) снижения в культуре числа клеток в S-фазе через пять суток после облучения ($0.16 \pm 0.03\%$ среди клеток, облученных с НЧЗ, против $3.9 \pm 0.1\%$ в контроле). В клетках Jurkart этот феномен не регистрировался.

По мнению авторов работы [40], различия во влиянии НЧЗ на радиочувствительность клеток разных по гистогенезу типов лейкоза нельзя объяснить только физическими механизмами, поскольку количество НЧЗ в клетках Jukart ко времени облучения было больше, чем в клетках HT-60. Считают, что это обусловлено и различными биологическими факторами. В качестве подтверждения приводится известный факт дефектности клеток HT-60, в отличие от клеток Jurkart, по p53 и механизмам гибели, которая для клеток HT-60 состоит преимущественно в митотической гибели.

В работе [44] было показано, что при использовании в качестве радиосенсибилизатора НЧЗ диаметром 1.9 нм (AuroVist^{TM}) усиление эффективности облучения обнаружено только на клетках РМЖ MDA-MB-231: ФУД составил 1.16–1.41 в зависимости от характера облучения, тогда как на нормальных клетках (L132) и клетках РПЖ DU-145 эффект не наблюдался (ФУД – 0.97–1.08). При сочетании таких же НЧЗ и мегавольтного облучения в дозе 2 Гр клеток глиобластомы человека линии U87 ФУД составил 1.27, тогда как на клетках РМЖ MCF-7 – 1.74 [74].

Сочетание мегавольтного облучения в дозе 2 или 4 Гр после четырех-шестичасовой инкубации клеток РПЖ (LNCaP и PC-3) с НЧЗ в форме стержня размером 50 нм не привело к увеличению гибели клеток LNCaP (оценка с помощью клоногенного теста) по сравнению с применением только облучения. На клетках PC-3 зарегистрировано достоверное снижение доли выживших клеток при облучении дозой 2 Гр, тогда как сочетание НЧЗ с облучением в дозе 4 Гр не изменило эффект одного облучения. Эффект от применения НЧЗ также не наблюдали при облучении нормальных клеток ПЖ (линия PNT1A) [67].

Следует отметить, что способность НЧЗ усиливать эффект облучения зависит не только от типа опухолевых клеток, но и от концентрации вводимых НЧЗ.

Так, авторы работы [75] исследовали влияние часовой инкубации с НЧЗ диаметром 1.9 нм (в дозе 10 мкг/мл и 100 мкг/мл) на эффект киловольтного облучения в дозе 2 Гр на клетках пяти разных опухолей – РПЖ (Du-145, PC-3), РМЖ (MCF-7, MDA-MB-231), глиобластомы человека (T98G) и трех линиях нормальных клеток (AGO-1552B – нормальные фибробласты человека, ASTRO – астроциты, L-132 – альвеолярный эпителий). Значимое увеличение эффекта облучения отмечено на клетках MDA-MB-231 (ФУД составил 1.67 и 1.11 при дозах 10 и 100 мкг/мл соответственно), на клетках T98G (ФУД – 1.3 и 1.91) и на клетках AGO-1552B (ФУД – 1.16 и 1.97). Интересно отметить, что на клетках РМЖ эффект оказался более значительным при меньшей дозе НЧЗ.

Особенности физико-химических свойств НЧЗ свидетельствуют об их потенциальной биологической активности и возможной цитотоксичности.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

В большом числе экспериментальных исследований показано, что применение НЧЗ может вызывать гибель опухолевых клеток *in vitro* и торможение роста опухолей *in vivo*.

Очевидно, что цитотоксический и противоопухолевый эффект золотосодержащих соединений следует учитывать при оценке радиосенсибилизирующего действия НЧЗ и при рассмотрении механизмов этого явления.

Цитотоксичность НЧЗ связывают прежде всего с развитием *оксидативного стресса* в результате взаимодействия НЧЗ с кислородом (O_2), что приводит к генерации супероксид радикала и продукции различных АФК. В результате возникают повреждения мембран, митохондрий, ДНК, белков и гибель клетки.

Следует заметить, что разработка препаратов, индуцирующих оксидативный стресс, рассматривается в настоящее время как одна из новых стратегий лекарственного лечения злокачественных опухолей [76].

В ряде исследований показано, что характер гибели клеток (в результате апоптоза, аутофагии или некроза) под действием НЧЗ зависит от размеров, формы и особенностей поверхности НЧЗ [11, 16, 77–82].

Так, например, установлено, что НЧЗ диаметром 1.4 нм, покрытые тиоглюкозой, вызывают преимущественно некротическую гибель клеток рака яичников человека (SKOV-3), поскольку применение ингибитора каспаз (Z-VAD-fmk) не предупреждало гибель клеток. При этом отмечались повреждения митохондрий и повышение уровня АФК [82].

Цитотоксичность НЧЗ может быть связана с их влиянием на уровень *антиоксидантных ферментов*.

Известно, что к развитию оксидативного стресса может вести подавление золотом активности антиоксидантного фермента тиоредоксинредуктазы 1 [71].

Показано, что кластеры Au_{25}, стабилизированные тридекапептидами, проходят через клеточную мембрану с локализацией в цитоплазме и оказывают дозозависимый, ингибирующий активность тиоредоксинредуктазы 1 эффект в результате связывания с содержащим глютаминовую кислоту доменом тиоредоксинредуктазы 1, что ведет к повышению интрацеллюлярного уровня АФК [83].

Зарегистрировано достоверное снижение уровня глутатионредуктазы и супероксидисмутазы при повышении уровня глутатионпероксидазы и восстановленного глутатиона в разных органах (печень, легкие, почки, сердце) после трехили семисуточного внутрибрюшинного введения крысам НЧЗ диаметром 10 нм в дозе 50 мкл [79, 80].

Еще одним механизмом цитотоксичности НЧЗ может быть *блок клеточного цикла*.

С помощью специально синтезированных НЧЗ, конъюгированных со специфическими пептидами, способными селективно проникать в ядра опухолевых клеток, показано, что инкубация клеток плоскоклеточного рака полости рта человека с такими НЧЗ приводит к блокированию клеточного цикла в фазе G_1, накоплению клеток в фазе G_0/G_1 и уменьшению клеток в фазах S и G_2/M [84, 85].

Влияние НЧЗ на клеточный цикл может различаться для клеток разных опухолей. Например, показано, что культивирование клеток РПЖ (DU-145) с НЧЗ диаметром 1.9 нм, связанными с тиолом (AuroVist^{TM}), ведет к блокированию клеток в фазе G_1, тогда как на клетках РМЖ (MDA-MB-231) изменения в клеточном цикле не наблюдаются [75].

Важное значение для реализации цитотоксического эффекта НЧЗ имеет их б*иодоступность*.

Биодоступность «голых» НЧЗ снижается из-за быстрого поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы и короткого времени циркуляции в крови.

Модификация поверхности НЧЗ является важным этапом создания эффективных НЧЗ. Целью модификации является обеспечение недоступности для фагоцитов, усиление проникновения в клетку, направленность к мишени (tartgeting), контролируемое биораспределение.

Выделяют две стратегии усиления таргетинга — пассивный и активный таргетинг. Пассивный таргетинг подразумевает усиление эндоцитоза и выхода НЧЗ из сосудов опухолевого окружения, что ведет к увеличению аккумуляции НЧЗ в опухоли. Активный таргетинг состоит в соединении НЧЗ со специфическими молекулами, мишенями для которых могут быть углеводороды, антигены и рецепторы поверхностной мембраны клеток. В качестве лигандов, связанных с НЧЗ и обеспечивающих активный таргетинг НЧЗ, используются фолиевая кислота, моноклональные антитела, гормоны, различные функциональные полипетиды и олигопептиды, глюкоза [3].

Характер окружающих НЧЗ *лигандов* наряду с размером и формой частиц также определяет цитотоксичность и радиосенсибилизирующий эффект НЧЗ. Эти параметры определяют транспортировку НЧЗ в опухоль после в/в введения и попадание в опухолевые клетки. В зависимости от этих особенностей НЧЗ проникают в клетку с помощью разных механизмов — простой диффузии (для очень маленьких НЧЗ), рецептор-опосредованного эндоцитоза, макропиноцитоза (для крупных НЧЗ). Наиболее часто НЧЗ проникают в клетку с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, активность которого зависит от размера, формы и свойств поверхности НЧЗ. Эти особенности разных НЧЗ определяют также их внутриклеточную аккумуляцию и распределение

внутри опухоли. Выведение НЧЗ из клетки осуществляется преимущественно путем лизосомального экзоцитоза, при этом его активность также зависит от особенностей НЧЗ [15, 16, 22, 86].

О влиянии природы лигандов на способность НЧЗ проникать в клетку свидетельствуют следующие экспериментальные данные.

Показано с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии достоверно большее внутриклеточное накопление НЧЗ, покрытых тиоглюкозой, по сравнению с «голыми» НЧЗ (культура клеток рака молочной железы MCF-7). Обнаружено также, что НЧЗ, покрытые тиоглюкозой, проникают в клетку и распределяются в цитоплазме, тогда как НЧЗ, покрытые цистамином, в основном связываются мембраной клеток MCF-7 [48].

Культивирование клеток с НЧЗ, покрытыми тиоглюкозой, как показано с помощью метода атомной эмиссионной спектроскопии, повысило интрацеллюлярное содержание НЧЗ на 31% по сравнению с «голыми» НЧЗ (культура клеток рака яичников человека SKOV-3) [9].

Соединение НЧЗ с трансферрином увеличивает накопление НЧЗ в клетках благодаря усилению эффекта EPR [22].

На роль лигандов в реализации цитотоксического действия НЧЗ указывает отсутствие цитотоксичности НЧЗ, покрытых глютатионом, что связывают с подавлением индукции оксидативного стресса [24].

Соединение НЧЗ с различными функциональными группами (пептиды, антитела), направленными на разные опухолевые мишени, ведет к активному транспорту НЧЗ к опухоли и увеличивает их селективность и интрацеллюлярную концентрацию [12, 30]. Однако это не всегда приводит к увеличению интернализации НЧЗ. Так, показано, что конъюгирование покрытых цитратом НЧЗ диаметром 60 нм с ингибитором тирозин киназы AGF1478 не увеличивает внутриклеточное содержание золота по сравнению с применением «голых» НЧЗ (культура клеток ПКРГШ) [55].

Размер НЧЗ считается наиболее важным фактором, определяющим интрацеллюлярную концентрацию НЧЗ, а следовательно, их цитотоксичность.

Данные о влиянии размера НЧЗ на их проникновение в клетки весьма противоречивы. Большинство исследователей считает, что оптимальный диаметр НЧЗ составляет 10–50 нм, но при этом важное значение имеет также форма НЧЗ и природа присоединенных лигандов, поскольку они влияют на характер взаимодействия НЧЗ с плазматической мембраной клеток [30].

Показано, что содержание золота в клетке (эпидермального рака линии A43) после инкубирования (24 ч) с НЧЗ диаметром 10 нм (концентрация 0.05 мг/мл) составило 0.78 пг/клетку, при этом НЧЗ локализовались в цитоплазме клеток. При инкубировании клеток с НЧЗ меньшего размера, диаметром 5 нм (в такой же концентрации) содержание золота было примерно вдвое меньше – 0.30 пг/клетку, но НЧЗ определялись как в цитоплазме, так и в ядре [61].

Установлено на примере исследования многоклеточных сфероидов из опухолевых клеток, что НЧЗ диаметром 2 нм проникают в клетки в три раза интенсивнее, чем НЧЗ диаметром 4 нм [87].

Показано, что НЧЗ диаметром 27–30 нм проникают в клетку преимущественно путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, в то время как НЧЗ диаметром ~5 нм способны проникать в клетку путем прямой диффузии [26].

Обнаружено, что наибольшее накопление НЧЗ в опухоли (ксенографты меланомы линии MDA-MB-435) достигается после в/в введения НЧЗ диаметром 100 нм. НЧЗ размером 60–80 нм накапливаются в 4.3 раза меньше, НЧЗ диаметром 40 нм – в 9 раз меньше, а НЧЗ диаметром 20 нм – в 38 раз меньше. При этом установлено, что более крупные НЧЗ аккумулировались около сосудистой сети опухоли, тогда как маленькие НЧЗ быстро проникали в опухолевые клетки [22].

По данным ряда исследований оптимальным размером для проникновения НЧЗ в клетку является диаметр 25–50 нм как *in vitro*, так и *in vivo*. У НЧЗ диаметром менее 10 нм и более 100 нм потенциал проникновения в клетку снижен [12].

Важное значение для реализации эффекта НЧЗ имеет скорость их проникновения в клетку, которая также зависит от размера НЧЗ – чем меньше НЧЗ, тем быстрее она попадает в клетку. Показано, что максимальное проникновение в клетку НЧЗ диаметром 1.9 нм происходит в первые часы после контакта НЧЗ с клетками с выходом на плато через 6 ч [12, 88, 89].

Имеются данные о способности НЧЗ селективно аккумулироваться в опухолевых клетках, что связывают с эффектом EPR [12, 16]. Выраженность этого эффекта также зависит от размера НЧЗ. Для всех НЧЗ диаметром менее 100 нм аккумуляция в опухоли определяется преимущественно EPR-эффектом [3]. Показано, что НЧЗ диаметром 10–30 нм аккумулируются в опухолевых клетках быстрее и более значительно, чем НЧЗ большего размера [36]. НЧЗ диаметром менее 50 нм обладают дополнительно способностью легко проходить через клеточные мембраны, а

НЧЗ диаметром менее 20 нм могут проникать через эндотелий сосудов [3].

Степень и скорость проникновения НЧЗ в клетку зависит от *заряда их поверхности*, при этом незаряженные НЧЗ попадают в цитозоль путем медленной диффузии, тогда как заряженные НЧЗ проникают в цитозоль в результате эндоцитоза [88].

На нескольких линиях нормальных клеток (COS-1, эритроциты, E.coli) цитотоксичность обнаружена для катионных НЧЗ диаметром 2 нм, тогда как такие же НЧЗ, несущие на поверхности отрицательный заряд, оказались нетоксичными. Этот феномен связывают со способностью катионных наночастиц взаимодействовать с отрицательно заряженными клеточными мембранами, что ведет к их повреждению [26].

Важное значение для реализации цитотоксического и радиосенсибилизирующего действия НЧЗ имеет их внутриклеточное распределение. Считается, что НЧЗ, попавшие в клетку, находятся в везикулах и не способны проникать в ядро. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано, что покрытые цитратом НЧЗ диаметром 16 нм после двухчасовой инкубации с клетками HeLa находятся в эндосомах и не определяются в цитозоле и ядре [90]. В то же время обнаружено, что 25% таких же НЧЗ, но меньшего размера (5 нм), попавших в клетки HeLa, регистрируются в ядрах клеток. При использовании НЧЗ такого же диаметра, покрытых пептидами, способными проникать в ядро, внутриядерное содержание наночастиц увеличилось в два раза [26]. НЧЗ диаметром 1.4 нм обнаружены в ядрах клеток меланомы, где они с высокой эффективностью связываются с ДНК (24.5% интернализированных НЧЗ оказались связанными с ДНК) [89]. В работе [13] после 20-часовой инкубации НЧЗ диаметром 18 нм авторы обнаружили их в эндоплазматическом ретикуломе и комплексе Гольджи клеток меланомы B16F10.

Следует отметить, что цитотоксичность НЧЗ для культивируемых опухолевых клеток и для клеток сформированной многоклеточной опухоли, растущих *in vitro*, может различаться. При сравнении цитотоксичности НЧЗ диаметром 3.5 нм в отношении обычной (2D) культуры клеток гепатоцеллюлярного рака линии HepG2 и культуры сфероидов (3D) этих клеток (диаметр сфероида 5.5 нм) обнаружено, что цитотоксичность НЧЗ в два-три раза меньше в отношении сфероидов по сравнению с 2D-культурой клеток. Меньшая цитотоксичность в отношении сфероидов может быть обусловлена плохим проникновением НЧЗ внутрь сфероида, что, по мнению авторов, следует учитывать при применении НЧЗ *in vivo* [91].

Степень проникновения НЧЗ в клетки зависит от *вида клеток*. Так, содержание ПНЧЗ диаметром 5 нм составило $3.0 \cdot 10^3$ и $6.9 \cdot 10^3$ в культурах Т-клеточного лейкоза (линия HL-60) и промиелоцитарного лейкоза (линия Jurkart) соответственно. При этом ПНЧЗ определялись, как правило, в околоядерных участках клеток, но не в ядре [40].

Исследование поступления в клетку и внутриклеточного распределения НЧЗ диаметром 1.9 нм (AuroVist^{TM}) при инкубации с разными типами клеток (нормальные клетки линии L132, клетки РПЖ линии DU-145, РМЖ MDA-MB-231), показало существенные различия в аккумуляции НЧЗ в разных клетках. При этом наибольшее накопление НЧЗ отмечено в цитоплазматических лизосомах клеток MDA-MB-231 [44].

ФАРМАКОКИНЕТИКА НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

Реализация радиосенсибилизирующего и цитотоксического эффекта НЧЗ при применении *in vivo* зависит также от их *фармакокинетики*, которая определяется размерами НЧЗ и связанными с ними лигандов.

При сравнении фармакокинетики ПНЧЗ размерами 4–13 нм и 100 нм установлено, что после в/в введения маленьких НЧЗ высокая концентрация НЧЗ в крови сохранялась в течение 24 ч с исчезновением из крови через семь суток. НЧЗ диаметром 100 нм полностью исчезали из крови через 24 ч. Пик концентрации маленьких НЧЗ в печени и селезенке определялся через семь суток после введения, а в мезентериальных лимфоузлах – через один месяц, тогда как максимум концентрации в этих тканях НЧЗ диаметром 100 нм достигался через 30 мин с более короткой последующей элиминацией. Выявленные различия связывают с разной реакцией клеток ретикулоэндотелиальной системы на НЧЗ разного размера, а также с различным влиянием на метаболические ферменты печени [92].

При в/в введениии крысам НЧЗ размерами 10, 50, 100 и 250 нм и определении в тканях разных органов тотального содержания элементарного золота методом ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) обнаружена зависимость характера распределения по органам от размера НЧЗ. При введении НЧЗ диаметром 10 нм золото детектировалось практически во всех исследованных органах (кровь, легкие, печень, селезен-

ка, почки, сердце, тимус, головной мозг, репродуктивные органы) [93].

Дозозависимое накопление золота во всех органах зарегистрировано в экспериментах, в которых мышам в/в вводили НЧЗ диаметром 12.5 нм в дозах 40, 200 и 400 мкг/кг/день ежедневно в течение восьми суток. Установлено, что небольшое количество золота аккумулируется в ткани головного мозга, что свидетельствовало о способности НЧЗ такого размера проходить сквозь гематоэнцефалический барьер. Подчеркивается, что токсические явления при всех изученных режимах введения НЧЗ не отмечались, не выявлены отклонения от нормы при биохимическом исследовании крови и морфологическом исследовании органов [94].

Однако в опытах на крысах с внутрибрюшинным введением в течение трех-семи суток НЧЗ диаметром 10, 20 и 50 нм зарегистрировано токсическое действие НЧЗ на печень; наиболее токсичными оказались НЧЗ наименьшего размера, при этом выраженность эффекта зависела от длительности применения НЧЗ. При гистологическом исследовании регистрировалась дегенерация цитоплазмы и разрушение ядра гепатоцитов. На основании полученных данных высказывается предположение, что токсическое действие НЧЗ может быть обусловлено их взаимодействием с белками и ферментами ткани печени, обеспечивающими механизмы антиоксидантной защиты, что ведет к генерации АФК и индукции оксидативного стресса [95].

По данным авторов работы [46] зависимость токсического действия НЧЗ на нормальные органы от размера НЧЗ нелинейна. Была изучена токсичность сферических НЧЗ размером от 3 до 100 нм, покрытых цитратом, при внутрибрюшинном введении в дозе 8 мг/кг/неделю мышам с Balb/C. Обнаружено, что НЧЗ диаметром 3 и 5 нм, как и 50 и 100 нм, не токсичны, тогда как введение НЧЗ размерами 8–37 нм приводило к развитию токсического поражения печени, селезенки, легких и гибели мышей с медианой 21 сутки. При исследовании пораженных органов с помощью рамановской спектроскопии регистрировалось присутствие в них НЧЗ. Интересно отметить, что в этом же исследовании применение таких «летальных» НЧЗ *in vitro* с клетками HeLa оказалось нетоксичным.

Токсическое поражение печени связывают также с развитием острого воспаления и апоптотической гибелью гепатоцитов, вызванных ПНЧЗ, которые определялись в печени и селезенке до семи суток после однократного введения мышам. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии обнаружены многочисленные НЧЗ в клетках Купфера и макрофагах печени [96].

Через две недели после длительного (еженедельно в течение семи недель) в/в введения крысам НЧЗ диаметром 14 нм в виде коллоидальной суспензии в дозах 0.9, 9 и 90 мкг наиболее значительное накопление золота отмечено в ткани печени и селезенки. Дозозависимая аккумуляция золота (в мкг/г) в тканях разных органов уменьшалась в ряду печень > селезенка > легкие > > кости > целая тушка, при этом накопление золота при применении НЧЗ в дозе 0.9 мкг было незначительным во всех тканях. Однако наблюдение за животными в течение эксперимента, биохимическое исследование крови и патоморфологическое исследование органов не выявили признаков острой и подострой токсичности со стороны всех исследованных органов, включая почки [97].

Через четыре недели после четырехнедельного в/в введения крысам НЧЗ диаметром 12.8 нм в дозах 10 и 100 мкг/кг/сутки дозозависимое накопление золота регистрировалось в печени, почках, селезенке и легких, а в ткани головного мозга, яичках и крови золото не обнаруживалось [98]. Через 24 ч после однократного в/в введения сферических НЧЗ диаметром 18 нм мышам с трансплантированной подкожно меланомой B16F10 наибольшее содержание НЧЗ обнаружено в селезенке (350.5 мкг/мг ткани), печени (147 мкг/мг) и опухоли (74.2 мкг/мг), при этом уровень НЧЗ в опухоли в 6.4 раза превышал уровень в окружающих нормальных тканях [23].

НЧЗ способны проникать через гематоэнцефалический барьер и селективно накапливаться в опухоли мозгах. На мышах с перевиваемой глиомой Tu-2449 показано, что через 4 ч после в/в введения сферических НЧЗ диаметром 11.2 ± 8.6 нм в дозе 4 г Au/кг (LD_{50} для этих НЧЗ >5 г Au/кг) опухоль мозга приобрела черный цвет, тогда как окружающая нормальная ткань мозга оставалась розовой. С помощью микроскопической компьютерной томографии через полтора часа после инъекции НЧЗ обнаружено селективное негомогенное накопление золота в ткани опухоли, что связывают с эффектом EPR. С помощью атомной абсорбционной спектроскопии показано, что содержание золота в опухоли составляет 10.0 ± 0.6% введенной дозы на 1 г опухоли(1.2 ± 0.1% w/w золота); отношение содержания золота в опухоли к содержанию в нормальной ткани мозга составило 18.8 : 1 [43].

Установлена возможность всасывания НЧЗ после перорального введения, скорость которого также зависит от их размера – чем меньше НЧЗ, тем быстрее они всасываются. С помощью электронной микроскопии обнаружено, что всасывание происходит в тонком кишечнике путем персорбции через поры в сосочках, образующихся в результате деградации отдельных энтероцитов. После введения мышам коллоидальных НЧЗ размером 4 нм они обнаруживались в тканях почек, печени, селезенки, легких, головного мозга, тогда как введение наибольших из изученных НЧЗ (58 нм) они обнаруживались только внутри желудочно-кишечного тракта, т.е. не всасывались [99].

Практически не исследована фармакокинетика НЧЗ, соединенных с функционально активными лигандами, хотя такая модификация поверхности НЧЗ может значительно влиять на их фармакокинетику [26].

Следует подчеркнуть сложность однозначной интерпретации экспериментальных данных о степени проникновения и накопления НЧЗ в клетках, обусловленную значительным разнообразием изучаемых НЧЗ, типов клеток, используемых методов определения внутриклеточного содержания НЧЗ, которое колебалось в разных исследованиях от десятков до нескольких тысяч [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение отметим, что исследования возможностей применения НЧЗ в лучевой терапии опухоли интенсивно продолжаются. Однако, несмотря на большой массив экспериментальных данных, полученных за прошедшие 20 лет в опытах *in vitro* и *in vivo*, клинические исследования эффективности сочетания лучевой терапии с применением НЧЗ пока не проводились.

Очевидно, что это связано с противоречивостью результатов разных исследований, обусловленной, по-видимому, значительными различиями в изученных НЧЗ и способах их сочетания с облучением. Все это не позволяет пока сделать однозначный вывод о способности определенных НЧЗ повышать эффективность лучевой терапии, необходимый для обоснования целесообразности клинических испытаний.

Несомненно, исследования в этой области весьма перспективны, но до перехода к клиническим испытаниям требуется значительное продолжение целенаправленных экспериментальных исследований [6, 97].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. В. Канаев, Практич.медицина **9**, 1 (2008).
2. K. Bromma and D. B. Chithani, Nanomaterials (Basel) **10**, 1671 (2020).
3. Y. Chen, J. Yang, S. Fu, and J. Wu, Int. J. Nanomedicine **15**, 9407 (2020).
4. S. Siddique and C. L. Chow, Appl. Sci. **10**, 3824 (2020).
5. W. Najahi-Missaui, R. D. Arnold, and B. Cummings, Int. J. Mol. Sci. **22**, 385 (2021).
6. E. Porret, X. L. Guevel, and J. L. Coll, J. Mater. Chem. **13**, 2216 (2020).
7. C. Gerosa, G. Crisponi, V. M. Nurchi, et al., Pharmaceuticals **13**, 192 (2020).
8. J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz, Phys. Med. Biol. **49**, 309 (2004).
9. F. Geng, K. Song, J. Z. Xing, et al., Nanotechnology **22**, 501 (2011).
10. M. Shi, B. Paquette, T. Thippayamentri, et al., Int. J. Nanomedicine **11**, 5323 (2016).
11. S. Her, D. A. Jaffray, and C. Allen, Adv. Drug Delivery Rev. **109**, 84 (2017).
12. S. Rosa, C. Connolly, G. Schettino, et al., Cancer Nanothechnol. **8**, 2 (2017).
13. M. Y. Chang, Y. H. Shiau, C. J. Chang, et al., Cancer Sci. **99**, 1479 (2008).
14. W. Roia, X. Zhang, L. Guo, et al., Nanothechnology **20**, 5101 (2009).
15. S. Penninckx, A. C. Heuskin, C. Michiels, and S. Lucas, Cancer (Basel) **12**, 2021 (2020).
16. X. Bai, Y. Wang, Z. Song, et al., Int. J. Mol. Sci. **21**, 2480 (2020).
17. A. Vilchis-Juarez, G. Ferro-Flores, S. Santos-Cuevas, et al., Biomed. Nanotechnol. **10**, 393 (2014).
18. S. Shrestha, L. N. Cooper, O. A. Andreev, et al., Jacobs J. Radiat. Oncol. **3**, 026 (2016).
19. W. Cai, T. Cao, H. Hong, and J. Sun, Nanothenol. Sci. Appl. **1**, 17 (2008).
20. Y. Tang, Y. Shen, L. Huang, et al., Environ. Toxicol. Pharmacol. **39**, 871 (2015).
21. R. I. Beelbeco, H. Korideck, W. Ngwa, et al., Rad. Res. **178**, 604 (2012).
22. W. Ngwa, R. Kumar, S. Sridhar, et al., Nanomedicine (London) **9**, 1063 (2014).
23. E. Connor, J. Nwamuka, H. Gole, et al., Small **1**, 325 (2005).
24. Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, et al., Small **3**, 1941 (2007).
25. S. Jain, M. B. Bch, D. G. Hirst, and L. M. O`Sullivan, Br. J. Radiol. **85**, 101 (2012).
26. A. M. Alkilany, C. J. Murphy, J. Nanopart. Res. **12**, 2313 (2010).

27. В. Н. Морозов, Ф. В. Белоусов, В. И. Зверев и др., Биофизика **5**, 629 (2020).
28. J. Zheng, D. J. Hunting, P. Ayotte, and L. Sanche, Radiat. Res. **169**, 19 (2008).
29. C. J. Liu, C. Y. Wang, S. T. Cheng, et al., Phys. Med. Biol. **55**, 931 (2010).
30. J. Scheumann, R. Berbeco, B. D. Chithrani, et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **94**, 189 (2016).
31. F. Xiao, J. Zheng, P. Cloutier, et al., Nanothechnology **22**, 465101 (2011).
32. K. T. Buttarworth, J. McMahon, F. J. Curreli, and K. M. Prise, Nanoscale **4**, 4830 (2012).
33. S. Farahani, N. P. Alam, S. Haghgoo, et al., J. Biomed. Phys. Engl. **9**, 199 (2019).
34. D. B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, et al., Radiat. Res. **173**, 719 (2010).
35. L. E. Taggart, S. J. McMahon, K. T. Butterworth, et al., Nanotechnology **27**, 215001 (2016).
36. P. Jawaid, M. Rehman, and Q. L. Zhao, Cell Death Discow. **6**, 83 (2020).
37. S. Penninckx, A. C. Yeuskin, C. Michiels, and S. Lucas, Nanomedicine (London) **13**, 2917 (2018).
38. K. Rieck, K. Bromma, W. Sung, et al., Br. J. Radiol. **92**, 1100 (2019).
39. C. Wang, Y. Jiang, X. Li, and L. Hu, Breast Cancer **22,** 413 (2015).
40. B. P. Coughlin, P. T. Lawrence, I. Lui, et al., J. Nanopart. Res. **22**, 53 (2020).
41. N. Ma, P. Liu, N. He, et al., ACS Appl. Mater Interfaces **9**, 31526 (2017).
42. L. Cui, K. Tse, P. Zahedi, et al., Radiat. Res. **182**, 475 (2014).
43. J. F. Hainfeld, H. M. Smilovitz, M. J. O`Connor, et al., Nanomedicine **8**, 1601 (2013).
44. S. Jain, J. A. Coulter, A. R. Hounsell, et al., Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. **79**, 531 (2011).
45. S. Yook, Z. Cai, Y. Lu, et al., J. Nucl. Med. **57**, 936 (2016).
46. Y. S. Chen, Y. C. Hung, I. Lian, and G. S. Huang, Nanoscale Res. Lett. **4**, 858 (2009).
47. G. Maltzahn, J. H. Park, A. Agrawal, et al., Cancer Res. **69**, 3892 (2009).
48. T. Kong, J. Zeng, X. Wang, et al., Small **4**, 1537 (2008).
49. N. Ma, F. G. Wu, X. Zhang, et al., ACS Appl. Mater. Interfaces **9**, 13037 (2017).
50. M. Enferadi, S. Y. Fu, J. H. Heng, et al., Int. J. Radiat. Biol. **94**, 124 (2018).
51. C. Villiers, H. Freitas, R. Couderc, et al., J. Nanopart. Res. **12**, 55 (2010).
52. S. Li, S. Bouchy, S. Penninckx, et al., Nanomedicine (London) **14**, 317 (2019).
53. A. Popovtzer, A. Mizrachi, M. Moteli, et al. Nanoscale **8**, 2678 (2016).
54. S. S. Mehrnia, B. Hashemi, S. J. Mowia, et al., Radiat. Oncol. **16**, 33 (2021).
55. M. Kashin, Y. Kakei, S. Teraoka, et al., Biomed. Res. Int. **2020**, 1281645 (2020).
56. N. H. Koonce, M. C. Quick, M. E. Hardel, et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **93**, 588 (2015).
57. T. Wolfe, D. Chatteriee, J. Lee, et al., Nanomedicine **11**, 1277 (2015).
58. X. D. Zhang, D. Wu, X. Shen, et al., Biomaterials **33**, 6408 (2012).
59. V. Lin, S. McMahon, H. Paganetti, J. Schuemann, Phys. Med. Biol. **60**, 4149 (2015).
60. B. Janic, S. L. Brown, R. Nelf, et al., Cancer Biol. Ther. **22**, 124 (2021).
61. S. Li, S. Penninckx, L. Karmani, et al., Nanotechnology **27**, 455101 (2016).
62. N. Chen, W. Yang, Y. Bao, et al., RSC Adv. **5**, 40514 (2015).
63. J. F. Hainfeld, F. A. Dilmanian, Z. Zhong, et al., Phys. Med. Biol. **55**, 3045 (2010).
64. M. Mousavi, H. A. Nedali, S. Khoei, et al., Int. J. Radiol. Biol. **93**, 214 (2017).
65. L. Taggart, S. I. McMahon, F. J. Currell, et al., Cancer Nanotechnol. **5**, 5 (2014).
66. M. Zabihzadeh, M. Hoseini-Chahfarokhi, V. Bayati, et al., Nanomedicine **5**, 111 (2018).
67. X. Zhang, J. Z. Xing, J. Chen, et al., Clin. Invest. Med. **31**, 3 (2008).
68. X. D. Zhang, Z. Luo. J. C. Chen, et al., Adv. Mater. **26**, 456 (2014).
69. X. D. Zhang, Z. Luo, J. Chen, et al., Sci. Rep. **5**, 8669 (2015).
70. S. Liu, J. Piao, Y. Liu, et al., Nanomedicine (London) **13**, 1371 (2018).
71. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, Вопр. онкологии, № 6, 78 (2018).
72. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., Рос. биотерапевтич. журн. **19** (4), 74 **(**2020).
73. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и др., Изв. РАН. Сер. хим. **66** (12), 2314 (2017).
74. R. Ahmad, G. Schettino, G. Royle, et al., Part. Part. Syst. Charact. **37**, 1900411 (2020).
75. K. T. Butterworth, J. A. Coulter, S. Jain, et al., Nanotechnology **21**, 295101 (2010).
76. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, Биофизика **64**, 552 (2019).
77. J. J. Li, D. Hartono, C. Orig, et al., Biomaterials **31**, 5996 (2010).
78. Y. J. Gu, J. Cheng, C. C. Lin, et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. **237**, 196 (2009).
79. M. Musielak, A. Bos-Liedke, I. Piotrowski, et al., Int. J. Mol. Sci. **22**, 16 (2021).
80. J. C. Dellavechia, B. T. Steiuer, M. L. Freitas, et al., J. Nanoparticle Res. **22**, 133 (2020).
81. A. Chakraborty, A. Das, S. Raha, and A. Burui, J. Photochem. Photobiol. B: Biology **203**, 11778 (2020).
82. Y. Pan, A. Leifert, D. Ruan, et al., Small **5**, 20657 (2009).
83. R. Liu, Y. Wang, Q. Yuan, et al., Chem. Commun. **50**, 10687 (2014).
84. M. A. Mackey, F. Saira, M. A. Mahmond, and M. A. El-Sayed, Bioconijugate Chem. **24**, 897 (2013).
85. B. Kang, M. A. Mackey, and M. A. El-Sayed, J. Amer. Chem. Soc. **132**, 1517 (2010).
86. L. Ding, C. Yao, X. Yin, et al., Small **14**, e1801451 (2018).
87. J. Bugno, M. J. Pollemann, and K. Sokolowski, Nanomedicine **21**, 102059 (2019).
88. D. B. Chithrani, Mol. Membrane Biol. **27**, 299 (2010).
89. M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, et al., Small **1**, 841 (2005).
90. P. Navito, I. Prior, and M. Brust, ACS Nano **2**, 1639 (2008).

91. J. Lee, D. Lilly, R. C. Doty, et al., Small **5**, 1213 (2009).
92. W. S. Cho, M. Cho, J. Jeong, et al., Toxicol. Pharmacol. **245**, 116 (2010).
93. W. H. De Yong, W. I. Haggens, P. I. Krystek, et al., Biomaterials **29**, 1913 (2008).
94. C. Lasagna-Reeves, D. Gonzalez-Romero, M. A. Barria, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **3939**, 649 (2010).
95. M. A. Abdelhalini and B. M. Jarrar, J. Nanobiotechnol. **10**, 5 (2012).
96. W. S. Cho, M. Cho, J. Jeong, et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. **236**, 16 (2009).
97. C. Rambanapasi, R. Zeevaart, H. Buntting, et al., Molecules **21**, 763 (2016).
98. J. H. Lee, J. H. Sung, H. R. Ryn, et al., Arch. Toxicol. **92**, 1393 (2018).
99. J. F. Hillyer and R. M. Albrecht, J. Pharm. Sci. **90**, 1927 (2001).

Gold Nanoparticles as Potential Radiosensitizing and Cytotoxic Agents

D.B. Korman, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluhterova, V.A. Rikova, and M.M. Fomina

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

The review summarizes data from the study which have been aimed to investigate the radiosensitizing properties and cytotoxic activity of gold nanoparticles on experimental tumor models. The plausible mechanisms related to the observed effects are evaluated.

Keywords: gold nanoparticles, radiosensitization, cytotoxicity, experimental tumor models.

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 6, с. 1246–1248

ХРОНИКА

ПАМЯТИ ЛЬВА АЛЕКСАНДРОВИЧА БЛЮМЕНФЕЛЬДА. К 100-ЛЕТИЮ

DOI: 10.31857/S0006302921060211

Я прожил жизнь. Не мне судить,
Как прожил — хорошо иль плохо,
Но не смогла совсем убить
Меня во мне моя эпоха.

Л. А. Блюменфельд

Неутомимо быстро уходит время. Студенты кафедры биофизики физического факультета МГУ, созданной Львом Александровичем, воспринимают его имя исключительно как имя легенды из истории науки и истории страны. Легенды из оставшегося позади XX века. Нашим студентам примерно по 20 лет, а Лев Александрович ушел из жизни 3 сентября 2002 года. Тоже прошло уже почти 20 лет. Уже другая страна и другая эпоха, но для нас, его учеников и соратников по Московскому университету и по Академии наук, Лев Александрович абсолютно современен и живет в нашей памяти и в наших трудах. Замечательно, что современная биофизика в фундаментальных своих направлениях развивает те самые идеи, о которых он писал в своих книгах, статьях или рассказывал на лекциях. Лев Александрович перешагнул время. Счастливая судьба человека и ученого – прекрасного человека и выдающегося ученого.

О Льве Александровиче Блюменфельде написано много содержательных статей, остались добрые воспоминания. В частности, в известной книге его друга и соратника С.Э. Шноля «Герои, злодеи, конформисты российской науки». Тем не менее, учитывая новый контингент читателей «Биофизики», пришло время еще раз вспомнить и рассказать о жизни и делах Льва Александровича.

Лев Александрович Блюменфельд родился 23 ноября 1921 года в Москве. В 1939 году он поступил на химический факультет МГУ. Осенью 1941 года студент 3-го курса Л.А. Блюменфельд добровольно отправился на фронт, где прошел путь от рядового связиста до командира взвода разведчиков полка самоходных артиллеристских установок. Его боевой путь пролег по дорогам России, Украины, Молдавии, Румынии, Венгрии, Болгарии, Австрии, Югославии. Он участвовал в боях под Москвой в декабре 1941 года – январе 1942 года, воевал под Харьковом, Полтавой и Одессой, участвовал в Ясско-Кишиневской операции, в тяжелейших боях у озера Балатон. Два раза был тяжело ранен. За боевые заслуги был награжден тремя орденами и восемью медалями. Для храброго боевого офицера Л.А. Блюменфельда война закончилась весной 1945 года во время наступления Советской армии на Австрию, когда он получил второе тяжелое ранение. День победы Л.А. Блюменфельд встретил в госпитале, в котором провел семь месяцев.

В ноябре 1945 года Л.А. Блюменфельд вернулся в Москву и продолжил учебу на химическом факультете МГУ, который экстерном окончил в 1946 г. Л.А. Блюменфельд – ученик академика Я.К. Сыркина и профессора М.Е. Дяткиной. В формировании его научного мировоззрения значительную роль сыграл академик И.Е. Тамм. Активную научную деятельность Лев Александрович начал еще в 1944 году, когда после первого ранения оказался в госпитале в румынском городе Тульче. Там он занялся квантово-химическими расчетами двухатомных молекул галогенового ряда – HF, HCl, HBr, HJ. Свою научную работу он продолжил в других госпиталях, в которых оказался после второго ранения в марте 1945 года. Результаты расчетов, выполненных Л.А. Блюменфельдом в перерывах между боями в 1944–1945 гг., легли в основу его дипломной работы, посвященной квантово-химическими расчетам двухатомных молекул галогенового ряда,

После окончания МГУ Л.А. Блюменфельд поступил в аспирантуру Физико-химического института им. Л.Я. Карпова. В 1948 г. он защитил кандидатскую диссертацию на тему «Электронные уровни и спектры поглощения углеводородов с сопряженными двойными связями». Поворотным моментом в научной судьбе Л.А. Блюменфельда, который привел его к занятиям биофизикой, был вынужденный уход из Физико-химического института. Одной из причин этого послужило смелое выступление Л.А. Блюменфельда в защиту теории резонанса в химии, объявленной в то время враждебной «идеалистической» теорией. После перехода на работу в Центральный институт усовершенствования врачей Л.А. Блюменфельд занялся изучением физико-химических свойств гемоглобина. Эти исследования он обобщил в докторской диссертации на те-

му «Структура гемоглобина и механизм обратимого присоединения кислорода», которую блестяще защитил в 1954 году в Институте химической физики АН СССР. Л.А. Блюменфельд получил ряд новых научных результатов и впервые сделал вывод о существовании конформационных перестроек молекулы гемоглобина, происходящих при присоединении кислорода. Этот вывод предвосхитил знаменитые результаты М. Перутца по исследованию структурных перестроек гемоглобина методом рентгеноструктурного анализа.

Л.А. Блюменфельд был пионером нового научного направления, связанного с изучением свободных радикалов в биологических системах методом электронного парамагнитного резонанса. Эти исследования активно проводились Л.А. Блюменфельдом более сорока пяти лет в Институте химической физики, где он с 1957 г. возглавлял лабораторию физики биополимеров, а также на кафедре биофизики физического факультета МГУ, возглавленной им после ее создания в 1959 г. Вместе со своими сотрудниками Л.А. Блюменфельд сконструировал ЭПР-спектрометр, с помощью которого ему удалось впервые зарегистрировать сигналы ЭПР некоторых биологических объектов. Пионерские работы Л.А. Блюменфельда заложили основу нового научного направления – применения метода ЭПР в биологии и медицине. Нельзя не отметить одно из самых выдающихся открытий в области клеточной биологии, сделанное в лаборатории Л.А. Блюменфельда. Речь идет об открытии А.Ф. Ваниным сигнала ЭПР, принадлежащего динитрозильным комплексам железа. В дальнейшем было показано, что молекула NO играет роль одного из важнейших регуляторов внутриклеточных и метаболических процессов. Исследования в области ЭПР-спектроскопии оставались в центре научных интересов Л.А. Блюменфельда до конца его жизни и были по достоинству оценены мировым научным сообществом: за выдающийся вклад в развитие биологических применений метода ЭПР он был удостоен в 1995 году Серебряной медали Международной ассоциации ЭПР.

Другим крупным направлением научных исследований Л.А. Блюменфельда стало изучение структурных релаксационных перестроек белков, связанных с их функционированием в качестве катализаторов биохимических реакций. В конце шестидесятых – начале семидесятых годов прошлого века Л.А. Блюменфельд выдвинул и обосновал новую концепцию ферментативного катализа и преобразования энергии в биологических системах. Согласно его гипотезе, важнейшую роль в работе ферментов играют сравнительно медленные структурные перестройки макромолекулы белка, определяемые ее (квази)механическими свойствами. Экспериментальное подтверждение основных положений этой гипотезы было получено в результате многочисленных экспериментальных исследований, выполненных в лаборатории Л.А. Блюменфельда в Институте химической физики и на кафедре биофизики физического факультета МГУ, а также в других лабораториях у нас в стране и за рубежом.

Этими работами Л.А. Блюменфельд заложил физические основы фундаментального направления сегодняшней биофизики, связанного с представлениями о молекулярных машинах. Выступая на 2-м Съезде биофизиков России в августе 1999 года с докладом «Биофизика 21-го века», Лев Александрович сказал, что одним из столбовых направлений нашей науки как раз и будет разработка физических принципов и механизмов работы молекулярных машин, объединяющее все направления молекулярной биологии. Это пророческое его высказывание реально сбывается на наших глазах. Фактически за это направление, за цикл исследований на тему «Физические механизмы преобразования энергии в биологических мембранах» Л.А. Блюменфельд был удостоен в 2001 г. Ломоносовской премии МГУ (совместно с авторами этой статьи).

Л.А. Блюменфельд является основателем крупнейшей биофизической школы. Тридцать лет он возглавлял кафедру биофизики на физическом факультете МГУ им. В. Ломоносова. В то время это была первая в мире кафедра биофизики, образованная на физическом факультете; кафедра, на которой из студентов-физиков готовили биофизиков – специалистов, имеющих фундаментальную подготовку по физике и биологии. За это время кафедру окончило более тысячи выпускников, которые успешно работают в различных областях биофизики, биохимии, молекулярной и клеточной биологии, физиологии, медицины, химической физики и других фундаментальных наук. Среди учеников Льва Александровича Блюменфельда более тридцати докторов наук, а также сотни кандидатов наук, внесших существенный вклад в современную биофизику. В течение многих лет Л.А. Блюменфельд возглавлял Научный совет по радиоспектроскопии при Академии наук. До последних дней своей жизни в качестве заместителя главного редактора он активно участвовал в работе журнала «Биофизика» и был членом редколлегий ряда других научных журналов.

Лев Александрович Блюменфельд – автор семи научных монографий, изданных в нашей стране и за рубежом, а также более 300 оригинальных научных работ. Его труды получили широкое признание во всем мире. В число основных научных сочинений Л.А. Блюменфельда входят следующие книги:

1) *Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода* (Изд-во АН СССР, М., 1957);

2) *Применение электронного парамагнитного резонанса в химии* (Изд-во СО АН СССР, Новосибирск, 1969) (совместно с В.В. Воеводским и А.Г. Семеновым);

3) *Проблемы биологической физики* (Изд-во «Наука», М., 1974);

4) *Physics of Bioenergetic Processes* (Springer-Verlag, Heidelberg, 1984);

5) *Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes. Molecular Machines of the Living Cell* (Springer-Verlag, New-York, 1994) (совместно с А.Н. Тихоновым);

6) *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики* (Изд-во УРРС, М., 2002).

Две монографии, «Применение электронного парамагнитного резонанса в химии» и «Современные проблемы биофизики», переведены на многие языки и изданы в разных странах.

Л.А. Блюменфельд был не только выдающимся ученым и педагогом. Он был также щедро одарен талантом поэта и писателя. Богатая биография Льва Александровича отчасти отражена в его романе «Две жизни». Л.А. Блюменфельд всегда писал стихи, он мог быть профессиональным поэтом, но стал ученым. Давно, еще студентом первого курса химического факультета МГУ, Лев Александрович написал замечательные стихи, которые ярко выразили его твердое убеждение в том, что «нельзя откладывать «на потом» и тратить лучшие годы на несущественные вещи»:

Не говори: настанет день,
И настоящее начнется,
И солнцем счастье улыбнется
Сквозь жизни серенькую тень.
Ты лишь сегодняшнего автор,
Забудь про годы впереди
И не надейся, и не жди
Ненаступающего завтра.
Ты станешь ждать, а все пройдет
Тоскливой вереницей буден.
Тот, кто сегодня не живет,
Тот завтра тоже жить не будет.
Иди ж дорогою своей,
Пока выдерживают ноги.
Ведь жизнь слагается из дней,
И даже не из очень многих.

Никакие трудные жизненные испытания не могли остановить исключительно насыщенную, интересную и плодотворную творческую жизнь Льва Александровича Блюменфельда. Окончательную правку своей последней монографии «Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики», Л.А. Блюменфельд сделал 3 сентября 2002 года, за несколько минут до своего ухода из жизни. С нами остались его замечательные книги, его многочисленные научные труды по-прежнему сохраняют свою актуальность, глубокие научные идеи Л.А. Блюменфельда успешно развиваются его учениками и последователями. В нас живет светлая память о нашем друге, учителе, безгранично щедром душой человеке.

В.А. Твердислов, А.Н. Тихонов