СОДЕРЖАНИЕ

_

Том 66, номер 1, 2021

=

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Автоволновой режим реакции образования динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами	
А.Ф. Ванин, Д.А. Горенберг, В.Д. Микоян	5
Плюсы и минусы кольцевых РНК в качестве губок для микроРНК	
М.А. Дук, М.Г. Самсонова	13
Взаимодействие ДНК с фенантролином и новыми фенантроцианиновыми комплексами Zn(II)	
Е.В. Акуленкова, В.Н. Демидов, А.О. Мартынова, С.В. Пастон	23
Оценка эффективности гибридизационного анализа при маркировании ДНК цианиновыми красителями красного и ближнего инфракрасного диапазона	
А.Ю. Иконникова, В.Е. Шершов, Ю.В. Мороз, В.А. Василисков, С.А. Лапа, Р.А. Мифтахов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина	31
Геномный анализ староместных сортов нута	
А.Б. Соколкова, С.В. Булынцев, П.Л. Чанг, Н. Карраскила-Гарсия, Д.Р. Кук, Э. Веттберг, М.А. Вишнякова, С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова	40
Нечеткое моделирование регуляции генов сегментации дрозофилы на языке лингвистических правил	
А.А. Макашов, Е.М. Мясникова, А.В. Спиров	49
БИОФИЗИКА КЛЕТКИ	
Разрушение цитохрома <i>c</i> , находящегося в комплексе с кардиолипином, при осуществлении катализа липопероксидазной реакции	
Л.А. Ромодин, Ю.А. Владимиров, Н.П. Лысенко	71
Температурная устойчивость электронного транспорта в мембранных препаратах фотосистемы ii без кальция в кислородвыделяющем комплексе	
Е.Р. Ловягина, Б.К. Сёмин	78
Адсорбция фибриногена на липидной поверхности как фактор регуляции фибринообразования	
Д.А. Файзуллин, Ю.А. Валиуллина, В.В. Сальников, Ю.Ф. Зуев	84
Лиганд сигма-1 рецепторов хлорпромазин подавляет депозависимый вход Ca ²⁺ в перитонеальных макрофагах	
Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И.Крутецкая	92
Теория инверсии зарядовой селективности в катион- или анион-селективных плотных контактах между эпителиальными клетками: нелокально-электростатический подход	
А.А. Рубашкин, П. Исерович, М.А. Воротынцев	99
Механизмы хеморецепции и терморецепции в ганглии Грюнеберга	
Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, А.А. Синегубов	107

Криоконсервация клеток HeLa под высоким гидростатическим давлением 1.0-1.5 кбар

С.В. Уграицкая, Н.В. Шишова, Э.Р. Валеева, С.А. Каурова,	
Н.Э. Швирст, Е.Е. Фесенко (мл.)	115
БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ	
Прогнозирование времени цветения дикого нута с учетом изменения климата	
А.Ю. Агеев, Э.Дж. Бишоп-фон Веттберг, С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова, К.Н. Козлов	126
Роль физико-химических свойств клеточных стенок корней в поглощении меди растениями вики нарбонской	
Н.Р. Мейчик, Ю.И. Николаева, О.В. Никушин, М.А. Кушунина	137
Антиоксидантная способность водных извлечений из йерба мате (Ilex paraguariensis)	
Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, Л.А. Павлова, А. Ли, А.А. Кочетова, А.Н. Осипов, Ю.А. Владимиров	147
Математическая модель стенки резистивного мозгового сосуда крысы	
Н.Х. Шадрина	157
Методы подобия и трехмерное моделирование электрической активности синоатриального узла сердца кролика и сопряженного с ним миокарда предсердия	
В.В. Галанин	168
Особенности нелинейной динамики показателей микроциркуляции верхних конечностей человека в условиях возмущающих воздействий	
Л.В. Мезенцева	176
Газообразный оксид азота и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как предполагаемые лекарственные средства, способные купировать COVID-19	
А.Ф. Ванин, А.В. Пекшев, А.Б. Вагапов, Н.А. Шарапов, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, А.А. Тимошин, В.И. Капелько	183

ХРОНИКА

VI съезд биофизиков России

Г.Ю. Ризниченко, А.А. Анашкина, Ю.Д. Нечипуренко, А.Б. Рубин 195

Contents

Vol. 66, No. 1, 2021

=

Ξ

Molecular Biophysics

Autowave Mode of the Reaction of the Formation of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands	
A.F. Vanin, D.A. Gorenberg, and V.D. Mikoyan	5
Pros and Cons of Circular RNAs as miRNA Sponges	
M.A. Duk and M.G. Samsonova	13
Evaluation of the Effectiveness of Hybridization Analysis when DNA is Labeled with Red and Near-Infrared Cyanine Dyes	
Interaction of DNA with Phenanthroline and New Phenanthrocyanine Complexes of Zn(II)	
E.V. Akulenkova, V.N. Demidov, A.O. Martynova, and S.V. Paston	23
Evaluation of the Effectiveness of Hybridization Analysis when DNA is Labeled with Red and Near-Infrared Cyanine Dyes	
A.Yu. Ikonnikova, V.E. Shershov, Yu.V. Moroz, V.A. Vasiliskov, S.A. Lapa, R.A. Miftakhov, V.E. Kuznetsova, A.V. Chudinov, and T.V. Nasedkina	31
Genomic Analysis of Historic Chickpea Landraces	
A.B. Sokolkova, S.V. Bulyntsev, P.L. Chang, N. Carrasquila-Garcia, D.R. Cook, E. von Wettberg, M.A. Vishnyakova, S.V. Nuzhdin, and M.G. Samsonova	40
Fuzzy Linguistic Modelling of Regulation of Drosophila Segmentation Genes	
A.A. Makashov, E.M. Myasnikova, and A.V. Spirov	49
Cell Biophysics	
Destruction of Cytochrome <i>c</i> in Cardiolipin Complex during Catalysis of Lipid Peroxidation	
L.A. Romodin, Yu.A. Vladimirov, and N.P. Lysenko	71
Thermal Stability of Electron Transport in the Oxygen-Evolving Complex of Ca-Depleted Photosystem II Membranes	
E.R. Lovyagina and B.K. Semin	78
Fibrinogen Adsorption on the Lipid Surface as a Factor of Regulation of Fibrin Clot Formation	
D.A. Faizullin, Yu.A. Valiullina, V.V. Salnikov, and Yu.F. Zuev	84
Sigma-1 Receptor Ligand Chlorpromazine Attenuates Store-Dependent Ca ²⁺ Entry in Peritoneal Macrophages	
L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, and N.I. Krutetskaya	92
A Theory on Reversal of Charge Selectivity in Cation- or Anion-Selective Tight Junctions between Epithelial Cells: Nonlocal Electrostatic Approach	
A.A. Rubashkin, P. Iserovich, and M.A. Vorotyntsev	99
Mechanisms of Chemoreception and Thermoreception in the Grueneberg Ganglion	
E.V. Bigdai, V.O. Samoilov, and A.A. Sinegubov'	107

Cryopreservation of HeLa Cells under High Hydrostatic Pressure of 1.0-1.5 kbar	
S.V. Ugraitskaya, N.V. Shishova, E.R. Valeeva, S.A. Kaurova,	
N.E. Shvirst, and E.E. Fesenko (Jr.)	115
Complex Systems Biophysics	
Forecasting the Timing of Floral Initiation in wild Chickpeas under Climate Change	10(
A.Yu. Ageev, E.J. Bishop-von Wettberg, S.V. Nuzhdin, M.G. Samsonova, and K.N. Kozlov	126
The Role of Physochemical Properties of the Root Cell Walls in Copper Uptake by Narbon Vetch (<i>Vicia narbonensis</i> L.)	
N.R. Meychik, Yu.I. Nikolaeva, O.V. Nikushin, and M.A. Kushunina	137
Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Yerba Mate (Ilex paraguariensis)	
Yu.O. Teselkin, I.V. Babenkova, L.A. Pavlova, A. Lee, A.A. Kochetova, A.N. Osipov, and Yu.A. Vladimirov	147
A Mathematical Model of the Wall of a Rat Cerebral Resistance Vessel	
N.Kh. Shadrina	157
Similitude Methods and Three-Dimensional Simulation of the Electrical Activity of the Rabbit Sinoatrial Node and Adjacent Atrial Myocardium	
V.V. Galanin	168
Features of Nonlinear Dynamics of Microcirculation Parameters of the Upper Limbs under Perturbation	
L.V. Mezentseva	176
Gaseous Nitrogen Oxide and Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Potential Medicines that Can Relieve COVID-19	
A.F. Vanin, A.V. Pekshev, A.B. Vagapov, N.A. Sharapov, V.L. Lakomkin, A.A. Abramov, A.A. Timoshin, and V.I. Kapelko	183

VI Congress of Biophysicists of Russia	
G.Yu. Riznichenko, A.A. Anashkina, Yu.D. Nechipurenko, and A.B. Rubin	195

УДК 577.3

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

АВТОВОЛНОВОЙ РЕЖИМ РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ

© 2021 г. А.Ф. Ванин*, **, Д.А. Горенберг*, В.Д. Микоян*

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

> *E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru* Поступила в редакцию 01.10.2020 г. После доработки 01.10.2020 г. Принята к публикации 16.10.2020 г.

При нанесении 20 мкл смеси 1 мМ Fe^{2+} и 0.5 М глутатиона на поверхность 0.5 М раствора S-нитрозоглутатиона, что приводит к образованию динитрозильных комплексов глутатиона, обнаружено краковременное (в течение 0.2 с) появление концентрических кольцевых структур, число которых существенно превосходит количество аналогичных колец, обусловленных механическими волнами, возникающими в результате погружения капли в водный раствор. Не исключено, что обнаруженные в растворе S-нитрозоглутатиона концентрические кольцевые структуры обусловлены автоволновым распределением продуктов, возникающих в ходе образования динитрозильных комплексов глутатиона.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, тиолсодержащие лиганды, S-нитрозотиолы, автоволны.

DOI: 10.31857/S0006302921010014

К настоящему времени накоплены данные, позволяющие утверждать, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами, возникающие в живых организмах как в мономерной, так и в биядерной форме (М-и Б-ДНКЖ, формула соответственно [(RS)₂Fe(NO)₂] и {(RS)₂Fe₂(NO)₄]) могут выступать в этих организмах в качестве «рабочей формы» монооксида азота (или как сейчас принято говорить - оксида азота (NO) - одного из универсальных эндогенных регуляторов разнообразных метаболических процессов [1, 2]. Поскольку генерация в клетках и тканях NO стимулирует образование в них S-нитрозотиолов [3-5], органических и неорганических нитритов и нитратов [6, 7], а также М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [1, 2, 8-12], в настоящее время уместно говорить о системе эндогенного монооксида азота, включающей в себя наряду с NO все перечисленные соединения. В итоге именно эту систему следует рассматривать в качестве одного из универсальных регуляторов биологических процессов. При этом в качестве «рабочей формы» этой системы выступают М-и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Включение в эти комплексы молекул NO обеспечивает стабилизацию этих молекул и их перенос в клетках и тканях к биологическим мишеням - гемсодержащим белкам с последующим связыванием NO с гемовыми группами этих белков. Кроме того, включение NO в М- и Б-ДНКЖ сопровождается превращением половины молекул NO в катионы нитрозония (NO^+) . Включение NO^+ в состав М- и Б-ДНКЖ предотвращает гидролиз этих катионов и обеспечивает их перенос на их биологические мишени – тиолсодержащие белки, образующие с катионами нитрозония соответствующие S-нитрозотиолы [13-18].

Представление ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в качестве «рабочей формы» системы оксида азота в живых организмах основывается на трех группах экспериментальных фактов [1, 2]. Первая группа этих фактов – установлено, что по своей биологической активности синтезированные химическим путем М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами имитируют систему эндогенного оксида азота. Речь идет о способности

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ – моноядерные и биядерные формы ДНКЖ, RS-NO – S-нитрозотиолы, GS-NO – S-нитрозоглутатион.

ДНКЖ и этой системы вызывать релаксацию кровеносных сосудов и тем самым снижение артериального давления, подавлять агрегацию тромбоцитов, ускорять заживление ран, вызывать эрекцию пениса и т.п. Вторая группа фактов – установлено, что подавляющая часть оксида азота, появляющегося в клетках и тканях, включается в М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Третья группа фактов – установлено, что эти комплексы способны инициировать S-нитрозирование тиолов. Последнее означает, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами способны выступать в качестве не только доноров нейтральных молекул NO, но и катионов нитрозония (NO⁺), реакция которых с тиолами, как уже говорилось выше, приводит к образованию S-нитрозотиолов.

Появление в составе ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами катионов нитрозония следует из предложенного нами ранее механизма образования этих комплексов в реакции газообразного NO, двухвалентного железа и тиолов, приведенного на схеме 1.



Схема 1. Предполагаемый механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции двухвалентного железа, тиолов и газообразного NO [1, 2, 10, 12, 15–17, 19].

В основе этого механизма лежит способность молекул NO как свободно-радикальных молекул включаться в реакцию диспропорционирования:

$$2NO \leftrightarrow NO^+ + NO^-$$

в ходе которой осуществляется одноэлектронное окисление-восстановление молекул NO с соответствующим их превращением в катион нитрозония и анион нитроксила (NO⁻) [2]

При концентрациях газообразного NO, соответствующих или меньших одной атмосферы, т.е. при концентрациях NO, синтезируемого в живых организмах, эта реакция практически не имеет места. Но она может реализоваться при тех же концентрациях при наличии в клетках и тканях слабосвязанных ионов Fe²⁺, входящих в пул сво-бодного железа, характеризующихся высоким сродством к молекулам NO [20] Связывание последних с ионами Fe²⁺ (попарно на один ион Fe²⁺) приводит к образованию железо-динитрозильной [(Fe(NO)₂]-группы. Включение в ее молекулярные орбитали π -орбиталей NO и d-орбиталей железа обеспечивает перенос электрона в этой группе с одной молекулы NO на другую (схема 1). Последующее протонирование появляющегося при этом аниона нитроксила (его гидролиз) приводит к его выходу в форме молекулы нитроксила (HNO) из лигандного окружения железа с последующим диспропорционированием двух молекул HNO с образованием из них закиси

азота и воды. Вместо HNO в лигандное окружение железа внедряется третья молекула NO; в результате железо в железо-динитрозильной группе из-за переноса на него электрона с молекулы NO приобретает d^7 -электронную конфигурацию с соответствующей резонансной структурой группы – $[Fe^+(NO^+)_2]$ [1, 2, 17, 19, 21].

Что касается ионов катиона в составе этой группы, их гидролиз (связывание с ними анионов гидроксила) должен делать эту группу неустойчивой. Последнее устраняется включением в лигандное окружение железа двух тиолсодержащих молекул, высокая π -донорная активность которых обеспечивает повышение электронной плотности на нитрозильных лигандах, т.е. нейтрализацию положительного заряда на этих лигандах, что и предотвращает их гидролиз [14–16, 19]. В результате в соответствии со схемой 1 образуются парамагнитные моноядерные М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, одна из резонансных структур которых описывается как [(RS⁻)₂Fe⁺(NO⁺)₂]⁺.

М-ДНКЖ существуют в растворе при избытке тиолсодержащих соединений, ионизованных по тиоловой группе. Как правило, такая ситуация реализуется при щелочных значениях рН. При нейтральных, «физиологических» значениях рН и при низком содержании такого рода тиолсодержащих соединений (а именно такая ситуация характерна для клеток и тканей) ДНКЖ представ-

лены в основном их биядерной формой. При повышении уровня тиолсодержащих соединений

Б-ДНКЖ обратимо (в соответствии со схемой 2) переходят в М-ДНКЖ.

M-ДНКЖ
$$\stackrel{- RS^{-}}{\longleftrightarrow}$$
 Б-ДНКЖ $+ RS^{-}$

Схема 2. Обратимое вхаимопревращение М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [22].

В отличие от парамагнитных М-ДНКЖ, характеризующихся сигналом ЭПР с $g_{cp} = 2.03$ (сигналом 2.03), Б-ДНКЖ диамагнитны. Основная их характеристика — спектр оптического поглощения, характеризующийся двумя интенсивными полосами на 310 и 360 нм [2, 22].

При распаде обеих форм ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, например при установлении химического равновесия между этими комплексами и составляющими их компонентами или распаде, вызванном, действием на эти комплексы сильных хелаторов железа, нитрозильные лиганды высвобождаются из комплексов в форме нейтральных молекул NO и катионов нитрозония, причем, как это показано для схемы химического равновесия для М-ДНКЖ (схема 3), в равном количестве.

$$[(RS^{-})_{2}Fe^{+}(NO^{+})_{2} \iff Fe^{2+} + NO + \frac{RS^{-} + NO^{+} + RS^{-}}{RS - NO}$$

Схема 3. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и компонентами этих комплексов [1, 2, 10, 15, 16].

При наличии в растворе тиолсодержащих соединений, сродство которых к катионам нитрозония на три-четыре порядка выше сродства последних к анионам гидроксила [23, 24], катионы нитрозония связываются с тиолами, что приводит к появлению в растворе соответствующих S-нитрозотиолов (RS-NO). При блокаде тиолов или их окислении вместо RS-NO в растворе (при нетйральных значенях pH) появляются анионы нитрита в количестве, равном количеству высвободившихся из ДНКЖ молекул NO (схема 4).

$$[(RS^{-})_{2}Fe^{+}(NO^{+})_{2}] \implies Fe^{2+} + NO + NO^{+}$$

$$RS^{-}$$

$$RS^{-}$$

$$RS^{-}$$

$$RS^{-}$$

Схема 4. Предполагаемый механизм распада М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, приводящий в присутствии или блокаде тиолов к накоплению соответственно S-нитрозотиолов или нитрита [14–16].

Отличительной чертой ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами является то, что они могут возникать не только в соответствии со схемой 1, т.е. в реакции газообразного NO, двухвалентного железа и тиолов, но и в соответствии со схемой 5 в реакции Fe^{2+} , тиолов и RS-NO.

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

7



Схема 5. Предполагаемый механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции Fe²⁺, тиолов и RS-NO [17, 25].

В этой реакции сами молекулы RS-NO, а не высвобождающиеся из них молекулы NO реагируют непосредственно с ионами железа (попарно на один ион), что и приводит сразу в результате диспропорционирования молекул RS-NO к образованию М-ДНКЖ. Наличие этого пути образования ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, наряду с возможностью их образования при участии молекул NO, делает возможным приведенный на схеме 6 «двухтактный» механизм образования этих комплексов:



Схема 6. Механизмы образования М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и высвобождения из них молекул NO и катионов NO⁺, а также соотношение между М- и Б-ДНКЖ и составляющими их компонентами [2, 26, 27].

В соответствии со схемой 6 при избытке NO или RS-NO в растворе, содержащем двухвалентное железо и тиолы, синтез ДНКЖ осуществляется либо по реакции 1, либо по реакции 2.

В ходе этих автокаталитических реакций происходит взаимопревращение соответственно NO в RS-NO или RS-NO в NO. В результате реакция 1 из-за накопления RS-NO сменяется на реакцию 2 и, наоборот, реакция 2 в результате накопления NO сменяется на реакцию 1. При поддержке в этой системе достаточно высокого уровня NO и тиолов, убывающих в результате преврашения NO в этой системе в закись азота, а тиолов – в дисульфиды, приведенная на схеме 6 система химических процессов может сохраняться в самоподдерживающемся режиме сравнительно длительное время. Что касается живых организмов, такая система может самопроизвольно возникать в клеточных компартментах, содержащих слабосвязанное (свободное) железо и тиолы, при появлении в этих компартментах оксида азота. Более того, при непрерывном воспроизводстве в клетках и тканях оксида азота и тиолов, выступающих в качестве «топливных» компонентов химической системы, приведенной на схеме 6,

эта система может поддерживаться в клетках и тканях в течение соответствующего длительного времени. Фактически сохранение этой системы обеспечивается энергией реакции происходящего в этой системе окисления тиолов монооксидом азота, приводящего к накоплению соответственно дисульфидов (RS-SR) и закиси азота (N₂O).

Приводимый на схеме 6 автокаталический «двухтактный» механизм образования М-ДНКЖ по неравновесным реакциям 1 и 2 с разными константами скоростей этих реакций [26], может, в соответствии с развивавшимися И. Пригожиным представлениями о роли автокатализа в установлении колебательного и автоволнового режима химических реакций [28], говорить о такой возможности для системы 6. Возможность функционирования этой системы в колебательном режиме была подтверждена результатами компьютерного анализа системы кинетических уравнений, описывающих схему 6, и ЭПР-измерений уровня М-ДНКЖ с цистеином, возникавших при смешивании в плоской кварцевой кювете растворов S-нитрозоцистеина и смеси «цистеин + Fe²⁺» [26]. Более того, при нанесении капли раствора (20 мкл) смеси 1 мМ FeSO₄ и 0.5 М глутатиона в

15 мМ HEPES-буфере (рН 7.5-8.0) на слой толщиной 0.3 мм 0.5 М раствора S-нитрозоглутатиона (GS-NO) в таком же HEPES-буфере при тех же нейтральных значениях рН в этой системе возникало множество концентрических колец с диаметром от 0.1 до 1 см, которые могли свидетельствовать об автоволновом распространении в растворе образующихся нем М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с глутатионом [27]. Речь идет об автоволнах (или Z-волнах), впервые обнаруженных для химических систем А. Жаботинским и А. Заикиным [29]. Вместе с тем появление такой кольцевой структуры могло быть обусловлено тривиальной причиной – образованием волн не химического, а механического происхождения в результате погружения в раствор GS-NO капли раствора смеси FeSO₄ и глутатиона, как это имеет место, например, при погружении в воду твердого предмета сферической формы. Отличие могло состоять лишь в том, что в наших опытах капля раствора соли железа и глутатиона погружалась в раствор в результате слияния (а не падения) капли с раствором GS-NO с последующим быстрым «растворением» капли в этом растворе. Поэтому в настоящей работе мы проделали те же опыты, как и в работе [27], проведя сравнение полученной кольцевой структуры в этих опытах и в опытах, в которых капля 0.5 М раствора нитрита наносилась на тонкий слой (толщиной в 0.3 мм) 0.5 М раствора GS-NO при нейтральных значениях pH. Очевидно, что система концентрических колец в растворе могла появиться только в результате механического взаимодействия погружаемой капли нитрита с окрашенным в розовый цвет раствором GS-NO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат (FeSO₄·7H₂O) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH) и нитрит нитрия — все от Sigma (США). 0.5 М раствор S-нитрозогутатиона (GS-NO) получали смешиванием 1 М растворов глутатиона при рН 1–2 и 1 М раствора нитрита в дистиллированной воде. В кислой среде нитрит превращался в азотистую кислоту, способную S-нитрозировать глутатион [30], после чего рН раствора полученного GS-NO повышали до нейтральных значений. Концентрацию GS-NO оценивали по интенсивности полосы поглощения на 334 нм с коэффициентом экстинкции 0.94 M^{-1} см⁻¹ [30].

Запуск реакции между Fe^{2+} , глутатионом и GS-NO и фотофиксирование образующейся в этой реакции кольцевой структуры. Запуск реакции между Fe^{2+} , глутатионом и GS-NO, приводящей к образованию кольцевой структуры, проводили в соответствии с условиями, указанными в

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

предыдущем параграфе (как это было предложено в работе [27]). Для фотосъемки этой структуры использовали закрепленный на штативе фотоаппарат Canon EOS 7D с объектив «Canon EF 100 f/2.8L Macro IS USM». Камера устанавливалась таким образом, чтобы съемка происходила вертикально сверху вниз. Параметры видеозаписи: ширина кадра – 1280 пикселей, высота кадра – 720 пикселей, частота кадров – 50 кадров в секунду, выдержка – 1/60 с, диафрагма – f8.0, ISO – 400, фокусировка в ручном режиме (фокус на поверхности раствора глутатиона или GS-NO). Для анализа полученных материалов видеозапись реакции разбивали на кадры при помощи специализированной программы Canon ZoomBrowser ЕХ. В качестве источника света использовали установленную сбоку и выше стола под углом приблизительно 45° обычную лампу накаливания, не дающую мерцания при съемке видео. Для эксперимента использовали чашку Петри, под которую подкладывали белый лист бумаги (в качестве фона, а также для упрощения последующей обработки фотоматериала – получения правильного баланса белого цвета).

Оптические и ЭПР-измерения. Оптические измерения проводили на спектрофотометре 2501PC (Shimadzu Europa GmbH, Германия) при комнатной температуре с использованием плоской кварцевой кюветы с длиной оптического пути 2 мм. ЭПР-измерения проводили на модифицированном радиоспектрометре Х-диапазона RadioPan (Польша) при 77 К с использованием в качестве эталонного образца раствора М-ДНКЖ с цистеином с известной концентрацией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На верхней и нижней части рис. 1 приводится фотоизображение кольцевых структур, возникавших с течением времени после нанесения капли смеси «FeSO₄ + глутатион» или нитрита на раствор GS-NO при нейтральных значениях рН. Как следует из сопоставления этих структур, основное различие между ними сводится, во-первых, к существенно большему числу колец, возникавших в растворе GS-NO после добавления к нему смеси «FeSO₄ + глутатион», и, во-вторых, к существенно более быстрому «смазыванию» кольцевой структуры в этом растворе по сравнению с кольцевой структурой, возникавшей в растворе «GS-NO + нитрит». При анализе фотоснимков выяснилось, что видоизменение возникающих кольцевых структур в первом случае завершалось к десятому-одиннадцатому кадру, то есть занимало около 0.2 с. Далее, очевидно, начинались обычные диффузионные процессы, которые вызывали «смазывание» кольцевой структуры (правый кадр в верхней части рис. 1). Через 5 с эта структура исчезала полностью (не показано).



Рис. 1. Кольцевые структуры, возникавшие через 40, 80 и 200 мс в растворе GS-NO (вверху) после нанесения на него капли соответственно раствора смеси «FeSO₄ + глутатион» (вверху) или раствора нитрита (внизу). Максимальный радиус кольцевых структур составлял 10 мм.

Кольцевая структура на нижней части рис. 1 за это время практически не изменялась.

Оптический и ЭПР-анализ жидкой фазы, включавшей в себя приведенные на верхней части рис. 1 кольцевые структуры, соответственно показал, во-первых, сохранение в этих структурах GS-NO, и во-вторых – накопление в них М-ДНКЖ с глутатионом, возникавших, очевидно, в соответствии со схемой 5 в реакции между Fe^{2+} , GS-NO и глутатионом. GS-NO обнаруживался по характерному для него спектру оптического поглощения с интенсивной полосой на 334 нм и слабой полосой на 543 нм, тогда как М-ДНКЖ по характерному для него сигналу ЭПР с $g_{cp} = 2.03$ (сигналу 2.03) и значениями тензора *g*-фактора $g_{\perp} = 2.04, g_{||} = 2.014$ (рис. 2). Судя по интенсивности этого сигнала в М-ДНКЖ включалось практически все железо, добавленное в раствор GS-NO. Что касается образования диамагнитных Б-ДНКЖ, которые можно было обнаружить только оптическим методом по полосам поглощения на 310 и 360 нм [22], последнее оказалось невозможным из-за наличия в спектре поглощения растворов интенсивной полосы поглошения GS-NO на 334 нм.

Следует отметить, что кольцевая структура, аналогичная приведенной на рис. 1 на нижней панели, обусловленная волнами механической природы, возникала и при добавлении капли чистой воды в воду. Однако из-за отсутствия окраски эта структура была слабо выраженной и с нее невозможно было снять фотокопию.

Приведенные выше результаты позволяют предположить, что при смешивании капли, содержавшей FeSO₄ + глутатион, с раствором GS-NO, приводившем к образованию М- и Б-ДНКЖ с глутатионом, могли возникать два типа волновых процессов: первый - механического происхождения, обусловленный погружением в раствор GS-NO сферической капли объемом 20 мкл капли смеси 1 мМ FeSO₄ + 0.5 М глутатиона в 15 мМ HEPES-буфера (рН 7.5-8.0), и второй обусловленный автоволновым характером процесса образования указанных выше комплексов. Наложение автоволн на волны механического происхождения могло проявляться в резком увеличении количества кольцевых структур, быстро «смазывающихся» и исчезающих, очевидно, изза броуновской (хаотической) диффузии образующихся окрашенных продуктов реакции – М- и Б-ДНКЖ, а также GS-NO.



Рис. 2. Спектр оптического поглощения GS-NO (a), препарат разбавлен в 200 раз) и сигнал ЭПР М-ДНКЖ с глутатионом (б), зарегистрированные в жидкой фазе кольцевых структур, возникавших в растворе GS-NO при нанесении на его поверхность в виде капли смеси «Fe²⁺ + глутатион».

Появление автоволновой картины в наших опытах инициировалось контактом раствора Fe²⁺ + глутатион с раствором GS-NO, приводившем к образованию М-ДНКЖ с глутатионом в показанной на схеме 6 неравновесной реакции 2. Последующее снижение уровня GS-NO в реакционной смеси, сопровождающееся накоплением в ней молекул NO, инициировало образование М-ДНКЖ по неравновесной реакции 1 и так далее с последующим затуханием этого процесса и установлением химического равновесия между М-ДНКЖ и составляющими их компонентами. Очевидно, что именно смена неравновесных реакций 1 и 2 могла определять появление автоволновых процессов в указанной на схеме 6 химической системе.

Если окажется, что химическая система, приведенная на схеме 6, способна в динамике функционировать в автоволновом режиме, то этот факт может иметь последствия фундаментального характера. Можно будет утверждать, что функционирование оксида азота и его эндогенных соединений – ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и RS-NO – обеспечивается не свободной диффузией этих соединений в их низкомолекулярной форме во внутриклеточном пространстве, а организовано в форме автоволн. Другими словами, вместо хаотического броуновского перемещения этих агентов имеет место направленный более эффективный перенос этих агентов к биологическим мишеням их действия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность д-ру К. Байбекову, принимавшему участие в работе на начальной ее стадии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00059а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. A.F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. 54, 15 (2016).
- 2. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
- B. M. Gaston, J. Carver, A. Doctor, et al., Mol. Intervent. 3, 253 (2003).
- 4. Y. Zhang and N. Hogg, Free Rad. Biol. Med. **38**, 831 (2005).
- D. Seth, D. T. Hess, A. Hausladen, et al., Mol. Cell 69, 451(2018).
- N. S. Bryan, T. Rassaf, R. E. Maloney, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 4308 (2004).
- 7. V. Titov, A. Osipov, and A. Vanin, Curr. Enz. Inhibition 15, 1 (2020).
- Р. М. Налбандян, А. Ф. Ванин и Л. А. Блюменфельд, в сб. тезисов конференции «Свободнорадикальные процессы в биологических системах» (Москва, 1964), с. 18.
- А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, Биофизика 10, 167 (1965).
- 10. A. F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. 21, 1 (2009).
- J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., Free Rad. Biol. Chem. 51, 1558 (2011).
- V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 62, 1 (2017).
- R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 29, 4 (2013).
- A. F. Vanin, Austin J. Analyt. Pharmac. Chem. 5, 1109 (2018).
- 15. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys. 77, 279 (2019).
- 16. А. Ф. Ванин, Биофизика 65, 353 (2020).
- 17. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, Nitric Oxide Biol. Chem. 1, 191 (1997).
- C. A. Bosworth, J. C. Toledo, J. W. Zmiewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 4671 (2009).
- 19. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, Biophys. J. 14, 818 (2011).
- 20. X. Xu and S. G. Chang, Chemisphere 67, 1628 (2007).

- 21. C. C. McDonald, W. D. Philips, and H. W. Mower, J. Am. Chem. Soc. 87, 3319 (1965).
- 22. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 23, 136 (2011).
- 23. D. A. Wink, R. W. Nims, J. F. Darbyshir, et al., Chem. Res. Toxicol. 7, 519 (1994).
- 24. V. G. Kharitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, J. Biol. Chem. 270, 28158 (1995).
- 25. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **35**, 110 (2013).
- 26. A. F. Vanin, A. A. Papina, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **10**, 60 (2004).
- 27. A. F. Vanin, V. D. Mikoyan, N. M. Rubtsov, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 23, 175 (2010).
- 28. I. Prigogine, *From Being to Becoming* (W.H. Freeman and Co, San Francisko, 1979).
- 29. A. N. Zaikin and A. M. Zhabotinsky, Nature 225, 535 (1970).
- 30. D. L. H. Williams, *Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).

Autowave Mode of the Reaction of the Formation of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands

A.F. Vanin*, **, D.A. Gorenberg*, and V.D. Mikoyan*

*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

Addition of 20 μ l mixture containing 1 mM Fe²⁺ + 0.5 M glutathione to the surface of 0.5 M S-nitrosoglutathione solution, that led to the formation of dinitrosyl iron complexes with glutathione, caused the transient short-lived (0.2 s) appearance of concentric ring-shaped structures in S-nitrosoglutathione solutions. The number of ring-like structures exceeds the number of concentric circles spread through the water (mechanical waves) when droplets of water fell into a body of an aqueous solution. Nevertheless, it seems likely that ringshaped structures observed in a solution of S-nitrosoglutathione are associated with autowave distribution of products generated during the formation of dinitrosyl iron complexes with glutathione.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, thiol-containing ligands, S-nitrosoglutathiols, autowaves

—— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.3

ПЛЮСЫ И МИНУСЫ КОЛЬЦЕВЫХ РНК В КАЧЕСТВЕ ГУБОК ДЛЯ микроРНК

© 2021 г. М.А. Дук*, М.Г. Самсонова**

*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26 **Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

E-mail: duk@mail.ioffe.ru Поступила в редакцию 21.08.2020 г. После доработки 21.08.2020 г. Принята к публикации 04.09.2020 г.

Роли некодирующих РНК различных типов в клетке активно изучаются в последние годы. Одним из типов некодирующих РНК являются кольцевые РНК, которые ранее рассматривались как отходы процесса сплайсинга, однако на нынешний день у многих из них были обнаружены важные регуляторные функции, в том числе и работа в качестве губки для миРНК. Нами проведено сравнение работы такой губки для миРНК с работой классической ветви регуляции с помощью транскрипционного фактора с точки зрения эффективности, времени работы и шума. Показано, что кольцевая РНК с множеством сайтов связывания для миРНК оказывается значительно эффективнее, чем транскрипционный фактор, и такой контур работает быстрее, однако это верно только в условиях неполного насыщения сайтов связывания молекулами миРНК. Кроме того, шумовые характеристики контура значительно ухудшаются с ростом количества сайтов связывания. Показано также, что кольцевая РНК с одним сайтом связывания малоэффективна в качестве губки для миРНК. Предполагается, что такой тип регуляции в клетке является скорее некоторым специфическим инструментом.

Ключевые слова: кольцевые РНК, миРНК, губки для миРНК, некодирующие РНК, шум. **DOI:** 10.31857/S0006302921010026

В последние годы некодирующие РНК привлекают все большее внимание исследователей. Помимо активно изучающихся микроРНК, или миРНК, большой интерес стали представлять кольцевые РНК, которые встречаются повсеместно [1–3] и имеют различные функции и происхождение.

Изначально обнаруживаемые в клетке кольцевые РНК принимали за продукт сплайсинга интронов, ошибочно соединившийся в кольцо и не играющий никакой значимой роли [4]. Однако вскоре стало понятно, что кольцевые РНК играют существенную роль в регуляции в клетке. У кольцевых РНК некоторых типов были обнаружены сайты связывания для миРНК [3, 5, 6], в некоторых случаях количество сайтов связывания было более 70, как для ciRS-7, связывающей miR-7 [5], а миРНК, которые связывались с этими сайтами кольцевых РНК, играют важнейшие регуляторные роли. Благодаря этому было выдвинуто предположение, что кольцевые РНК работают в качестве «губок» для миРНК (miRNA sponging), которые бы могли быстро связывать миРНК и убирать их из системы.

Обнаружение все новых типов кольцевых РНК привело к пониманию, что кольцевые РНК – это множество типов РНК с различным происхождением и функциями. Так, кольцевые РНК могут образовываться в процессе сплайсинга из вырезанных интронов, но гораздо чаще – в результате неканонического обратного сплайсинга или бэксплайсинга, происходящего во время генерации пре-мРНК или уже на готовой пре-мРНК [1, 3, 7]. Процесс бэксплайсинга идет иначе, чем канонический сплайсинг: в процессе бэксплайсинга нижестоящий донор сплайсинга присоединяется к предшествующему акцептору сплайсинга, таким образом получается обратный порядок экзонов, см. рис. 1. Предполагается, что бэксплайсинг мешает процессу линейного сплайсинга, и таким образом производство кольцевых РНК может подавлять производство линейной мРНК [1, 8, 9].

Тем не менее бэксплайсинг происходит намного реже, чем линейный сплайсинг [4, 10], и

Сокращение: ТФ – транскрипционный фактор.



Рис. 1. Схематическое представление различия линейного сплайсинга и обратного сплайсинга (бэксплайсинга). В процессе линейного сплайсинга из пре-мРНК вырезаются интроны и итоговым продуктом является зрелая мРНК. В процессе обратного сплайсинга экзоны поменяли порядок и пре-мРНК превратилась в кольцевую РНК.

количество кольцевых РНК одного типа в клетке значительно меньше, чем количество мРНК, полученных с этого же гена.

Функции кольцевых РНК тоже различны, так, кроме функционирования в качестве губок для миРНК, называется участие в развитии некоторых болезней [1, 11], участие в противовирусном иммунитете [8], а также возможность кодировать небольшие белки [8].Тем не менее большое количество обнаруженных кольцевых РНК, содержащих только один или два сайта связывания миРНК [1, 7], наводят на мысль, что функционирование кольцевых РНК в качестве губок для миРНК переоценено в литературе.

В данной работе представляется сравнение между контуром, в котором производство миРНК подавляется на транскрипционном уровне за счет репрессии белком-транскрипционным фактором, и контуром, в котором кольцевая РНК работает в качестве губки для миРНК. Показывается, что только кольцевая РНК с множественными сайтами связывания способна работать сопоставимо или эффективнее, чем транскрипционный фактор (ТФ), и только в условиях избыточности сайтов связывания.

Кроме того, были проанализированы шумовые характеристики, и показано, что хоть кольцевая РНК работает значительно быстрее, чем ТФ, внутренний шум у такого контура оказывается значительно больше.

МЕТОДЫ

Для оценки эффективности работы контура с кольцевой РНК для удаления миРНК из клетки сравнивается такая ветвь с классической ветвью регуляции, в которой ТФ репрессирует миРНК. Допустим, в системе производится пре-мРНК γ_1 , из нее после сплайсинга получается мРНК *r*, на основе этой мРНК строится белок – транскрипционный фактор *q*, который подавляет выработку миРНК m_1 в системе. Считаем, что мРНК используется несколько раз, т.е. не разрушается после производства белка на ее основе. Таким образом, в системе происходят реакции, показанные в табл. 1. Здесь скорость производства миРНК под действием транскрипционного фактора задается функцией Хилла: $k_m(q) = (k_m H^2)/(H^2 + q^2)$.

Уравнения для такой ветви регуляции будут иметь вид

$$d\gamma_{1}/dt = k_{\gamma} - g_{\gamma}\gamma_{1} - k_{r}\gamma_{1},$$

$$dr/dt = k_{r}\gamma_{1} - g_{r}r,$$

$$dq/dt = k_{q}r - g_{q}q,$$
 (1)

$$dm_{1}/dt = k_{m}H^{2}/(H^{2} + q^{2}) - g_{m}m.$$

Рассмотрим теперь ветвь регуляции, представляющую собой связывание миРНК с помощью кольцевой РНК (miRNA sponging). В данном случае вырабатывается пре-мРНК γ_2 , на основе нее в результате обратного сплайсинга образуется кольцевая РНК c_0 , которая связывает миРНК m_2 в системе. Индексы 1 и 2 здесь даны пре-мРНК и миРНК исключительно для отличия рассматриваемых контуров друг от друга, характеристики же, такие как скорость производства и распада, полагаем в двух контурах одинаковыми для возможности сравнения контуров между собой. Реакции показаны в табл. 2. Здесь n – число сайтов

Таблина	1.	Реакции	в систе	ме пр	и рег	улянии с	с помошью	транск	рипнионн	ото	фактоі	วล
паолица	••	гоакции	Denere	me np	n per	y mignin v	помощыю	ipunek	ринциони	010	quartop	Ju

	Производство	Распад
Пре-мРНК	$\varnothing \xrightarrow{k_{\gamma}} \gamma_1$	$\gamma_1 \stackrel{g_{\gamma}}{\longrightarrow} \emptyset$
мРНК	$\gamma_1 \xrightarrow{k_r} r$	$r \xrightarrow{g_r} \emptyset$
ΤΦ	$r \stackrel{k_q}{\to} r + q$	$q \stackrel{g_q}{ ightarrow} arnothing$
миРНК	$\varnothing \xrightarrow{k_m(q)} m_1$	$m_{l} \xrightarrow{g_{m}} \emptyset$

	Производство/связывание	Распад	Расщепление комплексов
Пре-мРНК	$\varnothing \xrightarrow{k_{\gamma}} \gamma_1$	$\gamma_2 \xrightarrow{g_{\gamma}} \varnothing$	
мРНК	$\varnothing \xrightarrow{k_m} m_2$	$m_2 \xrightarrow{g_m} \emptyset$	
Кольцевая РНК	$\gamma_2 \xrightarrow{k_c} c_0$	$c_0 \stackrel{g_c}{\rightarrow} \varnothing$	
Комплекс-1	$c_0 + m_2 \xrightarrow{k_{cm}} c_1$	$c_1 \stackrel{g_c}{\rightarrow} \emptyset$	$c_1 \xrightarrow{g_{cm}} c_0 + m_2$
Комплекс-2	$c_1 + m_2 \xrightarrow{k_{cm}} c_2$	$c_2 \xrightarrow{g_c} \emptyset$	$c_2 \xrightarrow{g_{cm}} c_1 + m_2$
Комплекс-и	$c_{n-1} + m_2 \xrightarrow{k_{cm}} c_n$	$c_n \xrightarrow{g_c} \emptyset$	$c_n \xrightarrow{g_{cm}} c_{n-1} + m_2$

Таблица 2. Реакции в системе при регуляции с помощью кольцевой РНК

связывания, а индекс у с отражает количество уже занятых сайтов связывания.

Уравнения для такой ветви регуляции будут иметь следующий вид:

 $d\gamma_2/dt = k_{\gamma} - g_{\gamma}\gamma_2 - k_c\gamma_2,$ $dc_0/dt = k_c\gamma_2 - g_cc_0 - k_{cm}c_0m_2 + g_{cm}c_1,$

 $dc_1/dt = k_{cm}c_0m_2 - g_cc_1 - k_{cm}c_1m_2 - g_{cm}c_1 + g_{cm}c_2,$

$$\frac{dc_2}{dt} = k_{cm}c_1m_2 - g_cc_2 - k_{cm}c_2m_2 - g_{cm}c_2 + g_{cm}c_3,$$

... (2)

$$dc_n/dt = k_{cm}c_{n-1}m_2 - g_mc_n - g_{cm}c_n,$$

$$dm_2 / dt = k_m - g_mm_2 - k_{cm}m_2\sum_{i=0}^{n-1}c_i + g_{cm}\sum_{i=1}^n c_i.$$

Вычисление коэффициентов модели производилось с учетом данных из литературы.

Средняя скорость работы полимеразы 3.79 kb/мин [12], средняя длина одного интрона в пре-мРНК 3.4 kb и их среднее количество 8 [13], таким образом, интроны занимают порядка 27.2 kb, на кодирующую часть гена у эукариот приходится порядка 1.3 kb [14], таким образом полагаем, что средняя длина пре-мРНК 28.5 kb, от-куда получаем скорость производства пре-мРНК $k_{\gamma} = 0.13 \text{ мин}^{-1}$.

Среднее время распада мРНК у бактерий 5– 10 мин [15], среднее время полураспада мРНК у млекопитающих — 50 мин (BNID:112681), вычисляя получаем скорость распада в среднем $g_r = 0.01 \text{ мин}^{-1}$.

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

Предполагаем, что скорость собственного распада пре-мРНК в п.о. такая же, как у мРНК, исходя из разницы длины мРНК и пре-мРНК, получаем скорость распада в молекулах в минуту: $g_{\gamma} = 0.0005 \text{ мин}^{-1}$.

Средняя длина белка около 500 а.а. (BNID:108984), а скорость трансляции – 5 а.а./с (BNID:104598, [16]), таким образом, вычисляем, что скорость производства белка $k_p = 0.6 \text{ мин}^{-1}$.

Скорости распада белков в клетках человека очень различны, поэтому используем не среднее, а медианное значение, приведенное в BNID: 112253 ([17]): $g_p = 0.034 \text{ y}^{-1} \approx 0.0006 \text{ мин}^{-1}$.

И микроРНК, и кольцевые РНК считаются очень стабильными [2, 10], поэтому полагаем, что их скорость распада сопоставима со скоростью распада белков. Характерную скорость производства миРНК тоже сложно оценить, так как миРНК может образовываться как из вырезанных интронов пре-мРНК, так и транскрибироваться отдельным продуктом (около 80 нуклеотидов пре-миРНК переносится в цитоплазму и обрезается до длины примерно 22 нуклеотида [18] в процессе сплайсинга). Для нашей задачи скорость производства миРНК выбираем так, чтобы количество молекул миРНК одного типа было порядка 10³, что соответствует данным по разным типам миРНК (BNID:101297–101299).

Скорость производства мРНК из пре-мРНК k_r , скорость производства кольцевой РНК k_c , а также константы связывания и развязывания комплексов молекул k_{cm} и g_{cm} также подбираем из расчета, чтобы итоговое количество молекул бел-ка ТФ, мРНК и миРНК в стационарном состоя-

	Описание	Значение	Источник
k_{γ}	Скорость производства пре-мРНК	$0.13 \; { m Muh}^{-1}$	[12], [14]
k _c	Скорость производства кольцевой РНК	$0.00483 \; { m Muh}^{-1}$	*, [10]
k _r	Скорость производства мРНК	$0.8 \; \mathrm{muh}^{-1}$	BNID:108248, 101729
k _m	Скорость производства миРНК	1 мин ⁻¹	BNID:101297-01299
k_q	Скорость производства белка-ТФ	0.6 мин ⁻¹	BNID:108984 [16]
g_{γ}	Скорость распада пре-мРНК	$0.0005 \; { m Muh}^{-1}$	[13-15]
g _c	Скорость распада кольцевой РНК	0.0006 мин ⁻¹	*
g _r	Скорость распада мРНК	$0.01 \; { m Muh}^{-1}$	[15], BNID:112681
g_m	Скорость распада миРНК	0.0006 мин ⁻¹	*
g_q	Скорость распада белка-ТФ	0.0006 мин ⁻¹	[17]
k _{cm}	Связывание комплексов кольцевая+миРНК	1 мин ⁻¹	*
g _{cm}	Развязывание комплексов кольцевая+миРНК	1 мин ⁻¹	*
Н	Коэффициент в функции Хилла	6000	*

Таблица 3. Коэффициенты, использованные в расчетах

Примечание. * – Подобранные коэффициенты.

нии по порядку соответствовало бы данным из литературы. Всего мРНК в клетке порядка 15000 и их около 20000 типов (BNID:108248), полагаем, мРНК одного типа в среднем будет порядка 10^{0} , количество молекул белка одного типа порядка $10^{3}-10^{4}$ (BNID:101729). Количество кольцевых РНК одного типа в клетке неизвестно, но бэксплайсинг, приводящий к появлению кольцевой РНК, случается значительно реже, чем прямой линейный сплайсинг [10], поэтому скорость производства кольцевой РНК должна быть значительно меньше чем скорость производства мРНК, что также учитывалось при подборе коэф-фициентов.

Коэффициент диссоциации H в функции Хилла для контура с ТФ был выбран равным половине характерного значения количества молекул белка ТФ.

Использованные коэффициенты представлены в табл. 3.

При исследовании внешнего шума рассматривалась величина $\sum_{i} |m^{\text{noise}} - m^{\text{stat}}|$, где $m^{\text{stat}} -$ количество миРНК в квазистационарном состоянии. Вектор внешнего шума строился таким образом: $z(i) = \exp(-0.1)z(i-1) + \sqrt{1 - \exp(-0.2)} \xi$, где ξ – стандартный белый шум, построенный процедурой MATLAB. Вектор *z* является дискретной моделью процесса Орнштейна–Уленбека, являющегося стационарным марковским гауссовым процессом. Компоненты полученного вектора *z* добавлялись к количеству молекул миРНК (m_1 или m_2) в каждый *i*-й момент времени, после чего численно решалась система уравнений (1) или (2) для следующего момента времени. Таким образом, был получен вектор количества миРНК в системе с внешним шумом m^{noise} . Количество молекул миРНК в начальный момент времени для m^{noise} (t = 0) = m^{stat} .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Скорость производства кольцевой РНК неизвестна, известно лишь, что обратный сплайсинг случается значительно реже, чем прямой сплайсинг. Скорость производства была выбрана таким образом, чтобы кольцевая РНК с несколькими сайтами (в нашем случае для наглядности было выбрано семь сайтов) приводила бы к тому же стационарному значению количества микроРНК, что и рассматриваемая схема с ТФ.

На рис. 2 показано сравнение количества миРНК при различных способах регуляции – сравнение свободной выработки миРНК, регуляции с помощью ТФ и регуляции с помощью кольцевой РНК с одним сайтом связывания; сравнение свободной выработки миРНК, регуляции с помощью ТФ и регуляции с помощью кольцевой РНК с семью сайтами связывания, а также количество связанных комплексов в системе регуля-



Рис. 2. (а) и (б) – Сравнение динамики количества микроРНК при свободной выработке, при регуляции с помощью ТФ и с помощью кольцевых РНК с одним и семью сайтами связывания соответственно; (в) и (г) – динамика количества кольцевой РНК и ее связанных комплексов во времени при наличии одного и семи сайтов связывания соответственно.

ции с помощью кольцевой РНК с одним или семью сайтами связывания.

Можно видеть, что одинаковая эффективность подавления миРНК в случае семи сайтов связывания достигается при примерно 200 молекулах кольцевой РНК против примерно 12000 молекул транскрипционного фактора. Таким образом, даже при очень низкой концентрации, которая была обнаружена у большинства типов кольцевых РНК [1, 2], кольцевые РНК могут работать достаточно эффективно при условии наличия множественных сайтов связывания, тогда как кольцевая РНК с одним сайтом связывания не обеспечивает достаточного уровня подавления своей мишени.

Также немаловажно, что контур с кольцевой РНК значительно быстрее приходит к стационарным значениям, тогда как в контуре с транскрипционным фактором наблюдается задержка. Из-за этой задержки на рис. 26 можно видеть максимум в количестве миРНК в контуре с транскрипционным фактором, связанный с тем, что производство необходимого для регуляции количества белка ТФ требует больше времени, чем производство РНК. Иными словами, в случае существования в системе подходящей на роль губки для миРНК кольцевой РНК, она удаляет миРНК из системы быстро и эффективно в сравнении с классической ветвью регуляции транскрипционным фактором. Однако, несмотря на скорость работы и эффективность, подобные губки для миРНК обладают некоторыми существенными минусами, о которых будет написано ниже, и которые, возможно, и являются причинами не столь широкой их распространенности.

Тем не менее при сравнении ветвей регуляции важны также и шумовые характеристики этих контуров. На рис. 3 показаны результаты стохастического моделирования контуров в квазиста-



Рис. 3. Стохастическое моделирование контуров: (а) – регуляция с помощью транскрипционного фактора; (б) – регуляция с помощью кольцевой РНК, один сайт связывания; (в) – регуляция с помощью кольцевой РНК, семь сайтов связывания. На рисунках (б) и (в) показана только концентрация свободной кольцевой РНК, концентрации связанных комплексов не показаны.

ционарном состоянии с использованием метода Гиллеспи, описанного в работе [19]. Так как при увеличении числа сайтов вероятность связывания кольцевой РНК хотя бы с одной молекулой миРНК значительно возрастает, на рис. Зв для кольцевой РНК с семью сайтами связывания практически не встречается свободная кольцевая РНК, тогда как на рис. Зб с кольцевой РНК с одним сайтом связывания свободная кольцевая РНК встречается часто. Наличие такого количества свободной кольцевой РНК в контуре с одним сайтом связывания косвенно говорит о низкой эффективности такого регулятора в качестве губки для миРНК.

С другой стороны, при наличии множества сайтов связывания, к которым миРНК может как прикрепляться, так и отсоединяться, увеличивается вариабельность в количестве свободных и присоединенных к кольцевой молекуле молекул миРНК, что означает увеличение внутреннего шума, что можно наблюдать на рис. Зв в сравнении с рис. Зб. Не очень большой уровень внутреннего шума, наблюдаемый на рис. За для контура с ТФ, можно связать с меньшей чувствительностью количества белка-ТФ к колебаниям в пре-мРНК в сравнении с чувствительностью у количества кольцевой РНК.

На рис. 4 показано относительное количество миРНК в рассматриваемых контурах. Можно видеть, что шум в контуре с кольцевой РНК с одним сайтом связывания меньше, чем в контуре с $T\Phi$, однако в контуре с кольцевой РНК с семью сайтами связывания шум гораздо больше, чем в контуре с ТФ. Таким образом, внутренний шум, связанный с прикреплением и отсоединением одной молекулы миРНК (что происходит в контуре, регулируемом кольцевой РНК с одним сайтом связывания) не достигает уровней, которые получаются из-за сложения шума от производства мРНК, а потом белка при сложном создании регулятора в контуре с транскрипционным фактором, что, в частности, можно было наблюдать, например, в работах [20, 21], где сравнивалась регуляция белка-мишени с помощью ТФ и с помощью миРНК и делался вывод о лучшей работе регулятора-РНК в сравнении с регулятором-бел-Однако ком. увеличение числа сайтов связывания значительно увеличило внутренний шум в контуре с кольцевой РНК. Учитывая тот факт, что подтвержденные в качестве губок для миРНК кольцевые РНК могут иметь до 70 сайтов связывания [5], внутренний шум при такой ветви регуляции будет очень заметным.

Также была исследована способность контуров подавлять внешний шум, который вносили в количество миРНК после прихода системы в стационарное состояние, после чего рассматривали величину $\sum |m^{noise} - m^{stat}|$, где m^{noise} – количество



Рис. 4. Сравнение относительного количества миРНК $m/(\langle m \rangle)$ в системе с ТФ и с кольцевой РНК: (a) – с одним сайтом связывания, (б) – с семью сайтами связывания.

миРНК при наличии внешнего шума, а m^{stat} – стационарное количество миРНК. Вектор внешнего шума строили так же, как и ранее в работе [21]. В данном случае контур с кольцевой РНК с семью сайтами связывания немного лучше подавлял внешний шум. Примеры результатов для одного и того же вектора внешнего шума показаны в табл. 4. Лучшее подавление внешнего шума при отсутствии внутреннего шума обеспечивается за счет того, что контур с кольцевой РНК с семью сайтами работает быстрее, чем контур с транскрипционным фактором, система быстрее приходит к стационарному состоянию после каждого единичного внесения шума, соответственно суммарный итоговый шум в количестве миРНК оказывается меньше. Тем не менее эффективность подавления внешнего шума теряется, если рассматривать систему, содержащую и внешний и внутренний шум, о котором написано выше.

Интересно также посмотреть на эффективность кольцевой РНК при различных значениях коэффициентов. На рис. 5 показаны значения стационарного количества миРНК в системе с транскрипционным фактором, а также в системе с кольцевой РНК с одним или с семью сайтами связывания.

Можно видеть, что при различных скоростях производства и распада микроРНК (k_m и g_m) и скоростях производства (k_{γ} и g_{γ}) пре-мРНК регулятора (ТФ или кольцевой РНК) контур с ТФ подавляет миРНК эффективнее, чем контур с кольцевой РНК с одним сайтом связывания. Однако для кольцевой РНК с семью сайтами связывания картина другая. РНК значительно эффективнее подавляет миРНК в условиях, когда не происходит полного насыщения молекулы кольцевой РНК молекулами миРНК, т.е. при малых скоростях производства миРНК или больших скоростях производства пре-мРНК кольцевой РНК (см. рис. 5а,б). Когда концентрация миРНК в системе оказывается достаточно большой, контур с кольцевой РНК с семью сайтами связывания начинает работать так же неэффективно, как контур с кольцевой РНК с одним сайтом связывания.

Таблица 4. Величина $\Sigma | m^{\text{noise}} - m^{\text{stat}} |$ в контуре с транскрипционным фактором и в контуре с кольцевой РНК с семью сайтами связывания при одних и тех же значениях внесенного в систему внешнего шума

Контур с кольцевой РНК
86.9057
89.2120
83.6620
84.2301



Рис. 5. Сравнение стационарного количества миРНК в системе с ТФ и с кольцевой РНК с одним и семью сайтами связывания: (а) – при разных значениях скорости производства миРНК k_m , (б) – при разных значениях скорости производства пре-мРНК регулятора k_{γ} , (в) – при разных скоростях распада миРНК g_m , (г) – при разных скоростях распада пре-мРНК регулятора g_{γ} .

Важно отметить, что переход от эффективного режима работы к неэффективному режиму оказывается достаточно резким при изменении скоростей производства субстрата или мишени.

Интересно отметить, что при уменьшении скорости распада миРНК g_m не наблюдается заметных различий в количестве миРНК в контурах (см. рис. 5в). Это связано с тем, что стабильность миРНК очень высока, т.е. характерная скорость распада миРНК, используемая нами, очень мала, и дальнейшее ее уменьшение слабо влияет на наблюдаемую картину. Однако скорость распада пре-мРНК кольцевой РНК g_{γ} заметно влияет на контур с кольцевой РНК с семью сайтами связывания, так как нехватка пре-мРНК для создания кольцевой РНК увеличивает вероятность, что все сайты связывания уже выработанных кольцевых РНК будут заняты, что уменьшает эффективность такого контура, приближая ее к эффективности контура с одним сайтом связывания (см. рис. 5г).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы было найдено много кольцевых РНК, содержащих малое количество сайтов связывания для миРНК. Несмотря на то что некоторые коэффициенты модели были подобраны исходя из общих представлений биохимии процессов, в нашей статье можно видеть, что кольцевая РНК с одним сайтом связывания не может достичь уровня эффективности классической регуляции с помощью транскрипционного фактора. Учитывая вероятность отсоединения миРНК от кольцевой РНК, при наличии только одного сайта связывания кольцевая РНК очень часто оказывается свободной, что можно увидеть при стоха-

стическом моделировании (см. рис. 3) и что косвенно указывает на то, что такая кольцевая РНК неэффективна в качестве губки для миРНК.

Исходя из этого факта, можно предположить, что скорее миРНК регулирует такую кольцевую РНК, а не наоборот, сама же кольцевая РНК с малым количеством сайтов связывания миРНК одного типа выполняет в клетке иные функции.

Тем не менее кольцевая РНК с множественными сайтами связывания значительно эффективнее понижает количество активных миРНК в системе, чем транскрипционный фактор. В нашем случае для наглядного сравнения была выбрана кольцевая РНК только с семью сайтами связывания. Для уменьшения количества миРНК до одинакового уровня понадобилось 200 молекул такой кольцевой РНК против 12000 молекул транскрипционного фактора, что говорит о высокой эффективности такой губки для миРНК. Учитывая тот факт, что у кольцевых РНК, подтвержденных в качестве губок для миРНК, обнаруживается 30-70 сайтов связывания, даже очень низкие уровни выработки кольцевых РНК могут быть достаточными для эффективной регуляции.

Еще одним несомненным плюсом в регуляции миРНК с помощью кольцевой РНК со множественными сайтами связывания, кроме ее эффективности, является скорость работы такого контура. Если для понижения количества миРНК с помощью транскрипционного фактора требуется время на сборку белка и на достижение необходимого количества регулятора, кольцевая РНК со множественными сайтами связывания начинает работать сразу, не позволяя количеству миРНК значительно возрасти.

С другой стороны, шумовые характеристики у контура с кольцевой РНК очень плохие по сравнению с контуром с транскрипционным фактором, и внутренний шум нарастает с увеличением количества сайтов связывания, поэтому контуры, регулируемые транскрипционным фактором, более эффективны в деле тонкой настройки, тогда как контуры с кольцевой РНК с множественными сайтами связывания работают по принципу: «быстро, но не точно». Несмотря на то что контур с кольцевой РНК немного лучше подавляет внешний шум, чем контур с транскрипционным фактором, этот эффект оказывается незаметным при рассмотрении одновременно внешнего и внутреннего шума за счет большой величины последнего. Большой внутренний шум, связанный с таким способом регуляции, возможно, является одной из причин слабой его распространенности в сравнении с другими способами регуляции в клетке.

Кроме того, кольцевая РНК с множественными сайтами связывания очень эффективно работает только в условиях неполного насыщения

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

сайтов связывания кольцевой РНК молекулами миРНК. В случае же насыщения, которое происходит при увеличении количества миРНК или уменьшении количества кольцевой РНК (например, в случае изменения скоростей производства k_m и k_{γ}), эффективность кольцевой РНК с множественными сайтами связывания оказывается сравнимой с эффективностью кольцевой РНК с одним сайтом связывания, причем переключение с эффективного режима на неэффективный режим происходит достаточно резко, см. рис. 5а,б. Также эффективность контура с кольцевой РНК оказывается чувствительной не только к скорости производства пре-мРНК k_{γ} , но и к ее скорости распада g_{γ} , при этом эффективность контура с транскрипционным фактором оказывается не настолько чувствительной к скорости распада премРНК, что, вероятно, связано с достаточной стабильностью молекул белка.

Подводя итог, можно сказать, что только кольцевые РНК с достаточно большим количеством сайтов связывания могут рассматриваться в качестве губок для миРНК, однако работа таких губок для миРНК имеет свои особенности. С одной стороны, такие губки могут быть очень эффективны, но только в некоторых пределах значений коэффициентов производства и распада компонентов. В условиях, когда за счет изменения этих скоростей сайты связывания кольцевой РНК оказываются занятыми, эффективность работы такого контура резко падает. Немаловажно, что губки для миРНК работают быстро, но скорость их работы компенсируется наличием значительного внутреннего шума, таким образом – губки для миРНК есть скорее некоторый специфический инструмент в живых клетках, нежели наиболее эффективный способ уменьшить количество активных миРНК в системе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С.А.Руколайне за консультации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование роли кольцевых РНК выполнено М.А. Дук в ФТИ им.А.Ф. Иоффе в рамках научной темы 0040-2019-0003 «Нелинейные процессы и механизмы переноса вещества в конденсированных средах и биоструктурах», верификация биологической значимости исследования выполнена М.Г. Самсоновой при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках реализации программы Научного центра мирового уровня по направлению «Передовые цифровые технологии» СПбПУ (соглашение № 075-15-2020-934).

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

- J. Greene, A. M. Baird, L. Brady, et al., Front. Mol. Biosci. 4, 38 (2017).
- 2. S. Guil and M. Esteller, Trends Biochem. Sci. **40** (5), 248 (2015).
- L. M. Holdt, A. Kohlmaier, and D. Teupser, Cell. Mol. Life Sci. 75, 1071 (2018).
- J. Salzman, C. Gawad, P. L. Wang, et al., PLoS One 7 (2), e30733 (2012).
- T. B. Hansen, J. Kjems, and C. K. Damgaard, Cancer Res. 73, 5609 (2013).
- I. Jost, L. A. Shalamova, G. K. Gerresheim, et al., RNA Biol. 15 (8), 1032 (2018). DOI: 10.1080/15476286.2018.1435248
- S. Memczak, M. Jens, A. Elefsinioti, et al., Nature 495, 333, (2013). DOI: 10.1038/nature11928

- M. Wang, F. Yu, W. Wu, et al., Int. J. Biol. Sci. 13, 1497 (2017). DOI: 10.7150/ijbs.22531
- R. Ashwal-Fluss, M. Meyer, N. R. Pamudurti, et al., Mol. Cell 56 (1), 55 (2014).
- 10. L. L. Chen and L. Yang, RNA Biol. 12 (4), 381 (2015).
- 11. Y. Dong, D. He, Z. Peng, et al., J. Hematol. Oncol. **10**, Art. 2 (2017). DOI: 10.1186/s13045-016-0370-2
- J. Singh and R. A. Padgett, Nat. Struct. Mol. Biol. 16 (11), 1128 (2009).
- 13. J. Hnilicová and D. Stanek, Nucleus 2 (3), 182 (2011).
- 14. L. Xu, H. Chen, X. Hu, et al., Mol. Biol. Evol. 23 (6), 1107 (2006).
- 15. Y. Taniguchi, P. J. Choi, G. W. Li, et al., Science **329** (5991), 533 (2010).
- 16. S. O. Olofsson, K. Boström, P. Carlsson, et al., Am. Heart J. **113** (2, Pt 2), 446 (1987).
- 17. M. K. Doherty, D. E. Hammond, M. J. Clague, et al., J. Proteome Res. 8 (1), 104 (2009).
- 18. T. C. Chang and J. T. Mendell, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 8, 215 (2007).
- 19. D. T. Gillespie, Phys. Rev. E 54 (2), 2084 (1996).
- 20. M. Osella, C. Bosia, D. Cora, and M. Caselle, PLoS Comput. Biol. 7 (3), e1001101 (2010).
- 21. S. Tej, K. Gaurav, and S. Mukherji, Phys. Biol. **16** (4), 046008 (2019). DOI: 10.1088/1478-3975/ab1563
- M. A. Duk, M. G. Samsonova, and A. M. Samsonov, BMC Genomics 15 (Suppl. 12), S9 (2014). DOI: 10.1186/1471-2164-15-S12-S9

Pros and Cons of Circular RNAs as miRNA Sponges

M.A. Duk* and M.G. Samsonova**

*Ioffe Institute, ul. Polytekhnicheskaya 26, St. Petersburg, 194021 Russia

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

In recent years, researchers have been challenged to study roles for non-coding RNA of various types in the cell. Circular RNAs (or circRNAs) are a type of non-coding RNAs previously considered junk by-products in splicing process. but to date, many of them are found to demonstrate important regulatory functions and also act as miRNA sponge. This study involved the comparison between the properties of miRNA sponge and the transcription factor associated with regulation of gene expression, assessing the efficiency, the time taken by the loop and noise characteristics. It was shown that circRNA with multiple binding sites for miRNA is much more effective than the transcription factor, and this loop works faster, however, this is only true when the binding sites are incompletely saturated with miRNA molecules. Moreover, the noise characteristics of the loop significantly are getting worse with an increase in the number of binding sites. It was also shown that circRNA with one binding site acts inefficiently as a sponge of miRNA. The results suggest that this type of regulation in the cell is rather a specific tool.

Keywords: circular RNAs, miRNA, miRNA sponge, non-coding RNA, noise

УДК 577.323

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С ФЕНАНТРОЛИНОМ И НОВЫМИ ФЕНАНТРОЦИАНИНОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ Zn(II)

© 2021 г. Е.В. Акуленкова*, В.Н. Демидов**, А.О. Мартынова*, С.В. Пастон*

*Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Ульяновская ул., 1 **OOO «Pro-Brite», 192289, Санкт-Петербург, ул. Софийская, 93 E-mail: s.v.paston@spbu.ru

Поступила в редакцию 25.01.2020 г. После доработки 12.07.2020 г. Принята к публикации 08.07.2020 г.

Методами оптической спектроскопии, флуоресценции и плавления ДНК изучено взаимодействие ДНК в водно-солевых растворах с комплексами Zn(II) и производных 1,10-фенантролина: бис-(1,10-фенантролин)-(1,10-фенантроцианин)-дицинка(II) ацетатом (diZn) и его предшественником – бис-(1,10-фенантролин)-цинка(II) ацетатом (monoZn). Взаимодействие фенантролина и металлокомплексов на его основе с ДНК существенно различается. МоnoZn и diZn образуют комплексы с ДНК, причем в зависимости от соотношения компонентов реализуется несколько типов связывания, один из которых, предположительно, – интеркаляция. Насыщение связывания не зафиксировано при $0,1 \le r \le 20$ для monoZn и при $0,1 \le r \le 1,67$ для diZn. Возможно образование вторичных комплексов monoZn и diZn на ДНК. Взаимодействие с ДНК приводит к тушению флуоресценции металлокомплексов.

Ключевые слова: ДНК, фенантролин, металлокомплексы, плавление ДНК, спектроскопия флуоресценции, интеркаляция.

DOI: 10.31857/S0006302921010038

Производные 1,10-фенантролина находят широкое применение в координационной химии, химии материалов, аналитической химии, фармакологии в качестве металлоферментов, зондов нуклеиновых кислот, хелатирующих агентов [1, 2]. Фенантролин – слабый флуорофор (квантовый выход $\Phi_{dn} = 0.0087$, время жизни синглетного состояния менее 1 нс в дихлорметане при комнатной температуре) [2, 3], однако к настоящему времени сконструировано множество вариантов замещенных фенантролинов и металлокомплексов на их основе, проявляющих весьма интересные флуоресцентные свойства: спектры испускания лежат в диапазоне от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области, а квантовый выход некоторых соединений достигает 0.8 [2, 4-6]. Синтезированы также полимеры на основе фенантролина. Они обладают повышенной способностью координировать ионы металлов, кроме того, они склонны образовывать эксимеры, что дает возможность получать информацию о конформации таких полимеров в различных

условиях из их спектров флуоресценции [2, 7]. 1,10-Фенантролин используют в качестве флуоресцентных датчиков для обнаружения ионов металлов. Спектральные сдвиги происходят в фенантролиновом фрагменте после связывания иона металла на открытом координационном сайте [4–6].

Взаимодействие 1,10-фенантролина и его комплексов d-элементов с молекулой ДНК были рассмотрены различными методами, при этом была отмечена способность лигандов к интеркаляции [1, 8–13]. Среди подобных комплексов d-элементов особое внимание привлекают соединения Ru(II). Это обусловлено различными факторами, среди которых следует отметить флуоресцентные свойства, весьма чувствительные к ближнему окружению соединения, а также способность таких металлокомплексов выступать в качестве эффективных фотосенсибилизаторов [14-16]. Значительный интерес вызывают комплексы железа с 1,10-фенантролином и его производными [17-19]. Благодаря способности фенантролина хелатировать ион Fe²⁺ он может блокировать реакцию Фентона и влиять на баланс Fe²⁺/Fe³⁺ в клетках [19].

Сокращения: monoZn — бис-(1,10-фенантролин)-(1,10фенантроцианин)-дицинка(II) ацетат, diZn — бис-(1,10фенантролин)-цинка(II) ацетат.

Металлокомплексы на основе фенантролина и других органических лигандов широко используются для разработки новых противоопухолевых, противомикробных и противогрибковых препаратов и искусственных нуклеаз [1, 8, 20–22]. Одними из наиболее перспективных препаратов данного спектра действия являются комплексы Zn(II) [8, 9, 23]. Связывание с молекулой ДНК или ее расщепление приводит к ингибированию синтеза макромолекулы в клетке [24]. В ряде случаев металлокомплексы проявляют фотосенсибилизирующий эффект [1, 25, 26]. К сожалению, часто на пути применения подобных соединений в качестве лекарственных форм стоит их плохая растворимость в воде. Поэтому разработка новых комплексных соединений, обладающих хорошей биосовместимостью, и исследование их биологической активности является актуальной задачей.

Наиболее распространенным методом исследования взаимодействия низкомолекулярных соединений с ДНК в растворе является метод электронной спектроскопии. Неаддитивность спекпоглощения компонентов при тров их смешивании свидетельствует о комплексообразовании в растворе [27]. Однако если спектры ДНК и исследуемого соединения перекрываются, сделать однозначный вывод о причинах спектральных изменений сложно. В данной работе изучается взаимодействие ДНК в растворе с фенантролином и двумя новыми комплексами Zn(II) с фенантролиновыми и фенантроцианиновыми лигандами с помощью методов спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, а также флуоресцентной спектроскопии и спектрофотометрического плавления ДНК. Последний метод активно применяется для изучения комплексообразования ДНК с биологически активными соединениями и нарушений в структуре ДНК, так как он дает информацию о степени спиральности макромолекулы и позволяет в ряде случаев оценить термодинамические параметры связывания [28-34].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ДНК тимуса теленка (Sigma, США) молекулярной массы $M = (9 \pm 1) \cdot 10^6$ Да, химически чистые NaCl и фенантролин, два новых комплексных соединения Zn(II) с производными 1,10-фенантролина: бис-(1,10-фенантролин)-(1,10-фенантроцианин)-дицинка(II) ацетат (условное обозначение diZn) и его предшественник — бис-(1,10-фенантролин)-цинка(II) ацетат (условное обозначение monoZn) (рис. 1). Синтез соединений проводили по методике, описанной в работе [35]. Zn7 представляет собой аморфное вещество красно-бурого цвета, Zn8 бесцветное вещество. В твердом состоянии в состав комплексов во внутренней координационной сфере входят 1 ацетат-ион в Zn8 и 2 ацетатиона в Zn7, которые при растворении соединений замещаются молекулами воды. Все растворы готовили на деионизованной воде, pH 6–7. Концентрацию поддерживающего электролита (0.00 M NaCl) сохраняли постоянной во всех экспериментах.

Оптическое поглощение растворов ДНК, фенантролина и металлокомплексов измеряли на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО, Россия). Концентрацию ДНК в растворе определяли по методу Спирина [36]. Измерения проводили при 20°С. Использовали кварцевую прямоугольную кювету с длиной оптического пути l=1 см.

Измерения спектров флуоресценции растворов проводили на флуоресцентном спектрофотометре Lumina (Thermo Fisher Scientific, США) под 90° в прямоугольной кварцевой кювете (l = 1 см) при температуре 20°. Длина волны возбуждения фенантролина 263 нм, топоZn и diZn – 270 нм. Спектры испускания корректировались на спектральную чувствительность прибора. Оптическая плотность растворов на длине волны возбуждения составляла $D \approx 0.1$.

Измерения кривых плавления ДНК в исследуемых растворах проводили на приборе Specord 200 plus (Analytik Jena, Germany) с приставкой Пельтье, с шагом 1°, скорость нагрева 2°/мин. Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути l = 1 см. В экспериментах измеряли оптическое поглощение раствора в максимуме поглощения ДНК D_{260} в зависимости от температуры *T*. Сбор данных и управление экспериментом осуществляли с помощью программы WinASPECT (Analytik Jena, Германия). Обработку данных проводили в программном пакете Origin-Pro. Значение температуры плавления ДНК ($T_{пл}$) определяли по положению максимума на дифференциальной кривой плавления $dD_{260}(T)/dT$ [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены спектры поглощения фенантролина, monoZn и diZn в воде при pH 6.0. Спектр поглощения фенантролина имеет два максимума: при 227 и 263 нм. Спектр поглощения monoZn имеет максимумы при 225, 270 и 292 нм и длинноволновое плечо в области 300 нм $< \lambda < < 350$ нм. В спектре diZn наблюдаются два максимума: при 227 и 271 нм. Кроме того, в диапазоне $\lambda = 290 \div 450$ нм присутствуют два длинноволновых плеча, обусловленные наличием неразрешенных полос. Как видно, спектры металлокомплексов в значительной мере перекрываются со спектром поглощения ДНК.

Были проведены исследования взаимодействия monoZn и diZn с ДНК в водно-солевых растворах 0.003M NaCl. На рис. За показана часть



Рис. 1. Структурные формулы исследуемых соединений: (a) – 1,10-фенантролин, (б) – бис-(1,10-фенантролин)-цинка(II) ацетат (monoZn) в водном растворе, (в) – бис-(1,10-фенантролин)-(1,10-фенантроцианин)-дицинка(II) ацетат (diZn) в водном растворе.

спектров, полученных в серии при постоянной концентрации ДНК и варьировании концентрации monoZn, причем в качестве растворителя при измерении поглощения использовали раствор monoZn в той же концентрации, что и в растворе в присутствии ДНК. На рис. За приведено отношение концентрации металлокомплекса к концентрации ДНК в парах оснований: r = [Zn]/[ДНК_{bp}]. Таким образом, спектры на рис. За показывают поглощение ДНК в комплексе (при условии, что спектр monoZn не изменился при взаимодействии) – и неаддитивность спектров ДНК и monoZn в смеси очевидна из рис. За. Для более наглядного представления спектральных изменений при комплексообразовании спектр ДНК также был вычтен из спектров двухкомпонентных растворов (рис. 3б). При отсутствии взаимодействия результат равнялся бы нулю, однако в этих разностных спектрах мы наблюдаем отклонения от нуля как в положительную, так и в отри-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

цательную область D, тем большую, чем больше величина r. Заметим, что наибольшие отклонения от нуля наблюдаются в разностных спектрах в диапазонах длин волн, соответствующих максимумам в спектре поглощения monoZn. Это свидетельствует о том, что спектр металлокомплекса существенно изменяется при комплексообразовании с ДНК, а именно, интенсивность его поглощения снижается (вычитание спектра растворителя с той же концентрацией monoZn в предположении, что спектр металлокомплекса не изменился в присутствии ДНК привело к избыточному вычитанию поглощения свободного monoZn из спектра комплекса). Отметим, что гипохромный эффект в полосе поглощения соединения является одним из признаков интеркаляционного типа связывания [1, 8, 9, 16]. Амплитуда интенсивности разностного спектра на длине волны максимума поглощения monoZn (270 нм) монотонно растет с увеличением r (рис. 3в); на этой зависимости можно выделить несколько



Рис. 2. Спектры поглощения фенантролина (phen), monoZn и diZn в нейтральном водном растворе.

участков, характеризующихся разной скоростью нарастания спектральных изменений: при $r \le 0.1$ $D_{270} \approx 0$, при 0.1 ≤ *r* ≤ 0.6 наблюдается резкий рост $|D_{270}|$, затем при $r \ge 0.6$ зависимость становится более пологой. Можно предположить, что это является следствием разных типов связывания monoZn с ДНК, которые реализуются при разных значениях r. Сходные эффекты наблюдаются в аналогичном эксперименте при взаимодействии diZn с ДНК (рис. 4). Однако в этом случае при больших значениях r пологий ход зависимости $D_{271}(r)$ сменяется участком быстрого роста $|D_{271}|$. Таким образом, и в случае diZn мы можем предположить формирование его комплексов с ДНК с разным типом связывания, причем насыщения связывания не наблюдается до $r \cong 1.2$. Учитывая большие размеры молекулы diZn, при соотношении более одной молекулы diZn на пару оснований ДНК мономерное связывание реализовываться не может. Очевидно, что при больших концентрациях diZn его молекулы взаимодействуют с уже связавшимися с ДНК металлокомплексами (вторичное связывание) [38].

Отметим, что при взаимодействии monoZn с ДНК наблюдается гиперхромный эффект в области длинноволнового плеча в полосе поглощения monoZn (≥ 310 нм), в которой ДНК не поглощает (рис. 3б). Это дает возможность провести спектрофотометрическое титрование раствора металлокомплекса, варьируя концентрацию ДНК (т.е. число мест связывания). К сожалению, при взаимодействии diZn с ДНК аналогичный эффект в длинноволновой области не наблюдается (рис. 4б). Спектры поглощения monoZn в области вне полосы поглощения ДНК при разных соотношениях ДНК_{bp}/[monoZn] = 1/r приведены на рис. 5а. Зависимость интенсивности поглощения от ДНК_{bp}/[monoZn] (рис. 5б) отражает тот



Рис. 3. (а) – Спектры поглощения ДНК в комплексе с monoZn (показана часть спектров в серии, чтобы не загромождать рисунок). Рядом со спектрами указаны значения *r*. (б) – Результат вычитания из спектров на рисунке (а) спектра ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-5}$, $M_{\text{bp}} = \text{const}$). в) – Зависимость оптической плотности ($\lambda = 270$ нм) от *r*, полученная из рисунка (б), погрешность задается размером точек.



Рис. 4. (а) – Спектры поглощения ДНК в комплексе с diZn (показана часть спектров в серии, чтобы не загромождать рисунок), значения *r* указаны на рисунке; (б) – результат вычитания из спектров на рисунке (а) спектра ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-5}$, $M_{\text{bp}} = \text{const}$); (в) – зависимость оптической плотности ($\lambda = 270$ нм) от *r*, полученная из рисунка (б).

факт, что с ростом числа мест связывания количество monoZn в комплексе с ДНК увеличивается и насыщение связывания при этом не наблюдает-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021



Рис. 5. (а) — Спектры поглощения monoZn в комплексе с ДНК (часть спектров серии), $C(\text{monoZn}) = 4.6 \cdot 10^{-4}$, M = const; (б) — зависимость оптической плотности ($\lambda = 326$ нм) от [ДНК]/[monoZn], полученная из рисунка (а).

ся. Заметим, что значения r в этом эксперименте варьируют в пределах $1.4 \le r \le 20$. Таким образом, и в случае взаимодействия ДНК с monoZn мы должны сделать вывод о наличии вторичного связывания.

Спектры флуоресценции металлокомплексов в водно-солевых растворах без добавок и в присутствии ДНК приведены на рис. ба,б. Видно, что в растворах с ДНК наблюдается тушение флуоресценции monoZn и diZn, что также является признаком комплексообразования. Можно предположить, что имеет место перенос возбуждения с молекул металлокомплекса, связанных с ДНК, на макромолекулу. Это позволяет рассматривать monoZn и diZn как возможные фотосенсибилизаторы. В растворе фенантролина, содержащем ДНК, тушение флуоресценции не наблюдается



Рис. 6. Спектры испускания исследуемых соединений в водно-солевых растворах и в растворах с ДНК: (a) – monoZn, $\lambda_{BO36} = 270$ нм (в максимуме поглощения monoZn); (6) – diZn, $\lambda_{BO36} = 270$ нм (в максимуме поглощения diZn); (в) – фенантролин, $\lambda_{BO36} = 263$ нм (в максимуме поглощения phen).

(рис. 6в). Это говорит об отличии в способе взаимодействия с ДНК фенантролина и металлокомплексов на его основе.



Рис. 7. Кривые плавления ДНК в растворах в присутствии металлокомплексов и фенантролина: (а) – зависимость поглощения в максимуме спектра ДНК от температуры; (б) – дифференциальные кривые плавления.

Результаты плавления ДНК в растворах с фенантролином, monoZn и diZn показаны на рис. 7 и 8. В присутствии металлокомплексов температура плавления ДНК существенно возрастает, линейно с ростом r (рис. 8). Интересно отметить, что оба соединения одинаково влияют на температуру плавления ДНК. Это может свидетельствовать о том, что способ первичного (мономерного) связывания с ДНК у monoZn и diZn сходный. Основываясь на литературных данных, можно предположить, что столь значительная стабилизация двойной спирали ДНК при взаимодействии с металлокомплексами свидетельствует об интеркаляционном типе связывания [10, 11, 16, 30]. Температура плавления ДНК в присутствии фенантролина заметно не изменилась (рис. 7 и 8), что подтверждает вывод о разных способах взаимодействия ДНК с металлокомплексами и фенантролином.



Рис. 8. Зависимости температуры плавления ДНК от содержания металлокомплексов и фенантролина в растворе.

Из полученных данных однозначно следует, что происходит комплексообразование ДНК с изучаемыми соединениями. Для металлокомплексов это вполне ожидаемо, так как monoZn и diZn заряжены положительно: в водном растворе monoZn имеет заряд 2+, diZn — заряд 4+. Для monoZn исследование проведено при $0.1 \le r \le 20$, для diZn — при $0.1 \le r \le 1.67$, для обоих соединений насыщение из связывания с ДНК не зарегистрировано. Для однозначного вывода о типе связывания полученных результатов пока недостаточно, можно лишь высказать некоторые предварительные предположения, опираясь на аналогичные данные, имеющиеся в литературе [1, 8-11, 16]. Можно предположить, что как в случае monoZn, так и в случае diZn один из типов комплексообразования – интеркаляция. На это указывает гипохромный эффект на полосах поглощения соединений, а также сильное повышение температуры плавления ДНК в комплексе с monoZn и diZn. Интеркаляция в двойную спираль различных металлокомплексов, содержащих фенантролин, описана в литературе [1, 8, 9, 16]. При этом, согласно полученным нами данным, отдельные молекулы фенантролина не интеркалируют в ДНК. Наблюдаемое нами отсутствие насыщения связывания для металлокомплексов при соотношении более чем одна молекула соединения на одну пару оснований (а в случае monoZn – более десяти молекул соединения на одну пару оснований) может говорить о том, что при больших значениях r осуществляется вторичное связывание молекул соединения с молекулами, уже связанными с ДНК, с образованием димеров (и, возможно, *n*-меров) [38].

выводы

Данные, полученные методами спектроскопии поглощения, флуоресценции и спектрофотометрического плавления ДНК свидетельствуют о комплексообразовании с ДНК двух новых металлокомплексов – бис-(1,10-фенантролин)-(1,10фенантроцианин)-дицинка(II) ацетата (diZn) и его предшественника бис-(1,10-фенантролин)цинка(II) ацетата (monoZn). Для обоих исследованных соединений реализуются несколько типов связывания с ДНК, один из которых, вероятно, интеркаляция. Насыщения связывания не происходит при $0.1 \le r \le 20$ для monoZn и при $0.1 \le r \le 1.67$ для diZn, поэтому мы предполагаем образование вторичных (ди- или *п*-мерных) комплексов исследуемых соединений на ДНК. Связывание с ДНК приводит к тушению флуоресценции металлокомплексов. Это позволяет рассматривать monoZn и diZn как возможные фотосенсибилизаторы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Методы анализа состава вещества» и «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники».

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. J. A. McCleverty and T. J. Meyer, *Comprehensive Coordination Chemistry II: From Biology to Nanotechnology* (Newnes, 2003).
- G. Accorsi, A. Listorti, K. Yoosaf, and N. Armaroli, Chem. Soc. Rev. 38, 1690 (2009).
- 3. M. S. Henry and M. Z. Hoffman, J. Phys. Chem. 83, 618 (1979).
- 4. Y.-W. Sie, C.-L. Li, C.-F. Wanb, et al., Inorgan. Chim. Acta **469**, 397 (2018).
- L. Zhang, Z. Wang, J. Zhang, et al., Nanomaterials 8, 1071 (2018).
- 6. S. Sangeetha, G. Sathyaraj, D. Muthamilselvan, et al., Dalton Trans. **41**, 5769 (2012).
- 7. K. Hayashi, H. Akutsu, H. Ozaki, and H. Sawai, Chem. Commun. **13** (12), 1386 (2004).

- 8. В. Н. Демидов, Н. А. Касьяненко, В. С. Антонов и др., Рос. хим. журн. **54** (6), 120 (2010).
- 9. N. Raman and R. Mahalakshmi, Inorgan. Chem. Commun. 40, 157 (2014).
- N. Kasyanenko, Z. Qiushi, V. Bakulev, et al., Polymers 9, 211 (2017).
- G. Barone, A. Terenzi, A. Lauria, et al., Coord. Chem. Rev. 257, 2848 (2013).
- С. В. Пастон, В. М. Бакулев, В. Н. Демидов и др., Вестн. СПбГУ. Сер. 4. Физика. Химия 2 (3), 299 (2015).
- H.-L. Seng, S.-T. Von, K.-W. Tan, et al., Biometals 23, 99 (2010).
- C. S. Devi, P. Nagababu, and S. Natarajan, Eur. J. Med. Chem. 72, 160 (2014).
- R. B. Sears, L. E. Joyce, M. Ojaimi, et al., J. Inorgan. Biochem. **121**, 77 (2013).
- Y. J. Jang, G-Y. Yeo, B. Park, and S. K. Kim, Biophys. Chem. 158, 38 (2011).
- В. Н. Демидов, Е. А. Божкова, И. М. Зырянова и Н. А. Касьяненко, Вестн. СПбГУ. Сер. 4, № 1, 150 (2012).
- Mudasir, K. Wijaya, E. Tri Wahyuni, et al., Spectrochim. Acta Part A 66, 163 (2007).
- I. G. J. de Avellar, M. M. M. Magalhaes, A. B. Silva, et al., Biochim. Biophys. Acta 1675, 46 (2004).
- Q. Jiang, N. Xiao, P. Shi, et al., Coord. Chem. Rev. 251, 1951 (2007).
- S. Ramakrishnan and M. Palaniandavar, Dalton Trans. 17 (29), 3866 (2008).
- 22. S. Roy, K. D. Hagen, P. U. Maheswari, et al., ChemMedChem **3**, 1427 (2008).
- 23. W. H. Mahmoud, G. G. Mohamed, and M. M. I. El-Dessouky, Int. J. Electrochem. Sci. 9, 1415 (2014).
- 24. A. Bolhuis and R. Janice, Bioorg. Chem. 55, 51 (2014).

- 25. А. А. Кузнецова, Л. И. Соловьева и О. С. Федорова, Биоорган. химия **34** (5), 683 (2008).
- C. M. Allen, W. M. Sharman, and J. E. Van Lier, J. Porphyrins Phthalocyanines 5 (2), 161 (2001).
- 27. D. S. Ershov, S. V. Paston, L. A. Kartsova, et al., Struct. Chem. 22 (2), 475 (2011).
- 28. А. А. Веденов, А. М. Дыхне и М. Д. Франк-Каменецкий, Успехи физ. наук **107** (3), 479 (1971).
- 29. A. T. Karapetian, N. M. Mehrabian, G. A. Terzikian, et al., J. Biomol. Structure and Dynamics 14 (2), 275 (1996).
- A. T. Karapetian, P. O. Vardevanian, G. A. Tarzikian, and M. D. Frank-Kamenetskii, J. Biomol. Structure and Dynamics 8 (1), 123 (1990).
- P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, et al., J. Biomol. Structure and Dynamics 34 (7), 1377 (2016).
- S. A. Tankovskaia, O. M. Kotb, O. A. Dommes, and S. V. Paston, J. Physics: Conf. Series **1038**, 012027 (2018).
- S. A. Tankovskaia, O. M. Kotb, O. A. Dommes, and S. V. Paston, Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 200 (2018) 85.
- D. Y. Lando, C.-L. Chang, A. S. Fridman, et al., J. Inorg. Biochem. 137, 85 (2014).
- В. Н. Демидов, Дис. ... д-ра хим. наук (Санкт-Петербургский государственный технологический институт, СПб, 2010).
- 36. А. С. Спирин, Биохимия 23, 656 (1958).
- D. Y. Lando, A. S. Fridman, C.-L. Chang, et al., Anal. Biochem. 479, 28 (2015).
- D. N. Osinnikova, E. B. Moroshkina, and D. M. Glushkina, J. Physics: Conf. Series 661, 012020 (2015).

Interaction of DNA with Phenanthroline and New Phenanthrocyanine Complexes of Zn(II)

E.V. Akulenkova*, V.N. Demidov**, A.O. Martynova*, and S.V. Paston*

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

**LLC "Pro-Brite", ul. Sofiyskaya 93, St. Petersburg, 192289 Russia

The interaction of Zn (II) complexes and derivatives of 1,10-phenanthroline: bis-(1,10-phenanthroline)-(1,10-phenanthrocyanine)-dizinc (II) acetate (diZn) and its precursor – bis-(1,10-phenanthroline)-zinc (II) acetate (monoZn) with DNA in aqueous-salt solutions has been studied by means of optical spectroscopy and fluorescence melting method. Interaction between phenanthroline and DNA is significantly different from interaction between metal complexes of phenanthroline and DNA. MonoZn and diZn form complexes with DNA; depending on molar ratio of the components, ligands may interact with DNA by several ways, one of them is, presumably, intercalation. No saturation binding was recorded at $0.1 \le r \le 20$ and $0.1 \le r \le 1.67$ for monoZn and diZn, respectively. The formation of secondary complexes of monoZn and diZn on DNA is possible. The interaction with DNA leads to quenching the fluorescence from metal complexes.

Keywords: DNA, phenanthroline, metal complexes, DNA melting, fluorescence spectroscopy, intercalation

УДК 577.29:615

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА ПРИ МАРКИРОВАНИИ ДНК ЦИАНИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ КРАСНОГО И БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА

© 2021 г. А.Ю. Иконникова, В.Е. Шершов, Ю.В. Мороз, В.А. Василисков, С.А. Лапа, Р.А. Мифтахов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина

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

E-mail: nased@biochip.ru Поступила в редакцию 22.09.2020 г. После доработки 22.09.2020 г. Принята к публикации 26.09.2020 г.

Исследована чувствительность гибридизационного анализа с использованием биологического микрочипа при маркировании ДНК производными 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, содержащими цианиновые красители типа Су5 и Су7 в качестве флуорофора. Были выбраны два Су5-dUTP и два Су7-dUTP, способные эффективно встраиваться в растущую цепь ДНК в ходе ПЦР. Продукты ПЦР, флуоресцентно-меченные разными красителями, гибридизовали с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биологического микрочипа. Результаты гибридизации регистрировали с помощью цифровой люминесцентной микроскопии в красном (для Cy5-dUTP) и ближнем инфракрасном (для Cy7-dUTP) диапазонах. Методом последовательных разведений определена минимальная исходная концентрация ДНК, при которой возможно определение генотипа в результате специфического взаимодействия флуоресцентно-меченные Су7-dUTP обеспечивают более высокую чувствительность гибридизационного анализа по сравнению с Су5-dUTP.

Ключевые слова: флуоресценция, модифицированные нуклеотиды, цианиновые красители, ИК-диапазон, ближний ИК-диапазон, биологические микрочипы, аллель-специфичная гибридизация.

DOI: 10.31857/S000630292101004X

Флуоресцентное маркирование нуклеиновых кислот с целью визуализации результатов молекулярно-генетического анализа является широко распространеным подходом в диагностических исследованиях [1]. Цианиновый краситель Су5, поглощающий и флуоресцирующий в красной области спектра (600–700 нм), используется во многих исследовательских и коммерческих тестах, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени или гибридизационном анализе с использованием биологических микрочипов (microarray) [2, 3].

Основными характеристиками любого диагностического метода являются его аналитическая чувствительность и точность. Естественным препятствием для повышения анналитической чувствительности анализа является остаточная фоновая флуоресценция биологического материала. Переход в ближнюю инфракрасную область в диапазоне 700—900 нм с меньшей фоновой флуоресценцией, в так называемое «диагностическое окно биологической ткани», позволяет решить эту проблему [4, 5].

К флуоресцентным меткам, спектрально попадающим в «диагностическое окно биологической ткани», относятся гептаметиновые цианиновые флуоресцентные красители Су7 с максимумами поглощения и флуоресценции в диапазоне 700—900 нм. Биологические ткани и их компоненты в этой спектральной области имеют минимальное поглощение и минимальную собственную флуоресценцию [6, 7], поэтому, например, оказалось возможным использовать гептаметиновые красители Су7, связанные с рецепторными группами, в инфракрасной визуализации опухолевых тканей [8, 9].

Интерес к флуоресцентным красителям ближнего инфракрасного диапазона возрос после того, как было показано, что использование гептаметиновых цианиновых флуоресцентных красите-

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, Су5dUTP – флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU2 и dU49, Су7-dUTP – флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU83 и dU84.

лей в твердофазном иммунологическом анализе в качестве флуоресцентной метки позволяет добиться чрезвычайно высокой чувствительности, соизмеримой с чувствительностью иммуноферментного анализа, использующего в качестве метки пероксидазу хрена [10]. С флуоресцентными метками видимого оптического диапазона добиться такой чувствительности не представляется возможным.

Гептаметиновые цианиновые красители достаточно стабильны в условиях проведения молекулярно-биологического анализа и обладают высокими коэффициентами молярной экстинкции и высокими квантовыми выходами флуоресценции [11–13].

Ранее было показано, что флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU2 и dU49 (Cy5-dUTP) встраиваются в растущую цепь ДНК в ходе ПЦР, причем эффективность встраивания зависит от структуры флуорофора, а также химического строения линкера, соединяющего нуклеотид с флуорофором [14-16]. Также было показано, что флуоресцентно-меченные 5'-трифосфаты 2'-дезоксиуридина dU83 и dU84 (Су7dUTP) способны встраиваться в ПЦР-продукты и обеспечивать высокую эффективность гибридизационного анализа [17]. Однако прямое сравнение наиболее перспективных производных Су5dUTP и Cy7-dUTP по их способности влиять на чувствительность и специфичность аллель-специфичной гибридизации на биологических микрочипах ранее не проводилось.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ эффективности гибридизационного анализа при маркировании ДНК, синтезируемой de novo в ходе ПЦР, с помощью 5'-трифосфатов 2'дезоксиуридина, содержащих пентаметиновый аналог Су5, флуоресцирующий в красной области, или гептаметиновый аналог Су7, флуоресцирующий в ближней инфракрасной области. Показано, что Су7-dUTP позволяют достичь более высокой разрешающей способности гибридизационного анализа по сравнению с Су5-dUTP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. В качестве мишени для амплификации выступали локусы, которые вносят вклад в полигенный риск развития рака молочной железы: rs4808801 в гене SSBP4, rs4849887 в локусе 2q14.2, rs4973768 в гене SLC4A7. Использовали следующие пары праймеров: 1) rs4808801_F GTCCTGCTGACCCCCACAG и rs4808801_R

tcattggatctcattaGTGCCACTGTGACTTCCCCT;

2) rs4849887_F TCGAGTGTCTGGCTTCCAGC и rs4849887_R

tcattggatctcattaCAGGGGTCCAGGTGGTTGAG;

3) rs4973768_F CTGTCACTGTCTCTCAAT-GAATGCT и rs4973768_R

tcattggatctcattaCTGACTACTCCATTTAAGAGCA-AAGGT.

Последовательность обратного праймера включала локус-специфичную часть и адаптер (выделен прописными буквами), что позволяло асимметрично нарабатывать ПЦР-продукт в ходе одноэтапной ПЦР для последующей гибридизации на биочипе.

Оценивали влияние Cy5-dUTP и Cy7-dUTP на прохождение ПЦР в зависимости от их концентрации с помощью ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя Eva-Green. Амплификацию проводили с праймерами для анализа rs4849887 в локусе 2q14. Использовали коммерчески доступную полимеразу с горячим стартом SynTaq ДНК-полимераза (НПК «Синтол», Россия). Состав реакционной смеси: 5 нг ДНК, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) в концентрации 200 мкМ каждый, 1×ПЦР буфер SynTaq, 1.5 мМ MgCl2, праймеры в концентрации 300 нМ, 1×EvaGreen (Biotium, США) и 0.75 ед. активности полимеразы на реакцию (объем реакционной массы 25 мкл). Также в реакцию добавляли один из двух Cy7-dUTP (dU83, dU84) или Cy5-dUTP (dU2, dU49) в концентрации 20, 8 и 4 мкМ. Реакцию проводили на приборе Light-Cycler 96 (Roche, Швейцария) по следующей программе: 94°С 4 мин, 45 циклов (94°С – 15 с, 62°С – 30 с, 72°С – 30 с) с детекцией флуоресценции красителя Еva-Green по каналу ResoLight.

Для оценки показателя динамики ПЦР в реальном времени использовали скорость амплификации, рассчитанную по тангенсу угла наклона линейного участка кривой накопления флуоресцентного сигнала (tga) [5], которую нормировали на скорость ПЦР без добавления модифицированных нуклеотидов.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле и проводили детекцию по каналу SYBR Green I с помощью системы гельдокументирования Gel Doc XR+ (BioRad, США) и по каналам Cy5 и Cy7 с использованием исследовательского анализатора гелей. Возбуждение флуоресценции осуществлялось с помощью ртутной лампы, регистрация – с помощью встроенного прибора с зарядовой связью RTE/CCD-1536-K/1 (Roper Scientific, США), поле регистрации 15 × 15 см. Флуоресценцентные сигналы регистрировали с диапазоном пропускания 630–

690 нм для Су5 и 810-830 нм для Су7 соответственно.

Электрофореграммы анализировали с помощью программы ІтадеЈ. Эффективность встраивания (*Eff*) исследуемых Су5- dUTP и Су7-dUTP определяли как долю флуоресцентно-меченного продукта в общем количестве наработанного продукта, т. е. как отношение суммарной интенсивности сигналов по каналам Су5 и Су7 ($I_{Cy} = S \cdot I_{средн}$, где S – площадь, занимаемая флуоресцентно-меченным продуктом, $I_{средн}$ – среднее локальное значение флуоресценции ПЦР-продукта) к интенсивности сигналов по каналу SYBR Green I ($I_{SG} = S \cdot I_{сред}$), с учетом квантового выхода (QCy7) и коэффициента молярной экстинкции (ε_{Cy7}).

$$Eff = \frac{I_{\rm Cy7}}{I_{\rm SG} \, Q_{\rm Cy7} \, \varepsilon_{\rm Cy7}}$$

Для проведения аллель-специфичной гибридизации с флуоресцентно-меченным ПЦР-продуктом использовали иммобилизованные олигонуклеотиды, позволяющие определять различные аллели для rs4808801, rs4849887, rs4973768:

N1 (rs4808801)_A CAAGAAGCAGACGAGCT

N1 (rs4808801)_G CAAGAAGCGGACGAGC

N2 (rs4849887) C TGGCAATGCTGAAGCT-TG

N2 (rs4849887)_T CTGGCAATGTTGAAGCT-TG N3 (rs4973768)_C GCAGTTAATTACCTAAAC-ATGAG

N3 (rs4973768)_T GCAGTTAATTACTTAAAC-ATGAGT

В состав реакции входили 1×ПЦР буфер, 4 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 2.5 ед. полимеразы SynTaq, по 1 пмолю локус-специфичных праймеров, 100 пмолей универсального праймера 5'-TCATTGGATCTCAT-ТА-3', ДНК в количестве 10, 5, 0.5 или 0.05 нг, а также исследуемые Cy5-dUTP или Cy7-dUTP в концентрациях 20, 8 и 4 мкМ (объем реакционной массы 25 мкл). Гибридизацию на биочипе осуществляли в смеси, содержащей 25% формамида, 5×SSPE, 50 об.% ПЦР-продукта, в течение 6-8 ч при 37°C, после инкубации промывали и высушивали. Флуоресцентные сигналы регистрировали методом цифровой люминесцентной микроскопии с помощью двух разных анализаторов биочипов: 1) при возбуждении на 655 нм и регистрации флуоресцентных сигналов в диапазоне 716 ± 22 нм для Су5; 2) при возбуждении на 760 ± 25 нм и регистрации на 810-830 нм для Су7 [18, 19]. Анализ изображения проводили с помощью программы ImaGeWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия). Интенсивность флуоресценции в ячейке биочипа I(f) определяли по формуле $(I_{\rm in} - I_{\rm out})/I_{\rm out}$, где $I_{\rm in}$ – интегральное значение

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

флуоресценции внутри ячейки, *I*_{out} – интегральное значение флуоресценции фона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы исследовали четыре производных 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, связанных по 5-положению с цвитерионными индодикарбоцианиновыми красителями (два Cy5-dUTP) и индотрикарбоцианиновыми красителями (два Cy7dUTP). Химическое строение и оптические характеристики флуоресцентно-меченных дезоксиуридинтрифосфатов приведены на рис. 1. Все соединения имели суммарный нейтральный заряд, что обеспечивает высокую эффективность встраивания флуоресцентно-меченных нуклеотидов в ПЦР продукты [12, 15, 17].

Влияние Cy5-dUTP и Cy7-dUTP на скорость амплификации изучали методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen [17]. Каждый из исследуемых дезоксиуридинтрифосфатов добавляли в трех концентрациях: 20, 8 и 4 мкМ. Результаты представлены на рис. 2. Видно, что в присутствии производного Cy7-dU83 скорость реакции практически не изменяется при всех трех концентрациях, в случае остальных соединений выраженный эффект ингибирования ПЦР наблюдался при концентрации 20 мкМ. Наименьшее влияние на скорость реакции отмечается для всех соединений при концентрации 4 мкМ, как было описано ранее [15, 17].

Способность изучаемых модифицированных d-UTP встраиваться в ДНК в ходе ПЦР оценивали на основании количественного анализа электрофореграмм, полученных для продуктов ПЦР в реальном времени, по каналам SYBR, Су5 и Су7 (рис. 3). Эффективность встраивания определяли по отношению количества флуоресцентно-меченного продукта, определенном на каналах Су5 и Су7, к общему количеству наработанного в реакции полноразмерного продукта, определеного на канале SYBR, с учетом квантового выхода Q и коэффициента молярной экстинкции є соответствующего красителя (рис. 1).

Результаты анализа электрофореграмм представлены на рис. 4. Эффективность встраивания флуоресцентно-меченных нуклеотидов в растущую цепь ДНК заметно снижается с уменьшением концентрации 20 мкМ > 8 мкМ > 4 мкМ для всех использованных соединений. Наименьшая эффективность встраивания наблюдается для dU83 по сравнению с другими флуоресцентномеченными трифосфатами в тех же концентрациях. В то же время при концентрации 4 мкМ все исследованные соединения имели близкую эффективность встраивания. С учетом того, что все исследованные трифосфаты при концентрации



Рис. 1. Химическое строение и оптические характеристики аналогов Су5 и Су7, измеренные в фосфатно-солевом буфере (0.15 M NaCl, 10 мМ калий-фосфат, pH 7.4). (a) - dU2: $\varepsilon = 2.10 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 643 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 661 \text{ нм}$, квантовый выход Q = 12%; (6) - dU49: $\varepsilon = 2.12 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 647 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 664 \text{ нм}$, квантовый выход Q = 36%; (в) - dU83: X = $-\text{CH}_2$, $\varepsilon = 1.95 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 744 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 767 \text{ нм}$, квантовый выход Q = 27%; (г) - dU84: X = $-(\text{CH}_2)_5 \text{NHCOCH}_2$, $\varepsilon = 1.99 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 744 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 767 \text{ нм}$, квантовый выход Q = 29%.

4 мкМ практически не ингибируют ПЦР, именно эта концентрация была выбрана в качестве рабочей в дальнейших экспериментах.

Для сравнительной оценки аналитической чувствительности метода при использовании различных флуоресцентно-меченных трифосфатов проводили ПЦР с последовательными разведениями ДНК-мишени таким образом, что в реакции ПЦР использовали 5, 0.5 и 0.05 нг ДНК. Далее флуоресцентно-меченные продукты ПЦР гибридизовали с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биочипа. На рис. 5 представлены результаты гибридизационного анализа при количестве исходной ДНК мишени 5 нг в одной реакции ПЦР. Гибридизационный анализ проводили в двух форматах: 1) три моноплексные ПЦР с последующей мультиплексной гибридизацией и 2) мультиплексная ПЦР с тремя парами праймеров и мультиплексная гибридизация. Как видно, dU84 демонстрирует наиболее четкое распределение и наибольшую интенсивность флуоресцентных сигналов как в моноплексном, так и в мультиплексном формате ПЦР. В целом интенсивность флуоресцентных сигналов на биочипе заметно выше для Cy7-dUTP по сравнению с Cy5-dUTP. Среди производных Cy5-dUTP наиболее четкую картину наблюдали для dU49 по сравнению с dU2, это различие более заметно при проведении ПЦР в мультиплексном формате (рис. 5в).



Рис. 2. Ингибирование полимеразной цепной реакции в зависимости от концентрации Cy5- и Cy7-dUTP. По оси ординат – скорость реакции в присутствии Cy-dUTP, нормированная на скорость реакции без добавления модифицированного нуклеотида, по оси абсцисс – различные соединения-аналоги Cy5 и Cy7 в концентрации 20, 8 и 4 мкМ соответственно.

Чувствительность и специфичность гибридизации также зависит от последовательности самого олигонуклеотидного зонда и вторичной структуры участвующего в гибридизации ПЦР-продукта. Это приводит к тому, что при уменьшении количества ДНК-мишени наблюдается «выпадание» сигналов, в первую очередь от тех зондов, которые по ряду причин образуют совершенные дуплексы с меньшей температурой плавления. Дальнейшие измерения интенсивности флуоресцентных сигналов для dU2, dU49, dU83 и dU84 при различных количествах ДНК-мишени проводили для наиболее сильно гибридизующегося зонда N3 (рис. 6). В целом интенсивность флуоресцентных сигналов для Cy7-dUTP существенно выше по сравнению с Cy5-dUTP. При количестве исходной ДНК, равном 5 нг, различие между dU84 и dU2, dU49 составляет около одного порядка. Интенсивность сигнала при минимальном количестве ДНК (0.05 нг) для dU84 достаточно высока и составляет около 40% от уровня сигнала при 5 нг ДНК, в то время как для dU2 и dU49 флуоресцентные сигналы едва превышают фон.



Рис. 3. Электрофореграммы ПЦР-продуктов, полученных в реакции с Cy5-dUTP (а) и Cy7-dUTP (б). Вверху – детекция по каналу SYBR Green, внизу – по каналу Cy5 (а) и Cy7 (б). Дорожки 1, 2, 3 – dU2, 5, 6, 7 – dU49, 10, 11, 12 – dU83, 14, 15, 16 – dU84 в концентрациях 20, 8 и 4 мкМ каждый соответственно; 4 и 13 – пустой гель; 8 и 17 – продукт ПЦР без модифированного нуклеотида; 9 и 18 – маркер длины фрагментов PUC19.



Рис. 4. Результаты количественного определения эффективности встраивания модифицированных нуклеотидов Cy5dUTP и Cy7-dUTP. По оси ординат – нормированное значение эффективности встраивания (эффективность встраивания в процентном отношении к максимальному значению для dU2), по оси абсцисс – различные соединения-аналоги Cy5 и Cy7 в концентрации 20, 8 и 4 мкМ соответственно.

Более длительное время экспозиции биочипа при регистрации флуоресцентного сигнала приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, однако эта зависимость проявляется по разному для Cy5- и Cy7-dUTP (рис. 7а). Для dU84 (Cy7-dUTP) наблюдали быстрый рост флуоресцентных сигналов при выдержках от 50 до 400 мс, при дальнейших измерениях интенсивность флуоресценции достигала максимума и выходила за пределы динамического диапазона регистрирующего устройства, в то же время фоновая флуоресценция продолжала расти. Для dU49 (Cy5-dUTP) общая интенсивность флуоресценции была существенно ниже, регистрация при всех выдержках от 50 до 800 мс происходила в пределах динамического диапазона, поэтому мы наблюдали постоянный рост интенсивности флуоресцентных сигналов от ячеек с совершенными дуплексами при очень низкой фоновой флуоресценции. Эта картина наглядно воспроизводится при определении отношения сигнала от совершенных дуплексов к фоновой флуоресценции пустого геля (рис. 76). При выдержках от 50 до 300 мс это отношение заметно выше для dU84, при времени экс-



Рис. 5. Результаты гибридизационного анализа при количестве исходной ДНК-мишени 5 нг в реакции ПЦР. (a) – Схема расположения олигонуклеотидных зондов на биочипе: 0 – пустой гель, N1 – rs4808801 (аллели A и G), N2 – rs4849887 (аллели C и T), N3 – rs4973768 (аллели C и T); серым цветом отмечены ячейки, соответствующие генотипу данного образца AG/CC/CC. (б) и (в) – Картины гибридизации после ПЦР с добавлением различных Cy-dUTP (выдержка 300 мс): (б) – моноплексный формат ПЦР (три параллельные реакции с гибридизацией на одном биочипе); (в) – мультиплексный формат ПЦР (одна реакция с тремя парами праймеров в одной пробирке).


Рис. 6. Результаты гибридизационного анализа. По оси ординат – интенсивность флуоресцентного сигнала от совершенных дуплексов для олигонуклеотидного зонда N3; по оси абсцисс – различные соединения-аналоги Су5 и Су7 при количестве исходной ДНК-мишени 5, 0.5 и 0.05 нг соответственно (выдержка 300 мс).



Рис. 7. Интенсивность флуоресценции для Cy5-dU49 и Cy7-dU84 в зависимости от длительности выдержки при регистрации картины гибридизации. По оси ординат: (а) – абсолютные значения интенсивности сигналов от совершенных дуплексов и ячейки с пустым гелем (фоновая флуоресценция геля), (б) – отношение сигнал/фон; по оси абсцисс – выдержка при регистрации сигналов в мс.

позиции более 400 мс это преимущество утрачивается в связи с ограничениями самой системы регистрации флуоресценции.

Известно, что применение красителей, флуоресцирующих при возбуждении в красной области спектра, позволяет повысить чувствительность анализов за счет уменьшения интенсивности флуоресценции компонентов исследуемого объекта, подложки, реагентов для проведения анализа [6, 7]. В настоящее время в качестве флуоресцентных меток в молекулярно-биологических исследованиях, включая исследования, проводимые с помошью биочипов, широко используют красители, флуоресцирующие в красной области спектра [20, 21]. Переход к красителям ближнего инфракрасного диапазона позволяет повысить надежность регистрации целевого флуоресцентного сигнала на фоне флуоресцирующих примесей [10].

Ранее при анализе флуоресценции ячеек, содержащих растворы красителей Су5 и Су7 с различной концентрацией, было показано, что при одной и той же концентрации краситель Су7 давал более высокую интенсивность флуоресцентного сигнала по сравнению с красителем Су5 [18]. Гибридизационный анализ продуктов ПЦР является многоэтапным процессом. Помимо спектральных характеристик самих красителей на интенсивность флуоресцентных сигналов оказывают влияние эффективность встраивания модифицированных нуклеотидов в анализируемую ДНК, количество наработанного продукта при проведении ПЦР, константа связывания ПЦРпродукта с комплементарным зондом и способность неспецифически связываться с некомплементарными зондами и элементами биочипа, а также характеристики самого регистрирующего устройства [19].

По результатам комплексного исследования показано, что Cy7-dUTP обладают рядом преимуществ по сравнению с Cy5-dUTP в качестве флуоресцентной метки при маркировании ДНК для гибридизационного анализа. Более высокая интенсивность регистрируемых сигналов, высокая эффективность встраивания в ходе ПЦР, меньшее влияние на специфичность взаимодействия праймеров с ДНК-мишенью обеспечивают более высокую аналитическую чувствительность метода, что дает возможность использовать более высокий уровень мультиплексности ПЦР при использовании флуоресцентно-меченных Cy7dUTP по сравнению с Cy5-dUTP.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 05.604.21.0234, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0234).

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. R. T. Ranasinghe and T. Brown, Chem. Commun. 44, 5487 (2005).
- 2. M. Dullaert-de Boer, O. W. Akkerman, M. Vermeer, et al., PLoS One **13** (1), e0190847 (2018).
- J. L. Ballard, V. K. Peeva, C. J. deSilva, et al., Mol. Biotechnol. 36 (3), 175 (2007).
- 4. E. Terpetsching and O. S. Wolfberg, in *Near-Infrared Dyes for High Technology Applicatios*. NATO ASI Series. Series 3. High Technology (Kluwer Acad. Publ., 1998), vol. 52, p. 161.
- 5. E. Soini and I. Hemmila. Clin. Chem. **25** (3), 353 (1979).
- S. Daehne, U. Resch-Genger, and O. S. Wolfberg, in Near-Infrared Dyes for High Technology Applicatios. NATO ASI Series. Series 3. High Technology (Kluwer Acad. Publ., 1998), vol. 52, p. 458.
- 7. G. Patonay and M. D. Antoine, Anal. Chem. **63** (6), 321a (1991).
- W. M. Leevy, S. T. Gammon, and J. R. Johnson. Bioconj. Chem. 19, 686 (2008).
- B. A. Smith, W. J. Akers, and W. M. Leevy, Am. Chem. Soc. 132 (1), 67 (2010).
- 10. A. E. Boyer, M. Lipowska, J.-M. Zen, and G. Patonay. Anal. Lett. **25** (3), 415 (1992).
- 11. M. A. Spitsyn, V. E. Kuznetsova, V. E. Shershov, et al., Dyes and Pigments **147**, 199 (2017).
- O. A. Zasedateleva, V. A. Vasiliskov, S. A. Surzhikov, et al., Nucl. Acids Res. 46, e732018 (2018).
- Д. О. Фесенко, Т.О. Гусейнов, С.А. Лапа и др., Молекуляр. биология 52 (3), 533 (2018).
- В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, Ю. П. Лысов и др., Биофизика 60 (6), 1216 (2015).
- 15. Т. С. Лисица, В. Е. Шершов, М. А. Спицын и др., Биофизика **62** (3), 464 (2017).
- 16. М. А. Спицын, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов и др., Биоорган. химия **43** (4), 444 (2017).
- 17. В. Е. Шершов, А. Ю. Иконникова, В. А. Василисков, С. А. Лапа и др., Биофизика **65** (5), 865 (2020).
- М. А. Спицын, В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова и др., Молекуляр. биология 49 (5), 760 (2015).
- Y. Lysov, V. Barsky, D. Urasov, et al., Biomed. Opt. Express 8 (11), 4798 (2017).

2021

Nº 1

БИОФИЗИКА том 66

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА

 W. Li, F. Jiangli, Q. Xiaoqiang, et al., Photobiol. A: Chemistry 210, 168 (2010).
W. Lee, P. H. von Hippel, and A. H. Marcus, Nucl. Acids Res. 42, 5967 (2014).

Evaluation of the Effectiveness of Hybridization Analysis when DNA is Labeled with Red and Near-Infrared Cyanine Dyes

A.Yu. Ikonnikova, V.E. Shershov, Yu.V. Moroz, V.A. Vasiliskov, S.A. Lapa, R.A. Miftakhov, V.E. Kuznetsova, A.V. Chudinov, and T.V. Nasedkina

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

We present a study of the sensitivity of hybridization analysis using a biological microchip when DNA is labeled with 2'-deoxyuridine¬-5'-triphosphates derivatives containing cyanine dyes Cy5 and Cy7 used as fluorophores. Two Cy5-dUTP and two Cy-7-dUTP dye analogs that can be effectively incorporated into a newly synthesized DNA strand during PCR were chosen for this study. The PCR products fluorescently labeled with different dyes were hybridized with a matrix of oligonucleotide probes immobilized within the microchip hydrogel cells. Fluorescent signals were recorded on a digital fluorescence microscope in the red (for Cy5-dUTP) and near-infrared (for Cy-7-dUTP) range. The minimum DNA concentration needed for genotypic studies at the end point of the relationship between the fluorescent-labeled PCR product and oligonucleotide probes on the biochip was determined using the serial dilution method. It was shown that the fluorescent labeled Cy7-dUTP unlike Cy5-dUTP provides greater sensitivity of hybridization analysis.

Keywords: fluorescence, modified nucleotides, cyanine dyes, red range, near-infrared range, biological microarray, allele-specific hybridization

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 519.876.5

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ СТАРОМЕСТНЫХ СОРТОВ НУТА

© 2021 г. А.Б. Соколкова*, С.В. Булынцев**, П.Л. Чанг***, Н. Карраскила-Гарсия***, Д.Р. Кук***, Э. Веттберг****, М.А. Вишнякова*****, С.В. Нуждин*, ******, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,

195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

**Кубанская опытная станция Федерального исследовательского центра «Всероссийского института генетических

ресурсов растений им. Н.И. Вавилова»,

352183, Краснодарский край, Гулькевичский район, пос. Ботаника, Центральная ул., 2

***Калифорнийский университет в Дэвисе, 95616, Дэвис, США

****Университет Вермонта, 05405, Берлингтон, США

*****Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений

им. Н.И. Вавилова», 190000, Санкт-Петербург, Большая Морская ул., 42-44

*****Университет Южной Калифорнии, 90089, Лос-Анджелес, США

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru Поступила в редакцию 20.11.2020 г. После доработки 20.11.2020 г. Принята к публикации 27.11.2020 г.

Коллекция банка семян Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) содержит староместные сорта, собранные в основных исторических центрах выращивания нута и его вторичной диверсификации. В статье приведен анализ результатов фенотипирования 407 староместных сортов нута на полях Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. Проведенный GWAS-анализ выявил три однонуклеотидных полиморфизма на хромосомах 2, 7 и 8, значимо ассоциированных с фенотипическим признаком «число дней цветения». Эти однонуклеотидные полиморфизмы и районы генома рядом с ними были идентифицированы в предыдущих исследованиях. При оценке взаимодействия «генотип–среда» были выявлены «лучшие» в средах генотипы для фенотипических признаков, связанных с семенами растений. Найденные генотипы имеют альтернативную гомозиготу в позиции Са7:30930779, которая значимо ассоциирована с данными фенотипическими признаками при фенотипировании на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. и с периодом цветения при фенотипировании в 2017 г. Полученные результаты могут ускорить поиск образцов коллекции наиболее перспективных для возделывания сортов нута.

Ключевые слова: нут (Cicer arietinum L.), генотипирование путем секвенирования, однонуклеотидные полиморфизмы, геномный анализ ассоциаций, GGE biplot анализ. DOI: 10.31857/S0006302921010051

Нут (*Cicer arietinum*) является одним из наиболее широко выращиваемых зернобобовых культур в мире и обеспечивает жизненно важный источник диетического белка для ~15% населения земного шара. Нут был впервые одомашнен примерно 10 тыс. лет назад в регионе Плодородного полумесяца и затем распространился в Индию (~6000 лет назад), а также в Эфиопию и Северную Африку (~3000 лет назад) [1]. В статье проведен анализ 407 староместных сортов, собранных из основных исторических центров выращивания нута и его вторичной диверсификации. Эти образцы являются частью коллекции банка семян Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) в Санкт-Петербурге, которая была сформирована в результате экспедиций под руководством Н.И. Вавилова в 1911–1940 гг.

В нашей предыдущей работе [2] был проведен геномный анализ ассоциаций (GWAS) для поиска статистически значимых ассоциаций между однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП) и фенотипическими признаками, измеренными на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. GWAS-анализ выявил большое количество геномных интервалов и потенциальных генов-кандидатов, которые могут влиять на важные агрономические признаки. Кроме того, в работе [3] мы идентифицировали 13 ОНП, ассоциированных с

Сокращения: GWAS – геномный анализ ассоциаций, ОНП – однонуклеотидные полиморфизмы.

Фенотипический признак	Единица измерения
Поражаемость аскохитозом	балл
Число дней от начала цветения до начала созревания	дни
Число дней цветения	дни
Число дней созревания	дни
Число дней от посева до начала всходов	дни
Число дней от начала всходов до начала цветения	дни
Число дней от начала всходов до начала созревания	дни
Число дней от начала всходов до конца цветения	дни
Число дней от начала всходов до конца созревания	дни

Таблица 1. Фенотипические признаки, оцененные в 2017 г. на Кубанской опытной станции, отобранные для GWAS анализа

биоклиматическими переменными в местах сбора образцов и являющимися сильными кандидатами как маркеры локальной адаптации.

В 2017 г. на полях Кубанской опытной станции ВИР был осуществлен посев 407 образцов нута, фенотипированных там же в 2016 г., но на другом месте в соответствии с севооборотом. Был проведен GWAS-анализ для поиска значимо ассоциированных ОНП с фенотипическими признаками и сравнение результатов с найденными районами генома в анализе данных 2016 г.

Известно, что в структуре фенотипической изменчивости количественных признаков, с которыми имеет дело селекция, большую роль играет взаимодействие «генотип-среда». Для оценки стабильности и адаптивности генотипов был проведен GGE (genotype plus genotype-environment interaction) biplot-анализ для трех фенотипических признаков: число дней цветения, число семян на одно растение и вес семян с одного растения. При оценке взаимодействия «генотипсреда» были использованы значения фенотипических признаков, измеренных на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 и 2017 гг., а также фенотипические признаки, измеренные в 2000-2005 гг. при посеве староместных сортов нута на опытной станции организации ICARDA (Международный центр сельскохозяйственных исследований засушливых регионов) в Алеппо (Сирия). Полученные результаты могут быть использованы в будущем для отбора генотипов с лучшими значениями фенотипов и фенотипической стабильностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетический материал и геномные данные. Генетический материал был получен из староместных образцов нута, собранных в 1920—1930 гг. в основных исторических центрах выращивания нута и его вторичной диверсификации, сохраняемых в коллекции ВИР. В изучение вошли образ-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

цы, собранные на Ближнем Востоке, в Северной Африке, Пакистане, Марокко, Бирме, Средней Азии, европейской части бывшего СССР и др. Для осуществления генотипирования путем секвенирования (GBS) был использован протокол из статьи [4]. Данные секвенирования доступны в базе данных Национального центра биотехнологий, код BioProject PRJNA388691. Набор ОНП, использованных в данной работе был получен в статье [2]: поиск ОНП был произведен с помощью программы Genome Analysis Tool Kit (GATK) [5], после фильтрации полученных ОНП с помощью программы VCFtools [6] для дальнейшего анализа были использованы 407 образцов нута и 2579 найденных у них ОНП. Обозначения образцов приведены в соответствии с их нумерацией при поиске ОНП.

Фенотипирование образцов на полях Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. В 2017 г. на полях Кубанского филиала ВИР был осуществлен посев 407 образцов нута из набора, изученного там же в 2016 г. Климат Кубанской опытной станции хорошо подходит для выращивания нута. Все агротехнические приемы при обработке почвы и посевы были идентичны 2016 г. Описание фенотипирования в 2016 г. приведено в статье [2].

Для проведения GWAS-анализа были выбраны девять фенотипических признаков (см. табл. 1), значения которых были измерены для всей выборки из 407 образцов, изученных в нашей предыдущей работе [2].

Для проведения GGE biplot-анализа были отобраны три фенотипических признака (число дней цветения, число семян на одно растение и вес семян с одного растения), оценка которых была произведена ранее на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. и в другой локации — на опытной станции организации ICARDA в Алеппо.

Статистический анализ количественных фенотипических признаков был выполнен с помощью программной среды R [7].

GWAS-анализ был проведен с использованием линейных смешанных моделей, реализованных в пакете программ FaST-LMM [8]. Анализ главных компонент 2579 ОНП, проведенный в программной среде R [7], выявил, что первые восемь главных компонент объясняют 48% вариабельности всех ОНП. Поэтому для учета популяционной структуры линейная смешанная модель была применена ко всем фенотипическим признакам с восемью главными компонентами, которые были использованы в качестве ковариатов. Для каждого фенотипического признака результат GWAS анализа был подвержен коррекции на множественное тестирование [9] с пороговым значением 0.05. Кроме того, для определения значимо ассоциированных с фенотипическими признаками ОНП был использован параметр геномного контроля (λ_{GC}).

GGE biplot-анализ. Для проведения GGE biplot-анализа были отобраны три фенотипических признака: число дней цветения, число семян на одно растение и вес семян с одного растения. Эти фенотипические признаки были оценены в двух разных локациях: на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 и 2017 гг. и на опытной станции организации ICARDA в Алеппо. Посев староместных сортов нута в Сирии проводили в 2000-2005 гг. Для исследования были подсчитаны средние значения фенотипических признаков, измеренных в этот период. Значения фенотипических признаков, измеренных на Кубанской опытной станции ВИР, будут рассмотрены раздельно по году фенотипирования. Оценка взаимодействия генотип-среда для фенотипического признака число дней цветения была произведена для 63 генотипов, для которых фенотипический признак был измерен во всех трех средах. Оценка взаимодействия генотип-среда для фенотипических признаков число семян на одно растение и вес семян с одного растения была произведена для 32 генотипов. GGE biplot-анализ был проведен с помощью библиотеки в R metan (Multi-Environment Trial Analysis) [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотипирование на Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. В 2017 г. на полях Кубанской опытной станции ВИР был осуществлен посев 407 староместных образцов нута, изученных там же в 2016 г. Описание фенотипирования на Кубанской станции ВИР в 2016 г. приведено в нашей предыдущей работе [2]. Сумма активных температур за лето 2016 г. составила 3073°С. Абсолютный максимум составил 39.8°С во второй декаде июля. Летом 2016 г. были зарегистрированы два опасных явления: в июне ливневый дождь с выпадением града, в августе — сильная жара. Сезон 2017 г. отличался наступлением ранней весны. В течение весеннего периода наблюдались колебания температур и возврат холодных периодов. Сумма активных температур за весенний период составила 736°С, что на 59°С меньше нормы. В связи с этим посев образцов осуществляли на четыре дня позже по сравнению с 2016 г. (2 мая). Летний период характеризовался резкими колебаниями среднесуточных температур воздуха в июне и июле. Сумма активных температур за лето 2017 г. составила 2887°С. Абсолютный максимум составил 38.1°С во второй декаде августа. Кроме того, в августе зарегистрировано опасное явление – «сильная жара» продолжительностью 13 дней, максимальная температура воздуха превышала 35°С.

GWAS-анализ по результатам фенотипирования на Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. Для проведения GWAS-анализа по результатам фенотипирования в 2017 г. были выбраны девять фенотипических признаков (табл. 1), значения которых были измерены для всей выборки из 407 образцов, изученных в нашей предыдущей работе [2].

Для каждого фенотипического признака для учета популяционной структуры GWAS анализ был проведен с восемью главными компонентами в качестве ковариантов, которые были посчитаны на основе 2579 ОНП. GWAS-анализ выявил три ОНП на хромосомах 2, 7 и 8 соответственно, значимо ассоциированных с фенотипическим признаком «число дней цветения» (табл. 2).

ОНП Са2:17161884 значимо ассоциирован с периодом цветения на Кубани в 2017 г. Этот ОНП, как и ОНП Са2:17161867, ассоциированный с весом растения без бобов при фенотипировании на Кубани в 2016 г. [2], находится в области интрона гена Са_16015 (табл. 2). Ген Са_16015 кодирует фосфоенолпируваткарбоксилазу – фермент, участвующий в фиксации углерода и цикле трикарбоновых кислот [11]. ОНП Са7:30930779 значимо ассоциирован с периодом цветения на Кубани в 2017 г. и с фенотипическими признаками, измеренными на Кубани в 2016 г. – числом семян на одно растение и весовыми характеристиками образцов [2] (табл. 2). ОНП на восьмой хромосоме Са8:10314452, ассоциированный с периодом цветения на Кубани в 2017 г., также был идентифицирован в наших предыдущих исследованиях. Этот ОНП значимо ассоциирован с весовыми характеристиками растений при фенотипировании на Кубани в 2016 г. [2] (табл. 2). Кроме того, при поиске ОНП, значимо ассоциированных с биоклиматическими переменными в местах сбора образцов в работе [3], две биоклиматические переменные SMS1 и SMS3, которые включают температурные характеристики, были совместно ассоциированы с ОНП Са8:10314452 (табл. 2). ОНП Ca8:10314452 находится на расстоянии ~25 kb от

Позиция	Хромосома	Признак	Ген
17161867	Cal	Вес растения без бобов, Кубань 2016 [2]	Ca_16015
17161884	Caz	Число дней цветения, Кубань 2017	
		Число семян на одно растение, Кубань 2016 [2]	
		Вес растения без бобов, Кубань 2016 [2]	
30930779	Ca7	Число дней цветения, Кубань 2017	
30330773	Car	Вес семян с одного растения, Кубань 2016 [2]	_
		Вес растения, Кубань 2016 [2]	
		Вес бобов, Кубань 2016 [2]	
		Вес растения без бобов, Кубань 2016 [2]	
10314452		Число дней цветения, Кубань 2017	
	Ca8	Вес растения, Кубань 2016 [2]	_
		SMS1 [3]	
		SMS3 [3]	

Таблица 2. ОНП, выявленные по результатам GWAS анализа и их связь с ОНП, выявленными в наших предыдущих исследованиях

ОНП, ассоциированного с весом растения в работе [12].

GGE biplot-анализ. Для оценки взаимодействия генотип-среда был использован GGE biplot-анализ. В работе рассматривали три среды выращивания староместных сортов нута: Кубанская опытная станция ВИР в 2016 г., Кубанская опытная станция ВИР в 2017 г. и опытная станция организации ICARDA в Алеппо (Сирия). Описание фенотипирования на Кубанской опытной станции и климатические условия выращивания в 2016 и 2017 гг. приведены выше. Фенотипирование в Сирии проводили в 2000-2005 гг. в условиях засушливого климата. Посев образцов проводили в феврале, а сбор урожая – в августе. Описание анализа фенотипических признаков, изученных в Сирии, приведено в работе [13]. Для исследования были рассчитаны средние значения фенотипических признаков, измеренных в указанный период. Для проведения GGE biplot-анализа отобраны три фенотипических признака, оценка которых была произведена во всех трех средах число дней цветения, число семян на одно растение и вес семян с одного растения.

Оценка стабильности и адаптивности генотипов для фенотипического признака «число дней цветения» была произведена для 63 генотипов. В табл. 3 представлены описательные статистики фенотипического признака с учетом среды фенотипирования.

GGE biplot-анализ показал, что первые две главные компоненты объясняют 86.5% от общей изменчивости, вызванной взаимодействием «генотип—среда» (рис. 1). Визуализация GGE biplotанализа, представленная на рис. 1, дает возможность оценить генотипы по их стабильности и

Признак	Среднее	Медиана	Стандартное отклонение	Минимальное значение	Максимальное значение
Число дней цветения, Кубань 2016	17.56	16	5.98	8	40
Число дней цветения, Кубань 2017	19.67	20	3.94	10	29
Число дней цветения, Сирия	26.73	28	4.26	9	34

Таблица 3. Описательные статистики фенотипического признака «число дней цветения»



Рис. 1. Визуализация GGE biplot-анализа для фенотипического признака «число дней цветения». Ранжирование генотипов по значению фенотипического признака и стабильности.

ранжировать их по значению фенотипического признака. Среднее значение фенотипа для каждого генотипа оценивается по проекции их маркеров на ось, обозначенную на рисунке стрелкой. Стабильность оценивается по проекции на ось, перпендикулярную данной оси. Таким образом, можно сделать вывод, что генотип VT0054_0897 имеет максимальное среднее значение, а генотип VT0031_0603 имеет минимальное среднее значение фенотипического признака число дней цветения. Кроме того, генотипы VT0050_0874 и VT0054_0897 проявили себя как наиболее вариабельные.

Оценка взаимодействия «генотип-среда» для фенотипического признака число семян на одно растение была произведена для 32 генотипов. В табл. 4 представлены описательные статистики фенотипического признака с учетом среды фенотипирования.

GGE biplot-анализ показал, что первые две главные компоненты объясняют 82% от общей изменчивости, вызванной взаимодействием «генотип-среда» (рис. 2а,б). Из визуализации GGE biplot-анализа, представленной на рис. 2а, мы можем сделать вывод, что генотип VE0119 0694 имеет максимальное среднее значение, а генотип VT0028_0599 — минимальное среднее значение фенотипического признака «число семян на одно растение». Генотип VT0039_0793 является самым вариабельным. При визуализации GGE biplotанализа, представленной на рис. 26, можно выделить генотипы, объединяющие высокие значения фенотипического признака и стабильность. Центр концентрических кругов представляет собой положение «идеального» генотипа, который



Рис. 2. Визуализация GGE biplot-анализа для фенотипического признака «число семян на одно растение»: (а) – ранжирование генотипов по значению фенотипического признака и стабильности, (б) – ранжирование генотипов по близости к «идеальному» генотипу.

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ СТАРОМЕСТНЫХ СОРТОВ НУТА

Признак	Среднее	Медиана	Стандартное отклонение	Минимальное значение	Максимальное значение
Число семян на одно растение, Кубань 2016	77.31	69.5	37.35	17	176
Число семян на одно растение, Кубань 2017	123.97	122	45.69	47	254
Число семян на одно растение, Сирия	65.95	37.5	53.11	18	196

Таблица 4. Описательные статистики фенотипического признака «число семян на одно растение»

Ta	блица 5.	C	Описательные	статистики	фенотипиче	ского	признака	«вес	семян	с одного	растения
					·						÷

Признак	Среднее	Медиана	Стандартное отклонение	Минимальное значение	Максимальное значение
Вес семян с одного растения, Кубань 2016	14.75	12.1	9.29	3.5	46.8
Вес семян с одного растения, Кубань 2017	19.73	20.6	7.27	7.5	44.2
Вес семян с одного растения, Сирия	19.79	20.05	7.78	6.9	52.1

может и не существовать, но его можно использовать в качестве эталонного генотипа. Можно сделать вывод, что для фенотипического признака «число семян на одно растение» наиболее желательным является генотип VE0119_0694, максимально приближенный к «идеальному» генотипу.

Оценка стабильности и адаптивности генотипов для фенотипического признака «вес семян с одного растения» была произведена для 32 генотипов. В табл. 5 представлены описательные статистики фенотипического признака с учетом среды фенотипирования.

GGE biplot-анализ показал, что первые две главные компоненты объясняют 78% от общей изменчивости, вызванной взаимодействием «генотип-среда» (рис. 3а,б). При визуализации GGE biplot-анализа, представленной на рис. 3а, можно сделать вывод, что генотип VT0040_0856 имеет максимальное среднее значение, а генотип VE0147_0766 — минимальное среднее значение фенотипического признака «число семян на одно растение». Кроме того, генотипы VT0039_0793 и VT0040_0856 являются самыми вариабельными. При визуализации GGE biplot-анализа, представленной на рис. 36, можно сделать вывод, что генотип VT0010_0351 является наиболее приближенным к «идеальному» генотипу.

Для фенотипических признаков «число семян на одно растение» и «вес семян с одного расте-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

ния» наиболее информативным является представление результатов GGE biplot-анализа в виде многоугольника «где какой генотип выигрывает» (рис. 4а,б). Пунктирные линии, которые делят график на сектора, разделяют его на набор сред. Генотипы, являющиеся вершинами многоугольника, имеют наибольшее значение фенотипического признака в средах, попадающих в один с ними сектор. Для фенотипического признака «число семян на одно растение» генотип VT0039 0793 был лучшим в среде «Кубань, 2016»; генотип VE0119 0694 – в среде «Кубань, 2017»; генотип VE0125 0730 – в среде «Сирия» (рис. 4а). Для фенотипического признака «вес семян с одрастения» генотипы VT0040 0856 и ного VE0125 0730 были лучшими в средах «Кубань, 2017» и «Сирия», образующих мега-среду, а генотип VT0039 0793 – в среде «Кубань, 2016» (рис. 4б).

Для фенотипического признака «число семян на одно растение» при фенотипировании на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. в нашей предыдущей работе [2] был найден значимо ассоциированный с этим признаком ОНП на седьмой хромосоме Са7:30930779. В табл. 6 представлены значения генотипов, которые являются «лучшими» в средах в этой позиции. Интересным является то, что генотип VT0039_0793, являющийся «лучшим» в среде «Кубань, 2016» и генотип



Рис. 3. Визуализация GGE biplot-анализа для фенотипического признака «вес семян с одного растения»: (а) – ранжирование генотипов по значению фенотипического признака и стабильности, (б) – ранжирование генотипов по близости к «идеальному» генотипу.

VE0125_0730, являющийся «лучшим» в среде «Сирия», имеют альтернативную гомозиготу (1/1) в позиции Ca7:30930779. Из 32 анализируемых генотипов только у шести генотипов в данной позиции присутствует альтернативная гомозигота (1/1).

Для фенотипического признака «вес семян с одного растения» при фенотипировании на Ку-



Рис. 4. Визуализация GGE biplot-анализа в виде многоугольника «где какой генотип выигрывает» для фенотипического признака «число семян на одно растение» (а) и признака «вес семян с одного растения» (б).

Среда	Кубань, 2016	Кубань, 2017	Сирия
Генотип VT0039_0793		VE0119_0694	VE0125_0730
Ca7:30930779 1/1		0/1	1/1

Таблица 6. Значения генотипов, которые являются «лучшими» в средах, в позиции, найденной в GWAS-анализе для фенотипического признака «число семян на одно растение»

Таблица 7. Значения генотипов, которые являются «лучшими» в средах, в позициях, найденных в GWAS-анализе для фенотипического признака «вес семян с одного растения»

Среда/Мега-среда	Кубань, 2	Кубань, 2016	
Генотип	VT0040_0856	VE0125_0730	VT0039_0793
Ca4:33967674	1/1	0/0	0/0
Ca7:30930779	0/1	1/1	1/1

банской опытной станции ВИР в 2016 г. в нашей предыдущей работе [2] были обнаружены два значимо ассоциированных с этим признаком ОНП: на четвертой хромосоме Са4:33967674 и тот же ОНП на седьмой хромосоме, что и для признака «число семян на одно растение» Са7:30930779. В табл. 7 представлены значения генотипов, которые являются «лучшими» в средах, в этой позиции.

ОБСУЖДЕНИЕ

В структуре фенотипической изменчивости количественных признаков, с которыми имеет дело селекция, большую роль играет взаимодействие «генотип-среда». Для более объективной оценки фенотипических признаков в 2017 году на полях Кубанской опытной станции ВИР был осуществлен посев 407 староместных образцов нута, фенотипированных там же в 2016 г. Проведенный GWAS-анализ выявил три ОНП на хромосомах 2, 7 и 8 соответственно, значимо ассоциированных с фенотипическим признаком число дней цветения на Кубани в 2017 г. Найденные ОНП попадают в районы генома, ранее идентифицированные в GWAS-анализе по результатам фенотипирования на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. [2]. GGE biplot-анализ фенотипических признаков, связанных с семенами растений, - числом семян на одно растение и весом семян с одного растения — выявил два «лучших» в средах геноти-VT0039 0793 и VE0125 0730. Генотип па: VT0039 0793, собранный в Турции, был «лучшим» в среде «Кубань, 2016» для обоих фенотипических признаков. Генотип VE0125 0730, собранный в Эфиопии, был «лучшим» в среде «Сирия»

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

для фенотипического признака «число семян на одно растение». Также в мегасреде «Кубань, 2017» и «Сирия» этот генотип был «лучшим» для фенотипического признака «вес семян с одного растения». Объяснением того, что образцы, собранные в Турции и Эфиопии, проявили себя как «лучшие» в средах «Кубань, 2016» и «Сирия» соответственно, может быть близость погодных условий в годы исследования. Генотипы VT0039 0793 и VE0125 0730 имеют альтернативную гомозиготу в позиции Са7:30930779, которая значимо ассоциирована с фенотипическими признаками «число семян на одно растение» и «вес семян с одного растения» при фенотипировании на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. Кроме того, данный ОНП значимо ассоциирован с периодом цветения при фенотипировании на Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. Из 32 анализируемых в GGE biplot-анализе генотипов, только у шести генотипов в данной позиции присутствует альтернативная гомозигота. Результаты данной работы могут помочь селекционерам в отборе наиболее перспективных для возделывания староместных сортов нута из коллекции банка семян ВИР.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Фенотипирование на Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г., GWAS- и GGE biplot-анализы были поддержаны грантом Российского научного фонда № 16-16-00007 (для АБС, СВН, МГС). Работа была также поддержана соглашением о сотрудничестве от Агентства США по международному развитию в рамках программы «Накорми будущее» AID-OAA-A-14-00008 (для ДК, ПЧ, СВН), Фондом Зумберджа (для СВН), грантом IOS-1339346 от Программы генома растений Национального научного фонда США (для ДК).

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

- R. J. Redden and J. D. Berger, In *Chickpea Breeding & Management*, Ed. by S. S. Yadav, R. Redden, W. Chen, B. Sharma (CABI, Wallingford, UK, 2007), pp. 1–13.
- 2. A. Sokolkova, et al., Int. J. Mol. Sci. 21, 3952 (2020).
- 3. А.Б. Соколкова и др., Биофизика 65 (2), 276 (2020).

- E. J. von Wettberg, P. L. Chang, A. Greenspan, et al., Nature Commun. 9, Art. 649 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-02867-z
- 5. A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, et al., Genome Res. 20, 1297 (2010).
- 6. P. Danecek, A. Auton, G. Abecasis, et al., Bioinformatics 27, 2156 (2011).
- R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018). Available online: https://www.R-project.org/ (accessed on 15 June 2020).
- 8. C. Lippert, J. Listgarten, Y. Liu, et al., Nat. Methods 8, 833 (2011).
- 9. J. D. Storey, Ann. Stat. 31, 2013 (2003).
- T. Olivoto and A. D. Lucio, Methods Ecol Evol. 11, 783 (2020). DOI: 10.1111/2041-210X.13384.
- R. Chollet, J. Vidal, M. H. O'Leary, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 273 (1996).
- 12. R. K. Varshney, M. Thudi, M. Roorkiwal, et al., Nat Genet. **51**, 857 (2019). DOI: 10.1038/s41588-019-0401-3.
- 13. E. Plekhanova, M. A. Vishnyakova, S. Bulyntsev, et al., Sci. Rep. 7, 4816 (2017).

Genomic Analysis of Historic Chickpea Landraces

A.B. Sokolkova^{*}, S.V. Bulyntsev^{**}, P.L. Chang^{***}, N. Carrasquila-Garcia^{***}, D.R. Cook^{***}, E. von Wettberg^{****}, M.A. Vishnyakova^{*****}, S.V. Nuzhdin^{*, ******}, and M.G. Samsonova^{*}

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

** Kuban Experimental Station, Federal Research Center "Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources", ul. Tsentralnaya 2, pos. Botanika, Gulkevichi District, Krasnodar Krai, 352183 Russia

*** University of California, Davis, California, 95616 United States of America

**** University of Vermont, Burlington, Vermont, 05405 United States of America

*****Federal Research Center "Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources", ul. Bolshaya Morskaya 42–44, St. Petersburg, 190000 Russia

******University of Southern California, Los Angeles, California, 90089 United States of America

The collection of seeds and living plants at N.I. Vavilov All Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) contains historic chickpea landraces sampled from major historic centers of chickpea cultivation and secondary diversification. In this work, we analyze the results obtained from phenotype characterization of 407 historic chickpea landraces grown in the trial fields of Kuban experimental station, VIR, in 2017. GWAS analysis identified three single nucleotide polymorphisms on chromosomes 2, 7 and 8, highly associated with the phenotype trait, i.e. days to flowering. These single nucleotide polymorphisms and the regions of genome near to these single nucleotide polymorphisms were identified in previous studies. Estimation of the Genotype-Environment interaction for phenotypic traits coincident with plant seeds led to identification of the "best" genotypes in the environments. These genotypes have an alternative homozygote at loci Ca7:30930779 which shows similar phenotypic traits described during phenotype characterization of seeds grown in the trial fields of Kuban experimental station, VIR in 2016 and with the period of flowering typical of phenotype characterization of plants in 2017. The obtained results can speed up the search for the seed samples most promising for cultivation of chickpea landraces.

Keywords: chickpea (Cicer arietinum L.), genotyping by sequencing, single nucleotide polymorphisms, genomewide association study, GGE biplot analysis

—— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.218

НЕЧЕТКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ СЕГМЕНТАЦИИ ДРОЗОФИЛЫ НА ЯЗЫКЕ ЛИНГВИСТИЧЕСКИХ ПРАВИЛ

© 2021 г. А.А. Макашов*, Е.М. Мясникова*, А.В. Спиров*, **

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29 **Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44 ***Институт научной информации по общественным наукам РАН, 117997, Москва, ул. Кржижановского, 15/2 *E-mail: alexander.spirov@gmail.com* Поступила в редакцию 26.12.2019 г. После доработки 12.08.2020 г. Принята к публикации 21.09.2020 г.

Понимание молекулярных механизмов регуляции генов — одна из фундаментальных проблем, на которые нацелена системная биология. В принятых подходах к моделированию генной регуляции зачастую невозможно отделить свойства модели, адекватно отображающие характеристики биологического объекта, от обусловленных природой модели. В данной работе развит логический подход к моделированию регуляции экспрессии генов, позволяющий в перспективе максимально использовать все имеющиеся эмпирические данные и минимизировать использование априорных гипотез. При этом правила регуляции генов формулируются в виде лингвистических (сформулированных на языке близком человеческому) условий. Авторы используют более точно отображающий реальность нечеткий подход, известный как нечеткое лингвистическое моделирование. Впервые лингвистическое моделирование использовано для разработки моделей активности цис-регуляторных модулей и применено к проблемам анализа экспрессии генов биохимической разметки эмбрионов. Такой подход позволил прояснить существенные детали механизмов «считывания» первичных морфогенетических градиентов двумя или более цис-регуляторными модулями одного гена в их взаимодействии.

Ключевые слова: регуляция генов, паттерны экспрессии, энхансеры, грамматика энхансеров, логическое моделирование, нечеткое моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302921010063

Понимание генной регуляции в целом и поведения генных регуляторных сетей (ГРС), в частности, это важнейшие фундаментальные проблемы, на которые нацелена современная системная биология. Для этих задач применяется подход, основанный на данных (data-driven approach), в котором имеющиеся данные используются для разработки модели, а затем выводы, полученные путем компьютерных тестов, проверяются новыми экспериментами, и эти новые результаты используются для улучшения модели [1]. Поэтому в системно-биологической парадигме равно важны как эксперименты, так и количественный анализ и моделирование полученных данных.

В настоящее время несколько разных подходов используются для изучения работы гена посредством моделирования [2]. Основная методологическая проблема в этой области заключается в том. что зачастую трудно или даже невозможно различить свойства модели, адекватно отображающие некоторые характеристики исследуемого биологического объекта, от тех свойств модели, которые обусловлены природой подхода к моделированию. Прежде всего это относится к проблеме выбора априорных гипотез при моделировании. Например, модели генной регуляции, исторически развиваемые в парадигме математической физики (прежде всего, модели реакциидиффузии), характеризуются рядом черт, обусловленных природой подхода, достаточно далекого от биологических реалий.

Одной из самых развитых областей системнобиологического анализа генной регуляции явля-

Сокращения: ГРС – генные регуляторные сети, ЦРМ – цис-регуляторные модули, $T\Phi$ – транскрипционные факторы, НЛМ – нечеткое лингвистическое моделирование.

ется моделирование динамики паттернов (биохимической разметки) эмбриона дрозофилы. Здесь наиболее популярными подходами являются нейросетевое (коннекционное, connectionist) и термодинамическое моделирование [3, 4]. Коннекционистские модели (или модели генных схем, gene circuits) относятся к классу «огрубленных» подходов, тогда как термодинамическое моделирование можно рассматривать как более детальный уровень моделирования [5]. Помимо этих подходов следует упомянуть упрощенные логические модели, опубликованные в начале 2000-х годов [6, 7], а также комбинированные модели последних лет, в которых объединяются транскрипционная модель и дифференциальные уравнения [8-10].

Коннекционистские модели рассматривают ГРС как простой однослойный перцептрон (искусственная нейронная сеть). Подход описывает ГРС системой уравнений математической физики (обычно уравнениями реакции-диффузии), по одному уравнению для скорости экспрессии каждого гена, при этом члены реакции основаны на матрице межгенных регуляторных взаимодействий (gene-gene action) [3, 5]. Метод неявно основан на ожидании того, что организация связей у хорошо обученного перцептрона будет соответствовать функциональной структуре изучаемой ГРС [11]. Эти ожидания очень старые, и такие модели, как оказалось, хороши для моделирования поведения ГРС в норме (дикого типа), но подобное моделирование не всегда подходит для того, чтобы предсказать последствия мутаций, возмущений или шума (низкая прогностическая сила [12]). Нам известны только работы по моделированию мутантов по генам *Kr* [13] и *bcd* [14].

Термодинамическое моделирование основано на экспериментальных или биоинформационных знаниях об организации регуляторных областей (энхансеров или цис-регуляторных модулей, ЦРМ) данного гена [2, 4, 15]. Это количественное моделирование для прогнозирования экспрессии генов исходя из анализа их нуклеотидной последовательности, и оно основано на подходах статистической термодинамики. Статистическая термодинамика характеризует специфическое связывание транскрипционных факторов (ТФ) с сайтами связывания на ДНК в равновесных условиях [16]. Таким образом, подход явно включает наши знания о сайтах связывания для ТФ, их силе, ориентации и точной позиции. Это дает ложное впечатление, что подход рассматривает точную экспериментально выявленную регуляторную организацию энхансеров. Но на самом деле это не так: подход обычно игнорирует многие детали иерархической организации регуляторных взаимодействий. Он обычно игнорирует неаддитивный, синергетический характер интеграции регуляторного входящего сигнала при помощи

ДНК-матрицы и механизма транскрипции (см. работы [4, 15]). Это прежде всего обусловлено существенной ограниченностью наших знаний о природе и молекулярных механизмах этой интеграции [17–20].

Все эти представления побуждают исследователей рассматривать другие подходы к моделированию поведения ГРС, более ориентированные на данные и позволяющие непосредственно включать в модель весь доступный эмпирический материал и делать это простым, естественным путем. Мы считаем, что наилучшим способом сделать это является дальнейшее развитие семейства разнообразных подходов, обычно называемых нечетким лингвистическим моделированием (НЛМ) [2]. Эти подходы, в частности, используют конструкции «если ..., в таком случае..., еще ...» («if ..., then..., else...») для словесного описания разнообразных взаимоотношений между регулирующими входными сигналами и путями их интеграции в выходные сигналы. Это позволяет сформулировать с помощью простых правил известные детали разнообразной и иерархической регуляторной организации генов.

В этой работе мы развиваем подход НЛМ к регуляции экспрессии генов с точностью до отдельных ЦРМов. Конкретно мы сосредоточимся на примере регуляций генов сегментации эмбриона дрозофилы, как одном из самых исследованных модельных объектов.

Нечеткие логические модели регуляции генов. Поведение биологических систем по своей природе нечеткое. Несмотря на то что новые высокопроизводительные технологии предоставляют биологам огромное количество ценных данных, необходимы методы, которые включают в моделирование погрешность (неточность, изменчивость), позволяя иметь дело со многими генами с невыясненной функцией и с «зашумленными» экспериментальными данными. Для получения биологически значимых результатов информация должна объединяться из разных источников для конструирования моделей ГРС. Такие нечеткие экспертные знания включают базы данных о генах и их продуктах, а также информацию о взаимодействиях между генами.

Нечеткая логика, как фундаментальная составляющая нечеткого метода, представляет собой комбинацию различных математических принципов представления знаний об изучаемом явлении в нечетком, не бинарном виде (в отличие от Булева подхода). Метод нечеткой логики состоит из ряда процедур, которые используются для сопоставления определенного входящего и ему соответствующего выходящего сигнала: процесс, называемый «нечетким выводом». Двумя наиболее известными методами вывода являются те, которые были связаны с именами Е. Mamdani

и М. Sugeno [21, 22]. Эти модели зависят от использования простого языка правил «if-then», описывающего ответ системы как функции нескольких лингвистических переменных.

Лингвистические описания (или описания на «естественных языках», в отличие от, например, формализма математической физики) наблюдаемых процессов могут быть легко переформулированы в предложения типа «if—then», которые отражают поведение системы, без необходимости использовать математические функции. Как правило, такие описания знаний на основе «естественного языка» явно или косвенно включают дискретизированные описания объектов или относятся к ним (например, низкие, средние и высокие концентрации).

Таким образом, представляется весьма перспективным развивать компьютерный подход, позволяющий прямое преобразование качественных знаний и описаний в создаваемую рабочую модель. При этом первым шагом будет найти подходящее формальное представление дискретных, неточных естественных языковых терминов, которые описывают состояния объектов. Второй шаг — найти подходящее формальное представление функций, которое позволит непосредственно объединить качественные знания на основе естественного языка и тем самым облегчить интерпретацию функциональности.

Развиваемый подход имеет отношение к логическому моделированию генной регуляции подходам к нахождению логик генной регуляции (gene-regulatory logic inferring [23]). Логические вентили (logic gates), которые используют более одного входа, уже давно применяются для описания сложных взаимодействий между ТФ, специфически связывающимися со своими сайтами на генно-регуляторном элементе. Регуляторная функция, которой описываются цис-регуляторные взаимодействия между ТФ, связанными со своими сайтами, и управляющими экспрессией их гена-мишени, может быть представлена в виде Булевых логик [21, 24]. Соответственно, переход от булевой логики к нечеткой представляется естественным обобщением.

В недавние годы опубликованы серии работ, реализующих моделирование на основе нечеткой логики (преимущественно, гибридные подходы) на уровне грубого моделирования ГРС (нечеткие модели генных сетей, fuzzy gene-circuit models) [25–29]. Вместе с тем в системной биологии продолжаются разработки моделей детального уровня, включающих формулирование генно-регуляторной логики (с целью расшифровать логику действия ТФ на генно-регуляторные элементы при контроле транскрипции) [30, 31]. Параллельно продолжаются работы по выяснению правил организации сайтов связывания для ТФ в функциональные генно-регуляторные модули, ЦРМ [32–36]. Это можно назвать грамматическими правилами для энхансера или грамматикой цисрегуляторного модуля [30, 31, 37]. Это способ переформулировать экспериментальные выводы, выраженные на языке экспериментаторов, на язык, используемый для разработки моделей. В свою очередь, область грамматики генно-регуляторных элементов естественно отнести к более общей области проблем на стыке молекулярной биологии и лингвистики [38, 39].

Несмотря на относительную развитость ряда направлений НЛМ на уровне грубого моделирования, попытки развить подходы нечеткого моделирования на уровне детального (fine-grained) описания находятся еще в самом зачаточном состоянии (см. работу [40]). В этой статье мы предлагаем нашу версию НЛМ на уровне детального моделирования. Мы соединяем подходы нечеткого моделирования с подходами, исходящими из формулировки правил грамматики цис-регуляторных элементов и подходами к нахождению логик генной регуляции при действии ТФ.

Примечательно, что именно подход к моделированию динамики генных сетей, основанный на нечеткой логике [41], оказался наиболее эффективным для тестовых задач обратной инженерии функциональной организации ГРС по сравнению с рядом других подходов ([42], проект «The DREAM Challenges» (https://www.synapse.org/ #!Synapse:syn3049712/wiki/74631)). Это побуждает нас развить аналогичный подход для моделирования паттернов экспрессии генов, с точностью до отдельных (полу)автономных ЦРМов.

Мы намереваемся интегрировать данные экспрессии генов и информацию о связывании ТФ с ДНК с конечной целью расшифровки логики регуляции экспрессии гена. Такой подход может количественно охарактеризовать закономерности взаимодействия между ТФ, объединяя цисрегуляторные логики и кинетику транскрипции в одной модели. Полученные логики цис-регуляций могут затем использоваться для установления функциональной организации ГРС. Мы иллюстрируем такой подход на тестовом примере одного из наиболее изученных наборов ЦРМов энхансеров гена hunchback, hb [43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51]. Он служит экспериментальной моделью для изучения многих других цис-регуляторных модулей в биологии развития и, в более общем плане, в эволюционной биологии (evo-devo).

НАШ ПОДХОД

Мы развиваем наш подход НЛМ к моделям генной экспрессии на уровне детального моделирования (уровень кластеров сайтов связывания

для ТФ). Этот уровень основан на детальных знаниях о функциональной организации генных регуляторных элементов и наиболее приближен к биологическим реалиям, в отличие от упрощенных подходов грубого уровня.

Мы используем анализ грамматики энхансеров (правила размещения сайтов связывания друг относительно друга, включая расстояния между ними), принадлежащих к одному семейству, для формулировки генно-регуляторной логики в виде наборов регуляторных функций [28, 29]. Знание этой грамматики позволяет в итоге сформулировать регуляторные функции для описания поведения ГРС. Эти правила могут быть использованы для развития НЛМ детального уровня.

Самое общее преимущество НЛМ по сравнению с другими подходами к моделированию поведения генных сетей заключается в том, что:

1) подход не использует априорных моделей механизмов генной регуляции и устроен как «черный ящик» (на входе регулирующие параметры, на выходе уровень экспрессии гена), так что зависимость выхода от входных параметров определяется системой нечеткого логического вывода,

2) нечеткий логический вывод в силу простоты организации находит конкретное частное решение простыми формальными процедурами и работает существенно быстрее по сравнению, например, с моделированием системами дифференциальных уравнений, что многократно ускоряет поиск при оптимизации эволюционными методами.

Развиваемый здесь подход, восходящий к классическим публикациям по нечеткому моделированию [52], можно трактовать как развитие подхода кусочно-линейных аппроксимаций нелинейных функций в приложении к разработке и анализу нелинейных динамических моделей генных и клеточных регуляторных сетей (см. работы [53, 54]).

Наш объект изучения. Почти 100 охарактеризованных энхансеров контролируют формирование паттерна раннего эмбриона дрозофилы, вероятно, наиболее изученный процесс эмбрионального развития ([45, 55-57]). Эти энхансеры регулируют экспрессию порядка 50 генов, контролирующих формирование передне-заднего и дорзовентрального паттернов на этапах сегментации и гаструляции. Такой массив экспериментальных и биоинформационных данных дает беспрецедентную возможность анализа регуляторной грамматики этих энхансеров, контролируемых примерно 30 ТФ. Результаты геномного секвенирования целого ряда различных видов дрозофилы делает возможным анализ эволюции этих энхансеров [58].

Морфогенетический градиент фактора Bicoid (Bcd) является одной из наиболее изученных моделей эволюционной биологии развития [48, 59]. Фактор Bcd активирует набор генов сегментации дрозофилы через набор энхансеров, управляемых Всd. Было описано несколько десятков активирующихся при помощи Bcd энхансеров, действующих в начале развития дрозофилы, и некоторые из них (прежде всего проксимальный элемент hb и элемент 2-й полосы гена even-skipped) были подробно изучены [15, 45, 47]. Функциональным ядром таких элементов является кластер сайтов связывания фактора Bcd (рис. 1а,б). Bcd обычно требует несколько сайтов связывания для активации экспрессии генов, и эта активация обычно является кооперативной.

Энхансеры, активируемые Bcd, как и многие другие ЦРМ, интегрируют множество регуляторных входных сигналов от активаторов и ко-активаторов и репрессоров, и ко-репрессоров для обеспечения воспроизводимости и устойчивости раннего эмбрионального паттерна (рис. 1). Регулирование является иерархическим и включает в себя как минимум три уровня.

Первый уровень — это уровень «раскрытия» хроматина, а ключевым фактором, участвующим в открытии, является Zelda, Zld (рис. 16). Zld представляет собой сайт-специфический TF, который также помогает связывать другие факторы, изменяя локальную доступность хроматина, тем самым играя главную роль в раскрытии конденсированного хроматина. Исследователи называют Zld-подобные факторы факторами-«пионерами», поскольку они контролируют активацию генома зиготы через их способность раскрывать конденсированный хроматин [60, 61]].

Второй уровень – типичное кооперативное связывание ДНК, например, между факторами Bcd, Hb и другими ключевыми активаторами, и коактиваторами. Этот эффект увеличивает общее сродство связывания, что приводит к согласованной «загрузке» сайтов при более низком общем уровне концентрации ТФ. Как результат, это обеспечивает и резкий регуляторный «скачок» в ответ на относительно небольшое увеличение концентрации активаторов. Далее, обсуждаемые энхансеры всегда содержат сайты связывания для факторов-репрессоров, как правило, вблизи сайтов для активаторов (рис. 1). Репрессоры обычно характеризуются как короткодействующие: они действуют репрессивно на соседние с ними связанные активаторы.

Третий уровень представляет собой транскрипционную синергию, в которой многочисленные специфически связанные ТФ взаимодействуют с компонентами транскрипционной машины, либо с базальными субъединицами, либо с общими ко-активаторами транскрипции [62].



Рис. 1. Детали функциональной организации трех наиболее изученных энхансеров гена hunchback (*hb*): проксимальный энхансер (а), дистальный («теневой», distal anterior enhancer, DAE) энхансер (б) и энхансер «полос» (stripe-element) (в). Указаны позиции сайтов связывания ключевых транскрипционных факторов (найденных экспериментально или биоинформационными методами). Хорошо видна тенденция сайтов связывания находиться в кластерах. Сайты активаторов показаны над элементом, а сайты репрессии – под ним: Bcd – Bicoid, Kr – Kruppel, Kni – Knirps, Gt-Giant, Zd – Zelda (согласно [47] и [64], с изменениями.

Конкретно, например, показано, что Всd активирует синергическую транскрипцию, взаимодействуя с ТВР-ассоциированными факторами ТАFII60 и ТАFII110 [17, 18]. Если эти факторы отсутствуют, то активации транскрипции не происходит.

Цис-регуляторные модули гена hunchback. Согласно относительно недавним (и совсем недавним) публикациям, ранний паттерн экспрессии гена *hb* находится под контролем трех ЦРМ: проксимального, теневого и энхансера полос [46, 47, 63, 64], что иллюстрировано схемами на рис. 1 (данные сведены на нашем веб-ресурсе НОХ рго [65, 66]). При этом функции проксимального и теневого элементов весьма схожи (что ставит вопрос о роли такой функциональной избыточности) [46, 47]. Все три элемента работают на интересующей нас здесь стадии раннего эмбриогенеза – четырнадцатом цикле. Согласно недавним исследованиям, вклад этих элементов в суммарный уровень экспрессии гена hb можно трактовать как близкий к аддитивному [63].

менее многие критические детали его функционирования по сию пору неясны. Наиболее изученная роль этого элемента – резко активировать ген hb при концентрации бикоида выше критической [47, 48, 67–73]. Сходным образом работает целый ряд ЦРМ ранних генов эмбриона дрозофилы, и этот энхансер считается для них прототипическим. Элемент имеет как несколько экспериментально охарактеризованных сайтов для фактора Bcd, так и ряд сайтов, обнаруживаемых биоинформационными методами. Резкий функциональный отклик (почти по типу «все или ничего») объясняется хорошо исследованной кооперативностью связывания (и действия) фактора Bcd с этим элементом [48, 74, 75]. Помимо этого, в проксимальном энхансере обнаружены (и частично охарактеризованы экспериментально) сайты для Hb и Kr (рис. 1а), как и некоторых других ТФ (не приведены на рисунке). Такая избыточность сайтов как для активации, так и для репрессии нуждается в дальнейшем анализе. Ос-

Проксимальный элемент (рис. 1а) безусловно относится к одним из самых изученных. Тем не



Рис. 2. Профиль экспрессии гена *hb* в головной половине раннего эмбриона дрозофилы включает головной домен и антериорный пик (Hb_{ant}). Их формирование контролируется тремя (полу)автономными энхансерами. (a) – Роль проксимального энхансера. В самом раннем развитии и до начала четырнадцатого цикла ген *hb* находится под преимущественным контролем активатора Bicoid (Bcd) через проксимальный (и теневой) энхансеры. Это определяет появление, рост и формирование головного домена *hb* со все более крутой (постериорной) границей (склоном) этого домена. Приведен профиль материнского фактора Hb, также контролирующего головной домен. На врезке показано, как меняется геометрия головного домена в раннем эмбриогенезе: склон становится все более крутым. (б) – Роль энхансера полос. С начала четырнадцатого цикла контроль над *hb* переходит к элементу полос (см текст). Энхансера контролирует формирование антериорного и постериорного (Hb_{post}) пиков (полос). На врезке иллюстрируются вклады проксимального энхансера и энхансера полос в итоговую картину экспрессии reна *hb* в четырнадцатом цикле (головной домен + антериорный пик). Экспрессия измеряется в относительных условных единицах от 0 до 1.

новная проблема заключается в том, что крутизна отклика гена hb в целом слишком велика, чтобы объяснить ее только кооперативностью действия Всd (врезка на рис. 2а иллюстрирует этот рост крутизны границы домена hb). Вопрос о том, как и какие именно другие ТФ участвуют в этих процессах, дающих в итоге отклик «все или ничего», требует дальнейшего изучения и объяснения.

Энхансер полос включает в себя сайты связывания для факторов Kr, Kni, Hb [47, 76] (рис. 1в). Под контролем энхансера полос ген-мишень дает два четких острых пика экспрессии в передней и задней частях эмбриона (антериорный и постериорный пики или полосы, Hb_{ant} и Hb_{post} , как на рис. 26). (Hb_{ant} известен также под именем пик PS4).

Полагают, что для элемента полос ген *hb* активируется какими-то малоисследованными общими активаторами, а роль этого элемента состоит именно в репрессии *hb* всюду, за исключением двух позиций, где и формируются пики экспрессии. При этом, в частности, склоны антериорного пика «справа» определяются доменом репрессора Kr, а «слева» (как полагают) — доменом



Рис. 3. Диаграмма системы нечеткой логики в приложении к проблеме моделирования экспрессии генного регуляторного элемента (энхансера). Машина вывода (inference engine) использует нечеткие функции генной регуляции, которые формулируются на основе анализа грамматики энхансера (см. текст).

головного Hb (саморепрессия), как иллюстрируется рис. 26.

Детали и механизмы действия энхансера полос все еще мало исследованы. В частности, неясны механизмы репрессии и степень их кооперативности.

Моделирование активности цис-регуляторных модулей с использованием нечеткой логики. Мы используем стандартное общее представление для НЛМ, приведенное на рис. 3. Специфика нашего подхода заключается в приложении общей стратегии НЛМ к конкретике деталей функционирования анализируемого семейства энхансеров.

Взаимодействия между биологическими объектами представляют собой процессы, которые влияют на будущее состояние объектов-мишеней исходя из текущего состояния объектов-эффекторов. Компьютерные модели имитируют взаимодействия при помощи функций, которые оперируют вычислительными представлениями о состояниях. Эти функции отображают текущие состояния эффекторов (входящие данные) в новые состояния или изменения состояния мишеней (выходные данные), как на рис. 3.

В общем случае механизм логического вывода включает фаззификацию, нечеткий вывод (fuzzy inference), и дефаззификацию (рис. 3). На входе нашей НЛМ находится набор уровней экспрессии регуляторных факторов, контролирующих экспрессию гена-мишени через анализируемый нами энхансер этого гена (сравни рис. 1 и 2), на выходе – уровень экспрессии (т. е. уровень продукции мРНК) нашего гена-мишени. (Для единообразия экспрессия генов приведена и в экспериментальных данных, и на выходе эксперимента к относительным условным единицам от 0 до 1.)

Процедуру фаззификации в нашем случае естественно выполнять исходя из треугольных термов с включением краевых трапециевидных термов [77] (см. рис. 4б). Для стадии дефаззификации мы воспользуемся широко употребляемой и простой процедурой дефаззификации по высоте (height defuzzification) [78].

Для нашего набора энхансеров (тест-объектов) мы формулируем набор грамматических правил, позволяющий определять вид и характеристики регуляторных функций как кусочно-линейных средствами НЛМ (см. работы [52–54]). Конкретно мы делаем такую аппроксимацию для функций активации и репрессии гена-мишени транскрипционным фактором-эффектором.

Мы исходим из того, что каждый ген, контролирующий формирование эмбрионального паттерна, состоит из нескольких (полу-) автономных регуляторных элементов (ЦРМ), так что каждый такой элемент описывается своей нечеткой моделью. На выходе такой модели уровень экспрессии гена, определяемый рассматриваемым ЦРМ, тогда как на входе – уровни концентраций сайтспецифических ТФ, способных специфически связываться с рассматриваемым ЦРМ и действовать на ген через него.

Нечеткие функции генной регуляции. Даже самый поверхностный анализ динамики паттернов экспрессии гена hb показывает, что кинетика действия и активаторов и репрессоров нелинейна. Мы ниже приходим к заключению, что для наших целей достаточно использовать признанную и достаточно простую модель регуляции рассматриваемого гена данным фактором (через данный ЦРМ) - модель Хилла. Модель Хилла описывает или активацию или репрессию. Мы, естественно, используем нечеткую формулировку этого закона. НЛМ могут быть сформулированы таким образом, чтобы они аппроксимировали сигмоидные профили функций Хилла, описывающие активирующие и ингибирующие эффекты, что иллюстрируется на рис. 4.

Достаточно четырех нечетких множеств и набора простых правил для создания кусочно-линейных аппроксимаций функций Хилла для активации. Качество аппроксимации зависит от количества нечетких множеств, но оно уже



Рис. 4. Нечеткое представление функции Хилла для задач моделирования кооперативного действия активатора на генмишень. (а) – Эмпирические зависимости экспрессии гена hb от уровней кооперативного активатора Всd на ранних стадиях эмбриогенеза дрозофилы (по материалам веб-ресурса FlyEx [91]). (б) – Детали подхода к нечеткому представлению функции Хилла (коэффициент Хилла $n_k = 3$) пятью термами: два крайних, имеющих форму трапеции, и три средних – треугольные; представлены входные термы нечеткой концепции, таблица правил и результат кусочно-линейной аппроксимации этой функции. (в) – Пример конкретного разбиения эмпирической зависимости hb от Всd (для временного класса t1 четырнадцатого цикла; сравни с панелью (а)) на пять термов. Эмпирический график аппроксимирован отрезками прямых. Отмечены координаты точек перелома аппроксимации. Координаты границ отрезков (по оси эффектор) соответствуют центрам входных термов, тогда как их координаты по оси «ген– мишень» определяют значение центров выходных термов (эти пары значений приведены в скобках; см текст). Экспрессия измеряется в относительных условных единицах от 0 до 1.

удовлетворительно, если даже используются только четыре нечетких множества (ср. [79]). Мы в нашем моделировании использовали пять или шесть термов для аппроксимации функций Хилла (рис. 4).

Используя только три нечетких множества, можно задать удовлетворительную кусочно-линейную аппроксимацию функций Хилла для кооперативной репрессии [79]. В общем случае вопрос параметров фаззификации, как и вопрос параметров самой функции Хилла, должен решаться оптимизацией при адаптации модели.

Наши алгоритмы процедур нечеткой логики. В описании подхода мы будем пользоваться терминами эффектор и ген-мишень. Под эффектором типично понимается сайт-специфический ТФ и предполагается, что в простейшем случае он действует на ген-мишень (через ЦРМ этого гена) или как активатор, или как репрессор. Ниже мы часто будем использовать понятие терм для лингвисти-

ческой переменной, определяющей уровни экс-прессии эффектора и мишени.

Входные (и выходные) термы. Входные и выходные термы определяются (строятся) по такому алгоритму.

Строим эмпирический график зависимости уровня экспрессии гена-мишени от уровня эффектора (на примере активатора, как на рис. 4б). Делим профиль зависимости гена-мишени от эффектора на области, в которых профиль близок к линейному. Таким образом, профиль аппроксимируется ломаной. Области не должны пересекаться и в совокупности давать весь отрезок (0, 1). Количество областей равно количеству входных термов.

Строим треугольные термы, вершины которых совпадают со значениями уровня гена-активатора в звеньях ломаной на графике (рис. 46, внизу). Координаты вершин занесены в верхнюю строку таблицы на рис. 46. Пусть всего имеется *n* термов (в примере n = 5). Тогда элементы таблицы в общем виде заданы $[0, B_1, B_2, ..., B_n, 1]$, где $B_i -$ координата вершины *i*-го терма. Построение термов проиллюстрировано на рис. (46, вверху). Треугольный терм имеет вершину в точке B_i со значением 1 и вершины в точках B_{i-1} и B_{i+1} со значением 0. Два крайних терма имеют вид трапеции, т.е. в вершинах с координатами 0 и B_1 у первого терма и с координатами B_n и 1 у последнего терма имеют значения, равные единице.

Определяем значения уровней гена-мишени в звеньях ломаной (рис. 46, внизу). Эти значения, являющиеся центрами выходных термов, занесены во вторую строку таблицы на рис. 46. По этим координатам строятся выходные термы, следуя тем же правилам, что и входные.

Генерация термов в виде треугольников или трапеций на основе их центров — в общем случае является непростой задачей, так как необходимо учитывать расстояния между центрами и следить за тем, чтобы центр масс фигуры совпадал с используемым центром.

База правил: После определения термов конструируется база правил. Для этого на каждом линейном участке ломаной, начиная с левого, ставится соответствие между номером входного терма, соответствующего участку, и номером выходного терма, чей центр совпадает с уровнем экспрессии гена-мишени в правом конце этого участка.

Наши алгоритмы для модели двух эффекторов одной мишени. Здесь мы рассмотрим реализацию нашего подхода на примере активации генной экспрессии для случая, когда на ген-мишень действует не один (как выше), а два эффектора. Например, у нас имеются два фактора-активатора, А1 и А2, значения каждого из которых находятся в интервале [0, 1], определяющие вместе уровень экспрессии мишени (который тоже определяется на интервале [0, 1]). Пусть для простоты уровень фактор А1 описывается двумя термами («отсутствует» и «присутствует»), тогда как фактора А2 – тремя: «низкий», «средний» или «высокий».

Далее мы определяем нечеткое множество для гена-мишени как три терма для скорости транскрипции: «нулевая», «низкая» и «высокая». Соответственно, система нечетких правил (П1–П6) для нашей модели может быть определена как набор правил общего вида «if-then» («если-тогда»):

П1: ЕСЛИ x1 = отсутствует И x2 = низкий, ТО-ГДА y = нулевая;

П2: ЕСЛИ x1 = отсутствует И x2 = средний, ТОГДА y = нулевая;

П3: ЕСЛИ x1 = отсутствует И x2 = высокий, ТОГДА y = нулевая;

П4: ЕСЛИ x1 = присутствует И x2 = низкий, ТОГДА y = нулевая;

П5: ЕСЛИ x1 = присутствует И x2 = средний, ТОГДА y = медленная;

П6: ЕСЛИ x1 = присутствует И x2 = высокий, ТОГДА y = быстрая.

Такой набор правил нагляднее представить таблицей (табл. 1).

Рассмотрим в заключение более общий случай, когда оба эффектора имеют по три уровня (рассмотрим на примере активации). Скорости транскрипции теперь характеризуются пятью термами. Поскольку запись базой правил становится слишком громоздкой, то приведем только табличный вид (табл. 2).

Сходные построения используются для случая пары репрессоров, R1 и R2.

Пример базы правил для трех термов приведен в табл. 3.

Таблица 1. Скорости транскрипции при разных значениях активаторов А1 и А	$2(2 \times 3)$
--	-----------------

		Уровень фактора А1		
		Низкий	Средний	Высокий
Vnopeuu dartona 12	Отсутствует	Нулевая	Нулевая	Нулевая
э ровень фактора А2	Присутствует	Нулевая	Медленная	Быстрая

		Уровень фактора А1			
		Низкий	Средний	Высокий	
Уровень	Низкий	Нулевая	Самая медленная	Медленная	
фактора А2	Средний	Самая медленная	Медленная	Быстрая	
	Высокий	Медленная	Быстрая	Самая быстрая	

Таблица 2. Скорости транскрипции при разных значениях активаторов A1 и A2 (3 × 3)

Таблица 3. Скорости транскрипции при разных значениях активаторов R1 и R2 (3 × 3)

		Уровень фактора R1			
		Низкий	Средний	Высокий	
Уровень	Низкий	Самая быстрая	Быстрая	Медленная	
фактора R2	Средний	Быстрая	Медленная	Самая медленная	
	Высокий	Медленная	Самая медленная	Нулевая	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что Bcd имеет тенденцию действовать как активатор кооперативно, вместе с другими (ко)-активаторами и кооперативность диктует свои правила для организации энхансеров. Мы можем назвать это грамматическими правилами [32, 33, 37]. В наиболее изученных случаях можно сформулировать грамматические правила, в частности, для силы, порядка и длины спейсеров для комплекса кластеров сайтов связывания (см. работы [30, 35, 45]).

Энхансеры, управляемые морфогенами. Для лингвистического описания функционирования энхансера было бы разумно определить функциональную организацию таких ЦРМ. Для этого необходимо сформулировать грамматические правила, описывающие энхансер.

Главные правила (на примере энхансеров, управляемых Bcd, как на рис. 1 (ср. с рис. 2):

1) Типичный энхансер, управляемый Всd, включает несколько сайтов связывания (рассеянных по последовательностям энхансера) для пионерных факторов, таких как Zld или другие кофакторы, способные «открывать» хроматин. В противном случае энхансер будет слишком слаб, чтобы активироваться Bcd.

2) Ядро энхансера состоит из кластера сайтов связывания Всd. Если два или более соседних сайта расположены слишком близко друг к другу или слишком далеко друг от друга, то они не действуют кооперативно.

3) Энхансер включает в себя несколько сайтов связывания для других активаторов, и эти активаторы имеют тенденцию действовать кооперативно с Bcd.

4) Энхансер включает в себя несколько сайтов связывания для близкодействующих репрессоров, и каждый сайт активации должен находиться поблизости (> 100 п.н.) от сайта репрессора. В противном случае энхансер будет работать в областях эмбриона, где он должен быть репрессирован.

Полное детальное моделирование действия энхансера должно в явном виде описывать три иерархических уровня энхансера, управляемого морфогеном, с помощью пионерных факторов (i), кооперативного связывания с матрицей активаторов (ii) и синергии с выходным механизмом транскрипции (iii). В этой статье мы сосредоточимся на нечетком моделировании только уровня ii в сравнении кооперативной активации с кооперативной репрессией.

Нечеткие правила грамматики энхансеров. Как неоднократно отмечалось, в основе одного из наиболее изученных ЦРМ – проксимального энхансера – кластер сайтов связывания фактора Всd (как иллюстрирует рис. 1а). Более того, функционально близкий (и функционально избыточный) теневой элемент также имеет в своей основе кластер сайтов связывания Всd (рис. 1б).

Кооперативность активации гена *hb* фактором Всd вообще и через проксимальный элемент в частности многократно обсуждалась в литературе (см. работу [48] и ссылки в ней). Поэтому у нас есть все основания сравнивать нашу нечеткую модель активации гена *hb* фактором Bcd (через проксимальный элемент) с моделью Хилла для активации.

С целью реализовать НЛМ обсуждаемых в статье энхансеров мы выполняем анализ грамматических правил их конструирования из сайтов свя-

зывания активаторов и репрессоров (см. рис. 1). В итоге мы пришли к таким заключениям.

Во-первых, ядро энхансера состоит из кластера сайтов связывания фактора Bcd. Эти сайты, как правило, разделяются расстояниями, равными или пропорциональными шагу спирали ДНК (10-11 п.н.) [44, 45, 80]]. Это то, что называют периодичностью в распределении сайтов связывания на ДНК энхансера. Именно такое расположение делает возможным кооперативную активацию таких энхансеров [80]. Специфическое связывание с матрицей ДНК первой молекулы Всd облегчает связывание второй, эти две связанные молекулы облегчают связывание третьей молекулы Bcd и так далее. Такие процессы определяют как кооперативное связывание с матрицей ДНК (template binding cooperativity). Более того, анализируемый нами класс энхансеров включает сайты связывания для некоторых других активаторов, и эти сайты также имеют тенденцию располагаться относительно сайтов Bcd согласно правилу периодичности [45, 80].

Во-вторых, энхансер включает в себя несколько сайтов связывания для «близкодействующих» репрессоров, действующих посредством квенчинга (quenching), и каждый сайт активации должен находиться поблизости (> 100 п.н.) от такого сайта репрессора. Типичный энхансер имеет тенденцию отвечать на связывание репрессора с его сайтом (в этом энхансере) неаддитивно. (Полагают, что при этом задействуется вся молекулярная машина транскрипции, включающая общие и специфические факторы.) Такую неаддитивность (в терминах химической кинетики) описывают как кооперативную или синергетическую репрессию. У нас есть основания (по аналогии с кооперативными активаторами) связать эту кооперативность с кластеризацией сайтов связывания этих ТФ.

Модель проксимального элемента ген hb. Два весьма схожих по характеристикам и функциям элемента гена *hb* – проксимальный и теневой энхансеры - относятся к одним из самых изученных, как обсуждалось выше. Принято считать, что первичная функция проксимального элемента — это обеспечивать активацию гена hb морфогеном Bcd. Тем не менее обширные исследования до сих пор не принесли ясности и однозначности в сложную картину экспериментальных наблюдений и выводов. Первая проблема заключается в том, что крутизна границы домена гена-мишени (*hb*) во второй половине четырнадцатого цикла слишком велика (см. рис. 2а), чтобы ее можно было объяснить только кооперативным действием Bcd [47, 48, 70-72]. В биохимических экспериментах показано, что кооперативность действия Всd соответствует коэффициенту Хилла $n_k = 3$ [68, 70], тогда как эмпирические наблюдения по-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

казывают, что во второй половине четырнадцатого цикла эмпирическая зависимость экспрессии *hb* от концентрации Bcd достигает $n_k = 12$ (как иллюстрируется графиком на рис. 4а), что не может быть объяснено кооперативностью действия Bcd [48]. В качестве альтернативных гипотез резонно рассматривать (кооперативное) действие других активаторов (см., например, работу [81]). Еще одно популярное альтернативное объяснение – это самоактивация гена *hb* кодируемым им фактором Hb [48, 75, 82].

Наконец, еще одно возможное объяснение – что высокая крутизна склона домена экспрессии *hb* достигается не кооперативной активацией, а является результатом кооперативной репрессии также крутых склонов соседствующих доменов репрессоров (прежде всего Kr и Kni) [47, 83, 84].

Вторая проблема состоит в том, что до сих пор неясно, как взаимодействуют обсуждаемые элементы с еще одним ЦРМ этого гена — энхансером полос (будет рассмотрен в следующем разделе).

Здесь следует отметить, что склон переднего домена экспрессии *hb* является, в свою очередь, вторичным морфогенетическим градиентом репрессивного действия и, как полагают, контролирует позиции границ доменов минимум восьми генов-мишеней [44]. Поэтому исчерпывающие знания и строгие заключения о природе и механизмах контроля крутизны и точности позиции этого склона экспрессии *hb* имеют существенное биологическое значение.

Соответственно, в этом разделе мы рассмотрим средствами НЛМ эти проблемы гена *hb* на примере проксимального элемента.

Кооперативная активация фактором Bcd. Мы начнем наш анализ с простейших нечетких моделей действия единственного активатора на генмишень (имея в виду кооперативное действие Bcd на ген *hb*). Мы зададим уровни экспрессии и эффектора (активатора е) и гена-мишени (t) тремя одинаковыми треугольными термами каждый (см. раздел «Наш подход»). Сила активатора (т.е. нелинейность, кооперативность его действия на мишень) заданы тремя возможными вариантами таблицы нечетких правил, как показано на рис. 5 для слабого, умеренного и сильного активатора.

Рис. 2а демонстрирует, как выглядят в динамике профили экспрессии *hb* вместе с профилем Всd. Сравнение результатов простой нечеткой модели и реальных данных приводит к заключению, что модели слабой и средней (но не сильной) активации ближе всего к экспериментальным данным. Более детальный анализ с большим числом термов и более детальными таблицами правил показывает, что такая модель слишком проста (сверхупрощение) и требуются более детальные нечеткие модели. При этом модель можно развивать просто увеличением числа одинако-



Рис. 5. Зависимость отклика (уровня экспрессии) простейшей нечеткой модели проксимального энхансера гена *hb* (здесь t – ген-мишень) от меры кооперативности эффектора-активатора (определяемой таблицей нечетких правил). Фактор-эффектором (е) выступает Bcd. Таблицы зависимости t от е соответствуют слабой (а), умеренной (б) и сильной (в) модели активации (и для эффектора и для мишени задано по три уровня – high, med, low). Модель сопоставляется с экспериментальными данными: на панели (а) внизу приведены эмпирические профили экспрессии фактора Bcd и его мишени гена *hb* для эмбриона дрозофилы на стадии середины четырнадцатого цикла (по материалам веб-ресурса FlyEx [91]). Можно заключить, что эмпирический профиль *hb* схож и с моделью (а), и с альтернативной модели, когда эффектор является не активатором, а репрессором. Это соответствует таблице правил, отличающейся от таковой на (в) тем, что столбец t перевернут (сверху вниз: high, med, med).

вых термов и тщательно подобранных бо́льших по размеру таблиц правил. А можно использовать относительно небольшое (пять-шесть) число термов и для эффектора, и для мишени и простую таблицу правил. Но при этом нужно подбирать размеры каждого терма индивидуально (вручную или автоматизированно, как рассматривается в разделе «Наш подход»). Мы ниже воспользуемся последним подходом к НЛМ.

Рассмотрим теперь нечеткое моделирование кооперативного действия активатора на ген-мишень в рамках модели Хилла и с неодинаковыми термами. Это проиллюстрирует принцип развиваемого подхода и позволит сравнить эмпирические профили гена-мишени (*hb*) с результатами нечеткого моделирования такой моделью.

Нечеткое моделирование функции Хилла выполняли, как описано в разделе «Наш подход». Моделирование выполняли для серии величин n_k (= 1, 2, 3, 4) и константой «диссоциации» (K_d) подобранной так, чтобы склон домена экспрессии находился (примерно) на одном месте при тестируемых значениях n_k . Использовали шесть термов для эффектора и для мишени (см. рис. 6).

Вместе с нечеткой моделью Хилла в координатах «доза—эффект» («активатор—мишень») результаты представлены также в виде профилей в зависимости от кривой активатора, экспоненциальной вдоль пространственной оси (т. е. профиль активатора аппроксимировали отрезком экспоненты). Это позволяло сравнить эмпирические профили паттернов экспрессии гена *hb* вдоль главной (передне-задней) оси раннего эмбриона дрозофилы. На рис. 6 модельные профили сопоставляются с экспериментальным профилем гена *hb* на той самой ранней стадии четырнадцатого цикла, когда, как полагают (см. работу [48]), экспрессия гена-мишени *hb* находится под преимущественным контролем Bcd.



Рис. 6. Нечеткое моделирование действия активатора Всd на проксимальный элемент гена *hb* демонстрирует, что активация гена *hb* морфогеном Всd в начале четырнадцатого цикла может быть аппроксимирована законом Хилла при $n_k = 3$. (а)–(в) – Модель профиля экспрессии гена-мишени вдоль передне-задней оси эмбриона под контролем экспоненциального пространственного градиента Всd при разных уровнях кооперативности действия фактора Всd (величина коэффициента Хилла $n_k = 2$, 3, 4) и соответствующая кривая зависимости уровня экспрессии гена-мишени от уровня активатора (на врезках справа). Теоретические модели профиля экспрессии гена-мишени сопоставляются с экспериментальным профилем гена *hb* в начале четырнадцатого цикла.

Рис. 6 демонстрирует, что эмпирический профиль экспрессии гена *hb* (самое начало четырнадцатого цикла) хорошо аппроксимируется нечеткой моделью функции Хилла с параметрами $n_k = 3$ и $K_d = 0.0013$ (рис. 6б). На основании наших результатов мы приходим к заключению, что простой гипотезы кооперативного действия ТФ Всd на проксимальный энхансер достаточно, чтобы объяснить геометрию профиля Hb в начале четырнадцатого цикла. Это сопоставимо с заключениями других авторов [68, 69]. Вместе с тем существенный рост крутизны границы домена *hb* в ходе четырнадцатого цикла требует альтернативных гипотез для своего объяснения.

Кооперативная активация фактором Hb^{mat}. Как отмечалось выше, основная проблема с количественным моделированием динамики профиля

Нь заключается в том, что крутизна границы домена экспрессии hb (т.е. именно то, что мы здесь моделируем) очень быстро, в ходе четырнадцатого цикла, нарастает и становится столь крутой, что в рамках модели Хилла это соответствует $n_k = 12$. Столь высокая кооперативность активации сомнительна из общих соображений кинетики и молекулярных механизмов действия активатора Всd. Тщательные количественные исследования кооперативности кинетики активации кластеров сайтов связывания Всd в биохимических экспериментах также ставят под сомнение столь высокую кооперативность.

Возможное и широко обсуждаемое объяснение состоит в том, что проксимальный элемент интегрирует активирующее действие не только от Bcd, но и от других $T\Phi$ -активаторов (например Hb [81]). Прежде всего, обращает на себя внимание наличие в проксимальном элементе как предполагаемых, так и экспериментально подтвержденных сайтов связывания фактора Hb. Вместе с тем, как хорошо известно, фактор Нь поставляется в яйцеклетку-зиготы материнским организмом еще до активации эмбрионального гена hb [85], так что он формирует домен в передней части раннего эмбриона с пологой границей (напоминая более поздний домен эмбрионального Hb). Важность этого материнского домена в предопределении раннего развития эмбриона хорошо известна [86]. Поэтому мы выполнили здесь альтернативное нечеткое моделирование, приняв в качестве активатора материнский Hb^{mat}.

Результаты НЛМ для кооперативной активации фактором Hb^{mat} (с коэффициентами Хилла $n_k = 2, 3, 4$) приведены на рис. 7а. Рисунок наглядно иллюстрирует, что действие пространственно более крутого (чем экспонента фактора Bcd) активатора может объяснить большую крутизну склона домена экспрессии зиготного гена hb. Там же приведены реальный профиль экспрессии гена *hb* для середины четырнадцатого цикла. Видно, что кооперативное действие Hb^{mat} может частично объяснить наблюдаемую более высокую крутизну склона hb (чем модель для Bcd, см. рис. 7б). (Заметим также, что больший, чем в эмпирических данных, сдвиг границы домена экспрессии hb в модели объясним отсутствием деградации в нашей простой НЛМ.) Однако крайне высокая и все нарастающая крутизна склона домена экспрессии hb во второй половине четырнадцатого цикла по-прежнему нуждается в дальнейшем исследовании.

Коактивация двумя факторами. В развитие подхода к НЛМ генно-регуляторных элементов необходимо уметь включать в модель действие на данный элемент нескольких регулирующих ТФ. Случай нечеткого действия двух эффекторов на мишень особенно нагляден, поскольку набор правил представим таблицей (раздел «Наш под-ход», табл. 1–3).

В общем же совокупное действие может вычисляться из отдельных акций (активации и репрессии) согласно операторам AND, OR или MEAN (см. работу [41]).

В развитие вышеприведенных моделей нам резонно рассмотреть НЛМ с двумя активаторами, Всd и Hb^{mat}. Всd мы моделируем двумя или тремя термами (как фактор А2 в табл. 1 и 2), тогда как Hb^{mat} – тремя термами (фактор А1). Результат работы такой НЛМ приведен на рис. 7в. Наше моделирование в рамках табл. 1 и 2 дало сходные результаты.

Таким образом, (неаддитивное) действие пары активаторов (Всd и Hb^{mat}) более реалистично моделирует активацию гена мишени. Поэтому мы можем предположить, что коактивация этих двух факторов существенна для объяснения крутизны профиля hb в более позднем четырнадцатом цикле.

Самоактивация гена. Наконец, рассмотрим последнюю из простых и распространенных альтернативных объяснений динамики склона домена экспрессии *hb*. А именно, исследуем поведение такой НЛМ, в которой исходный, начальный профиль экспрессии Hb (в результате экспрессии гена *hb*), полученный, например, кооперативной активацией фактором Hb^{mat} ($n_k = 3$), на втором шаге моделирования сам становится активатором для экспрессии своего гена, как на рис. 7г. В представленной серии тестов мы считаем механизм самоактивации кооперативным ($n_k = 3$). В результате такой серии шагов самоактивации профиль экспрессии очень быстро становится очень крутым.

Следовательно, в результате тестов с нашими НЛМ мы приходим к заключению, что (кооперативная) самоактивация гена фактором, который этот ген кодирует, — это самое простое объяснение крутизны домена экспрессии гена *hb*. Эти результаты согласуются с заключениями некоторых предыдущих публикаций [48, 75, 82]. Тем не менее проблема еще далека от своего окончательного разрешения, поскольку самоактивация гена *hb* не исследована во всех деталях и у исследователей нет единого мнения по этому вопросу (см. работу [47]).

Возможное альтернативное объяснение существенного нарастания крутизны границы домена это действие элемента полос, рассмотренное ниже.

Модель элемента полос гена *hb*. Опубликованные результаты анализа активности элемента полос свидетельствуют, что его функция — это ре-



Рис. 7. Возможные более общие случаи механизмов действия проксимального энхансера гена hb. (a) и (б) – Нечеткологическое моделирование действия активатора Hb^{mat} в рамках модели Хилла с коэффициентами Хилла $n_k = 2, 3, 4$. (a) – Профили экспрессии гена hb как результат действия активатора Hb^{mat} в рамках модели Хилла с $n_k = 2, 3, 4$ в сравнении с эмпирическим профилем экспрессии hb в середине четырнадцатого цикла (t4). (б) – Сопоставление результата нечеткого моделирования отдельно для активатора Bcd и для активатора Hb^{mat} (при одном и том же значении коэффициента Хилла $n_k = 3$). Видно, что действие материнского Hb способно объяснить большую крутизну склона домена экспрессии гена hb. (в) – Нечеткое моделирование совместного действия пары активаторов (коактивация) Bcd и Hb^{mat}. Также приведен профиль экспрессии в середине четырнадцатого цикла (t4). Видно, что совместное действие двух активаторов в рамках нечеткой модели дает более крутой склон домена экспрессии гена hb, чем действие каждого из факторов по отдельности. (г) – Динамика профиля экспрессии гена hb для случая нечеткой модели самоактивации. Исходный профиль материнского фактора Hb^{mat} действует как активатор на зиготный ген hb, давая профиль экспрессии hb к моменту t_1 (мишень, t4). Далее, с момента t_1 этот профиль зиготного фактора Hb действует как активатор (само-активация), давая, в свою очередь, профиль экспрессии hb к моменту t_2 (мишень, t2). Наконец, с момента t_2 этот профиль зиготного фактора Hb действует как активатор, давая в итоге очень крутой профиль экспрессии hb к моменту t_3 (мишень, t3).

прессирование гена-мишени на всем протяжении главной оси раннего эмбриона, за исключением двух небольших областей, как на рис. 26 [47]. Это и дает в итоге два четких пика экспрессии.

Мы начнем наш анализ кооперативной репрессии с общих результатов, аналогично таковым, описанным в параграфе «Кооперативная активация фактором Bcd» и на рис. 5. Рис. 5в(1) иллюстрирует то общее соображение, что для крутых склонов доменов экспрессии требуется как активация, так и репрессия по неаддитивному (кооперативному) механизму.

Продолжим изучение средствами НЛМ кооперативного действия репрессоров на ген-мишень в рамках модели Хилла с достаточным числом тер-

мов и разными уровнями кооперативности (с различными значениями коэффициента n_k). Мы сосредоточимся на анализе поведения домена PS4 (антериорный пик, Hb^{ant}, см рис. 2б). Этот домен представляет собой четкий и крутой пик локальной экспрессии. Его задний склон, как полагают, находится под преимущественным контролем «S-образного» профиля фактора Kr (а также фактора Kni) [50, 87]. Передний склон домена PS4, как полагают, находится под преимущественным контролем «S-образного» профиля фактора Gr [88]. Есть также экспериментальные наблюдения, что этот склон находится под контролем собственно фактора Hb, кодируемого геном *hb* [47], что труднее представить с точки зрения кинетики.

Сначала рассмотрим результаты моделирования кооперативности репрессии гена-мишени репрессором Kr, исходя из простейшей гипотезы, что именно профиль Kr отвечает за геометрию профиля пика экспрессии hb (его постериорный склон), как иллюстрируется на рис. 8а-в. Моделирование выполняли для ряда величин n_k (= -1, -2, -3, -4) и константой «диссоциации» подобранной так, чтобы склон домена экспрессии находился (примерно) на одном месте при тестируемых значениях *n_k*. Профили репрессоров для ранней экспрессии генов сегментации естественно аппроксимировали отрезком S-образной (сигмоидной) функции (см. рис. 2). Использовано пять или шесть термов для эффектора и для мишени (рис. 8).

Результаты численного решения уравнения Хилла (относительно участка сигмоидного профиля репрессора) сопоставляются с результатами нечеткого моделирования и с эмпирическим профилем экспрессии гена *hb* (на уровне мРНК) в середине четырнадцатого цикла, как представлено на рис. 8а–в. Рис. 8 демонстрирует, что эмпирический профиль экспрессии *hb* примерно соответствует решению Хилла со значением n_k между -3 и -4.

Найденная нами существенная кооперативность действия Kr на *hb* находится в некотором несогласии с известным количеством и распределением экспериментально подтвержденных сайтов связывания для Kr на энхансере полос (пара в одной половине энхансера и всего один — в другой, как на рис. 1в). В этой связи можно предложить, что не все сайты для Kr найдены. Здесь существенно, что биоинформационный анализ демонстрирует наличие большего числа сайтов для Kr, расположенных плотными кластерами, как в случае теневого элемента (см. рис. 1б). Альтернативная модель кооперативной корепрессии рассмотрена в следующем подразделе.

Далее, аналогичным образом, антериорный склон домена PS4, как полагают, находится под

преимущественным контролем «S-образного» профиля фактора-репрессора Gt [88]. Результаты нашего нечеткого моделирования контроля эффектором Gt переднего склона пика PS4 в сопоставлении с профилем модели Хилла с $n_k = -3, -4$ демонстрируют, что эмпирическая кривая весьма сходна с результатами нечеткого моделирования (не показано). Отметим здесь, что знак действия Gt на ген *hb* (активатор или репрессор) все еще обсуждается [64]. В качестве альтернативы некоторые авторы рассматривают механизм саморепрессии *hb* через энхансер полос [47]. Поэтому вопрос нуждается в дальнейшем экспериментальном и теоретическом анализе.

Корепрессия двумя факторами. Альтернативная гипотеза состоит в том, что сайты связывания Кг оказывают репрессивное действие кооперативно с сайтами связывания другого репрессора — Кпі, которых охарактеризовано тоже три, так что получается плотный маленький кластер из трех сайтов связывания в одной половине энхансера и трех — в другой (рис. 1в). В целом этот вопрос требует дальнейших исследований.

С целью проанализировать возможности кооперативной репрессии двумя факторами (Кг и Кпі) мы выполнили соответствующее нечеткое моделирование, как объяснено в разделе «Наш подход», табл. 3. Результаты приведены на рис. 9. Видно, что совместная кооперативность двух репрессоров объясняет крутизну профиля домена. Так что такая модель лучше подходит для интерпретации грамматики элемента полос.

На основании наших результатов мы приходим к заключению, что простой гипотезы кооперативного действия эффекторов-репрессоров на энхансер полос достаточно, чтобы объяснить геометрию склонов антериорного (PS4) пика *hb* в четырнадцатом цикле. При этом каждый склон пика PS4 независимо контролируется своим репрессором (или репрессорами). Примечательно, что кооперативность репрессии достаточно высока и сравнима с кооперативностью активации этого гена в том же четырнадцатом цикле. Мы не знаем публикаций, где бы обсуждалась кооперативность репрессии для генов сегментации.

Аддитивность действия регуляторных элементов данного гена. В заключение отметим, что при анализе генной регуляции для распространенных случаев нескольких (автономных и полуавтономных) регуляторных элементов возникает общая проблема: как интегрируется действие этих элементов, если они активны одновременно (и в данном клеточном массиве).

Недавние исследования, проведенные, в частности, и на рассматриваемых здесь регуляторных элементах, показали целый спектр суммирования действия двух элементов одного гена: супераддитивность, аддитивность и субаддитивность [89].



Рис. 8. Репрессия гена *hb* фактором Kr через элемент полос подчиняется закону Хилла. (а) – Крутой склон домена экспрессии репрессора Kr формирует постериорную границу пика PS4 (Hb_{ant}). (б)–(г) – Модель профиля экспрессии гена-мишени вдоль участка передне-задней оси эмбриона под контролем «S-образного» профиля репрессора Kr при трех разных уровнях кооперативности (величина коэффициента Хилла, $n_k = -2, -3, -4$) и соответствующая кривая зависимости уровня экспрессии гена-мишени *hb* от уровня репрессора Kr (на врезках справа). Теоретические модели профиля экспрессии гена-мишени сопоставляются с экспериментальным профилем гена *hb* в середине четырнадцатого цикла.



Рис. 9. Нечеткое моделирование действия пары репрессоров (Кг и Кпі, корепрессия) через элемент полос на крутизну постериорного склона пика PS4. Совместное действие двух репрессоров в рамках нечеткой модели дает более крутой склон домена экспрессии гена *hb*, чем действие каждого из факторов по отдельности (сравни с рис. 7в).

Исходя из простой гипотезы аддитивности действия элемента полос и проксимального элемента, мы наблюдаем, что суммарная картина экспрессии гена-мишени *hb* хорошо аппроксимирует эмпирические профили мРНК *hb* к середине четырнадцатого цикла, как показано на рис. 10.

Полученные здесь результаты являются существенным дополнением к нашим результатам детального детерминистического моделирования экспрессии гена *hb* (системой детальных уравнений в частных производных) [51], где акцент был сделан на наличии двух промотеров у этого гена. Для получения исчерпывающей картины деталей динамики этого гена требуется свести воедино оба подхода.

Сходно организованные гены. Тщательный анализ результатов исследования поведения ЦРМ генов сегментации эмбриона дрозофилы показывает, что схема динамики паттерна, анализируемая здесь на примере hb, может быть характерна для целого ряда генов. А именно, имеются ЦРМ, которые контролируют формирование достаточно обширных доменов экспрессии (аналогично проксимальному элементу гена hb). И имеются ЦРМ, которые контролируют формирование более коротких острых и четких пиков экспрессии в пределах начального широкого домена, как это имеет место в случае элемента полос гена hb. Прежде всего это относится к таким генам семейства gap (к которым относится и hb), как gt, Kr и tailless. Эти ЦРМ были исследованы в ряде публикаций [55-57, 90]. Их функциональная близость к *hb* делает такие наблюдения по деталям их регуляции (сходство с *hb*), в достаточной мере ожидаемым. Все эти факты, вместе взятые, свидетельствуют о том, что моделируемые в этой статье детали динамики экспрессии под контролем пар ЦРМ с весьма различающейся стратегией контроля паттерна могут быть общим принципом регуляции генов, вовлеченных в процессы сегментации.

выводы

Нами впервые нечеткое моделирование применяется для разработки моделей активности цис-регуляторных модулей и впервые применяется к проблемам экспрессии генов биохимической разметки ранних эмбрионов. Подход представлен в приложении к анализу конкретной проблемы перехода от самых ранних механизмов паттерна эмбриональной сегментации к более поздним. По такому сценарию охарактеризована экспрессия целого ряда генов эмбрионального паттерна, но наиболее изучена она для гена hb. Сценарий заключается в том, что самый ранний паттерн формируется как активация гена-мишени (например, ранний hb) морфогенетическими градиентами (прежде всего, Bcd) в форме широких доменов экспрессии. На этом этапе действуют свои, ранние механизмы контроля границы экспрессии (типично - кооперативная активация гена-мишени морфогеном). Примечательно, что эти процессы находятся под контролем соответствующих ранних полуавтономных регуляторных элементов (например, проксимальный элемент hb). На следующем этапе (на фоне этих широких доменов) быстро формируются четкие и узкие полосы (пики) экспрессии. Они контролируются своими регуляторными механизмами (например, контролем соседствующими доменами факторов-репрессоров). Эти процессы регулируются своими полуавтономными регуляторными элементами (например, элемент полос гена hb). Результирующий паттерн экспрессии анализируемых генов высоко динамичен и определяется наложением двух процессов контроля паттерна экспрессии.

С помощью подхода НЛМ проанализирована регуляция проксимальным энхансером крутизны



Передне-задняя ось эмбриона

Рис. 10. Аддитивность действия двух основных регуляторных элементов гена hb в четырнадцатом цикле. Сумма профилей нечетких моделей действия проксимального элемента и элемента полос хорошо аппроксимируют эмпирический профиль экспрессии гена hb. (a) — Экспериментально наблюдаемый профиль экспрессии гена hb в начале четырнадцатого цикла (на уровне мРНК; график получен исходя из данных, доступных на веб-ресурсе BID BDTNP [92]). (б) — Профиль головного домена экспрессии hb как результат кооперативной ко-активации Bcd и другими активаторами через проксимальный элемент. (в) — Антериорный пик экспрессии hb^{ant} (домен PS4) как результат кооперативной корепрессии пар (или большего числа) репрессоров (независимо для переднего и заднего склона пика hb^{ant}). (г) — Суммарный профиль головной экспрессии, полученный нечетким моделированием и хорошо аппроксимирующий экспериментальный профиль (а).

постериорного склона переднего домена экспрессии hb. Показано, что рост этой крутизны может быть объяснен кооперативной коактивацией двух активаторов (Bcd и Hb^{mat}), а также самоактивацией фактором Hb его гена. Это соответствует количеству, силе и размещению сайтов для ТФ этого энхансера (грамматика ЦРМ) и, по крайней мере отчасти, объясняет парадоксально

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

высокую крутизну исследуемого склона, необъяснимую только кооперативной активацией морфогеном Bcd.

Подходом НЛМ также проанализирована регуляция энхансером крутизны постериорного склона антериорного пика экспрессии гена *hb* (домен PS4). Показано, что крутизна этого склона может быть объяснена (кооперативной) корепрессией минимум двух факторов (Kr и Kni). Это соответствует грамматике энхансера полос.

Следует подчеркнуть, что кооперативные механизмы действия ЦРМ абсолютно необходимы в становлении эмбрионального паттерна для получения резкого ответа по типу «вкл/выкл» при формировании резкой границы экспрессии вдоль морфогенетических градиентов.

Мы уверены, что нечеткое лингвистическое моделирование поведения ГРС способно естественным образом охарактеризовать очерченные признаки типичных энхансеров. Таким образом, мы можем включить все уровни синергии энхансеров: кооперативное действие пионерного фактора (типа Zld), кооперативное связывание $T\Phi$ с матрицей ДНК и синергические взаимодействия связанных ТФ с машиной транскрипции. Мы убеждены, что модели активности генных сетей, основанные на натуральных языках и нечеткой логике, имеют внутреннюю функциональную организацию, более близкую к молекулярной машинерии генно-регуляторных механизмов, чем модели в парадигме математической физики. А это должно давать нечетким моделям бо́льшую предсказательную силу.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Результаты раздела «Наш подход» были получены в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 16.8549.2017 / 8.9). Остальные результаты получены в рамках гранта Российского научного фонда (проект № 17-18-01536).

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. J. Linde, S. Schulze, S. G. Henkel, and R. Guthke, EXCLI J. 14, 346 (2015).
- 2. H. de Jong, J. Comput. Biol. 9 (1) 67 (2002).
- 3. J. Jaeger, Manu, and J. Reinitz, Curr. Opin. Genet. Dev. 22, 533 (2012).
- M. A. H. Samee, B. Lim, N. Samper, et al., Cell Systems 1 (6) 396 (2015).
- 5. A. Spirov, and D. Holloway, in *Evolutionary Algorithms* in *Gene Regulatory Network Research*, Ed. by N. No-

man, and H. Iba (Wiley Interscience, 2015), pp. 240–268.

- L. Sanchez and D. Thieffry, J. Theor. Biol. 211 (2), 115 (2001).
- D. Thieffry and L. Sanchez, Curr. Opin. Genet. Dev. 13 (4), 326 (2003).
- 8. K. Kozlov, V. Gursky, I. Kulakovskiy, and M. Samsonova, BMC Genomics 15 (12), S6 (2014)
- K. Kozlov, V. V. Gursky, I. V. Kulakovskiy, et al., BMC Genomics 16 (13), S7 (2015).
- V. V. Gursky, K. N. Kozlov, I. V. Kulakovskiy, et al. PloS One **12** (9), e0184657 (2017).
- M. A. Gibson and E. Mjolsness, in *Computational Modeling of Genetic and Biochemical Networks*, Ed. by J. M. Bower and H. Bolouri (MIT Press, Cambridge, MA, 2001), pp. 1–48.
- 12. E. Myasnikova and A. Spirov, J. Bioinform. Comput. Biol. 16 (2), 1840008 (2018).
- K. Kozlov, S. Surkova, E. Myasnikova, et al., PLoS Comput. Biol. 8 (8), e1002635 (2012).
- С. А. Андреев, М. Г. Самсонова и В. В. Гурский, Биофизика 60 (2), 225 (2015).
- 15. H. Janssens, S. Hou, J. Jaeger, et al., Nat Genet. **38** (10), 1159 (2006).
- 16. N. E. Buchler, U. Gerland, and T. Hwa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 5136 (2003).
- 17. F. Sauer, S. K. Hansen, and R. Tjian, Science **270**, 1825 (1995).
- F. Sauer, D. A. Wassarman, G. M. Rubin, and R. Tjian, Cell 87, 1271 (1996).
- K. Gupta, D. Sari-Ak, M. Haffke, et al., J. Mol. Biol. 428 (12), 2581 (2016).
- 20. E. Nogales, R. K. Louder, and Y. He, Annu. Rev. Biophys. 46, 59 (2017).
- E. H. Mamdani and S. Assilian, Int. J. Man-Machine Studies 7 (1), 1 (1975).
- 22. M. Sugeno, *Industrial applications of fuzzy control* (Elsevier Science Pub. Co, 1985).
- 23. S. Istrail and E. H. Davidson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**, 4954 (2005).
- 24. R. D. Zeigler, J. Gertz, and B. A. Cohen, BMC Bioinformatics **8**, 272 (2007).
- 25. C.-P. Lee, Y. Leu, W.-N. Yang, Applied Soft Computing **12** (3), 1115 (2012).
- J. Bordon, M. Moskon, N. Zimic, and M. Miha, IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform. 12 (5), 1199 (2015).
- B. H. Wang, J. W. Li, and J. S. Lim, Genetics Mol. Res. 15 (3), gmr.15039002 (2016).
- J. Liu, Y. Chi, C.Zhu, and Y. Jin, BMC Bioinformatics 18 (1), 241 (2017).
- 29. K. Wu and J. Liu, IEEE Transactions on Fuzzy Systems 25 (6) 1546 (2017).
- S. Ben-Tabou de-Leon and E. H. Davidson, Dev Biol. 325, 317 (2009).

- 31. B. Yan, D. Guan, C. Wang, et al., Nat. Commun. 8 (1), 1044 (2017).
- 32. S. Rastegar, I. Hess, T. Dickmeis, et al., Dev Biol. **318**, 366 (2008).
- K. J. Won, A. Sandelin, T. T. Marstrand, and A. Krogh, Bioinformatics 24, 1669 (2008).
- 34. J. Gertz, E. D. Siggia, and B. A. Cohen, Nature **457**, 215 (2009).
- 35. L. Li and Z Wunderlich, Front. Genet. 8, 63 (2017).
- J. O. Yáñez-Cuna, E. Z. Kvon, and A. Stark, Trends Genet. 29, 11 (2013).
- 37. J. Grice, B. Noyvert, L. Doglio, and G. Elgar, PloS One **10** (7), e0130413 (2015).
- С. Т. Золян и Р. И. Жданов, Философия науки и техники 23 (1), 88 (2018).
- S. T. Zolyan, and R. I. Zhdanov, Semiotica 2018 (225), 1 (2018). DOI: 10.1515/sem-2016-0214
- 40. X. Li, Y. Li, Y. Liu, and L. Wang, Int. J. Pattern Recognit. Artif. Intell. **31** (10), 1 (2017).
- 41. R. Küffner, T. Petri, L. Windhager, and R. Zimmer PloS One **5** (9), e12807 (2010).
- 42. D. Marbach, T. Schaffter, C. Mattiussi, and D. Floreano, J. Comput. Biol. **16** (2), 229 (2009).
- 43. D.M. Holloway, J. Reinitz, A. Spirov, and C. E. Vanario-Alonso, Trends Genet. **18**, 385 (2002).
- 44. D. Yu and S. Small, Curr. Biol. 18, 868 (2008).
- 45. D. Papatsenko, Y. Goltsev, and M. Levine, Nucl. Acids Res. **37** (17), 5665 (2009).
- M. W. Perry, A. N. Boettiger, and M. Levine, Proc Nat Acad Sci USA 108, 13570 (2011).
- 47. M. W. Perry, J. P. Bothma, R. D. Luu, and M. Levine, Curr. Biol. **22**, 2247 (2012).
- F. J. P. Lopes, A. V. Spirov, and P. M. Bisch, Dev. Biol. 370 (2), 165 (2012).
- E. A. Zagrijchuck, M. A. Sabirov, D. M. Holloway, and A. V. Spirov, J. Bioinform. Comput. Biol. 12, 1441009 (2014).
- 50. D. M. Holloway and A. V. Spirov, PloS One **10** (3), e0118450 (2015).
- A. V. Spirov, E. M. Myasnikova, and D. M. Holloway, J. Bioinform. Comput. Biol. 14 (2), 1 (2016).
- 52. T. Takagi and M. Sugeno, IEEE Trans. System Man Cybernet. **15**, 116 (1985).
- 53. M. Storace and O. De Feo, IEEE Trans. Circuits and Systems I: Regular Papers **51** (4), 830 (2004).
- 54. Y. Park, K. M. Shaw, H. J. Chiel, and P. J. Thomas, Eur. J. Appl. Math. **29** (5), 905 (2016).
- M. D. Schroeder, M. Pearce, J. Fak, et al., PLoS Biol. 2, E271 (2004).
- E. Segal, T. Raveh-Sadka, M. Schroeder, et al., Nature 451 (7178), 535 (2008).
- M. Kazemian, C. Blatti, A. Richards, et al., PloS Biol. 8 (8), e1000456 (2010).
- M. J. Bronski, C. C. Martinez, H. A. Weld, and M. B. Eisen, Genes, Genomes, Genetics 10, g3.400959 (2019). DOI: 10.1534/g3.119.400959

- 59. D. Lebrecht, M. Foehr, E. Smith, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102** (37), 13176 (2005).
- Z. Xu, H. Chen, J. Ling, et al., Genes & Development 28 (6), 608 (2014).
- 61. S. M. Foo, Y. Sun, B. Lim, et al., Curr. Biol. 24, 1341 (2014).
- C. P. Verrijzer, and R. Tjian, Trends Biochem. Sci. 21, 338 (1996).
- M. V. Staller, B. J. Vincent, M. D. J. Bragdon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112 (3), 785 (2015).
- 64. X.-Y. Li, and M. B. Eisen, BioRhiv 2018-07-3010.1101/3808571 (2018).
- 65. A. V. Spirov, T. Bowler, and J. Reinitz, Nucl. Acids Res. 28, 337 (2000).
- 66. A. V. Spirov, M. Borovsky, and O.A. Spirova, Nucl. Acids Res. **30**, 351 (2002).
- W. Driever, G. Thoma, and C. Nüsslein-Volhard, Nature **340**, 363 (1989).
- X. G. Ma, D. Yuan, K. Diepold, et al., Development 122, 1195 (1996).
- D. S. Burz, R. Rivera-Pomar, H. Jäckle, and S. D. Hanes, EMBO J. 17, 5998 (1998).
- T. Gregor, D.W. Tank, E. W. Wieschaus, and W. Bialek, Cell 130, 153 (2007).
- F. He, Y. Wen, D. Cheung, et al., BMC Dev. Biol. 10, 80 (2010).
- 72. F. He, J. Ren, W. Wang, J. Ma, PLoS One **6** (4), e19122 (2011).
- 73. D. M. Holloway, F. J. P. Lopes, L. da Fontoura Costa, et al., PLoS Comput. Biol. 7 (2), e1001069 (2011).
- 74. G. Struhl, K. Struhl, and P.M. Macdonald, Cell **57** (7), 1259 (1989).
- 75. F. J. P. Lopes, F. M. C. Vieira, D. M. Holloway, et al., PLoS Comput. Biol. **4** (9), e1000184 (2008).
- 76. J. S. Margolis, M. L. Borowsky, E. Steingrímsson, et al., Development **121** (9), 3067 (1995).
- 77. J. M. Mendel, Uncertain Rule-Based Fuzzy Logic Systems: Introduction and New Directions (Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 2001).
- Ю. И. Митюшин, Б. И. Мокин и А. П. Ротштейн, Soft Computing: идентификация закономерностей нечеткими базами знаний (Універсум-Вінниця, 2002).
- 79. L. Windhager, Ph.D. Dis. (der Fakultat fur Mathematik, Informatik und Statistik, der Ludwig-Maximilians-Universitat, Munchen, 2013).
- V. J. Makeev, A. P. Lifanov, A. G. Nazina, and D. A. Papatsenko, Nucl. Acids Res. 31, 6016 (2003).
- M. Simpson-Brose, J. Treisman, and C. Desplan, Cell 78 (5), 855 (1994).
- E. M. Myasnikova, and A.V. Spirov, BioSystems 166, 50 (2018).
- D. E. Clyde, M. S. Corado, X. Wu, et al., Nature 426 (6968), 849 (2003).
- 84. X. Y. Li, S. MacArthur, R. Bourgon, et al., PLoS Biol. 6 (2), e27 (2008).
- 85. J. S. Margolis, M. Borowsky, C. W. Shim, and J. W. Posakony, Dev. Biol. **163**, 381 (1994).

- G. Struhl, P. Johnston, and P. A. Lawrence, Cell 69 (2), 237 (1992).
- 87. J. Jaeger, Cell. Mol. Life Sci. 68 (2), 243 (2011).
- 88. R. Kraut and M. Levine, Development 111 (2), 611 (1991).
- J. P. Bothma, H. G. Garcia, S. Ng, et al., Elife 4, e07956 (2015).
- 90. 90. E. Z. Kvon, T. Kazmar, G. Stampfel, et al., Nature 512 (7512), 91 (2014).
- A. Pisarev, E. Poustelnikova, M. Samsonova, and J. Reinitz, Nucl. Acids Res. 37 (Database issue), D560-6 (2009).
- 92. A. C. Fowlkes, C. L. Luengo Hendriks, S. V. E. Keränen, et al., Cell **133**, 364 (2008).

Fuzzy Linguistic Modelling of Regulation of Drosophila Segmentation Genes

A.A. Makashov*, E.M. Myasnikova*, and A.V. Spirov**, ***

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytechnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

**Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia

*** Institute of Scientific Information for Social Sciences, Russian Academy of Sciences, ul. Krzhizhanovskogo 15/2, Moscow, 117997 Russia

Understanding molecular mechanisms involved in gene regulation is one of the underlying issues in systems biology. Often, common approaches used to model gene regulation fail to distinguish between the model properties that adequately reflect the characteristics of a biological object and those associated with the nature of the model. This study concerns the development of a logical approach for modeling the regulation of gene expression thereby enabling further maximum use of all the available empirical data and minimum use of a priori hypotheses. Moreover, the rules for gene regulation are formulated in the form of linguistic modelling, namely, restated in the language of approach developers instead of the language of researchers. We use a fuzzy approach known as fuzzy linguistic modelling which reflects reality more accurately. In our study, for the first time, we used linguistic modelling for modeling the activity of the cis-regulatory modules and applied it to the problems of analysis of gene expression for biochemical labeling of embryos. This approach made it possible to clarify the essential details of the mechanisms of "reading out" primary morphogen gradients by two or more cis-regulatory modules of the same gene in combination.

Keywords: gene regulation, expression patterns, enhancers, enhancer grammar, logical modelling, fuzzy modelling

УДК 577.152.1

РАЗРУШЕНИЕ ЦИТОХРОМА с, НАХОДЯЩЕГОСЯ В КОМПЛЕКСЕ С КАРДИОЛИПИНОМ, ПРИ ОСУЩЕСТВЛЕНИИ КАТАЛИЗА ЛИПОПЕРОКСИДАЗНОЙ РЕАКЦИИ

© 2021 г. Л.А. Ромодин*, Ю.А. Владимиров**, ***, ****, ****, Н.П. Лысенко*

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

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

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

****Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ РФ,

117997, Москва, ул. Островитянова, 1

*****Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59

E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2020 г. После доработки 23.06.2020 г. Принята к публикации 26.06.2020 г.

Изучено разрушения цитохрома c во время катализа им липопероксидазной реакции, обуславливающей в живых клетках разрушение митохондриальных мембран и выход в цитозоль различных проапоптотических факторов. С помощью спектрофотометрического анализа показано гораздо более интенсивное разрушение цитохрома c при добавлении перекиси водорода в присутствии тетраолеилкардиолипина при соотношениях белок : кардиолипин, равных 1 : 30 и 1 : 60 и являющихся оптимальными для образования комплекса цитохрома c с кардиолипином, в сравнении с пробой, в которой присутствовали только перекись водорода и цитохром c. Во втором случае разрушение порфиритовой группировки гема принимало вид линейной функции, в то время как в присутствии кардиолипина зависимость носила явно экспоненциальный характер, причем при внесении дополнительного липидного субстрата, в роли которого выступала фосфатидная кислота, значение константы скорости первого порядка разрушения цитохрома c возрастало. Предположено, что быстрое разрушение цитохрома c при осуществлении им катализа липопероксидазной реакции является эволюционно развившимся механизмом, направленным на предотвращение самопроизвольного запуска апоптоза.

Ключевые слова: anonmos, комплекс цитохрома с с кардиолипином, пероксидаза, спектрофотометрия, липопероксидазная реакция.

DOI: 10.31857/S0006302921010075

Ключевым фактором запуска программы апоптоза (запрограммированной гибели клеток) по внутреннему, или митохондриальному, пути является разрушение митохондриальных мембран, происходящее вследствие липопероксидазной активности цитохрома *с* (ЦитС) [1]. Пероксидазная активность у ЦитС появляется благодаря разрыву координационной связи между гемовым железом и остатком метионина в положении 80 апопротеина и специфическому изменению конформации белка (переходу в состояние «расплавленной глобулы», *анел. «molten globule»*) при его связывании с кардиолипином [1, 2]. В силу того что ЦитС проявляет пероксидазную активность только в определенных условиях (в клетках таковым является его связывание с кардиолипином), называть его классической пероксидазой нельзя. В обзоре [3] по отношению к нему наряду с гемоглобином, цитоглобином, миоглобином и другим белкам со схожими свойствами применяется термин «псевдопероксидаза». Однако, на наш взгляд, данный термин не совсем уместен, так как механизм пероксидазной активности указанных выше белков в целом схож с таковым для классических ферментов-пероксидаз, а образующиеся продукты реакции взаимодействия фермента с

Сокращения: ЦитС – цитохром с, ФК – фосфатидная кислота, ТОКЛ – тетраолеилкардиолипин, ЦитС-ТОКЛ – комплекс цитохрома с с тетраолеилкардиолипином.



Рис. 1. Общая схема реакций ферментов-пероксидаз. АН₂ – липидный субстрат, X – атом галогена [6]. Основными реакциями считаются реакции *1*, *3а* и *4a*, осуществляющие запуск перекисного окисления липидов [3].

пероксидазой идентичны как для этих белков, так и для классических пероксидаз [4, 5]. А приставка «псевдо-» скорее означает что-то внешне похожее, лишь кажущееся, но не являющееся таковым. Поэтому по отношению к цитохрому *с* и другим похожим белкам, на наш взгляд, больше подходит термин «факультативная пероксидаза». На рис. 1 приведена схема механизма проявления белком пероксидазной активности, целиком и полностью заимствованная из статьи [6]; приведенные на ней реакции справедливы как для классических, так и для факультативных пероксидаз, в том числе и для комплекса цитохрома *с* с кардиолипином.

Основными реакциями, способствующими последующему разрушению мембран митохондрий и, следовательно, ведущими к апоптозу, являются реакция 1 и реакции За и 4а, приводящие к образованию липидных радикалов, запускающих каскад реакций перекисного окисления липидов. Механизмы этих реакций подробно изложены в работах [3, 6, 7], поэтому не будем здесь на них останавливаться; а в обзоре [3] приводятся частные отличия между реакциями классических и факультативных пероксидаз, называемых автором работы [3] псевдопероксидазами. В частности, приводятся сведения касательно того, что факультативные пероксидазы разрушаются в ходе проявления пероксидазной активности. Кроме того, в работе [8] непосредственно показано разрушение ЦитС, находящегося в комплексе с кардиолипином и катализирующего пероксидазную реакцию. Однако в работе [8] указывается лишь на качественный факт разрушения ЦитС без анализа кинетики этого процесса. Разрушение ЦитС при катализе пероксидазной реакции внимательным образом исследовалось в работе [9], однако в указанном исследовании соотношение ЦитС : кардиолипин при максимальном количестве кардиолипина составило 1:10, в то время как, согласно данным работы [1], чтобы ЦитС в полной мере начал проявлять пероксидазную активность, необходимо, чтобы на одну его молекулу приходилось более 20 молекул кардиолипина. В одном из экспериментов, результаты которого представлены в работе [9], количество молекул фосфолипидов на одну молекулу ЦитС все-таки равно 20, однако половина из них – это молекулы 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина, которые, по данным самих авторов работы [9], сами по себе даже в соотношении 20 на 1 молекулу ЦитС не вызывали никакого увеличения скорости окисления белка в сравнении с пробой, содержащей только ЦитС и H₂O₂. А это в свете данных касательно факультативных пероксидаз, представленных в обзоре [3], означает, что в том случае активация пероксидазных свойств ЦитС не происходила вовсе.

Поэтому в настоящей работе мы поставили цель изучить разрушение ЦитС, находящегося в комплексе с тетраолеилкардиолипином при со-
отношениях белок : липид, равных 1 : 60 и 1 : 30, во время катализа им липопероксидазной реакции при внесении в качестве дополнительного липидного субстрата в некоторые пробы со вторым соотношением фосфатидной кислоты (ФК).

На наш взгляд, также необходимо обратить внимание читателя на то, что пероксидазный цикл может проходить и без участия липидного субстрата, посредством взаимодействия с другими молекулами H₂O₂. К примеру, Compound I способен окислить не только молекулу липида, но и Н₂О₂ с образованием супероксидного анионного радикала (реакция 3b на рис. 1), который Compound II окисляет до кислорода (реакция 4b на рис. 1). Также Compound II может окислить еще одну молекулу H_2O_2 (реакция 11 на рис. 1) с образованием еще одной формы фермента - пероксидазы, называемой Compound III (его не нужно путать с «промежуточным соединением III» из работы [10], так как в ней не установлен его состав, и под ним может крыться лишь одна из других форм пероксидазы с окисленным апопротеином), который, выделяя супероксидный анионный радикал, превращается в исходную форму пероксидазы, содержащую трехвалентное железо (реакция 9 на рис. 1), или же, выделяя кислород, – в форму, содержащую двухвалентное железо (реакция 7 на рис. 1). Эта форма по реакции 10, идентичной реакции 1 для Ferric-формы, превращается в Compound II [6]. Все эти реакции нужно иметь в виду при анализе данных экспериментов по изучению свойств комплекса цитохрома с с кардиолипином, особенно когда липидный субстрат в системе трудноокисляем, а перекись водорода находится в высокой концентрации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе были использованы следующие реактивы: KH_2PO_4 , 20 мМ буферный раствор (pH 7.4); пероксид водорода, 8.6 М водный раствор (Sigma-Aldrich, США); цитохром *c*, 1 мМ раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); 1,1',2,2'тетраолеилкардиолипин (ТОКЛ), 6 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США); фосфатидная кислота, 12 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США).

Растворы указанных выше веществ более низких концентраций приготовляли методом последовательных разведений растворов, указанных в списке, кратность последовательных разбавлений не превышала 10.

Методика эксперимента. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord 200 (Analytik Jena, Германия) с ис-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

пользованием кювет из кварцевого стекла с длиной оптического пути 1 см. Спектры поглощения регистрировали в пробе объемом 3 мл в диапазоне 300-600 нм, в качестве растворителя использовали 20 мМ фосфатный буфер с рН 7.4. Концентрацию ЦитС вычисляли, используя уравнение Бугера-Ламберта-Бера, на основании серии спектров поглощения, зарегистрированных по алгоритму, подробно изложенному в патенте [11]. В опытную пробу мы вносили 100 мкл 100 мкМ ЦитС, в пробу для формирования комплекса цитохрома с с тетраолеилкардиолипином (ЦитС-ТОКЛ) при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 вносили 150 мкл 6 мМ метанольного раствора ТОКЛ, при соотношении 1:60 – 300 мкл, в некоторые пробы, содержащие ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30, также вносили 150 мкл 12 мМ метанольного раствора ФК. Липопероксидазную реакцию мы запускали внесением в пробы 300 мкл 2150 мкМ раствора H₂O₂.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами были зарегистрированы серии спектров оптической плотности реакционных смесей следующего состава: 1) 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H₂O₂ эта проба позволяет оценить непосредственное разрушение ЦитС под действием перекиси водорода, другие три пробы отражают разрушение этого белка, являющееся следствием проявления им пероксидазной активности; 2) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ Н₂О₂; 3) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС: ТОКЛ = 1:60 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; 4) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H_2O_2 . Некоторые из зарегистрированных спектров представлены на рис. 2 и 3. На рис. 2 показаны спектры поглощения в диапазоне длин волн 300-600 нм

На рис. 3 показана область спектра в диапазоне длин волн 500—580 нм, содержащая второй пик поглощения ЦитС, значение оптической плотности в котором значительно меньше, чем в полосе Соре. Но тем не менее по этому пику тоже можно судить о разрушении ЦитС в процессе реакции.

Из данных, представленных на рис. 2 и 3, следует, что ЦитС разрушается при действии перекиси водорода, о чем свидетельствует уменьшение оптической плотности в пиках поглощения, причем это разрушение сильнее в том случае, когда в смеси присутствует кардиолипин, связывание с которым придает ЦитС пероксидазную активность. Сам по себе этот факт был установлен ранее, хотя в том исследовании соотношение ЦитС : кардиолипин и отличалось от оптимального, способствующего максимальной пероксидазной активности данного белка [9].



Рис. 2. Спектры поглощения в диапазоне 300–600 нм реакционных смесей: (a) – 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H_2O_2 ; (b) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (b) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 60 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H_2O_2 . Спектры зарегистрированы в определенные моменты с начала реакции: *1* – через 1 мин; *2* – через 3.5 мин; *3* – через 6 мин; *4* – через 12 мин для (a), (b), (г) и через 13 мин для (в); *5* – через 86 мин.

Далее нами с использованием уравнения Бугера—Ламберта—Бера были определены концентрации ЦитС в различные моменты времени от начала реакции. Так как в изучаемом диапазоне длин волн (300–600 нм) вкладом в общую оптическую плотность смеси, вносимом ТОКЛ, Φ K и H₂O₂, можно пренебречь, то при вычислении концентрации ЦитС можно использовать непосредственно значения оптической плотности смеси. При определении концентрации ЦитС мы использовали значение оптической плотности на длине волны, равной 409 нм. Поглощение на этой длине волны обусловлено содержанием в молекуле ЦитС порфириновой группировки гема [10].

Вычисленные значения концентрации ЦитС для указанных выше проб представлены на рис. 4.

Как видно из графиков, представленных на рис. 4, разрушение ЦитС, находящегося в составе комплекса ЦитС-ТОКЛ и, следовательно, проявляющего пероксидазную активность, носит характер экспоненциальной функции (рис. 46–г), в то время как функция разрушения ЦитС в присутствии H₂O₂ и в отсутствие липида в целом носит линейный характер.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя данные об уменьшении концентраций ЦитС, мы определили константы скорости реакции первого порядка для его разрушения. Рассматривать разрушение ЦитС в качестве реакции первого порядка в данном случае уместно, так как его концентрация более чем на порядок ниже концентрации перекиси водорода. Разрушение ЦитС в системе, где к нему добавлена только перекись водорода (рис. 2а, 3а, 4а), является результатом просто действия Н₂O₂ на белок, вернее – на содержащуюся в нем порфириновую группировку гема. Разрушение же ЦитС в других рассматриваемых случаях - следствие проявления им пероксидазной активности. Мы предполагаем, что быстрое разрушение ЦитС в этом случае, в сравнении с классическими пероксидазами [3], – это механизм защиты клеток от запуска программы апоптоза.



Рис. 3. Спектры поглощения в диапазоне 500–580 нм реакционных смесей: (a) – 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H_2O_2 ; (b) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (b) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 60 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H_2O_2 . Спектры зарегистрированы в определенные моменты с начала реакции: *1* – через 1 мин; *2* – через 3.5 мин; *3* – через 6 мин; *4* – через 12 мин для (а), (б), (г) и через 13 мин для (в); *5* – через 86 мин.

Однако перед вычислением констант скорости разрушения ЦитС, находящегося в составе комплекса с ТОКЛ, мы определили ее для разрушения свободного ЦитС под действием перекиси водорода. Эту реакцию мы рассмотрели двумя способами: 1) как реакцию первого порядка; 2) как реакцию нулевого порядка — в пользу этого свидетельствует визуальная близость функции уменьшения концентрации (рис. 4а) к линейной, а также то, что применение дифференциального метода Вант-Гоффа дало такое значение: результат округления до единиц углового коэффициента прямой, построенной в координатной плоскости зависимости натурального логарифма скорости реакции от натурального логарифма концентрации ЦитС для соответствующих моментов времени, равен нулю. Таким образом, мы получили значение константы скорости реакции первого порядка для разрушения свободного ЦитС при действии 215 мкМ H₂O₂, равное $(0.000057 \pm 0.000001) \text{ c}^{-1}$, и значение константы скорости реакции нулевого порядка, которое яв-

лее верным, равное $(52.3 \pm 0.4) \cdot 10^{-11}$ моль/л·с. Относительная ошибка аппроксимации функции уменьшения концентрации ЦитС в ходе реакции, определенной как реакция нулевого порядка, составляет всего 0.3%.

ляется применительно к данной реакции наибо-

Далее мы определили константы скорости разрушения ЦитС, находящегося в составе комплекса с ТОКЛ. Константы скорости реакции разрушения ЦитС, определенные нами для первых минут реакции, составляют: для системы ЦитС-ТОКЛ при соотношении белок : липид = 1 : 30 при внесении 215 мкМ H_2O_2 (0.00159 ± 0.00007) с⁻¹; при соотношении 1:60 – (0.00139 ± 0.00007) с⁻¹; для системы ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1:30 при внесении 600 мкМ легкоокисляемой ФК и 215 мкМ H_2O_2 (0.00262 ± ± 0.00162) с⁻¹.

Схожесть значений констант скорости первого порядка разрушения ЦитС при соотношениях



Рис. 4. Уменьшение концентрации ЦитС за первые 700 с реакции в смесях: (a) – 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H_2O_2 ; (б) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (в) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 60 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H_2O_2 .

ЦитС: ТОКЛ 1: 30 и 1: 60 позволяет сделать вывод о том, что, достигнув оптимальных значений для активации пероксидазных свойств у ЦитС, соотношение ЦитС: кардиолипин внутри этих значений не особо влияет на скорость катализируемой ЦитС пероксидазной реакции, о чем можно судить по скорости разрушения самого ЦитС в ходе реакции для первых двух систем. Отметим, что в случае, когда в систему не добавлена фосфатидная кислота, по нашему мнению, скорее всего пероксидазный цикл протекает через реакции 3b, 11, 10, 4b (рис. 1), а не через реакции За и 4а, так как остатки олеиновой кислоты, имеющие место в ТОКЛ, должны давать липидные радикалы с большим трудом. Значение же константы скорости реакции первого порядка в присутствии ФК для разрушения ЦитС, находящегося в комплексе с ТОКЛ, выше (хотя тут необходимо указать на большие пределы погрешностей, поэтому для данной системы целесообразно в будущем провести более детальное исследование). В данном случае как раз происходит липопероксидазная реакция, имеющая место в живых митохондриях.

выводы

В ходе изучения процесса разрушения цитохрома с, находящегося в комплексе с ТОКЛ в соотношении, свойственном таковому для наблюдаемого в природе, в ходе катализируемой им липопероксидазной реакции определены константы скорости реакции первого порядка этого процесса. Путем сравнения динамики уменьшения концентрации цитохрома с в ходе катализа им пероксидазной реакции с динамикой уменьшения концентрации свободного цитохрома с, подвергнутого воздействию H₂O₂, показано, что разрушение этого белка в первом случае гораздо выше и носит выраженный экспоненциальный характер. По нашему предположению, быстрое разрушение цитохрома с в ходе катализа им липопероксидазной реакции является эволюционным механизмом защиты клеток от разрушения мембран митохондрий и дальнейшего запуска апоптоза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Выполнение экспериментов, результаты которых представлены в работе, было поддержано

грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-015-00491 «Изучение механизма реакций образования свободных радикалов в мембранах клеток и митохондрий, катализируемых комплексом цитохрома *с* с анионными липидами (Cyt-AL)».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина и А. В. Алексеев, Биохимия 78, 1391 (2013).

- M. Li, A. Mandal, V. A. Tyurin, et al., Structure 27, 806 (2019). DOI: 10.1016/j.str.2019.02.007
- 3. I. I. Vlasova, Molecules **23** (10), 2561 (2018). DOI: 10.3390/molecules23102561
- A. Mandal, C. L. Hoop, M. DeLucia, et al., Biophys. J. 109, 1873 (2015). DOI: 10.1016/j.bpj.2015.09.016
- N. A. Belikova, Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, et al., Biochemistry 45, 4998 (2006).
- P. G. Furtmuller, W. Jantschko, M. Zederbauer, et al., Jpn. J. Infect. Dis. 57, 830 (2004).
- 7. J. N. Rodriguez-Lopez, D. J. Lowe, J. Hernandez-Ruiz, et al., J. Am. Chem. Soc. **123**, 11838 (2001).
- 8. Л. А. Ромодин, С. В. Шангин, Ю. А. Владимиров и др., Изв. Международной академии аграрного образования, № 42-1, 118 (2018).
- Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., Биохимия 71, 1225 (2006).
- C. Dallacosta, E. Monzani, and L. Casella, J. Biol. Inorg. Chem. 8, 770 (2003). DOI: 10.1007/s00775-003-0478-z
- Л. А. Ромодин, М. Ф. Трифонова, Н. П. Лысенко и С. А. Бекузарова, Патент РФ № 2720807 (заявл. 04.06.2019, опубл. 13.05.2020).

Destruction of Cytochrome c in Cardiolipin Complex during Catalysis of Lipid Peroxidation

L.A. Romodin*, Yu.A. Vladimirov**, ***, ****, *****, and N.P. Lysenko*

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

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

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

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

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

This study explores the changes in cytochrome c catalyzing the lipoperoxidase reaction, thereby causing the destruction of mitochondrial membranes in living cells and the release of various pro-apoptotic molecules into the cytosol. Spectrophotometric analysis revealed that cytochrome c destroyed much more intensively when hydrogen peroxide was added in the presence of tetraoleilcardiolipin at the protein/cardiolipin ratios of 1 : 30 and 1 : 60. These ratios are optimum for the formation of the cytochrome c-cardiolipin complex rather than the sample, which contained only hydrogen peroxide and cytochrome c. At a ratio of 1 : 60, the shape of the destruction of heme porphyrin group was linear, while data looked exactly exponential after addition of cardiolipin. Besides, the value of a first order rate constant of destruction of cytochrome c was increased after applying the lipid substrate. It was a phosphatidic acid. These results suggest that a rapid destruction of cytochrome c during catalysis of lipid peroxidation is the mechanism designed by evolution to prevent the spontaneous initiation of apoptosis.

Keywords: apoptosis, cytochrome c-cardiolipin complex, peroxidase, spectrophotometry, lipid peroxidation

УДК 577.355.3

ТЕМПЕРАТУРНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В МЕМБРАННЫХ ПРЕПАРАТАХ ФОТОСИСТЕМЫ II БЕЗ КАЛЬЦИЯ В КИСЛОРОДВЫДЕЛЯЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ

© 2021 г. Е.Р. Ловягина, Б.К. Сёмин

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12 E-mail: semin@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 25.11.2019 г. После доработки 12.10.2020 г. Принята к публикации 20.10.2020 г.

Исследована температурная устойчивость электронного транспорта к искусственному акцептору электронов 2,6-дихлорофенолиндофенолу в препаратах нативной фотосистемы II и фотосистемы II без катиона кальция в кислородвыделяющем комплексе. Температурная стабильность процессов выделения кислорода и переноса электрона от кислородвыделяющего комплекса к 2,6-дихлорофенолиндофенолу в фотосистеме II значительно отличаются – восстановление 2,6-дихлорофенолиндофенола более устойчиво к действию температуры, чем выделение кислорода. Реакция восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола в препаратах фотосистемы II без кальция менее устойчива к нагреванию, чем в препаратах нативной фотосистемы ІІ. Температурная инактивация мембранных препаратов фотосистемы II без кальция ингибируется цитохромом с при концентрации 50 молекул цитохрома с на реакционный центр фотосистемы II. Активность препарата (скорость восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола) при этом максимально возрастает на 19%, приближаясь к активности нативной фотосистемы II. Протекторная функция цитохрома с, по-видимому, определяется его белковой природой, а не его редокс-функцией, так как равный по величине защитный эффект наблюдался и при добавлении альбумина в аналогичной концентрации. Практически полная инактивация реакции восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола в препаратах фотосистемы II с кальцием и без кальция в кислородвыделяющем комплексе имеет место при одинаковой температуре (50°С). Согласно данным ЭПР после инкубации при этой температуре в препарате фотосистемы ІІ без кальция отсутствует марганцевый кластер, но присутствует периферический белок 33 кДа.

Ключевые слова: фотосистема 2, кислородвыделяющий комплекс, кальций, термоустойчивость. **DOI:** 10.31857/S0006302921010087

Расшифровка механизма влияния повышенных температур на функционирование фотосинтетического аппарата растений имеет не только теоретическое значение, но и значительный практический интерес. В этой связи данная проблема интенсивно исследуется, и в настоящее время достигнуты определенные успехи в этом направлении (см. обзорную работу [1]). В результате многочисленных исследований установлено, что при повышенных температурах в первую очередь происходит инактивация фотосистемы II (ФС II) фотосинтетического аппарата в результате ингибирования самого чувствительного к теплу компонента ФС II – кислородвыделяющего комплекса (КВК). Термоингибирование КВК сопровождается диссоциацией периферических белков и высвобождением катионов марганца из связывающих участков [2-6]. Полная инактивация выделения кислорода наблюдается при температурах 49-50°С [2, 4, 7]. Первоначальной стадией данного процесса является, по-видимому, диссоциация периферического белка 18 кДа, сопровождающаяся высвобождением катиона кальция из КВК [6]. Затем диссоциируют периферический белок 23 кДа и марганецстабилизирующий белок 33 кДа [4], после чего попарно (2+2) высвобождаются катионы марганца [8]. Предполагается, что нагревание инициирует генерацию синглетного кислорода ¹О₂ и гидроксильного радикала НО•, которые разрушают D1белок реакционного центра фотосистемы II и та-

Сокращения: ФС II – фотосистема II, КВК – кислородвыделяющий комплекс, ДХФИФ – 2,6-дихлорофенолиндофенол, ФСII(-Са) – фотосистема II без катиона кальция в кислородвыделяющем комплексе, ФСII(-Мп) – фотосистема II без марганцевого кластера в кислородвыделяющем комплексе, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

ким образом индуцируют диссоциацию периферических белков PsbO, PsbP и PsbQ, так же как и катионов марганца, что и приводит к ингибированию функциональной активности ФС II [9].

В исследованиях, посвященных данной проблеме, основным измеряемым параметром, отражающим эффективность термоингибирования ФС II, является скорость выделения кислорода КВК в процессе окисления им воды. В нативной ФС II эти реакции (окисление воды и выделение молекулярного кислорода) сопряжены, т.е. осуществляются взаимосвязанно. Однако при некоторых обстоятельствах молекулы воды могут окисляться не до О2, а до промежуточного продукта Н₂О₂ без выделения кислорода. Такой процесс происходит в результате эффекта «разобщения» и имеет место в мембранах ФС II после удаления катиона Ca²⁺ совместно с перифериче-скими белками PsbP (23 кДа) и PsbQ (18 кДа) из КВК [10]. Выделение кислорода в таких препаратах отсутствует, тогда как светоиндуцируемый электронный транспорт, регистрируемый по восстановлению искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндофенола (ДХФИФ), сохраняется на достаточно высоком уровне (около 70% от исходной величины) [10]. Этот эффект дает возможность в контексте вышеизложенного исследовать особенности термоингибирования реакции окисления воды, не связанной с процессом выделения кислорода. В данной работе мы провели сравнительное исследование зависимости ингибирования восстановления ДХФИФ, а не выделения О2, от температуры инкубации мембранных препаратов интактной ФС II и ΦCII(-Ca).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение мембранных препаратов ФС II из листьев шпината. Мембранные препараты ФС II (BBY-частицы) были выделены из листьев рыночного шпината согласно методике, опубликованной в работе [11]. Препараты хранили при температуре –80°С в буфере А следующего состава: 400 мМ сахарозы, 15 мМ NaCl, 50 мМ 2-(Nморфолино)этансульфоновой кислоты/NaOH (pH 6.5). Концентрацию хлорофилла определяли в 80%-м растворе ацетона согласно методу, предложенному в работе [12].

Экстракция катионов Ca²⁺ из препаратов ФС II. Ca²⁺, PsbQ- и PsbP-белки КВК были удалены из нативных препаратов ФС II путем обработки их буфером, содержащим 2 M NaCl, 0.4 M сахарозы и 25 мM 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты/NaOH (pH 6.5) [13]. Мембраны ФС II инкубировали в этом буфере при концентрации хло-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

рофилла 0.5 мг/мл в течение 15 мин при комнатном освещении (4–5 мк $\Im \cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$) и температуре 22°С. Полученные препараты Φ СІІ(-Са) дважды отмывали буфером A и ресуспендировали в буфере A (pH 6.5).

Экстракция катионов марганца из препаратов ΦC II. Экстракцию Mn из ΦC II осуществляли путем обработки нативных препаратов при концентрации хлорофилла 0.5 мг/мл 0.8 M трис-HCl-буфером (pH 8.5) (время инкубации 15 мин при комнатных температуре и освещении). Полученные препараты ΦC II без марганцевого кластера в кислородвыделяющем комплексе ($\Phi CII(-Mn)$) осаждали и трижды отмывали буфером A для удаления неспецифически связанных ионов Mn(II), а затем ресуспендировали в буфере A (pH 6.5). Такие мембранные препараты не содержат всех внешних белков KBK, включая Mn-стабилизирующий белок PsbO, а также катион Ca²⁺ и марганцевый каталитический кластер.

Измерение электрон-транспортной активности препаратов ФС II. Скорость восстановления ДХФИФ определяли спектрофотометрически при длине волны 600 нм за первые 30 с освещения препаратов насыщающим светом. Для расчетов использовали коэффициент молярной экстинкции депротонированной формы ДХФИФ, равный 21.8 м $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ [14]. Кинетику фотоиндуцированного выделения кислорода препаратами ФС II регистрировали с помощью закрытого электрода Кларка в термостатируемой ячейке при 25°С. В качестве искусственного акцептора электронов использовали 2,6-дихлоро-*n*-бензохинон в концентрации 200 мкМ. Источником возбуждающего света при регистрации кинетик восстановления ДХФИФ и выделения кислорода служили светодиоды XBDROY (Cree Inc., США) с максимумом излучения при 450 нм.

Термоинактивация препаратов. Все препараты ФС II с концентрацией хлорофилла 20 мкг/мл инкубировали при определенной температуре в течение 15 мин (время термообработки, при котором инактивирующий эффект выходит на плато) в темноте, помещая образцы в предварительно прогретый буфер. Затем быстро охлаждали до 4°С во льду (3 мин). Все измерения проводили при температуре 25°С.

Регистрация спектров электронного парамагнитного резонанса. Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) был использован для определения светозависимого окисления экзогенных катионов Mn(II) препаратами ФСII(-Са) путем регистрации шестилинейчатого спектра свободных катионов Mn(II). ЭПР-измерения проводили на радиоспектрометре РЭ1307 трехсантиметрового диапазона (СКБ средств автоматики, Смоленск). Условия регистрации: мощ-



Рис. 1. Зависимости скорости выделения O_2 и восстановления ДХФИФ различными препаратами ФС II от температуры предварительной инкубации: 1, 2 – скорости выделения O_2 и восстановления ДХФИФ нативными препаратами ФС II соответственно; 3 – скорость восстановления ДХФИФ препаратом ФСII(-Ca); 4 – скорость восстановления ДХФИФ препаратом ФСII(-Mn) с донорной системой [2 мкМ Мn + 3 мМ H₂O₂]. 100% соответствует активности конкретного препарата после инкубации при температуре 25°С: 160 мкмоль ДХФИФ · мг Хл⁻¹ · ч⁻¹ и 480 мкмоль O₂ · мг Хл⁻¹ · ч⁻¹ для нативной ФС II; 110 мкмоль ДХФИФ · мг Хл⁻¹ · ч⁻¹ – для препарата ФСII(-Ca); 170 мкмоль ДХФИФ · мг Хл⁻¹ · ч⁻¹ – для препарата ФСII(-Mn). Условия термоинактивации описаны в разделе «Материалы и методы».

ность CBЧ – 20 мВт, амплитуда ВЧ-модуляции – 10 Гс, константа времени – 10 мс, время развертки – 20 с, ширина развертки – 1000 Гс. Образцы помещали в плоскую кварцевую кювету с внутренним зазором 0.25 мм. Освещение проводили в резонаторе радиоспектрометра сфокусированным светом интенсивностью 1500 мкЭ · м⁻² · c⁻¹. Концентрация хлорофилла составляла 1 мг/мл. Все эксперименты были выполнены при 22°С.

Представленные на рисунках и в таблице данные являются средними арифметическими значениями, полученными в независимых экспериментах при проведении не менее трех измерений в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе измерения температурной устойчивости препараты были инкубированы при заданной температуре в интервале 25–50°С в течение 15 мин, а затем деструктивное действие тепла быстро останавливали, охлаждая препараты во льду. Измерения активности препаратов (восстановление ДХФИФ или выделение кислорода) проводили при температуре 25°С. На рис. 1 показаны зависимости устойчивости реакции выделения кислорода интактным препаратом ФС II (кривая 1) и реакции восстановления ДХФИФ препаратами ФС II, ФСІІ(-Са) и препаратом ФС II без катионов марганца в КВК (ФСІІ(-Mn)). В последнем случае в качестве донора электронов использовали систему H_2O_2 (3 мM) + Mn(II) (2 мкМ). Полученные результаты показывают, что процесс восстановления ДХФИФ в нативных препаратах ФС II более устойчив к повышенной температуре, чем реакция выделения О2. Процесс инактивации выделения О2 начинается при более низких температурах (30-35°С), чем ингибирование восстановления ДХФИФ (рис. 1). Этот факт может быть объяснен ранней диссоциацией периферического белка 18 кДа (PsbQ) и ингибированием вследствие этого реакции выделения кислорода [6]. В то же время в результате эффекта разобщения [10] реакция окисления воды ингибируется незначительно, что проявляется в большой скорости восстановления ДХФИФ. Сочетание этих двух механизмов и является причиной различия в температурной устойчивости выделения О₂ и восстановления ДХФИФ. Реакция восстановления ДХФИФ в мембранных препаратах ФСІІ(-Са) менее устойчива к нагреванию (рис. 1, кривая 3), чем в нативных препаратах ΦC II, но более устойчива, чем процесс выделения кислорода нативными мембранами ФС II. Поскольку препарат ФСІІ(-Са) не содержит периферических белков PsbP и PsbQ, скорость окисления им воды меньше, чем в нативных препаратах, и определяется только присутствием марганцевого кластера и одного периферического (Мп-стабилизирующего) белка PsbO, что делает эту реакцию более чувствительной к температуре. Зависимость 4 на рис. 1 демонстрирует устойчивость к температуре препарата ФС II без КВК (ФСІІ(-Mn)), т.е. зависимость электрон-транспортной цепи от Y_Z до Q_B. Полученный результат показывает, что наиболее чувствительным к температуре в ФС II является марганцевый кластер в комплексе с периферическими белками.

В последующих экспериментах мы исследовали возможность увеличения устойчивости к повышенной температуре ФС II без двух периферических белков и кальция в КВК путем добавления экзогенного белка, в качестве которого был выбран цитохром c. Это обусловлено тем, что в ФС II термофильных цианобактерий в качестве периферического белка присутствует цитохром c_{550} , стабилизирующий КВК при термоинактивации [15]. Цитохром c, добавленный к препарату ФСII(-Са) в соотношении 50 молекул на реакционный центр, существенно увеличивает устойчивость мембранного препарата к нагреванию (рис. 2, таблица). Следует отметить, что цитохром c может быть восстановлен электрон-транспорт-

ными компонетами Φ C II [16, 17], т.е. окислять их, влияя тем самым на структурные особенности препарата. Однако редокс-активность цитохрома *c*, по-видимому, не является основной в обнаруженной нами защитной функции, так как другой белок (без редокс-активности) — альбумин — также повышает устойчивость Φ CII(-Ca) к термоинактивации (см. таблицу).

Интересно отметить, что полная инактивация процесса переноса электрона от КВК к ДХФИФ происходит при одинаковой температуре (50°С) как в нативном препарате ФС II, так и в препарате ФСІІ(-Ca). Прекращение электронного потока к экзогенному акцептору электронов означает полное ингибирование процесса окисления воды скорее всего в результате полной деструкции марганцевого кластера. Мы исследовали препарат ФСІІ(-Са), прогретый при температуре 50°С (рис. 3). В растворе катионы Mn(II) имеют шестилинейчатый спектр ЭПР, который надежно регистрируется при диссоциации восстановленного марганцевого кластера [18-20]. Измеренный ЭПР-спектр прогретого препарата показывает наличие в растворе свободных катионов восстановленного марганца, которые исчезают при освещении. Исчезновение шестилинейчатого спектра свидетельствует об окислении катионов Mn(II) препаратом Φ CII(-Ca), которое может происходить только на высокоаффинном Mnсвязывающем участке [21]. Эти результаты свидетельствуют, что прогревание фотосистемы при температуре, близкой к 50°С, сопровождается восстановлением катионов марганца каталитического центра, их выходом из участков связывания и появлением свободного высокоаффинного



Рис. 2. Влияние цитохрома *с* на термоустойчивость электронного транспорта (восстановление ДХФИФ) в препаратах ФСП(-Са), прогретых при 40 или 45°С. За 100% принята величина скорости восстановления акцептора каждым конкретным препаратом, измеренная после прогревания при температуре 25°С. Препараты инкубировали в буфере A (pH 6.5) при заданной температуре в течение 15 мин, затем быстро охлаждали до 4°С (3 мин), центрифугировали 5 мин при 16000 *g* и суспендировали в буфере A. Измерения проводили при температуре 25°С. Концентрация цитохрома *c* составляла 5 мкМ.

участка. Увеличение концентрации катионов марганца в растворе при добавлении экзогенного марганца не влияет на эффективность их окисления при освещении, что демонстрирует высокую концентрацию окисляющих центров. Следует отметить, что окисленные на свету катионы мар-

	Температура инкубации 25°С		Температура инкубации 45°С		
Препарат	Скорость восстановления ДХФИФ				
	мкмоль \cdot мг X л ⁻¹ \cdot ч ⁻¹	%	мкмоль \cdot мг X л ⁻¹ \cdot ч ⁻¹	%	
ΦC II	160	100	131	82	
ΦCII(-Ca)	109	68	58	36	
Φ CII(-Ca) + 5 мкМ цитохрома <i>c</i> (измерение активности в присутствии цит. <i>c</i>)	108	68	82	51	
ФСІІ(-Са) + 5 мкМ цитохрома <i>с</i> (цитохром с удален после прогревания)	106	66	80	50	
ФСІІ(-Ca) + 5 мкМ альбумина (измерение активности в присутствии альбумина)	109	68	84	53	
ФСІІ(-Ca) + 5 мкМ альбумина (альбумин удален после прогревания)	107	67	83	52	

Влияние цитохрома *с* и альбумина на термоустойчивость электронного транспорта в препаратах ФСІІ(-Ca)



Магнитное поле, Гс

Рис. 3. Спектры ЭПР препаратов ФСІІ(-Са), прогретых при 50°С в течение 15 мин. Термоинкубацию препаратов проводили при концентрации хлорофилла 20 мкг/мл в темноте, затем препарат быстро охлаждали до 4°С и концентрировали с помощью центрифугирования 5 мин при 16000 *g*. Концентрация мембран в образце составляла 1 мг Хл/мл (4 мкМ реакционных центров), экзогенного Mn(II) 4 мкМ, ДХФИФ 40 мкМ. Интенсивность освещения 1500 мкЭ · м⁻² · c⁻¹. Условия измерения ЭПР-спектров приведены в разделе «Материалы и методы».

ганца быстро восстанавливаются в темноте. При освещении препарата в присутствии ДХФИФ восстановленный ДХФИФН₂ частично восстанавливает окисленные катионы марганца, в результате чего на свету появляется шестилинейчатый спектр. Скорость восстановления значительно увеличивается при наличии в фотосистеме белка PsbO [19], поэтому наличие шестилинейчатого спектра в спектре ЭПР образца, освещенного в присутствии ДХФИФ, свидетельствует, что во всяком случае 15-минутная инкубация препарата ФСП(-Са) при температуре 50°С не сопровождается полной диссоциацией этого белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование термоустойчивости реакции окисления воды с выделением кислорода (полярографическая регистрация кинетик синтеза O_2 препаратами ФС II) и неполного окисления воды до перекиси водорода (спектрофотометрическая регистрация скорости восстановления акцептора электронов ДХФИФ препаратами ФС II без катиона Ca²⁺ в KBK) показало, что в обоих препаратах полная инактивация этих реакций происходит при одной темпера-

туре (50° C), хотя их температурная зависимость разная: процесс неполного окисления воды более устойчив к нагреванию препарата ФС II. Полученный результат, по-видимому, обусловлен эффектом разобщения [10], т.е. тем, что первоначально происходит инактивации реакции синтеза молекулярного кислорода и лишь затем реакции неполного окисления воды без выделения О2 частично поврежденным КВК. Полная инактивация препарата ФСІІ(-Ca), в отличие от нативного препарата ФС II, сопровождается удалением марганцевого кластера при сохранении белка PsbO. Установлено, что водорастворимый белок цитохром с повышает термоустойчивость электронтранспортной цепи в препаратах ФСІІ(-Ca), не участвуя при этом в окислительно-восстановительных превращениях.

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. S. I. Allakhverdiev, V. D. Kreslavski, V. V. Klimov, et al., Photosynth. Res. **98**, 541 (2008).
- D. Nash, M. Miyao, and N. Murata, Biochim. Biophys. Acta 807, 127 (1985).
- L. K. Thompson, R. Blaylock, J. M. Sturtevant, et al., Biochemistry 28, 6686 (1989).
- 4. I. Enami, M. Kitamura, T. Tomo, et al., Biochim. Biophys. Acta **1186**, 52 (1994). Isao
- 5. Y. Yamane, Y. Kashino, H. Koike, et al., Photosynth. Res. **57**, 51 (1998).
- 6. M. Barra, M. Haumann, and H. Dau, Photosynth. Res. **84**, 231(2005).
- S. Z. Toth, J. T. Puthur, V. Nagy, et al., Plant Physiol. 149, 1568 (2009).
- P. Pospisil, M. Haumann, J. Dittmer, et al., Biophys. J. 84, 1370 (2003).
- A. Yamashita, N. Nijo, P. Pospís^{*}il, et al., J. Biol. Chem. 283, 28380 (2008).
- K. Semin, L. N. Davletshina, I. I. Ivanov, et al., Photosynth. Res. 98, 235(2008).
- 11. F. Ghanotakis and G. T. Babcock, FEBS Lett. **153**, 231 (1983).
- 12. R. J. Porra, W. A. Tompson, and P. E. Kriedemann, Biochim. Biophys. Acta 975, 384 (1989).
- 13. T. Ono and Y. Inoue, Biochim. Biophys. Acta 1020, 269 (1990).
- J. M. Armstrong, Biochim. Biophys. Acta 86, 194 (1964).

- 15. Y. Nishiyama, H. Hayashi, T. Watanabe, et al., Plant Physiol. **105**, 1313(1994).
- S. A. Khorobrych and B. N. Ivanov, Photosynth. Res. 71, 209 (2002).
- 17. B. K. Semin, L. N. Davletshina, K. N. Timofeev, et al., Photosynth. Res. **117**, 385 (2013).
- A-F. Miller and G. W. Brudvig, Biochim. Biophys. Acta 1056, 1 (1991).
- 19. B. K. Semin, T. E. Podkovirina, L. N. Davletshina, et al., J. Bioenerg. Biomembr. 47, 361 (2015).
- A. Zavafer, M. H. Cheah, W. Hillier, et al., Sci. Rep. 5, 16363 (2015).
- 21. T. Ono and H. Mino, Biochemistry 38, 8778 (1999).

Thermal Stability of Electron Transport in the Oxygen-Evolving Complex of Ca-Depleted Photosystem II Membranes

E.R. Lovyagina and B.K. Semin

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

Thermal stability of electron transport to artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenolindophenol was investigated in intact photosystem II (PS II) and Ca-depleted photosystem II (PSII(-Ca)) membranes in the oxygen-evolving complex. The thermal stability data of the processes of oxygen evolution and electron transport from the oxygen-evolving complex to 2,6-dichlorophenolindophenol in PS II vary significantly –reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol is more stable than oxygen evolution in the the effects of temperature exposure. Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol in PSII(-Ca) membranes is less temperature resistant than that in the intact PS II samples. Heat inactivation of PSII(-Ca) membranes is inhibited by cytochrome c in the presence of 50 cytochrome c molecules per the PS II reaction center. Meanwhile, the sample activity (the rate of 2,6-dichlorophenolindophenol reduction) increased to the maximum by 19% reaching the value close to that of the activity of intact PS II samples. Protective function of cytochrome c is apparently determined by its protein nature rather than by its redox function since a similar protective effect was observed after addition of albumin at the same concentration. Almost full inactivation of 2,6-dichlorophenolindophenolindophenol since a similar protective effect was observed after addition at this temperature, the manganese cluster is absent in the PSII(-Ca) sample but the extrinsic 33 kDa protein is still present.

Keywords: photosystem II, oxygen-evolving complex, calcium, temperature stability

УДК 577.322.2

АДСОРБЦИЯ ФИБРИНОГЕНА НА ЛИПИДНОЙ ПОВЕРХНОСТИ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ФИБРИНООБРАЗОВАНИЯ

© 2021 г. Д.А. Файзуллин*, Ю.А. Валиуллина*, В.В. Сальников*, Ю.Ф. Зуев*

*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН», 420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31 E-mail: dfaizullin@mail.ru

С-тап. ајагдинт@тап.ти Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 29.06.2020 г. Принята к публикации 26.10.2020 г.

Установлено, что ферменты каскада коагуляции взаимодействуют с липидными микрочастицами или микровезикулами природного или искусственного происхождения, циркулирующими в крови. Такие взаимодействия могут модулировать гемостаз. Меньше известно о последствиях прямого взаимодействия фибриногена/фибрина с микровезикулами. С использованием очищенных систем в работе показано, что присутствие в растворе липидных частиц различного состава может оказывать специфическое влияние на кинетику полимеризации фибрина. Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие, что эти эффекты являются следствием адсорбции фибриногена на поверхности микровезикул. В частности, показано, что адсорбция фибриногена в достаточно высокой концентрации приводит к ускорению индуцированной тромбином полимеризации фибрина, благодаря локальному концентрирующему эффекту и включению микровезикул в структуру сгустка. Таким образом, непосредственное взаимодействие фибриногена с микровезикулами представляет собой существенный фактор гемостаза, который следует учитывать при анализе нарушения свертывания крови и разработке искусственных липидных носителей лекарственных препаратов.

Ключевые слова: липиды, фибрин, адсорбция, коагуляция. DOI: 10.31857/S0006302921010099

Фибриноген является ключевым участником системы гемостаза. Для поддержания коагуляционного равновесия значение имеют как концентрация фибриногена в крови, так и его активность. Известно, что одним из компонентов крови, который оказывает существенное влияние на свертывание крови, являются липиды. Липиды в кровотоке представлены в форме липопротеинов высокой и низкой плотности и в виде микровезикул, которые отшнуровываются от наружной клеточной мембраны в ходе активации и апоптоза клеток крови и эндотелиоцитов. Микровезикулы окружены фосфолипидной мембраной и характеризуются размерами приблизительно от 30-100 нм (экзосомы) до 1 мкм (клеточные микровезикулы) и больше (апоптотические тела и частицы липидных отложений). Основную популяцию циркулирующих в крови микровезикул образуют тромбоцитарные микровезикулы, выделяемые в кровоток при активации тромбоцитов. Установлено, что микровезикулы крови могут влиять на фибринообразование, структуру и устойчивость сгустка к лизису благодаря их участию в генерации активного тромбина и плазмина [1-5]. Вместе с тем имеются данные, что влияние тромбоцитарных микровезикул на строение и свойства фибрина не ограничивается тромбин-опосредованным кинетическим механизмом, но может также быть прямым, т.е. за счет их непосредственного связывания с фибрином в процессе его образования [3, 6–12].

Помимо естественно циркулирующих в крови липидных микровезикул, на гемостаз могут влиять также искусственные липидные частицы, применяемые в качестве носителей лекарств [13— 15] или заменителей тромбоцитов [16]. Имеются данные, что липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина обладают прокоагулянтной активностью, значительно превышающей активность других тромбоцитарных липидов [7].

Одной из причин изменения свертывающих свойств фибриногена может быть его адсорбция на поверхности липидных частиц [17–19], поскольку вторичная и третичная структура и ориентация молекул относительно поверхности вли-

Сокращения: ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3фосфохолин, ПОФГ – 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин), ПОФХ – 1-пальмитоил-2олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин.

яют на доступность молекул фибриногена для тромбина [20–23]. В свою очередь, изменение динамики полимеризации фибрина приводит к вариациям его пористости, толщины и разветвленности волокон [24], определяющих механическую устойчивость, проницаемость и скорость лизиса сгустка [25, 26].

В настоящей работе методами турбидиметрии и инфракрасной спектроскопии, а также микровесовым методом изучена адсорбция фибриногена на поверхности липидных бислоев из дипальмитоилфосфатидилхолина и бинарных липидных смесей и обсуждаются факторы, влияющие на способность фибриногена к свертыванию в этих условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибриноген из плазмы быка (Calbiochem, Германия) растворяли в воде, после чего переводили в буфер (20 мМ трис; 150 мМ NaCl, pH 7,4), используя колонки Zeba 7 kDa (ThermoFisher, USA). Концентрацию белка определяли, принимая коэффициент экстинкции равным $E_{280\rm HM}^{1\%} = 15,1$. Формирование сгустка инициировали введением тромбина из плазмы быка (Sigma, CША).

В качестве липидной компоненты использовали липосомы, приготовленные из следующих фосфолипидов: яичного лецитина (Sigma, США), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ДПФХ) (Sigma, США), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерина) (ПОФГ) и 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) (Avanti, США). Навески липидов растворяли в хлороформе, выпаривали под вакуумом и разводили в буфере. Суспензию кефалина («Технология-стандарт», Россия) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя. Полученные грубые липидные дисперсии подвергали нескольким циклам замораживания при температуре жидкого азота и оттаивания при 55°С. Липосомы получали методом экструзии через поликарбонатные фильтры с размером пор 100 нм (Avanti, США) при 55°С.

Измерение сорбции фибриногена на пленках липидов проводили с помощью кварцевых микровесов QCM-200 (Stanford Research Systems, США). Использовали кварцевые резонаторы на 5 МГц с золотым покрытием. Исследуемые растворы липидов (1 мг/мл) в смеси хлороформ/этанол (95 : 5 по объему) наносили на поверхность электрода кварцевого резонатора и сушили при комнатной температуре. Полноту удаления растворителей контролировали по постоянству частоты колебания резонатора до и после нанесения вещества судили о массе образовавшейся

пленки: $\Delta M = -\Delta F/Cf$, где ΔF – наблюдаемое изменение частоты в Гц; ΔM – изменение массы на единицу площади, в мкг/см²; *Cf* – коэффициент чувствительности кристалла (56.6 Г μ · мкг⁻¹ · см²). Толщину пленки липида оценивали, используя значение удельного объема для ДПФХ, равное 0.94 см³/г [27]. Толщина пленок липидов варьировала в пределах 100 ÷ 200 нм. Затем погружали открытую резонаторную ячейку с высушенной пленкой липида в буферный раствор при 60°С в течение 60 мин для гидратации и формирования однородного слоя [28, 29]. После уравновешивания и охлаждения вносили аликвоты стокового раствора фибриногена, последовательно увеличивая его концентрацию. Измеряли изменение частоты колебаний, пропорциональное массе сорбированного фибриногена. Все измерения проводили в идентичных условиях при температуре 25°С.

Кинетику полимеризации фибрина изучали методом турбидиметрии [30]. В кювете спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer, США) с толщиной оптического слоя 1 см смешивали раствор фибриногена и буферный раствор (контроль) или раствор, содержащий липосомы, в соотношении 1:1 по объему. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°С, после чего вносили тромбин. Конечные концентрации фибриногена и тромбина составляли 1 мг/мл и 0.26 ед/мл, соответственно. Концентрация липидов - 1.0 или 0.5 мг/мл. Формирование сгустка регистрировали по увеличению оптической плотности образца на длине волны 350 нм. Максимальную скорость роста рассеяния и длительность лаг-периода определяли по графику первой производной от турбидиметрической кривой.

Инфракрасные спектры регистрировали на спектрофотометре IR Affinity1 (Shimadzu, Япония) на приставке нарушенного полного внутреннего отражения с кристаллом ZnSe в качестве измерительного элемента. Спектральное разрешение 8 см⁻¹, число накоплений 512. Суспензии свободных липосом и липосом с фибриногеном пропускали через проточную микрокювету, смонтированную на кристалле приставки нарушенного полного внутреннего отражения. Адсорбцию липосом на поверхности измерительного элемента регистрировали по росту интенсивности полосы поглощения эфирных карбонилов $1730 \,\mathrm{cm}^{-1}$ до завершения кинетики. Неадсорбированные липосомы удаляли, пропуская раствор буфера. Кювету термостатировали при 37°С.

Для сканирующей электронной микроскопии на поверхность металлического (золотого) электрода кварцевого резонатора наносили раствор фибриногена, инкубировали при 37°С в течение 1 часа, ополаскивали буфером и наносили рас-



Рис. 1. Кинетика полимеризации фибриногена в суспензии липосом. Номера на кривых соответствуют: *1*, *2* – ДПФХ, *3* – контроль без липида, *4* – ДПФХ + + 20%ПОФХ, *5* – ДПФХ + 20%ПОФГ; *1*, *4*–*5* – концентрация липида 1 мг/мл, *2*–0.5 мг/мл. Концентрация фибриногена 1 мг/мл.

твор тромбина. Через 1 ч поверхность ополаскивали буфером и водой и высушивали на воздухе. Образующиеся структуры исследовали без предварительной металлизации на сканирующем микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия) в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» КФУ (Казань).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика фибринообразования, отслеживаемая по росту светорассеяния в буфере и в суспензии липосом, приведена на рис. 1. На контрольной кривой без липидов (кривая *3* на рис. 1) рост рассеяния происходит с задержкой от момента добавления тромбина. В течение этого времени, называемого лаг-периодом, происходит образование и рост коротких двухтяжевых протофибрилл. По достижении критического размера протофибрилл начинается быстрый рост рассеяния, обусловленный латеральной агрегацией протофибрилл и формированием относительно толстых многотяжевых нитей фибрина. От толшины нитей фибрина и пористости сгустка зависит уровень рассеяния на плато после завершения формирования фибрина [24]. Присутствие липидных частиц вызывает ряд эффектов в зависимости от химической природы липида (табл. 1). Наиболее выраженное воздействие оказывает ДПФХ: по сравнению с контролем наблюдается сокращение лаг-периода до нуля, некоторое увеличение начальной скорости и линейный рост рассеяния вместо выхода на плато после завершения полимеризации (кривая 1). Двукратное уменьшение концентрации липида усложняет зависимость: наблюдается как начальный резкий рост рассеяния, так и сокращенный по длительности участок лаг-периода (кривая 2). Добавление 20% ПОФГ в липосомы из ДПФХ существенно нивелирует воздействие последнего: увеличивается длительность лаг-периода и уменьшается начальная скорость, при этом существенно понижается уровень плато (кривая 5). Влияние таких липидов, как яичный лецитин и кефалин, минимально и заключается в небольших вариациях длительности лаг-периода и начальной скорости роста рассеяния (зависимости не приводятся). В смеси «ДПФХ + 20% ПОФХ» наблюдается существенное удлинение лаг-периода и уменьшение начальной скорости (кривая 4). Таким образом, присутствие липидных частиц влияет на все основные параметры кинетической кривой. Результатом является образование фибринового сгустка, морфологические характеристики которого

Таблина 1	Папамет	пы кинетики	фибрин	ообразован	MU B CV	спензиах	пипипов
таолица т.	Trapamer	pbi kmiernkn	φπορπη	ooopasoban	In D Cy	CHCHSENA	линдов

	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Липид	Длительность лаг-периода, с	Максимальная скорость роста светорассеяния, с ⁻¹
Контроль без липида, фибриноген 1 мг/мл	55 ± 8	$6.35e - 4 \pm 0.2$
ДПФХ 1 мг/мл, фибриноген 1 мг/мл	0	$6.95e-4 \pm 0.4$
ДПФХ 0,5 мг/мл, фибриноген 1 мг/мл	0	$4.22e-4 \pm 0.4$
ДПФХ / 20% ПОФХ, фибриноген 1 мг/мл	207 ±2 0	$2.91e-4 \pm 0.6$
ДПФХ / 20% ПОФГ, фибриноген 1 мг/мл	82 ± 17	$2.20e-4 \pm 0.2$
Яичный лецитин, фибриноген 1 мг/мл	61 ± 8	$5.98e-4 \pm 0.2$
Кефалин, фибриноген 1 мг/мл	59 ± 6	



Рис. 2. Изотермы адсорбции фибриногена на иммобилизованных липидных бислоях и поверхности золотого электрода. Обозначения экспериментальных точек указаны на легенде. Зависимости аппроксимированы моделью Ленгмюра (сплошные линии).

видоизменяются в зависимости от химической структуры липидных частиц [3, 6].

Одной из возможных причин указанных явлений может быть адсорбция молекул фибриногена на поверхности липидных микрочастиц. Изображенные на рис. 2 изотермы сорбции фибриногена на плоских иммобилизованных липидных бислоях свидетельствуют, что фибриноген способен адсорбироваться на липидной поверхности, причем константа и предельная величина адсорбции зависят от химической структуры липида (табл. 1). Максимальную адсорбирующую способность по отношению к фибриногену имеет бислой из ДПФХ – незаряженного липида с полностью насыщенными жирнокислотными остатками. Добавление к ДПФХ липидов, содержащих ненасыщенные жирнокислотные цепи или несущих отрицательный заряд, снижает сродство к фибриногену.

Взаимодействие фибриногена с липидным бислоем оценивали также на основании анализа инфракрасных спектров. Известно, что частота колебаний метиленовых групп имеет более низкое значение в бислоях с более упорядоченной структурой гидрофобного слоя [31]. Из данных на рис. 3 следует, что в бислое из ДПФХ валентное колебание метиленовых групп имеет частоту 2917.7 \pm 0.1 см⁻¹, что соответствует высокоупорядоченному состоянию жирнокислотных цепей. Добавление к ДПФХ 10% ПОФГ – отрицательно заряженного липида с одной ненасыщенной цепью - практически не сказывается на упорядоченности углеводородной части бислоя. Увеличение содержания ПОФГ до 20% приводит уже к заметному росту частоты, что указывает на

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021



Рис. 3. Положение максимума полосы метиленовых групп липида в контроле (темные символы) и при адсорбции фибриногена (светлые символы).

увеличение подвижности алифатических групп. Аналогичный эффект оказывает добавление 20% ПОФХ, нейтрального по заряду. Максимальную подвижность имеют гетерогенные по структуре жирнокислотные цепи яичного лецитина. Присутствие фибриногена не оказывает достоверного влияния на упорядоченность гидрофобной части бислоя, из чего можно заключить, что фибриноген не проникает глубоко в структуру бислоя, адсорбируясь на его внешней поверхности.

Состояние полярной области бислоя оценивали по спектрам фосфатных групп липидов. Полоса асимметричных валентных колебаний $v_{as}PO^{2-}$ имеет двухкомпонентную структуру, образуемую расщеплением основного колебания при образовании водородной связи [32-34]. Величина расщепления зависит от силы водородной связи с окружением и для исследованных нами липидов определяется преимущественно гидратированностью фосфатной группы. Мы сопоставили величины предельной адсорбции фибриногена с интенсивностью расщепления фосфатной полосы (рис. 4). Данные свидетельствуют, что фибриноген проявляет меньшее сродство к липидам, у которых расщепление и, следовательно, гидратированность больше. Таким образом, гидратированность поверхности препятствует адсорбции. Ранее уже отмечалось, что низкое сродство фибриногена к липидам с ненасыщенными жирнокислотными остатками, в частности к яичному лецитину, может быть следствием высокой подвижности липидных молекул в бислое и гидратированности их полярных частей [35]. Известно, что при температурах выше точки плавления липидных структур одновременно с увеличением



Рис. 4. Соотношение между величиной предельной адсорбции и величиной расщепления компонент полосы поглощения $v_{as}PO^{2-}$ фосфатной группы липида.

подвижности возрастает и гидратация [36]. Из использованного набора липидов только ДПФХ при температуре 37°С находится в высокоупорядоченном гелевом состоянии. Добавление к бислою из ДПФХ липидов, содержащих ненасыщенные жирнокислотные цепи, приводит к понижению температуры плавления, так что при 37°С бислой находится в более подвижной жидкокристаллической конформации. Фибриноген интенсивно адсорбируется на наименее гидратированной поверхности жесткого бислоя из ДПФХ. В то же время наименьшим сродством фибриноген обладает к высокогидратированной поверхности рыхлого и подвижного бислоя яичного лецитина. Таким образом, различия в сорбционной способности изученных нами липидных бислоев по отношению к фибриногену в значительной мере определяются их гидратированностью.

Определенные выводы о структуре адсорбционных слоев фибриногена можно сделать, сопоставляя их механические (вязкоупругие) свойства с интенсивностью адсорбции. На рис. 5 приведены величины коэффициента потерь при возбуждении радиочастотных колебаний резонатора с нанесенной на его поверхность липидной пленкой в зависимости от массы адсорбированного фибриногена. При адсорбции фибриногена непосредственно на металлической поверхности резонатора коэффициент потерь, соответствующий начальному крутому участку изотермы (см. рис. 2), имеет небольшую величину и слабо зависит от массы, что характерно для плотных адсорбционных слоев, прочно связанных с поверхностью [37].



Рис. 5. Корреляции между приростом коэффициента потерь ΔR и массы ΔM при адсорбции фибриногена на иммобилизованных липидных бислоях. Обозначения экспериментальных точек указаны на легенде.

По достижении определенного уровня адсорбции, соответствующей выходу изотермы адсорбции на более пологий участок, зависимость потерь от массы адсорбированного белка усиливается, что указывает на формирование более рыхлого и гидратированного слоя [38]. Качественно сходный вид имеют и зависимости, полученные при адсорбции на бислоях липидов, с тем отличием, что начальный пологий участок имеет небольшую протяженность, а основная масса белка образует адсорбционный слой с высоким коэффициентом потерь, более рыхлый и вязкий по сравнению с адсорбцией на металле. Очевидно, что в рыхлом слое молекулы фибриногена более подвижны и доступны растворителю, что делает их также более доступными и действию тромбина. О том, что адсорбированный в виде рыхлого слоя фибриноген сохраняет способность к полимеризации, свидетельствуют результаты исследования методом атомно-силовой микроскопии поверхности адсорбированного фибриногена на металле после действия тромбина. При адсорбции из раствора с очень низкой концентрацией белка (0.01 мкМ), соответствующей начальному крутому участку изотермы адсорбции, образуется плотный слой фибриногена, не полимеризующийся под действием тромбина. В то же время фибриноген, адсорбированный из раствора с концентрацией 3 мкМ и образующий более толстые и рыхлые слои, под действием тромбина превращается в фибрин, формируя длинные волокна (рис. 6). Сходство вязкоупругих характеристик фибриногена, адсорбированного на золоте и на липидном бислое, позволяет предполагать структурное сходство адсорбционных слоев и сохранение коагуляционной способности фибриногена при адсорбции на липидной поверхности.



Рис. 6. Поверхность металлического золота после адсорбции фибриногена из раствора с концентрацией белка 4 мкг/мл (слева) и 1 мг/мл (справа) и обработки его тромбином. Изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии.

Степень влияния адсорбированного фибриногена на формирование структуры объемного сгустка, таким образом, зависит от доли адсорбированного белка и в нашем случае максимальна для липосом из ДПФХ. Наличие прочно связанного с поверхностью фибриногена способствует удержанию и включению липидных частиц в состав фибриновой сети [2, 6].

Другим очевидным фактором, влияющим на пространственную структуру сгустка, является само присутствие в растворе объемных липидных частиц в достаточно высокой концентрации. При низкой доле адсорбированного фибриногена эффекты пространственного ограничения на диффузию и фибриллообразование начинают преобладать, что проявляется в виде увеличения

Таблица 2. Параметры аппроксимации сорбционных зависимостей моделью Ленгмюра (y = (kxA) / (1 + kx))

Липид	Значение		
ดีแบบเน้ สอบบรรมน	A	0.75 ± 0.06	
Личныи лецитин	k	7.77 ± 2.33	
ДПФХ	Α	3.73 ± 0.82	
	k	8.64 ± 4.61	
ДПФХ/10%ПОФГ	A	0.93 ± 0.03	
	k	17.63 ± 2.70	
ДПФХ/20%ПОФГ	A	0.30 ± 0.07	
	k	3.48 ± 1.72	
ДПФХ/20%ПОФХ	A	0.91 ± 0.06	
	k	45.22 ± 14.26	

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

длительности лаг-периода и более медленного образования пространственной сети на примере липосом из ДПФХ / 20% ПОФХ (рис. 1, кривая 4).

Довольно специфичной выглядит кинетика фибринообразования в суспензии с добавкой отрицательно заряженного ПОФГ (рис. 1, кривая 5). Низкий уровень рассеяния на плато обусловлен образованием более тонких фибрилл [6]. По-видимому, электростатические взаимодействия одноименно заряженных фибриногена и ПОФГ в объеме раствора также играют роль, модифицируя процесс фибриллообразования [39], однако конкретный механизм такого взаимодействия пока неясен и требует дальнейшего изучения.

выводы

Основываясь на полученных результатах, можно заключить, что особенности кинетики полимеризации фибриногена в суспензии липосом могут быть в значительной мере обусловлены реактивностью белка, адсорбированного на поверхности липосом. Адсорбция максимальна на поверхности бислоя из ДПФХ и уменьшается при добавлении липидов с ненасыщенными жирнокислотными остатками или несущих отрицательный заряд, что связано с ростом гидратированности поверхности. Фибриноген адсорбируется в виде рыхлого гидратированного слоя, сохраняя способность к коагуляции под действием тромбина. Участие адсорбированного фибриногена в коагуляции проявляется в сокращении лаг-периода и увеличении скорости фибринообразования, что позволяет охарактеризовать такой белок, как более тромбогенный.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования с применением сканирующей электронной микроскопии выполнены в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» Казанского федерального университета (Казань).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. R. M. Nabiullina, D. A. Faizullin, C. Nagaswami, et al., Blood **124**, 2807 (2014).
- Р. М. Набиуллина, И. Г. Мустафин, Ю. Ф. Зуеви др., Докл. РАН 562 (1), 111 (2015).
- 3. L. D. Zubairova, R. M. Nabiullina, C. Nagaswami, et al., Sci. Rep. 5, 1 (2015).
- 4. M. T. Cunningham, B. A. Citron, and T. A. Koerner, Thrombosis Res. 95, 325 (1999).
- B. Váradi, K. Kolev, K. Tenekedjiev, et al., J. Biol. Chem. 279, 39863 (2004).
- Д. Р. Бакирова, Д. А. Файзуллин, Ю. А. Валиуллина и др., Бюлл. эксперим. биологии и медицины 163 (6), 687 (2017).
- A. M. Galán, M. R. Hernández, J. Bozzo, et al., Transfusion 38 (11–12), 1004 (1998).
- 8. B. Alving, Transfusion 38 (11-12), 997 (1998).
- 9. M. R. Hernández, P. Urbán, E. Casals, et al., Int. J. Nanomedicine 7, 2339 (2012).
- N. Amabile, C. Guignabert, D. Montani, et al., Eur. Respir. J. 42 (1), 272 (2013).
- 11. F. Kunz, W. D. Zwierzina, and H. Hörtnagl, Atherosclerosis 49 (2), 195 (1983).
- 12. M. F. Matus, C. Vilos, B. A. Cisterna, et al., Vasc. Pharmacol. **101**, 1 (2018).
- 13. A. S. Jakate, C. M. Einhaus, A. P. DeAnglis et al., Cancer Res. 63 (21), 7314 (2003).
- A. Tanka-Salamon, A. Bóta, A. Wacha, et al., BioMed Res. Int. 2017, 5130495 (2017).
- 15. Y. Hu, C. Wu, C. Zhu, et al., Int. J. Pharm. **552**, 319 (2018).
- 16. M. Shukla, U. D. Sekhon, V. Betapudi, et al., J. Thromb. Haemost. **15** (2), 375 (2017).

- Yu. F. Zuev, R. I. Litvinov, A. E. Sitnitsky, et al., J. Phys. Chem. B 121, 7833 (2017).
- T. Ueda, D. Murakami, and M. Tanaka, Front. Chem. 6, 542 (2018).
- 19. K. Sankaranarayanan, Biointerphases 10, 021009 (2015).
- B. C. Cook and G. S. Retzinger, J. Colloid Interface Sci. 162 (1), 171 (1994).
- G. S. Retzinger, B. C. Cook, A. P. DeAnglis, J. Colloid Interface Sci. 168, 514 (1994).
- 22. Z. Adamczyk, J. Barbasz, and M. Cieśla, Langmuir 27, 6868 (2011).
- 23. L. Zhang, B. Casey, D. K. Galanakis, et al., Acta Biomater. **54**, 164 (2017).
- 24. J. W. Weisel and C. Nagaswami, Biophys. J. 63, 111 (1992).
- 25. T. Sugo, H. Endo, M. Matsuda, et al., J. Thromb. Haemost. 4, 1738 (2006).
- 26. J. W. Weisel and R. I. Litvinov, Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 6, 161 (2008).
- A. I. Greenwood, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, Chem. Phys. Lipid. 143(1–2), 1 (2006).
- 28. Y. Okahata and H. Ebato, Anal. Chem. 63, 203 (1991).
- S. R. Tabaei, J.-H. Choi, G. H. Zan, et al., Langmuir 30(34), 10363 (2014).
- 30. R. R. Hantgan and J. Hermans, J. Biol. Chem. 254, 11272 (1979).
- 31. P. T. T. Wong, D. J. Siminovitch, and H. H. Mantsch, Biochim. Biophys. Acta **947**, 139 (1988).
- 32. F. M. Goñi and J. L. Arrondo, Faraday Discuss. Chem. Soc. **81**, 117 (1986).
- T. Shimanouchi, M. Sasaki, A. Hiroiwa, et al., Colloids Surf. B: Biointerfaces 88, 221 (2011).
- 34. S. J. Hug, J. Colloid Interface Sci. 188, 415 (1997).
- K. Glasmästar, C. Larsson, F. Höök, and B. Kasemo, J. Colloid Interface Sci. 246 (1), 40 (2002).
- R. Koynova and B. Tenchov, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (John Wiley & Sons, Hoboken, 2009), vol. 2, pp. 601–615.
- 37. P. Jia, M. He, Y. Gong, et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 7 (12), 6422 (2015).
- T. Nezu, M. Taira, S. Saitoh, et al., Int. J. Biol. Macromol. 46 (4), 396 (2010).
- S. R. Baker and R. A. S. Ariëns, in *Cardiovascular Thrombus*, Ed. by O. Topaz (Acad. Press, London, San Diego, Cambridge, Oxford, 2018), pp. 31–49.

Fibrinogen Adsorption on the Lipid Surface as a Factor of Regulation of Fibrin Clot Formation

D.A. Faizullin*, Yu.A. Valiullina*, V.V. Salnikov*, and Yu.F. Zuev*

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

It has been established that enzymes of the coagulation cascade can interact with lipid microparticles or microvesicles of natural or artificial origin circulating in the blood. Such interactions can modulate hemostasis. Less is known about the effects of the direct interaction of fibrinogen/fibrin with microvesicles. Using purified systems in this study, it was shown that the presence of lipid particles of various compositions in solution may have a specific effect on the kinetics of fibrin polymerization. Experimental evidence presented here reveals that this effect arises from fibrinogen adsorption on the surface of the microvesicles. In particular, it was demonstrated that the adsorption of fibrinogen in a sufficiently high concentration leads to acceleration of the thrombin-induced fibrin polymerization due to the local concentration effect and the inclusion of microvesicles into the structure of the clot. Thus, the direct interaction of fibrinogen with microvesicles is an essential factor in hemostasis, which should be taken into account when analyzing blood coagulation diseases and developing an artificial lipid as drug carriers.

Keywords: lipids, fibrin, adsorption, coagulation

= БИОФИЗИКА КЛЕТКИ =

УДК 576.32/.36

ЛИГАНД СИГМА-1 РЕЦЕПТОРОВ ХЛОРПРОМАЗИН ПОДАВЛЯЕТ ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Са²⁺ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ

© 2021 г. Л.С. Миленина*, З.И. Крутецкая*, В.Г. Антонов**, Н.И.Крутецкая*

*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9 **Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

> *E-mail: cozzy@mail.ru, z.krutetskaya@spbu.ru* Поступила в редакцию 21.05.2020 г. После доработки 08.06.2020 г. Принята к публикации 16.06.2020 г.

С использованием флуоресцентного Ca²⁺-зонда Fura-2AM впервые показано, что антагонист рецепторов сигма-1 — нейролептик хлорпромазин — значительно подавляет в перитонеальных макрофагах крыс депозависимый вход Ca²⁺, индуцируемый иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном, а также ингибиторами эндоплазматических Ca²⁺-ATФаз тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой. Полученные результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca²⁺ в макрофагах.

Ключевые слова: рецепторы сигма-1, депозависимый вход Са²⁺, макрофаги. **DOI:** 10.31857/S0006302921010105

Депозависимый или «емкостной» вход Ca²⁺, впервые описанный Дж. Патни более тридцати лет назад, является повсеместным (ubiquitous) механизмом регулируемого входа Ca²⁺ в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных Ca²⁺-депо [1, 2]. Депозависимый вход Ca²⁺ участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (экзоцитоз, экспрессия генов, рост и пролиферация клеток и др.) в норме и патологии [3, 4].

Функциональной единицей депозависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс (store-operated calcium influx complex, SOCIC), компоненты которого обладают высокой мобильностью, а взаимодействия между ними жестко регулируются [5, 6]. Основными компонентами комплекса, необходимыми и достаточными для активации депозависимого входа Ca^{2+} , являются Ca^{2+} -каналы Orail в плазмалемме и Ca^{2+} -сенсор STIM1 в мембране Ca^{2+} -депо [4]. При опустошении Ca^{2+} -депо STIM1 олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orail, вызывая депозависимый вход Ca^{2+} [7–9]. В состав комплекса входят также регуляторные белки: кальмодулин, аденилатциклаза и Ca^{2+} -АТ Φ аза в мембране Ca^{2+} -депо [5, 6].

Важными участниками процессов Ca²⁺-сигнализации в клетках являются рецепторы сигма-1 лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль [10]. Эти рецепторы экспрессированы в клетках различных типов, включая клетки иммунной системы [10]. Взаимодействуя с белками-мишенями, такими как ионные каналы и рецепторы, рецепторы сигма-1 регулируют многие клеточные процессы в норме и патологии [10, 11]. Так, обнаружено, что взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы Ca^{2+} -сигнализации в клетках – мобилизацию Ca^{2+} из депо и вход Ca^{2+} из наружной среды [12].

Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по химической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты, нейролептики, анальгетики, противосудорожные и противокашлевые средства [13].

Ранее нами было впервые показано, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик галоперидол (производное бутирофенона) значительно подавляет мобилизацию Ca²⁺ из депо и депозави-

Сокращение: [Ca²⁺]_i – внутриклеточная концентрация Ca²⁺.

симый вход Ca²⁺, вызываемые дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (динатриевая соль окисленного глутатиона с dметаллом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсаном® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ») [14] и ингибиторами эндоплазматических Ca²⁺-АТФаз тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой [15] в перитонеальных макрофагах крыс.

Для подтверждения участия рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах представлялось целесообразным исследовать влияние другого, структурно отличного антагониста рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, а также тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крыс, что и составило предмет настоящего исследования.

В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 — нейролептик фенотиазинового ряда хлорпромазин (аминазин, торазин) [16], широко используемый для лечения шизофрении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar.

Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180-250 г по методу, описанному ранее [17, 18]. Сразу после выделения клетки имели сферическую форму (диаметр 10-20 мкм). Суспензию клеток помещали в бакпечатки, содержащие кварцевые стекла размером 10 × 10 мм. Клетки на стеклах культивировали в течение одних-трех суток при 37°C в среде 199 (рН 7.2), содержащей 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 Ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на α -нафтилэстеразу [19] показал, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях были макрофагами.

Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–24°С) через одни-двое суток после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава: 140 мМ Na-Cl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂ и 5 мМ HEPES-NaOH, pH 7.3–7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 0 мМ CaCl₂ и 1 мМ ЭГТА.

Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы Fura-2AM (1 мМ), циклопьязоникой кислоты (10 мМ) и тапсигарги-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

на (0.5 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточный раствор хлорпромазина (25 мг/мл) готовили в воде. Препараты глутоксим и моликсан были предоставлены фирмой ФАРМА-ВАМ (Санкт-Петербург). Маточные растворы глутоксима (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) готовили в воде.

Измерение внутриклеточной концентрации Ca²⁺. Для измерения внутриклеточной концентрации Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин при 22-24°С в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив микроскопа. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосные оптические фильтры. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи специализированной видеокамеры Leica DFC340FX. Для управления экспериментом использовали систему обработки изображения ImageJ (плагин Micro-Manager 1.4).

Результатом измерений являлось отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при облучении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности флуоресценции при облучении светом с длиной волны 380 нм (F_{340}/F_{380}), где F_{340} – интенсивность флуоресценции Fura-2AM, связанного с Ca²⁺, а F_{380} – интенсивность флуоресценции Fura-2AM, не связанного с Ca²⁺, отражающее изменения [Ca²⁺]_i в клетках во время измерений [20, 21]. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. В экспериментах применяли объектив 10× с апертурой 8 мм. Значения [Ca²⁺]_i рассчитывали по уравнению Гринкевича [22].

Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Достоверными считали различия при $p \le 0.05$. На рисунках представлены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных экспериментах было показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение [Ca²⁺]_i,



Рис. 1. Влияние хлорпромазина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крыс, вызываемое глутоксимом: (а) – макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) – клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) – клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс – время. Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из шести-восьми независимых экспериментов.

отражающее мобилизацию Ca²⁺ из внутриклеточных депо. В среднем (n = 6 для каждого из препаратов) через 20 мин после добавления агентов величина [Ca²⁺]_i увеличивалась от базального уровня, равного 90 ± 18 нМ, до 135 ± 18 нМ для глутоксима и 134 ± 20 нМ для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ Ca²⁺ наблюдалось дальнейшее повышение [Ca²⁺]_i, отражающее депозависимый вход Ca²⁺ в цитозоль (рис. 1а, 2а). В среднем (n = 6) увеличение [Ca²⁺]_i во время входа Ca²⁺ составило 223 ± 22 и 202 ± 20 нМ для глутоксима и моликсана соответственно.

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл хлорпромазина в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на 58.5 ± 4.6%, n = 7), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетку (на 59.1 ± 6.1%, n = 7), индуцируемых глутоксимом (рис. 16). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 25 мкг/мл хлорпромзаниа на Ca^{2+} -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана (рис. 26). В среднем (n = 8) хлорпромазин вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на 43.2 ± 8.9% и подавление депозависимого входа Ca^{2+} в клетку на 59.2 ± 9.2%, индуцированных моликсаном.

Добавление 0.5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных



Рис. 2. Влияние хлорпромазина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крыс, вызываемое моликсаном: (а) – макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) – клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) – клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс – время.

Са²⁺-депо (рис. 3а). В среднем (n = 7) увеличение [Са²⁺]_i во время фазы мобилизации составило 26 ± 7 нМ (рис. 3а). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Са²⁺ наблюдался депозависимый вход Са²⁺ в цитозоль (рис. 3а). В среднем (n = 7) увеличение [Са²⁺]_i во время входа Са²⁺ составило 160.2 ± 20.5 нМ. Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ циклопьязониковой кислоты (рис. 4а). В среднем (n = 7) увеличение [Са²⁺]_i, отражающее мобилизацию Са²⁺ из внутриклеточных Са²⁺-депо, составило 37.8 ± 9.8 нМ, а увеличение [Са²⁺]_i во время депозависимого входа Са²⁺ составило 150.2 ± 23.7 нМ.

Мы впервые обнаружили, что преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл хлорпромазина в номинально бескальциевой среде в течение 10 мин до

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

введения 0.5 мкМ тапсигаргина вызывает значительное подавление обеих фаз Ca²⁺-ответа, индуцированного тапсигаргином (рис. 36). Так, подавление фазы мобилизации Ca²⁺ из депо составило 59.3 \pm 8.2% (n = 7), а депозависимого входа Ca²⁺ – 68.2 \pm 10.4% (n = 7). Сходные результаты были получены в опытах с применением 10 мкМ циклопьязониковой кислоты (рис. 46). Подавление хлорпромазином мобилизации Ca²⁺ из депо составило 40.2 \pm 9.1% (n = 7), а подавление депозависимого входа Ca²⁺ – 63.4 \pm 11.5% (n = 7).

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крыс показали, что антагонист рецепторов сигма-1 – нейролептик фенотиазинового ряда хлорпромазин – подавляет мобилизацию Ca²⁺ из депо и депозависимый вход Ca²⁺, вызываемые глутоксимом или моликсаном, а также тапсигаргином и циклопья-



Рис. 3. Влияние хлорпромазина на Ca²⁺-ответы, вызываемые тапсигаргином в макрофагах: (а) – клетки стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca²⁺ инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca²⁺; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 0.5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca²⁺ инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca²⁺; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 0.5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca²⁺ инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca²⁺. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс – время.

зониковой кислотой в макрофагах. Результаты согласуются с данными других авторов, которые обнаружили, что хлорпромазин подавляет мобилизацию Ca²⁺ из депо и последующий депозависимый вход Ca²⁺, вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [23] и ингибирует депозависимый вход Ca²⁺, индуцируемый брадикинином или тапсигаргином в клетках феохромоцитомы крыс (линия PC12) [24]. Обнаружено также, что антагонисты сигма-1 рецепторов (BD1063 и BD1047) ингибируют вход Ca²⁺, индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [25]. Кроме того, известно [26], что хлорпромазин ингибирует потенциалзависимые Ca²⁺-каналы в клетках разных типов.

Результаты настоящей и более ранних работ [14, 27] о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 Ca²⁺-ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах, свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению [Ca²⁺]_i в перитонеальных макрофагах крыс. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксим или моликсан и нейролептика хлорпромазина.

Полученные нами данные свидетельствуют также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, в перитонеальных макрофагах крыс и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут влиять на депозависимый вход Ca^{2+} , регулируя связывание между основными компонентами белкового ком-



Рис. 4. Влияние хлорпромазина на Ca²⁺-ответы, вызываемые циклопьязониковой кислотой в макрофагах: (а) – клетки стимулировали 10 мкМ циклопьязониковой кислоты в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca²⁺ инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca²⁺; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 10 мкМ циклопьязониковой кислоты, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F₃₄₀/F₃₈₀ при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс – время.

плекса депозависимого входа Са²⁺ – белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума и Orail в плазмалемме [28].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановых тем кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностии Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург), а также Договора на выполнение научно-исследовательских работ № 28-12-38.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИОФИЗИКА 2021 том 66 **№** 1

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных и все манипуляции с ними выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями Приказа Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. J. W. Putney, Cell Calcium 11, 611 (1990).
- 2. J. W. Putney, Adv. Exp. Med. Biol. 981, 205 (2017).
- 3. J. W. Putney, Neurochem. Res. 36, 1157 (2011).
- 4. M. Prakriya and R. S. Lewis, Physiol. Rev. 95, 1383 (2015).
- 5. L. Vaca, Cell Calcium 47, 199 (2010).
- 6. C. Moreno and L. Vaca, in *Store-operated Ca²⁺ entry* (*SOCE*) pathways (Springer-Verlag, Wien, 2012), pp. 93–113.

- 7. R. M. Nwokonko, X. Cai, N. A. Loktionova, et al., Adv. Exp. Med. Biol. **993**, 83 (2017).
- N. T. Nguyen, W. Han, W.-M. Cao, et al., Comprehensive Physiol. 8, 981 (2018).
- 9. V. Lunz, C. Romanin, and I. Frischauf, Cell Calcium 77, 29 (2019).
- 10. C. G. Rousseaux and S. F. Greene, J. Recept. Signal Transduct. **36**, 327 (2016).
- 11. T.-P. Su, T. Hayashi, T. Maurice, et al., Trends Pharmacol. Sci. **31**, 557 (2010).
- 12. T. Hayashi and T.-P. Su, Cell 131, 596 (2007).
- 13. E. J. Cobos, J. M. Entrena, F. R. Nieto, et al., Curr. Neuropharmacol. 6, 344 (2008).
- З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, А. А. Наумова и др., Докл. РАН 472 (6), 723 (2017).
- 15. З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, А. А. Наумова и др., Докл. РАН **480** (5), 613 (2018).
- Y. Itzhak, M. Ruhland, and H. Krahling, Neuropharmacol. 29, 181 (1990).
- 17. R. E. Conrad, in *Manual of macrophages methodology* (Marcell Dekker, New York, 1981), pp. 5–11.

- C. Randriamampita and A. Trautmann, Cell. Biol. 105, 761 (1987).
- R. A. Monahan, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak, Blood 58, 1089 (1981).
- 20. J. I. E. Bruce and A. C. Elliott, Brit. J. Physiol. **131**,761 (2000).
- 21. Q. Xie, Y. Zhang, C. Zhai, et al., J. Biol. Chem. 277, 16559 (2002).
- 22. G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, J. Biol. Chem. **260**, 3440 (1985).
- 23. J. L. Harper and J. W. Daly, Drug Dev. Res. 47, 107 (1999).
- 24. S.-Y. Choi, Y.-H. Kim, Y.-K. Lee, et al., Brit. J. Pharmacol. **132**, 411 (2001).
- 25. M. S. Amer, L. McKeown, S. Tumova, et al., Brit. J. Pharmacol. **168**, 1445 (2013).
- 26. N. C. McNaughton, P.J. Green, and A. D. Randall, Acta Physiol. Scand. **173**, 401 (2001).
- 27. З. И. Крутецкая, Л.С. Миленина, А. А. Наумова и др., Докл. РАН **481** (5), 570 (2018).
- S. Srivats, D. Balasuriya, M. Pasche, et al., J. Cell Biol. 213, 65 (2016).

Sigma-1 Receptor Ligand Chlorpromazine Attenuates Store-Dependent Ca²⁺ Entry in Peritoneal Macrophages

L.S. Milenina*, Z.I. Krutetskaya*, V.G. Antonov**, and N.I. Krutetskaya*

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

**S.M. Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, Saint-Petersburg, 194044 Russia

Using Fura-2AM, a fluorescent Ca^{2+} indicator, we have shown for the first time that the sigma-1 receptor antagonist - neuroleptic chlorpromazine - significantly inhibits the store-dependent Ca^{2+} entry induced by immunomodulators glutoxim as well as molixan and endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid in rat peritoneal macrophages. The results suggest the involvement of sigma-1 receptors in the regulation of store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages.

Keywords: sigma-1 receptors, store-dependent Ca^{2+} entry, macrophages

——— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ =

УДК 577.352.4 + 591.047

ТЕОРИЯ ИНВЕРСИИ ЗАРЯДОВОЙ СЕЛЕКТИВНОСТИ В КАТИОН-ИЛИ АНИОН-СЕЛЕКТИВНЫХ ПЛОТНЫХ КОНТАКТАХ МЕЖДУ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ: НЕЛОКАЛЬНО-ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЙ ПОДХОД

© 2021 г. А.А. Рубашкин*, П. Исерович**, М.А. Воротынцев***, ****, *****

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

**Медицинский центр Государственного университета Нью-Йорка,

***Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,

119071, Москва, Ленинский просп., 31

****Институт проблем химической физики РАН, 142432, Черноголовка Московской области, просп. Академика Семенова, 1

*****ICMUB, UMR 6302 CNRS – Université de Bourgogne, Dijon, France

E-mail: andrey.rubashkin@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 29.11.2019 г. Принята к публикации 24.09.2020 г.

Развита теория инверсии зарядовой селективности плотных контактов между эпителиальными клетками при изменении знака фиксированного в них заряда. На основе метода нашей работы, учитывающей эффект полости иона, рассчитаны изменения энергий сольватации ионов при их переходе в плотных контактах. Выведена формула для определения зависимостей отношения проницаемостей Na^+ и Cl^- в плотных контактах от концентрации и знака фиксированных в плотных контактах контактах зарядов, а также от корреляционной длины воды. Развитая теория согласуется с имеющимися в литературе экспериментальными данными по инверсии Na^+/Cl^- -селективности для клеток почки собаки Майдин-Дэрби при экспрессии в плотных контактах белковых молекул клаудина-15 с измененным знаком заряда аминокислотных остатков.

Ключевые слова: эпителиальные клетки, плотные контакты, инверсия зарядовой селективности, нелокальная электростатика, энергия сольватации иона, эффект полости иона.

DOI: 10.31857/S0006302921010117

Инверсия зарядовой селективности в плотных контактах (ПК) между эпителиальными клетками от Na⁺-селективных к Cl⁻-селективным при экспрессии в ПК клаудинов-15, в которых отрицательно заряженные группы заменены на положительно заряженные, была экспериментально обнаружена в работах [1, 2]. Этот эффект качественно объяснялся в работах [1–4] электростатическим взаимодействием между зарядами молекул клаудина и ионами Na⁺ и Cl⁻. При этом теория инверсии зарядовой селективности в ПК не была развита, как и теория Na⁺-селективности в ПК. В работе [4] была предложена модель систе-

мы двух типов пор, образованных клаудинами в ПК. В ней ионы двигались только через поры малого радиуса, что с точки зрения авторов работы [4] объясняло существование зарядовой селективности в ПК. Через поры большого радиуса в этой модели могли двигаться только молекулы больших размеров. Однако не было представлено объяснение, почему ионы не могут попадать в крупные поры. С нашей точки зрения построить адекватную теорию зарядовой селективности в ПК невозможно, если не учитывать, что энергия сольватации ионов в ПК отличается от ее значения в свободном растворе, как это предполагалось в наших с коллегами работах [5–7]. Однако специалисты по эпителиальному транспорту до сих пор не учитывают эффект изменения энергий сольватации ионов при их переходе в ПК.

^{11203,} Бруклин, Нью-Йорк, Кларксон авеню, 450, США

Сокращения: ПК – плотные контакты между эпителиальными клетками (ТЈ – tight junctions), MDCK-клетки – клетки почки собаки Майдин-Дэрби (Madin-Darby canine kidney cells).

Теория диэлектрического вытеснения ионов из пор была построена в работах [8, 9] на основе нелокально-электростатической теории [10], которой была посвящена монография [11]. В работах [8, 9] были получены формулы, связывающие изменение энергии сольватации ионов при их переходе в поры, от параметров системы. В частности, предполагалось изменение корреляционной длины воды в поре. Однако, в отличие от представленной нами работы, в работах [8, 9] авторы использовали только однополюсную модель диэлектрического отклика воды без учета эффекта переэкранирования, а также не учитывали эффект вырезания растворителя из объема, занятого ионом. Кроме этого, наша модель отличается от указанных работ наличием фиксированного в ПК объемного заряда, обусловленного диссоциацией ионогенных групп молекул клаудина в ПК.

При описании ионного и водного транспорта через монослой эпителиальных клеток мы с коллегами показали в работе [5], используя классическую формулу Борна, что коэффициенты распределения ионов между свободным раствором и ПК значительно меньше единицы. В работах [6, 7] это было доказано методами нелокальной электростатики. Однако при этом не учитывался эффект переэкранирования диэлектрической функции воды (см. работу [12]). Также в работах [6, 7] не учитывался и эффект вырезания растворителя из объема, занятого ионом (эффект полости иона), теория которого была создана в работе [13], а затем недавно развита в работах [14–16]. Описание воды как нелокальной диэлектрической среды [16] использовано в данной работе для расчета высоты энергетического барьера для проникновения Na⁺ и Cl⁻ в ПК. Молекулы клаудина в ПК [1], несущие ионогенные группы, влияют на этот процесс как за счет своих зарядов, что было экспериментально показано в работе [1], а теоретически в работах [5-7], так и за счет изменения структуры воды внутри ПК, влияя на корреляционную длину воды $\Lambda_{\Pi K}$ в ПК [6, 7]. Эффект увеличения корреляционной длины Л рядом с белками был исследован в работе [17], где было показано существование протяженной области вокруг белков с увеличенной Л. Этот эффект приводит к изменению энергий сольватаций ($W_{\rm Na}$ и $W_{\rm Cl}$) ионов Na⁺ и Cl⁻ в ПК по сравнению с их значениями в объемной воде. Эти энергии сольватации ионов как в свободном растворе, так и в ПК были рассчитаны нами как по формулам предложенного в нашей работе [16] подхода, так и по теории [12], которая предполагает, что полярная среда (вода) занимает все пространство, включая пространственную область, занятую ионом. Ссылки на статьи по нелокальной электростатике можно найти в монографии [11] и в работе [16]. Наша процедура [16] позволяет получить простое аналитическое выражение для электростатического вклада в энергию сольватации ионов. На основе этого подхода нами рассчитаны значения изменений энергий сольватации ионов ΔW_{Na} и ΔW_{Cl} при их переходе в ПК. При этом использовалась модель для плотности заряда иона $\rho(r)$, которая является функцией от расстояния от центра иона (см. работы [12] и [18]). Развитая теория описывает как эффект возникновения зарядовой селективности в ПК, так и эффект ее обращения при замене знака фиксированных в них зарядов. Показано, что модели, игнорирующие эффект пересольватации ионов при их переходе в ПК, неспособны объяснить эффект возникновения зарядовой селективности.

МОДЕЛЬ

Na⁺/Cl⁻-селективность в плотных контактах, коэффициенты распределения ионов и скачок электростатического потенциала между плотными контактами и свободным раствором. Расположение клаудинов и их зарядов внутри ПК можно найти в работе [3], посвященной молекулярной физиологии пор в ПК, ограниченых двумя плоскопараллельными плазматическими мембранами, расстояние между которыми не менее 40 Å. Белковые молекулы клаудинов имеют, петли, расположенные внутри ПК. Заряженные аминокислотные остатки, находящиеся на этих петлях, создают фиксированный объемный заряд, определяющий существование Na⁺-селективности или Cl⁻-селективности в ПК. Из-за наличия в ПК белковых молекул корреляционная длина воды в них $\Lambda_{\Pi K}$ превышает ее значение в Λ_0 в свободном растворе ($\Lambda_0 = 3 \text{ Å}$), однако это превышение не больше, чем в 1.6 раза, как это будет показано ниже. Поэтому для иона, находящегося в центре ПК, расстояние до мембраны, ограничивающую ПК, значительно превышает как радиус иона, так и ЛПК. По этой причине основной вклад в изменение энергии иона при его переходе в центр ПК связан с изменениями свойств растворителя в ПК, а не с влиянием мембран, ограничивающих ПК. Мы показали это в работе [7], пользуясь формулами, выведенными в работах [8, 9].

Условие электронейтральности в ПК может быть записано в виде

$$[c_{\text{Na}}]_{\Pi \text{K}} - [c_{\text{Cl}}]_{\Pi \text{K}} + Z_{\text{f}}c_{\text{f}} = 0,$$

где первый и второй члены равны концентрациям Na⁺ и Cl⁻ в ПК, а третий член – произведение концентрации $c_{\rm f}$ заряженных аминокислотных остатков молекул клаудина в ПК на их зарядовое число $Z_{\rm f}$, ($Z_{\rm f}$ = -1 или 1).

Изменения энергий сольватации иона ΔW связано с разностью энергий сольватации в ПК и в свободном растворе: $\Delta W = W(\Lambda_{\Pi K}) - W(\Lambda_0)$, и оно равно изменению химического потенциала иона $\Delta \mu$, взятому с обратным знаком ($\Delta W = -\Delta \mu$). Отметим, что в предыдущих работах [6, 7] была введена величина $\delta W = W(\Lambda_0) - W(\Lambda_{\Pi K})$, равная изменению химического потенциала иона $\Delta \mu$.

Если ввести $n_{\rm Na}$ и $n_{\rm Cl}$ – коэффициенты распределения ионов Na⁺ и Cl⁻ в ПК, связанные с изменением энергий сольватации $\Delta W_{\rm Na}$ и $\Delta W_{\rm Cl}$ при переходе этих ионов в ПК из свободного раствора по формулам:

$$n_{\text{Na}} = \exp(F\Delta W_{\text{Na}}/RT); n_{\text{Cl}} = \exp(F\Delta W_{\text{Cl}}/RT), (1)$$

го уравнение, описывающее условие электроней-
гральности, примет следующий вид:

$$n_{\text{Na}}c_{\text{o}}\exp(-F\Delta\phi/RT) - n_{\text{Cl}}c_{\text{o}}\exp(F\Delta\phi/RT) + Z_{\text{f}}c_{\text{f}} = 0,$$

в котором первый и второй члены — это концентрации Na⁺ и Cl⁻ в ПК, c_0 — концентрация NaCl в свободном растворе ($c_0 = 0.15$ M), $\Delta \phi$ — разность электростатических потенциалов между ПК и свободным раствором, которая определяется из предыдущего уравнения как:

$$\Delta \phi = -(RT/F) \ln \left\{ -Z_{\rm f} X_{\rm f} / 2n_{\rm Na} + \left[\left(Z_{\rm f} X_{\rm f} / 2n_{\rm Na} \right)^2 + n_{\rm Cl} / n_{\rm Na} \right]^{1/2} \right\},\tag{2}$$

где $X_{\rm f} = c_{\rm f}/c_{\rm o}$ – относительная концентрация заряженных групп молекул клаудина в ПК. Формула для Na⁺/Cl⁻-селективности в ПК ($P_{\rm Na}/P_{\rm Cl}$) по-

лучается как отношение концентраций ионов в ПК умноженное на отношение коэффициентов диффузии $D_{\rm Na}/D_{\rm Cl}$:

$$P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}} = (D_{\text{Na}}/D_{\text{Cl}}) \left[n_{\text{Na}} \exp(-F\Delta\phi/RT) \right] / \left[n_{\text{Cl}} \exp(F\Delta\phi/RT) \right]$$

подставляя в которую выражение (2), получим для селективности ПК:

$$P_{\rm Na}/P_{\rm Cl} = (D_{\rm Na}/D_{\rm Cl})(n_{\rm Na}/n_{\rm Cl}) \left\{ -Z_{\rm f}X_{\rm f}/2n_{\rm Na} + \left[(Z_{\rm f}X_{\rm f}/2n_{\rm Na})^2 + n_{\rm Cl}/n_{\rm Na} \right]^{1/2} \right\}^2.$$
(3)

Это выражение связывает селективность с плотностью заряда $X_{\rm f}$, обусловленного заряженными аминокислотными остатками молекул клаудина внутри поры. Также селективность связана с коэффициентами распределения ионов $n_{\rm Na}$ и $n_{\rm Cl}$, которые зависят от энергий пересольватации ΔW ионов при их переходе в ПК из свободного раствора. Формулы для ΔW приведены ниже.

Расчет изменения энергий сольватации ионов ΔW при их переходе в плотные контакты. Расчет ΔW без учета эффекта полости иона. Для расчета коэффициентов распределения ионов по формуле (1) необходимо знать изменения энергий сольватации при переходе этих ионов в ПК. В рамках развитой в [12] теории энергия сольватации ионов W в зависимости от корреляционной длины растворителя Λ рассчитывается по формуле

$$W(\Lambda) = (1 / \pi) \int_{0}^{\infty} [1 - 1 / \varepsilon(k, \Lambda)] [\rho_{\text{SBS}}(k)]^2 dk, \quad (4)$$

в которой $\varepsilon(k, \Lambda)$ – диэлектрический отклик растворителя вокруг иона, k – волновой вектор, $\rho_{\text{SBS}}(k)$ – Фурье-образ плотности размытого заряда иона $\rho(r)$, связанный с ним формулой (SBS - размытая борновская сфера):

$$\rho(k) = (4\pi / k) \int_{0}^{\infty} r \rho(r) \sin k r \, dr,$$

где $\rho(r)$ — размытый заряд иона как внутри, так и снаружи его борновской сферы [12]:

$$\rho_{\text{SBS}}(r) = (eN_{\text{SBS}} / 8\pi) \exp\left(-\left|r-a\right| / \eta\right), \quad (5a)$$
$$0 < r < \infty,$$

где r — расстояние от центра иона, a — координата максимума плотности заряда иона, η — ширина размытия заряда иона. Нормировочный коэффициент N_{SBS} рассчитывается как:

$$N_{\rm SBS} = \left\{ \eta \left[a^2 + \eta^2 \left(2 - \exp(-a / \eta) \right) \right] \right\}^{-1}.$$
 (56)

Фурье-образ от $\rho(r)$ определяется по формуле

$$\rho_{\text{SBS}}(k) = \frac{\pm e N_{\text{SBS}} D(k)}{2k} g_1(k), \qquad (5B)$$

в которой вспомогательные функции D(k) и $g_1(k)$ определяются следующим образом:

РУБАШКИН и др.

$$D(k) = \frac{1}{1 + (k\eta)^2},$$

$$g_1(k) = 2k \left\{ \frac{a\eta}{k} \sin(ka) + D(k)\eta^3 \left[2\cos(ka) - \exp(-a/\eta) \right] \right\}.$$

Параметры в формулах плотности заряда иона (5а) и (5б) соответствуют используемым в работе [12]: радиусы ионов r_i для расчетов были выбраны по шкале Гурари и Адриана [19]: $r_{Na} = 1.17$ Å, $r_{Cl} = = 1.64$ Å, а величины максимума плотности размытия заряда *a* и ее ширина η составляют $a = r_i - 0.35$ Å, $\eta = 0.35$ Å. Отметим, что выход заряда иона за пределы его борновской сферы уменьшает расчетное значение энергии сольватации иона, как это было показано нами в [18]. Формулы (4) и (5в) кроме работы [12] также использовались в работе [20].

Выражение для расчета изменения энергий сольватации ионов $\Delta W = W(\Lambda_{\Pi K}) - W(\Lambda_0)$ при их переходе в ПК получается, если дважды применить формулу (4):

$$\Delta W = (1 / \pi) \int_{0}^{\infty} [1 / \varepsilon(k, \Lambda_{o}) - 1 / \varepsilon(k, \Lambda_{TJ})] [\rho_{SBS}(k)]^{2} dk, \qquad (6)$$

где корреляционная длина воды в ПК обозначена как Λ_{TJ} .

Поскольку в теории [12] не учитывается эффект вырезания растворителя из объема, занятого ионом, то формулы (4)–(6) применимы только для этого случая. Расчет ΔW с учетом эффекта полости иона. Как было показано в нашей работе [16], при расчете энергии сольватации иона Wс учетом эффекта вырезания растворителя из объема, занятого ионом, необходимо весь внутренний заряд иона q_{cav} , находящийся в полости иона, поместить на его борновскую сферу радиуса r_i . При этом формула (4) имеет вид

$$W(\Lambda) = (1 / \pi) \int_{0}^{\infty} [1 - 1 / \varepsilon(k, \Lambda)] [q_{cav} \sin kr_i / kr_i]^2 dk,$$

где $q_{cav} \sin kr_i / kr_i - \Phi$ урье-образ заряда, находящегося на борновской сфере.

В работе [16] мы вывели эту формулу для случая, когда весь заряд иона заключен внутри сфе-

ры радиуса r_i , однако можно обобщить предыдущую формулу и на случай, когда часть плотности заряда иона ρ_{ext} выходит за пределы его борновской сферы, что и было выведено нами в работе [21]:

$$W(\Lambda) = (1 / \pi) \int_{0}^{\infty} [1 - 1 / \varepsilon(k, \Lambda)] [q_{cav} \sin kr_i / kr_i + \rho_{ext}(k)]^2 dk,$$
(7)

где $\rho_{\text{ext}}(k) - \Phi$ урье-образ плотности размытого заряда иона $\rho_{\text{ext}}(r)$, находящейся за пределами его борновской сферы ($r > r_{\text{i}}$):

$$\rho_{\text{ext}}(r) = \rho_{\text{SBS}}(r) = \rho_o (4\pi\eta)^{-1} \exp(-(r - r_i) / \eta),$$

$$\rho_o = q_{\text{ext}}(r_i^2 + 2r_i\eta + 2\eta^2)^{-1} \quad r > r_i,$$
(8a)

где $q_{\rm ext}$ — часть заряда иона, находящаяся за пределами его борновской сферы, причем сумма $q_{\rm ext}$ и заряда внутри полости $q_{\rm cav}$ равна полному заряду иона: $q_{\rm ext} + q_{\rm cav} = \pm e$.

Тогда для $\rho_{\text{ext}}(k)$ можно получить следующее выражение:

$$\rho_{\text{ext}}(k) = q_{\text{ext}}k^{-1}(1+k^2\eta^2)^{-2}(r_i^2+2r_i\eta+2\eta^2)^{-1}[f_1\cos kr_i+f_2\sin kr_i]$$

$$f_1 = k\eta(r_i+2\eta+r_ik^2\eta^2);$$

$$f_1 = r_i+\eta+r_ik^2\eta^2-k^2\eta^3.$$
(86)

Так как мы рассчитываем энергию сольватации как по теории, учитывающей эффект вырезания растворителя из полости иона, так и по теории, не учитывающей этот эффект, то нам надо иметь формулы, связывающие заряд q_{ext} с параметрами модели размытого заряда иона (формулы (5а) и(5б)). Используемые параметры r_i , η в формулах плотности заряда иона (8а) и (8б) такие же, как и выписанные выше рядом с формулой (5в). Заряды внутри полости иона q_{cav} и вне полости q_{ext} связаны с этими параметрами r_i , a, η по формулам:

$$q_{\rm cav} = \pm e (N_{\rm SBS} / N_2);$$

 $q_{\rm ext} = \pm e (1 - N_{\rm SBS} / N_2),$

в которой нормировочный коэффициент $N_{\rm SBS}$ определяется формулой (5б), а параметр N_2 связан с ним формулой

$$N_2 = \left\{ (N_{\text{SBS}})^{-1} - 0.5\eta \exp[(a - r_i) / \eta] [r_i^2 + 2r_i \eta + 2\eta^2] \right\}^{-1}.$$

Эта формула получается интегрированием плотности распределения заряда иона, задаваемого формулой (5а), как это было показано нами в работе [18], в которой был объяснен смысл параметра N_2 . Заряд $q_{\rm cav}$ полости иона, рассчитанный по последним формулам, при значениях параметров $r_{\rm i}$, a, η : $a = r_{\rm i} - 0.35$ Å, $\eta = 0.35$ Å, $r_{\text{Na}} = 1.17$ Å, $r_{\text{Cl}} = 1.64$ Å равен для Na⁺: $q_{\text{cav}} = 0.51e$, а для Cl⁻: $q_{\text{cav}} = -0.61e$.

Применяя формулу (7) для расчета изменения энергий сольватации ионов $\Delta W = W(\Lambda_{\Pi K}) - W(\Lambda_0)$ при их переходе в ПК по теории, учитывающей эффект ионной полости, получим выражение:

$$\Delta W = (1 / \pi) \int_{0}^{\infty} [1 / \varepsilon(k, \Lambda_{o}) - 1 / \varepsilon(k, \Lambda_{TJ})] [q_{cav} \sin kr_{i} / kr_{i} + \rho_{ext}(k)]^{2} dk.$$
(9)

Для трехмодовой модели диэлектрической функции воды, учитывающей эффект переэкранирования, 1/ε(k) согласно работе [12] имеет вид:

$$\frac{1}{\varepsilon(k,\Lambda)} = 1 - \frac{C_1}{1 + (k\lambda_1)^2} - \frac{C_2}{1 + (k\lambda_2)^2} - C_3 \left\{ 1 + k^2 \left[\frac{A + Bk^2}{G(k)} - \frac{\Lambda^2}{1 + (k\Lambda)^2} \right] \right\} \frac{1}{1 + (k\lambda)^2}$$

Параметры в этой формуле, как и функцию G(k), можно найти в работе [12]. Используя дважды последнее соотношение, получим для разности обратных диэлектрических откликов воды формулу, которая использовалась в формулах (6) и (9) для расчета изменения энергий сольватации ионов:

$$\frac{1}{\varepsilon(k,\Lambda_{\rm o})} - \frac{1}{\varepsilon(k,\Lambda_{\rm TJ})} = -C_3 k^2 \Lambda_{\rm o}^2 \left(\frac{(\Lambda_{\rm TJ} / \Lambda_{\rm o})^2}{1 + (k \Lambda_{\rm TJ})^2} - \frac{1}{1 + (k \Lambda_{\rm o})^2} \right) \frac{1}{1 + (k \lambda)^2}.$$
(10)

Приведем параметры в выражении (10), которые использовались нами для расчетов ΔW : $C_3 = 0.19$; $\lambda = 0.15$ Å (λ – вспомогательный параметр и не является корреляционной длиной). Значение Λ_0 корреляционной длины воды для свободного раствора: $\Lambda_0 = 3$ Å. Функция [$1/\varepsilon(k, \Lambda_0) - 1/\varepsilon(k, \Lambda_{TJ})$], задаваемая формулой (10), использовалась для расчетов ΔW в подынтегральных выражениях формул (6) и (9).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Величины Na⁺/Cl⁻-селективности и электростатического потенциала в ПК связаны с коэффициентами распределения ионов, как это следует из формул (2) и (3), а они зависят от изменения энергий сольватации ΔW по формулам (1). Поэтому значения $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ и $\Delta \phi$ различаются, если рассчитывать ΔW по теории, учитывающей эф-



Рис. 1. Зависимости *P*_{Na}/*P*_{Cl} – отношения проницаемости Na⁺ в плотных контактах между эпителиальными клетками к проницаемости Cl⁻ в ПК от изменения корреляционной длины $\Lambda_{\Pi K}$ в ПК, рассчитанные по формуле (3) при $\Lambda_0 = 3$ Å. Коэффициенты n_{Na} и n_{Cl} в формуле (3) связаны по формулам (1) с изменениями энергий сольватации ионов *ΔW*. Сплошные кривые 1 и 2 соответствуют теории, учитывающей эффект вырезания растворителя из объема иона (эффект полости иона), для которого ΔW рассчитывается по формулам (8) и (9). Расчет для штриховых кривых 1'и 2' не учитывает этот эффект (ΔW определено по формулам (5) и (6)). Кривые 1 и 1' рассчитаны для случая, когда в ПК находятся отрицательно заряженные ($Z_{\rm f} = -1$) аминокислотные остатки молекул клаудина с относительной концентрацией $X_{\rm f} = c_{\rm f}/c_{\rm o} =$ = 0.06. Для кривых 2 и 2' в ПК положительно заряженные ($Z_{f} = 1$)..

фект полости иона (формула (9)), или по теории, в которой этот эффект отсутствует (формула (6)). Сплошные кривые 1 и 2 на рис. 1–3 соответствуют расчету с учетом эффекта полости иона, а штриховые кривые 1' и 2' – без учета этого эффекта.

На рис. 1 приведены рассчитанные по формуле (3) кривые 1, 1' и 2, 2', которые показывают отношения проницаемости Na⁺ в ПК между эпителиальными клетками к проницаемости Cl⁻ в них при изменения корреляционной длины в ПК. Сплошная горизонтальная линия 6 соответствует случаю, когда отсутствует Na⁺/Cl⁻-селективность ПК, а отношение проницаемостей Na⁺ и Cl⁻ в ПК равно отношению коэффициентов диффузии Na⁺ и Cl⁻: $D_{Na}/D_{Cl} = 0.66$. Область выше этой линии соответствует Na⁺-селективности в ПК, наоборот, область ниже линии 6 соответствует Cl⁻-селективности. Кривые 1 и 1' рассчитаны для случая, когда в ПК находятся отрицательно

заряженные аминокислотные остатки молекул клаудина ($Z_{\rm f} = -1$) с относительной концентрацией $X_{\rm f} = c_{\rm f}/c_{\rm o} = 0.06$, рассчитанной из условия, что на один заряженный центр приходится объем $\Delta V_{\rm f} = 40 \times 40 \times 120$ Å, что соответствует данным работы [3] по топологии размещения заряженных аминокислотных остатков молекул клаудина в ПК, а концентрация $X_{\rm f}$ равна $1/(N_{\rm A} \Delta V_{\rm f} c_{\rm o})$ ($N_{\rm A}$ – число Авогадро, $c_0 = 0.15$ М). В этом случае в ПК имеется Na⁺-селективность, которая увеличивается с ростом корреляционной длины воды в них (кривые 1 и 1' на рис. 1). Кривые 2 и 2' рассчитаны, когда в ПК находятся положительно заряженные группы ($Z_f = 1$) при той же относительной концентрации фиксированных зарядов в ПК. Поскольку обе эти кривые находятся в области ниже линии 6, то в этом случае в ПК имеется Cl⁻-селективность. При положительных значениях $Z_{\rm f}$ в ПК отношение $P_{\rm Na}/P_{\rm Cl}$ уменьшается с ростом корреляционной длины воды в ПК (кривые 2 и 2' на рис. 1), т.е. обратная величина $P_{\rm Cl}/P_{\rm Na}$ увеличивается.

Согласно экспериментальным значениям Na⁺/Cl⁻-селективности для клеток почки собаки Майдин-Дэрби (Madin-Darby canine kidney cells, MDCK), измеренным в работе [1], отношение *P*_{Na}/*P*_{Cl} при экспрессии в ПК немутированных белковых клаудинов-15 составляло от 4 до 5 (штриховая линия 3). Также в работе [1] была осуществлена экспрессия в ПК клаудинов-15, в которых отрицательно заряженные группы были заменены положительно заряженными. При этом зарядовая селективность ПК обращалась, они становились Cl⁻-селективными, чему соответствует штриховая линия 4 на рис. 1. По точкам пересечения прямых 3 и 4 с расчетными кривыми P_{Na}/P_{Cl} определены значения корреляционной длины воды $\Lambda_{\Pi K}$ в ПК. Для случая, когда в ПК находятся отрицательные фиксированные заряды (рис. 1, кривая 1) корреляционная длина $(\Lambda_{\Pi K} = 1.56)$ больше, чем корреляционная длина $(\Lambda_{\Pi K} = 1.44)$ в ПК с положительно заряженными аминокислотными остатками (рис. 1, кривая 2). Возможно, это связано с существованием нелинейных эффектов в окрестности ионов, которые сильнее для отрицательных ионов, как это было показано в работе [20]. Для расчета селективности по теории, не учитывающей эффект полости иона, получается заниженный результат для $\Lambda_{\Pi K}$, однако разница с расчетами по теории, учитывающей этот эффект, не превышает 3%. Если в формуле (3) для $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ положить $n_{\text{Na}} = n_{\text{Cl}} = 1$, т.е. считать, что изменения энергий сольватации ионов равны нулю, то в ПК будет незначительная зарядовая селективность. Этому случаю соответ-



Рис. 2. Зависимости электростатического потенциала $\Delta \phi$ в ПК между эпителиальными клетками от изменения корреляционной длины $\Lambda_{\Pi K}$ в ПК, рассчитанные по формуле (2). Сплошная горизонтальная линия 6 соответствует нулевому потенциалу. Нумерация других линий соответствует нумерации на рис. 1.

ствуют штриховые прямые линии 5 ($Z_f = -1$) и 7 ($Z_f = 1$), построенные при той же концентрации X_f , что и кривые 1 и 2.

На рис. 2 представлены зависимости электростатического потенциала $\Delta \phi$ в ПК от корреляционной длины воды как для положительно, так и для отрицательно заряженных фиксированных групп в ПК, построенные по формуле (2). При замене отрицательно заряженных фиксированных групп положительными $\Delta \phi$ также меняет знак, однако нет симметрии кривых 1 и 2 относительно оси абсцисс. Это связано с различием изменения энергий сольватаций Na⁺ и Cl⁻. На рис. 3 представлены зависимости изменений энергии сольватации ионов в ПК. Из рис. 3 видно, что как для Na^+ , так и для $Cl^- \Delta W$ по абсолютной величине существенно больше единицы и, следовательно, коэффициенты распределения этих ионов между свободным раствором и ПК значительно меньше единицы.

выводы

В данной работе развита теория инверсии зарядовой селективности при изменении знака заряда аминокислотных остатков в ПК, описывающая экспериментальные результаты работы [1] по экспрессии клаудинов в ПК. Выполненные расчеты селективности по нелокально-электростатической теории с учетом эффекта полости иона подтверждают выводы, сделанные нами ранее в работах [6, 7] при анализе зарядовой селективности в ПК на основе простой модели сольватации

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021



Рис. 3. Зависимости изменения ΔW энергий сольватации Na⁺ и Cl⁻ при переходе этих ионов в ПК между эпителиальными клетками от изменения корреляционной длины $\Lambda_{\Pi K}$ в ПК. Кривые *1* и *1*' представляют энергию пересольватации Na⁺, кривые *2* и *2*' – энергию пересольватации Cl⁻. Сплошные кривые *1* и *2* рассчитаны по формулам (8) и (9) и соответствуют нашей теории, учитывающей эффект вырезания растворителя из объема, занятого ионом (эффект полости иона). Штриховые кривые *I*' и *2*' рассчитаны по формулам (5) и(6), не учитывающим этот эффект.

ионов, не учитывающей этого эффекта. Причиной значительной величины зарядовой селективности в ПК является сочетание двух факторов: 1) наличия в них заряженных групп, фиксированных в объеме ПК и 2) большого энергетического барьера для входа ионов из раствора внутрь ПК, обусловленным уменьшением их энергий сольватации в ПК. Расчеты по модели, не учитывающей эффект полости иона, дают завышенные значения как Na⁺/Cl⁻-селективности в ПК (при отрицательном заряде фиксированном в ПК), так и для Cl⁻/Na⁺-селективности (при положительном заряде в ПК) по сравнению с расчетами по теории, учитывающей этот эффект. Однако качественно результаты расчетов по этим двум моделям совпадают. Теории, не учитывающие эффекта изменения сольватации ионов при их переходе в ПК, не могут объяснить существование большой Na^+/Cl^- - или Cl^-/Na^+ -селективности в ПК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания № АААА-А17-117032350032-3 (А.А. Рубашкин) и при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Госзадание № АААА-А20-120101090002-4 (М.А. Воротынцев).

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

- O. R. Colegio, C. M. Van Itallie, H. J. McCrea, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283, C142 (2002).
- C. M. Van Itallie, A. S. Fanning, and J. M. Anderson, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 285, F1078 (2003).
- 3. C. M. Van Itallie and J. M. Anderson, Physiology **19**, 331 (2004).
- 4. J. M. Anderson and C. M. Van Itallie, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1, a002584 (2009).
- A. A. Rubashkin, P. Iserovich, J. A. Hernandez, et al., J. Membr. Biol. 208, 251 (2005).
- А. А. Рубашкин и П. Исерович, Цитология 60, 136 (2018).
- 7. А. А. Рубашкин, Д. В. Конев и А. Б. Цыганов, Электрохимическая энергетика **15**, 149 (2015).
- А. А. Корнышев, Г. И. Цицуашвили и А. Э. Ярощук, Электрохимия 25, 1037 (1989).

- А. А. Корнышев, Г. И. Цицуашвили и А. Э. Ярощук, Электрохимия 25, 1045 (1989).
- 10. R. R. Dogonadze and A. A. Kornyshev, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II **70**, 1121 (1974).
- М. А. Воротынцев и А. А. Корнышев, Электростатика сред с пространственной дисперсией (Наука, М., 1993).
- 12. A. A. Kornyshev and G. Sutmann, J. Phys. Chem. **104**, 1524 (1996).
- M. A. Vorotyntsev, J. Phys. C: Solid State Physics 11, 3323 (1978).
- 14. M. A. Vorotyntsev and A. A. Rubashkin, Phys. Chem. Liquids 55, 141 (2017).
- 15. М. А. Воротынцев, А. А. Рубашкин и А. Е. Антипов, Электрохимия **54**, S54 (2018).
- M. A. Vorotyntsev and A. A. Rubashkin, Chem. Phys. 521, 14 (2019).
- 17. S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104** (52), 20749 (2007).
- A. A. Rubashkin and M. A. Vorotyntsev, Curr. Phys. Chem. 6, 120 (2016).
- B. S. Gourary and F. J. Adrian, Solid State Phys. 10, 127 (1960).
- 20. M. V. Fedorov and A. A. Kornyshev, Mol. Phys. 105, 1 (2007).
- 21. A. A. Rubashkin, P. Iserovich, and M. A. Vorotyntsev, J. Mol. Liq. **317**, 113884 (2020).

A Theory on Reversal of Charge Selectivity in Cation- or Anion-Selective Tight Junctions between Epithelial Cells: Nonlocal Electrostatic Approach

A.A. Rubashkin*, P. Iserovich**, and M.A. Vorotyntsev***, *****

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

**Downstate Medical Center, State University of New York, 450 Clarkson Ave., Brooklyn, NY, 11203 USA

***Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 31, Moscow, 119071 Russia

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

*****ICMUB, UMR 6302 CNRS, Université Bourgogne – Franche-Comté, Dijon, France

A theory on reversal of charge selectivity in tight junctions between epithelial cells by changing the sign of the fixed charge in tight junctions is developed. With the method used in our work, taking into account the effect of the ion cavity, we calculated changes in ion solvation energies associated with the transferring of ions to tight junctions. A formula is derived to determine the dependences of the permeability ratio of Na^+ versus Cl^- in tight junctions on the concentration and the sign of fixed charges in tight junctions, as well as on the correlation length of water. The developed theory coincides with the experimental data available in the literature on reversal of Na^+/Cl^- selectivity for Madin-Darby canine kidney cells in the expression of claudin-15 protein molecules in tight junctions with a changed sign of the charge of amino acid residues.

Keywords: epithelial cells, tight junctions, reversal of charge selectivity, nonlocal electrostatics, ion solvation energy, ion cavity effect

УДК 573

МЕХАНИЗМЫ ХЕМОРЕЦЕПЦИИ И ТЕРМОРЕЦЕПЦИИ В ГАНГЛИИ ГРЮНЕБЕРГА

© 2021 г. Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, А.А. Синегубов

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6 E-mail: bigday50@mail.ru Поступила в редакцию 25.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г. Принята к публикации 22.07.2020 г.

Ганглий Грюнеберга — один из периферических отделов обонятельной сенсорной системы, специализирующийся на детекции жизнеугрожающих стимулов. В фокусе статьи находятся хеморецепторы нейронов ганглия и сопряженные с ними сигнальные пути, в совокупности обеспечивающие мультимодальную рецепторную функцию. Молекулярная организация рецепторного аппарата нейронов данного органа претерпевает значительные изменения в ходе онтогенеза, обеспечивая смещение специализации в направлении от терморецепции в неонатальный период до хеморецепции на более поздних стадиях развития.

Ключевые слова: ганглий Грюнеберга, терморецепция, хеморецепция, гуанилатциклаза. **DOI:** 10.31857/S0006302921010129

Скопление нервных клеток в предверии носовой полости мыши, в дальнейшем получившее название ганглия Грюнеберга (Grünebeng ganglion, GG), впервые было обнаружено в 1973 г. [1]. GG идентифицирован у множества млекопитающих, включая человека [2]. У грызунов он составляет порядка нескольких сотен нейронов, отграниченных от соединительной ткани GFAP- и S100ß-позитивными, глия-подобными клетками [3]. В отличие от других отделов периферической части обонятельной системы, клетки GG не являются частью эпителия и не составляют компактной структуры, они разбросаны в собственной пластинке слизистой оболочки преддверия полости носа, образуя кластеры из нескольких десятков клеток, лишенных прямой связи с внешней средой [4].

Нетипичное для обонятельной системы строение данного органа привело к гипотезе о том, что данный ганглий является частью терминального нерва, однако маркеры его нейронов – гормон гонадотропин-рилизинга и ацетилхолинэстераза – обнаружены не были [5, 6]. Вместе с тем в ходе эмбриогенеза впервые популяция нейронов в предверии носа обнаруживается на четырнадцатые сутки и составляет часть эпителия. К шестнадцатым суткам они мигрируют в толщу соедини-

Сокращения: GG – ганглий Грюнеберга (Grünebeng ganglion), OMP – ольфакторный маркерный белок, TAAR – рецепторы следовых аминов. тельной ткани, приобретая характерную для взрослых морфологию [7]. В 2006 г. авторы работы [8] получили первые свидетельства того, что GG является частью обонятельной системы: применяя трансгенных мышей, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок под промотором характерного маркера дифференцированных нейронов основного обонятельного эпителия и эпителия вомероназального органа – ольфакторного маркерного белка (ОМР), обнаружили экспрессию репортера в нейронах GG. Основная часть аксонов данных клеток образовывала синапсы в гломерулах передней части дополнительной обонятельной луковицы, что было независимо подтверждено различными методами [9, 10]. Таким образом, в начале XXI века было доказано, что GG принадлежит дополнительной обонятельной сенсорной системе, о чем свидетельствуют проекции аксонов.

Вместе с тем гломерулы, образуемые ими, имеют «ожерелье-подобное» строение, сходное с теми, к которым направляются нейриты экспрессирующих рецепторную гуанилатциклазу D нейронов основного обонятельного эпителия [12].

Несмотря на необычную локализацию, нейроны GG в некоторой степени гомологичны сенсорным клеткам основного обонятельного эпителия. Так, в ответ на удаление обонятельной луковицы они так же дегенерируют и восстанавливаются в течение, в среднем, 11 суток в неонатальный период [13], однако пул клеток-предшественников на данный момент не идентифицирован. Подобие так же выражается в наличии специализированных органелл — жгутиков, в которых локализуются хеморецепторы и компоненты их сигнальной трансдукции [2]. Между тем уже в ходе ранних исследований GG гиганской белозубки (*Suncus murinus*) было обнаружено, что, в отличие от нейронов других отделов обонятельной системы, они не контактируют непосредственно с внешней средой и, как и тело нейрона, на всем протяжении покрыты сателлитными клетками [5].

Строение GG детально охарактеризовано для четырех видов грызунов: C57BL/6J мышей (Mus *musculus*), крыс Wistar (*Rattus norvegicus*), сирийских хомячков (Mesocricetus auratus) и монгольпесчанок (*Meriones unguiculatus*) [14]. ских Хотя общие черты – наличие инвагинированных жгутиков и глия-подобных вспомогательных клеток - присутствуют у ганглиев всех рассмотренных видов, детали их строения значительно различаются. Так, в широких пределах варьирует соотношение числа сателлитных клеток И нейронов, количество и длина жгутиков, форма и размеры тел нейронов. Особенно необычно обнаружение у сирийских хомячков атипичных жгутиков с конфигурацией цитоскелета >9+0. В отличие от нейронов основного обонятельного эпителия, отчетливая кластеризация компонентов сигнальной трансдукции хеморецепторов в пределах цилий наблюдается только у мышей и значительно менее выражена у других видов. В сумме полученные данные указывают на высокую степень дивергенции данного органа даже у близкородственных видов, не наблюдаемую для других отделов обонятельной сенсорной системы [15].

ХЕМОРЕЦЕПТОРЫ НЕЙРОНОВ ГАНГЛИЯ ГРЮНЕБЕРГА

Следует отметить, что в отличие от других периферических отделов обонятельной системы, функциональная роль GG изменяется по мере взросления животного, и репертуар рецепторов претерпевает значительные изменения в ходе онтогенеза. Своего пикового развития GG достигает в позднем эмбриональном периоде, в дальнейшем неуклонно атрофируясь [16]. Вместе со снижением численности клеток происходит смена доминантных типов рецепторов. Было обнаружено, что ольфакторные рецепторы, характерные для основной обонятельной системы, отсутствуют в GG. С помощью ПЦР с обратной транскрипцией была выявлена экспрессия десяти ольфакторных рецепторов, но с помощью гибридизации in situ был идентифицирован только один из них – OR256-17 [17]. Его экспрессия, как и иммунореактивность к основным компонентам

канонической сигнальной трансдукции — antiаденилатциклаза III и anti-G_{olf/s}, — выявляется лишь в небольшой фракции клеток (>1% от всей популяции) и ограничена стадиями E16 — P0.

Применяя ПЦР с обратной транскрипцией с дегенеративными праймерами к мРНК ольфакторных рецепторов, вомероназальных рецепторов I и II подтипов, авторы работы [15] обнаружили практически полное отсутствие мРНК указанных генов, за исключением соответствующих вомероназальным рецепторам II типа семейства С. Основным оказался ранее не идентифицированный V2r83. V2r83-позитивные клетки составляют большинство из всех нейронов GG на всех стадиях онтогенеза, достигая пика в неонатальный период (83.2 % от всех ОМР-позитивных нейронов). В дальнейшем, V2r83-нейроны несколько снижаются в своей численности, однако составляют большинство в течении всей жизни.

Другим классом хеморецепторов, представленных в GG, являются рецепторы следовых аминов (TAAR) [18]. У мышей данный класс составляет 15 интактных генов, все представители которого, за исключением Taar1, встречаются в основном обонятельном эпителии, составляя отдельную функциональную подсистему детекции аминов [19]. С помощью ПЦР с обратной транскрипцией была обнаружена экспрессия шести генов: Taar2, Taar4, Taar5, Taar6, Taar7A и Taar7D. Общее количество TAAR-позитивных нейронов значительно убывает, начиная с Е17.5, составляя популяцию лишь в несколько десятков клеток у взрослых животных. Соотношение различных типов было определено только для новорожденных мышей, у которых доминирующими оказались *Taar6* и *Taar7*.

V2r83, рецепторы следовых аминов и транзиторно экспрессируемый OR256-17 составляют весь репертуар хеморецепторов GG на эмбриональной стадии развития и в период новорожденности [18]. При этом по данным иммуногистохимии и *in situ* гибридизации в течение этих этапов онтогенеза один нейрон экспрессирует один рецептор. Однако у взрослых животных (6–8 недель) суммарное количество V2r83- и TAAR-позитивных клеток в пять раз ниже, чем количество всех OMP-позитивных клеток.

Вышеперечисленные рецепторы ранее были обнаружены и в других отделах обонятельной системы. Между тем авторы работы [20] идентифицировали в качестве хеморецепторов нейронов GG представителей семейства вкусовых рецепторов типа II, отвечающих за восприятие горечи. 3 из 35 [19] известных функциональных генов данного семейства экспрессируются в GG: *Tas2r115, Tas2r131* и *Tas2r143*. Частота встречаемости этих трех белков, как и возможность их коэкспрессии с классическими «обонятельными»


Рис. 1. Механизм канонической сигнальной трансдукции в нейронах основного обонятельного эпителия включает в себя G-белок G_{olf}, аденилатциклазу III, циклонуклеотид-зависимые и кальций-активируемые хлорные каналы. Выделены компоненты, обнаруженные в OR256-17-экспрессирующих нейронах GG.

рецепторами, неизвестна. Однако иммуногистохимически TAS2R-позитивные нейроны обнаруживаются в том числе и у новорожденных мышей, у которых, согласно ранее опубликованным данным [18], все OMP-позитивные нейроны экспрессируют либо V2r83, либо один из рецепторов следовых аминов, что косвенно указывает на их колокализацию с TAS2R в пределах одного нейрона.

Помимо рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR), у грызунов идентифицированы нейроны, экспрессирующие рецепторные гуанилатциклазы. В субпопуляции обонятельных нейронов обнаружены клетки, экспрессирующие рецепторную гуанилатциклазу D (GC-D) [22] и использующие цГМФ-опосредованный механизм трансдукции, отвечая на такие стимулы, как два Na-уретических пептидных гормона – урогуанилин и гуанилин [23]. Семейство рецепторных гуанилатциклаз у мышей составляет семь генов [24], из которых в GG представлена только рецепторная гуанилатциклаза G (GC-G). Она коэкспрессируется всеми V2r83-позитивными клетками и отсутствует в TAAR-позитивных клетках [25].

КОМПОНЕНТЫ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В GG

Трансдукция в ТААК- и OR256-17-экспрессирующих нейронах. Механизм хемотрансдукции начинается со взаимодействия раздражителя со специфическим рецептором. Для основного обонятельного эпителия характерна гетерогенность механизмов обонятельной рецепции [26]. Однако лучше других исследованы механизмы, осуществ-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

ляющиеся через G_{olf}, стимулирующим в ответ на действие одоранта аденилатциклазу III. Облигатными компонентами ольфакторной трансдукции являются также кальций-активируемые хлорные каналы и циклонуклеотид-зависимые каналы, селективные к цАМФ [27] (рис. 1).

В GG была обнаружена фракция клеток, экспрессирующая аденилатциклазу III и Golf/s [15]. Она составляет лишь небольшую часть, близкую по своему количеству к OR256-17 по данным гибридизации *in situ*, и присутствует лишь у мышей на стадии Е16. Позже доминирующая в основном обонятельном эпителии цАМФ-фосфодиэстераза 4а, а также и OR256-17 [28] не выявляются. Вероятно, на ранней стадии развития мышей нейроны GG обеспечивают ольфакторную рецепцию, механизм трансдукции которой осуществляется через ольфакторные рецепторы OR256-17, сопряженные с аденилатциклазой III и Golf/s. В более поздний период эта функция исчезает. Об этом свидетельствуют данные, в которых показано, что у новорожденных не выявляются Golf, PDE4a и циклонуклеотид-зависимые каналы, селективные к цАМФ – CNGA2, CNGB1 и CNGA4.

На смену нейронам, экспрессирующим OR256-17, приходят клетки с другим типом рецепторов. Среди них особый интерес вызывают рецепторы следовых аминов, которые в основном обонятельном эпителии сопряжены с G_{olf} [29]. В отличие от OR256-17, TAAR-позитивные нейроны составляют значительную популяцию клеток GG новорожденных. Иммуногистохимически обнаружена колокализация TAAR и характерных для сигнальной системы в клетках вомероназального органа G-белков $G_{i/o}$ [28], но ни функциональная сопряженность этих белков, ни другие компоненты их сигнальных путей в TAAR-позитивных нейронах не обнаружены. Поэтому роль, которую играют TAAR в нейронах GG, пока спорна.

Известно, что во вкусовых сенсорных клетках, отвечающих за рецепцию горечи, белком, сопряженным с этими рецепторами, является густдуцин (G_t) [30]. В изолированных с помощью лазерной микродиссекции нейронах GG, как и во вкусовых клетках, обнаружена экспрессия мРНК, кодирующей альфа-субъединицу данного белка – Gnat3 [20]. Иммунореактивность к anti-GNAT3 и anti-TAS2R143 колокализовалась в одних и тех же клетках. Между тем ПЦР с обратной транскрипцией с праймерами к мишеням GNAT3 – фосфолипазе β2 (Plcb2) и меластиновому каналу M5 (Тгрт5) – не позволила детектировать продукт ампликации. Функционально воздействие предполагаемых лигандов данных рецепторов на нейроны GG ведет к повышению концентрации цитозольного кальция. Аналогичные результаты были получены и в опытах с гетерологической экспрессией TAS2R143. В совокупности это свидетельствует об отличном от вкусовых рецепторных клеток механизме трансдукции в нейронах GG.

Компоненты сигнальной трансдукции V2r83экспрессирующих нейронов. Наиболее крупной по числу клеток популяцией в GG на всех этапах онтогенеза представлены нейроны, экспрессирующие V2r83. В вомероназальном органе трансдукция сигнала осуществляется через $G_{i/o}$, основной мишенью которого является фосфолипаза Сβ [31]. Образующиеся при этом вторичные посредники открывают инозитолтрифосфат-чувствительные кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума и меластиновые каналы, в первую очередь – TRPM2.

Однако несмотря на то что V2r83-позитивные нейроны GG экспрессируют начальные компоненты сигнального пути, присущего вомероназальным клеткам (G_{i/o}), меластиновые каналы в GG не обнаруживаются. Вероятно, в механизме трансдукции в клетках GG, экспрессирующих V2r83, участвует не фосфоинозитидная сигнальная система, а гуанилатциклазная, поскольку в данных нейронах выявлена специфическая для GG рецепторная гуанилатциклаза G (GC-G) [29], а также в этой фракции клеток новорожденных мышей и взрослых животных идентифицированы такие компоненты гуанилатциклазного каскада, как фосфодиэстераза 2a (PDE2a) [32], цГМФ-зависимая протеинкиназа II (GMKII), а также типичные для GG, содержащие субъединицу CN-

GA3 циклонуклеотид-зависимые каналы, чувствительные к цГМФ [28].

МУЛЬТИМОДАЛЬНОСТЬ РЕЦЕПЦИИ В GG

Впервые хеморецепторная функция GG была обнаружена авторами работы [3] при применении в качестве пахучего стимула неидентифицированной смеси веществ, сорбированных из атмосферы в ходе умерщвления мышей в CO₂-камере.

Анализ активации «ожерелье-подобных» гломерул в GG в ответ на хемостимуляцию позволил обнаружить их реакцию на 2,5-диметилпиразин и 2-гептанон [33]. Исходя из этого, авторы работы [34] исследовали реакцию нейронов GG на серию структурно схожих с 2,5-диметилпиразином веществ. Среди всего перечня одорантов им удалось найти лишь один лиганд — 2,3-диметилпиразин, взаимодействие с которым было подтверждено электрофизиологическими методами [35].

Реагирующими на препарат были клетки, которые принадлежали к субпопуляции V2r83-позитивных. V2R - второй основной класс сенсорных клеток в вомероназальном органе. Они обнаруживают несколько семейств пептидных и протеиновых феромонов, которые являются важными для химической коммуникации и регуляции социального поведения. Кандидатные лиганды для V2Rs включают в себя три семейства полипептидов: major urinary proteins (MUPs); major histocompatability complex (MHC) peptids; exocrine gland-secreting peptide (ESP). Вомероназальные сенсорные клетки, экспресирующие V2R, обнаруживают комбинаторную коэкспрессию различных V2Rs, означая, что эти клетки, по-видимому, составляют исключение из правила «одна клетка - один рецептор» для хемосенсорных клеток [36].

Нокаутированные по CNGA3 и GC-G мыши, т.е. с отсутствующей функциональной сигнальной системы гуанилатциклазы G, не реагировали на 2,3-диметилпиразин деполяризацацией нейронов, что свидетельствует о том, что данное вещество в механизм трансдукции вовлекает именно эту сигнальную систему (рис. 2). Однако чувствительные к 2,3-диметилпиразину клетки удалось обнаружить только на ранних стадиях постнатального периода, когда 2,3-диметилпиразин, вероятно, выполняет важную для выживания молодых животных роль.

Об этом говорят данные, полученные в работе [37], в которой был проведен поиск лигандов на основе пиридин- и пиразинсодержащих мотивов. Полученные результаты привели к выводу о структурной гомологии лигандов рецепторов GG с выделяемыми хищниками с мочой веществами. Поведенческие эксперименты показали, что эти идентифицированные лиганды индуцировали ре-



Рис. 2. Механизм трансдукции GC-G в субпопуляции V2r83-позитивных нейронов включает в себя циклонуклеотидзависимые каналы и цГМФ-зависимую протеинкиназу II; PDE2a – ключевой фермент деградации цГМФ.

акцию избегания, сопровождавшуюся повышением артериального давления, и являлись стрессорным фактором для взрослых мышей.

В качестве лиганда, действующего на GG, был идентифицирован также 2-sec-бутил-4,5-дигидротиазол. Как и другие, он инициирует реакцию избегания у мышей и повышение уровня цитозольного кальция в клетках GG [37]. И поведенческие реакции, и формирование рецепторного потенциала в ответ на стимуляцию отсутствовали у GC-G-нокаутных мышей, также указывая на роль цГМФ внутриклеточной сигнальной системы в механизме трансдукции sec-бутил-4,5-дигидротиазола. Это предположение убедительно доказали авторы работы [38], которые, используя гетерологическую экспрессию, впервые подтвердили, что 2-sec-бутил-4,5-дигидротиазол связывается с экстрацеллюлярным доменом GC-G, стимулируя каталитическую активность фермента, и получили величину $K_{\rm D} = 78.3$ нМ.

Как видно из вышеизложенного, своего пикового развития GG достигает в ранние периоды онтогенеза. Эта особенность стимулировала поиск возможной роли данного сенсорного органа во взаимодействии матери и ребенка.

Действительно, их сепарация вела к активации нейронов, что проявлялось в повышении экспрессии с-Fos - протоонкогена, ранее использованного для мониторинга активации нейронов основного обонятельного эпителия одорантами [43]. Необычность явления состояла в том, что унилатеральная окклюзия носового прохода не вызывала исчезновения реакции, которая наблюдалась только в V2r83-позитивных клетках. Было предположено, что хеморецепция не участвует в данном феномене [40], а в качестве объяснения предложена и в дальнейшем подтверждена гипотеза термочувствительности этих нейронов [11, 40-42].

В периферической нервной системе млекопитающих термочувствительные рецепторы принадлежат семейству TRP. Среди них основную роль в реакции на понижение температуры играют TRPM8 и TRPA1. В ответ на действие их агонистов – ментола, ицилина и аллилизотиоцианата – авторы работы [42] не получили значимого повышения концентрации кальция в клетках, что может свидетельствовать об отсутствии TRPM8 и TRPA1 в GG. Это предположение подтверждается отсутствием экспрессии Ттрт8 в клетках ганглия [32], а также тем, что у мышей, нокаутированных по Trpa1, не выявлялось ослабления термочувствительности у нейронов GG.

Тот факт, что основным внутриклеточным посредником в данных нейронах является цГМФ, привел к дискуссии о сходстве GG с термо- и хеморецепторным аппаратом нематоды Caenorhabditis elegans. Помимо сходства в адекватных раздражителях и гомологичности механизмов трансдукции, в этих нейронах обнаружено сходство в последовательностях генов, кодирующих компоненты цГМФ-зависимого пути: GC-G имеет 29%-ю идентичность и 65%-ю схожесть с DAF-11, СNGA3 и TAX-4 – 44% и 91%, PDE2A и pde-2 – 38% и 58%, cGKII и egl-4 – 47% и 96% соответственно [43]. Такое сходство между нейронами GG млекопитающих и нейронами AWA нематоды свидетельствует о консерватизме молекулярных механизмов хемо- и терморецепции, сохранившихся в процессе эволюции.

Так, у C. elegans термотаксис реализуется преимущественно за счет функционирования рецепторной гуанилатциклазы DAF-11, локализующейся в мембране жгутиков АWA-нейронов. Сигнальный каскад представлен ТАХ-4, pde-2 и egl-4.

БИОФИЗИКА том 66 **№** 1

2021

БИГДАЙ и др.

Рецепторы	Адекватный раздражитель	Механизм трансдукции
V2r83	?	?
GC-G	 Пониженная температура в диапазоне от 11.9 до 21.9°С. Ряд природных каиромонов хищников и их синтетических аналогов 	GC-G – μΓΜΦ – CNGA3
TAS2R115, TAS2R131 и TAS2R143	Ряд веществ, ранее идентифицированных как горечи и сходных с метаболитами в моче хищников*	GPCR – Gt – ?**
OR256-17	Широкий спектр одорантов, в том числе следовые амины*	GPCR — G _{olf} — аденилатциклаза III — CNG**
TAARs	Следовые амины*	?

Илентид	оинированные	ренепторы	нейронов GG.	их алекватные	разлражители и	механизмы	гранслукнии
	, induit o partitione	pedenioppi.	memponion e e,	In appendent to the test	paroppennin erin n		pane, indi

Примечание. * – Лиганды, взаимодействие с которыми показано в других отделах обонятельной системы и/или в системах гетерологической экспрессии; ** – предполагаемый механизм, построенный на основе морфологических данных.

Реакция V2r83-позитивных нейронов GG на понижение температуры реализуется с помощью сходного механизма трансдукции сигнала. Исследования на нейронах GG показали, что L-цисдилтиазем – антагонист CNG-каналов – полностью блокирует ответ на охлаждение, а 8-бромцГМФ имитирует действие температуры [42]. В качестве мишени вторичного посредника предполагается CNGA3, локализованный в мембране жгутиков [44]. На это указывают данные, полученные на нокаутных по СпдаЗ мышах. Нейроны их GG реагируют на изменение температуры повышением концентрации кальция в цитозоле, но в то же время термочувствительные клетки отвечают на повышение внутриклеточной концентрации цГМФ при введении 3-изобутил-1-метилксантина (неселективного ингибитора фосфодиэстераз) и не чувствительны к активатору аденилатциклазы III форсколину [42]. Таким образом, в механизме термотрансдукции в качестве температурного сенсора выступает гуанилатциклаза GC-G, активация которой повышает внутриклеточную концентрацию цГМФ, открывающего циклонуклеотид-зависимые каналы, генерируя рецепторный потенциал в жгутиках. Измеряя активацию гломерул в ответ на температурное воздействие GG по уровню экспрессии с-Fos, Bumbalo et al. получили сходные данные – у CNGA3-нокаутных мышей чувствительность к охлаждению снижалась [11]; посредством той же техники были получены аналогичные результаты и на препаратах GG [45].

В дальнейшем в аксонах этих нейронов генерируется потенциал действия, распространяющийся к гломерулам. Электрофизиологические методы выявили характерную для нейронов GG спонтанную генерацию потенциалов действия, которая позволила всю популяцию разделить на три группы: 1) группа, генерирующая повторные одиночные потенциалы, 2) группа с фазной и 3) группа со спорадической активностью [46]. Возможно, эта активность обусловливается функционированием CNG-каналов в мембране жгутиков клеток GG в отсутствие внешнего раздражителя, как это происходит в обонятельных жгутиках сенсорных нейронов различных типов животных [47]. В ответ на снижение температуры потенциал действия возникает за счет совокупного входящего натриевого тока в данных клетках, состоящего из двух фракций, из которых одна – относительно резистентная к действию тетродотоксина.

Обнаруженные в GG рецепторы, их сигнальные каскады и адекватные раздражители суммированы в таблице. Таким образом, рецепторная гуанилатциклаза G является ключевым ферментом в хемо- и терморецепции в большинстве нейронов ганглия Грюнеберга. Активируясь при сдвиге температуры в диапазоне от 11.9 до 21.9°С либо связываясь с лигандом, GC-G катализирует образование цГМФ — вторичного посредника, открывающего циклонуклеотид-зависимые каналы А4. Другой рецепторной подсистемой в GG являются вкусовые рецепторы подтипа II, сопряженные с густдуцином. Сигнальный каскад, активируемый в ответ на связывание лиганда остается неизвестным. В совокупности эти две системы обеспечивают детекцию жизнеугрожающих раздражителей. В ранний постнатальный период доминирует терморецепторная функция GG, обеспечивая регуляцию взаимодействия с матерью. У взрослых животных данный орган функционирует преимущественно как хеморецепторный, обеспечивая, с одной стороны, восприятие веществ, эмитируемых другими животными во время опасности, с другой - каиромонов хищников.

Остается неясной роль транзиторной экспрессии OR256-17 в GG на эмбриональной стадии развития. В основном обонятельном эпителии OR256-17-позитивные клетки демонстрируют чрезвычайно широкий профиль чувствительности, включая и следовые амины в том числе [48].

Так же на данный момент неизвестны функции и механизмы трансдукции для других рецепторов GG — V2r83 и TAAR. Ранее они были идентифицированы в других отделах периферической части обонятельной сенсорной системы, однако, исходя из совокупности приведенных данных, ассоциированые с ними сигнальные пути отличны от типичных для вомероназального органа и основного обонятельного эпителия соответственно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014— 2020 годы (ГП-14, раздел 63).

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. H. Grüneberg, Z. Anat. Entwicklungsgesch. **140** (1), 39 (1973).
- 2. J. Fleischer and H. Breer, Histol. Histopathol. **25** (7), 909 (2010).
- J. Brechbühl, M. Klaey, and M. C. Broillet, Science 321 (5892), 1092 (2008).
- 4. S. H. Fuss, M. Omura, and P. Mombaerts, Eur. J. Neurosci. 22 (10), 2649 (2005).
- T. Tachibana, N. Fujiwara, and T. Nawa, Arch. Histol. Cytol. 53 (2), 147 (1990).
- 6. J. Fleischer, N. Hass, K. Schwarzenbacher, et al., Histochem. Cell Biol. **125** (4), 337 (2006).
- 7. J. Fleischer, K. Schwarzenbacher, S. Besser, et al., J. Neurochem. **98** (2), 543 (2006).
- S. H. Fuss, M. Omura, and P. Mombaerts, Eur. J. Neurosci. 22 (10), 2649 (2005).
- D. Roppolo, V. Ribaud, V. P. Jungo, et al., Eur. J. Neurosci. 23 (11), 2887 (2006).
- 10. M. J. Storan and B. Key, J. Comp. Neurol. **494** (5), 834 (2006).

- R. Bumbalo, M. Lieber, L. Schroeder, et al., Cell. Mol. Neurobiol. **37** (4), 729 (2017).
- R. E. Cockerham, A. C. Puche, and S. D. Munger, PLoS One 4 (2), e4657 (2009).
- F. Chehrehasa, A. Jacques, J. A. St John, and J. A. K. Ekberg, Brain Res. 1688, 65 (2018).
- 14. J. Brechbühl, M. Klaey, F. Moine, et al., Front. Neuroanat. 8, 87 (2014).
- N. Falk, M. Lösl, N. Schröder, and A. Gießl, Cells 4 (3), 500 (2015).
- H. Breer, J. Fleischer, and J. Strotmann, Cell Mol. Life Sci. 63 (13), 1465 (2006).
- 17. J. Fleischer, K. Schwarzenbacher, S. Besser, et al., J. Neurochem. **98** (2), 543 (2006).
- J. Fleischer, K. Schwarzenbacher, and H. Breer, Chem. Senses 32 (6), 623 (2007).
- 19. R. R. Gainetdinov, M. C. Hoener, and M. D. Berry, Pharmacol Rev. **70** (3), 549 (2018).
- 20. F. Moine, J. Brechbühl, and M. Nenniger Tosato, et al., BMC Biol 16, 12 (2018).
- J. Chandrashekar, M. A. Hoon, N. J. Ryba, and C. S. Zuker, Nature 444 (7117), 288 (2006).
- H. J. Fülle, R. Vassar, D. C. Foster, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (8), 3571 (1995).
- 23. F. Zufall, S. D. Munger, Mol. Cell. Biochem. **334** (1), 191 (2010).
- 24. M. Kuhn, Physiol. Rev. 96 (2), 751 (2016).
- 25. K. Mamasuew, N. Hofmann, V. Kretzschmann, et al., Neurosignals **19** (4), 198 (2011).
- 26. Е. В. Бигдай, Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова **90** (6), 710 (2004).
- 27. C. Y. Su, K. Menuz, and J. R. Carlson, Cell **139** (1), 45 (2009).
- C. Y. Liu, S. E. Fraser, D. S. Koos, J. Comp. Neurol. 516 (1), 36 (2009).
- 29. J. Zhang, R. Pacifico, D. Cawley, et al., J. Neurosci. 33 (7):3228, (2013).
- G. T. Wong, K. S. Gannon, and R. F. Margolskee, Nature 381 (6585), 796 (1996).
- 31. A. Pérez-Gómez, B. Stein, T. Leinders-Zufall, and P. Chamero, Front. Neuroanat. 8, 135 (2014).
- 32. J. Fleischer, K. Mamasuew, and H. Breer, Histochem. Cell Biol. **131** (1), 75-88 (2009).
- 33. W. Lin, J. Arellano, B. Slotnick, D. Restrepo, J. Neurosci. **24** (14), 3703 (2004).
- K. Mamasuew, N. Hofmann, H. Breer, and J. Fleischer, Chem. Senses 36 (3), 271 (2011).
- 35. W. Hanke, K. Mamasuew, M. Biel, et al., Neurosci. Lett. **539**, 38 (2013).
- 36. S. D. Munger, T. Leinders-Zufall, and F. Zufall, Annu. Rev. Physiol. **71**, 115 (2009).
- J. Brechbühl, F. Moine, M. N. Tosato, et al., Front. Neurosci. 9, 253 (2015).
- Y. C. Chao, J. Fleischer, and R. B. Yang, EMBO J. 37 (1), 39 (2018).

- 39. E. M. Norlin, V. Vedin, S. Bohm, and A. Berghard, J. Neurochem. **93** (6), 1594 (2005).
- 40. K. Mamasuew, H. Breer, and J. Fleischer, Eur. J. Neurosci. 28 (9), 1775 (2008).
- 41. R. Bumbalo, M. Lieber, E. Lehmann, et al., Neuroscience **366**, 149 (2017).
- 42. A. Schmid, M. Pyrski, M. Biel, et al., J. Neurosci. **30** (22), 7563 (2010).
- 43. J. Brechbühl, F. Moine, and M. C. Broillet, Front. Behav. Neurosci. 7, 193 (2013).
- 44. C. Y. Liu, S. E. Fraser, and D. S. Koos, J. Comp. Neurol. **516** (1), 36 (2009).
- 45. K. Mamasuew, S. Michalakis, H. Breer, et al., Cell. Mol. Life Sci. **67** (11), 1859 (2010).
- C. Y. Liu, C. Xiao, S. E. Fraser, et al., J. Neurophysiol. 108 (5), 1318 (2012).
- 47. S. J. Kleene, Chem Senses 33 (9), 839 (2008).
- 48. B. Tazir, M. Khan, P. Mombaerts, and X. Grosmaitre, Eur. J. Neurosci. **43** (5), 608 (2016).

Mechanisms of Chemoreception and Thermoreception in the Grueneberg Ganglion E.V. Bigdai, V.O. Samoilov, and A.A. Sinegubov

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, Saint-Petersburg, 199034 Russia

The Grueneberg ganglion is an olfactory compartment in the peripheral structure of the sensory system that can detect threat-relevant stimuli. In this study, we focus on the chemoreceptors of the ganglion neurons and signaling pathways associated with them. Complex interaction between these components allows the ganglion to function as a multimodal sensory system. The molecular mechanism that orient olfactory receptor neurons of the Grueneberg ganglion undergoes significant changes during ontogenesis, promoting transition from thermoreception in the neonatal period to chemoreception at later stages of development.

Keywords: Grueneberg ganglion, therrmoreception, chemoreception, guanylate cyclase

УДК 577.3

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК HeLa ПОД ВЫСОКИМ ГИДРОСТАТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ 1.0-1.5 КБАР

© 2021 г. С.В. Уграицкая, Н.В. Шишова, Э.Р. Валеева, С.А. Каурова, Н.Э. Швирст, Е.Е. Фесенко (мл.)

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

E-mail: eugeny.ef@gmail.com Поступила в редакцию 15.07.2020 г. После доработки 20.09.2020 г. Принята к публикации 30.10.2020 г.

Идея использовать высокое давление для снижения криоповреждений имеет проработанное теоретическое обоснование, однако экспериментальных данных по замораживанию живых объектов под давлением крайне мало. Мы исследовали выживаемость клеток линии HeLa под давлением 1.0-2.0 кбар, токсические эффекты пяти классических криопротекторов в этих условиях, а также выживаемость клеток HeLa в процессе медленной криоконсервации под давлением 1.0 и 1.5 кбар. Экспериментально показана высокая устойчивость клеток HeLa к гидростатическому давлению: 100%-я выживаемость при 1.0 кбар и 60-минутной инкубации. Токсическое воздействие криопротекторов под давлением можно расположить в следующем ряду: глицерин < этиленгликоль < 1,2пропандиол = ДМСО < ДМСО + формамид. Наименьшую токсичность проявили глицерин и этиленгликоль, для которых также показаны выраженные баропротекторные эффекты. При криоконсервации под давлением 1.0 кбар высокая выживаемость $-83 \pm 16\%$ по данным флуоресцентного окрашивания — была достигнута при использовании 10%-го глицерина, однако она не превысила показателей выживаемости, полученных в контрольных нормобарических экспериментах. Замораживание проводили по методу медленной классической криоконсервации. Использование давления для замораживания биоматериала методом витрификации может привести к другим результатам.

Ключевые слова: криоконсервация, гидростатическое давление, криопротекторы, баропротекторы, глицерин, формамид.

DOI: 10.31857/S0006302921010130

Криоконсервация является важным элементом современных биотехнологий, так как это единственный метод, обеспечивающий длительное – на месяцы и годы – хранение жизнеспособного биологического материала. С помощью криоконсервации осуществляется хранение самого разного биологического материала – клеток крови, гамет, клеточных культур, эмбрионов и др. Несмотря на то что для многих объектов процедуры замораживания и хранения разработаны и широко используются (например, для крови, спермы и т.п.), продолжается поиск повышения эффективности методов криоконсервации. Изучение новых подходов в дополнение к существующим традиционным методам замораживания необходимо также в связи с тем, что пока не разработаны протоколы криоконсервации для значительного числа биологических объектов (яйцеклеток, эмбрионов и личинок рыб, эмбрионов птиц, массивов тканей и органов животных и человека и др.).

Большинство криоповреждений биологического материала при криоконсервации прямо либо косвенно связано с образованием кристаллов льда в процессе замораживания. Такие параметры, как количество кристаллов льда, их размер, форма, локализация, соотношение кристаллического льда и остеклованного остаточного раствора, оказывают значительное влияние на жизнеспособность и качество замороженно-оттаянного биологического материала. Перечисленные параметры существенно зависят прежде всего от состава криозащитной среды и от скорости замораживания в различных температурных диапазонах, однако и другие факторы могут влиять на формирование структуры замороженного раствора.

Сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

Известно, что гидростатическое давление воздействует на процесс кристаллизации льда [1, 2]. В связи с тем, что вода обладает аномальными свойствами, при повышении давления в диапазоне до 2.1 кбар температура кристаллизации воды и водных растворов понижается [1, 2]. Каждые дополнительные 100 бар давления понижают точку кристаллизации воды примерно на 1°С, а температуру образования зародышей кристаллической фазы в отсутствие примесей (точку гомогенной нуклеации) - на 2.0-2.5°С [1, 2]. Одновременно с этим под воздействием высокого гидростатического давления увеличивается вязкость растворов и несколько повышается температура перехода раствора из жидкого в стеклообразное состояние [3].

Идея об использовании высокого гидростатического давления для снижения криоповреждений в процессе замораживания биологических объектов появилась достаточно давно и обсуждалась еще в семидесятые годы прошлого века [4, 5]. Впоследствии было несколько исследований поведения растворов криопротекторов при охлаждении под давлением [3, 6]. Ряд специалистов полагает, что криоконсервация под высоким гидростатическим давлением может быть перспективным направлением криобиологии применительно к объектам, плохо поддающимся процедуре обратимого замораживания [6–9].

Концепция замораживания биологических объектов в условиях высокого гидростатического давления нашла применение в технологии фиксации биологических образцов для исследования клеточных структур. Замораживание под давлением 2.0–2.1 кбар является рутинным методом фиксации образцов для исследований методами электронной микроскопии [10, 11]. Отмечается, что замораживание под давлением позволяет хорошо сохранить клеточные структуры без искажений и возникновения артефактов.

Несмотря на перечисленное, экспериментальные данные по замораживанию живых объектов под высоким гидростатическим давлением крайне малочисленны. В 1976 г. А. Воротилин с соавторами [5] замораживали красные кровяные клетки под высоким гидростатическим давлением, для достижения которого применялась технология «ледяной бомбы». Точные значения давления не были указаны, но очевидно, что оно достигало приблизительно 1.5-2.0 кбара. Авторы отмечали, что в случае криоконсервации эритроцитов в присутствии непроникающих криопротекторов (ПЭО-400, сахароза, поливинилпирролидон) замораживание под высоким давлением позволяло уменьшить повреждения замороженно-оттаянных клеток, снижая гемолиз в полторатри раза. Однако при применении проникающих криопротекторов (диметилсульфоксид (ДМСО),

глицерин, ацетамид, пропиленгликоль) использование давления в процессе замораживания, напротив, проявляло негативный эффект, значительно ухудшая сохранность эритроцитов.

Н. Грир [12] также замораживал эритроциты под высоким гидростатическим давлением. В этих экспериментах замораживание осуществлялось в условиях давления от 0.7 до 2.0 кбар, в то время как оттаивание проводили при атмосферном давлении. В отличие от предыдущих авторов в данной работе была отмечена высокая эффективность сочетания давления и проникающих криопротекторов (ДМСО, глицерин). Было найдено, что оптимальное давление для замораживания эритроцитов составляет 1.2 кбар. В экспериментах с наиболее удачным сочетанием давления (1.2 кбар), скорости охлаждения (35°С/мин) и криопротектора (7%-й глицерин) гемолиз эритроцитов не превышал 5%.

Дж. Хубингер с соавторами [13] сделали попытку получить жизнеспособные замороженнооттаянные культуры, используя технологию криофиксации биообъектов под давлением, разработанную для электронной микроскопии. Они замораживали культуру Escherichia coli, дрожжи Saccharomyces cerevisiae и культуру клеток HeLa. Были использованы две технологии, применяемые в электронной микроскопии: система быстрой заморозки под давлением (SPRF) и замораживание под высоким давлением (HPF). Дрожжи Saccharomyces cerevisiae выживали приблизительно одинаково как в контроле (замораживание при атмосферном давлении), так и в экспериментальных группах с использованием указанных методов. Клетки HeLa при замораживании в системе SPRF продемонстрировали выживаемость 75-90% (в зависимости от применяемых криопротекторов и конкретной модели камеры SPRF), однако при замораживании в системе HPF выживало не более 2-4% клеток. Нужно отметить, что система SPRF обеспечивает давление внутри камеры только в случае частичной кристаллизации воды, однако применяемые авторами криозащитные растворы и скорости замораживания были близки к витрифицирующим. Если образцы полностью витрифицировались, давление в камере SPRF оставалось близким к значениям атмосферного, так что наличие высокого гидростатического давления при указанных условиях замораживания клеток HeLa в системе SPRF остается спорным.

Также необходимо упомянуть серию работ по изохорическому (с сохранением постоянного объема) сохранению биологических объектов при отрицательной температуре (Isochoric preservation at subfreezing temperatures) [14–17]. Метод предполагает использование принципа Ле Шателье для минимизации льдообразования ниже точки кри-

сталлизации раствора. Вода обладает свойством увеличивать объем при замерзании. За счет этого свойства при кристаллизации воды в замкнутой системе с жестко фиксированным объемом, образующийся лед вызывает повышение давления, что в свою очередь сдвигает равновесную точку льдообразования и препятствует дальнейшему росту кристаллов льда. Хранение биологических образцов осуществляют при небольшой отрицательной температуре, в условиях частичного замерзания раствора, окружающего биологический объект. Авторы данного метода сообщают о высокой выживаемости в описываемых условиях нематод [14], сохранения жизнеспособности и функциональных свойств панкреатических островков [15] и сердца крысы [16, 17].

Для понимания перспектив использования высокого гидростатического давления для совершенствования методов криоконсервации необходимо значительно расширить экспериментальную базу в этой области. Также необходимы исследования по воздействию криопротекторов на живые клетки под высоким гидростатическим давлением.

В нашей работе мы исследовали токсичность и баропротекторные свойства ряда криопротекторов в условиях гидростатического давления 1.0, 1.5 и 2.0 кбар в отношении клеток линии HeLa и проводили криоконсервацию этих клеток под давлением 1.0–1.5 кбар по методу медленной (классической) криоконсервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В качестве тест-объектов для криоконсервации использовали клетки линии HeLa, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток проводили по стандартной методике [18]. Использовали среду ДМЕМ в модификации Дульбекко (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина. Клетки выращивали в культуральных флаконах Е75 (Eppendorf, США). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе MCO-175 (SANYO, Япония) при 37°C во влажной атмосфере в течение 48 ч, после чего пассировали их в расчете 30– 50 тыс. кл./см². Ферментативное открепление клеток от культуральной чашки проводили с использованием 0.05%-го раствора трипсина– ЭДТА (Gibco, Великобритания).

Применяемые криозащитные растворы. Растворы криопротекторов готовили на среде ДМЕМ в модификации Дульбекко с добавлением 10% ЭТС. В экспериментах использовали глицерин,

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021



Рис. 1. Камера высокого давления для исследования поведения растворов при замораживании-оттаивании: 1 – металлическая емкость с внешней термоизоляцией, 2 – охлаждающая (жидкий азот) или разогревающая (теплая вода) жидкость, 3 – гайка обтюратора, 4 – обтюратор, 5 – тело камеры, 6 – капсулы с биологическим материалом, 7 – рабочее пространство камеры, заполненное 50%-м раствором глицерина, 8 – поршень Бриджмена, 9 – гайка-фиксатор поршня, 10 – приложение давления с помощью децимального пресса.

этиленгликоль, 1,2-пропандиол, ДМСО (конечная концентрация в суспензии клеток – 10%) и смесь ДМСО/формамид в соотношении 2 : 1 (конечная концентрация 6.6% ДМСО, 3.4% формамида). Все криопротекторы были приобретены у фирмы Sigma-Aldrich (США).

Подготовка клеток к экспериментам. Перед экспериментом клетки, растущие в виде монослоя, переводили в суспензию. Для этого монослой трижды промывали 0.05%-м раствором трипсина—ЭДТА и выдерживали в течение 3 мин при 37°С, после чего раствор сливали, клетки пипетировали несколько раз и переносили в среду ДМЕМ с 10% ЭТС. Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева. Криопротекторы к суспензии клеток добавляли в два этапа с интервалом 30 с. Концентрация клеток в экспериментах по определению токсичности и баропротекторных свойств криопротекторов составляла 2 млн/мл, в экспериментах по криоконсервации клеточной культуры — 5 млн/мл.

Воздействие гидростатического давления на клетки, определение токсичности криопротекторов под давлением. Для экспериментов по определению устойчивости клеток к давлению и изменению токсичности криопротекторов под давлением использовали специализированную камеру (рис. 1). Суспензию клеток помещали в силиконовые капсулы объемом 70 мкл с закрывающимися подвижными поршнями, изготовленными из фторопласта по системе «цилиндр плюс два поршня» (см. позицию 6 на рис. 1). Данные поршни использовали с целью предотвращения возможного повреждения капсул из-за изменения объема суспензии в процессе подачи давления или кристаллизации воды. При заполнении капсул следили, чтобы в них отсутствовали пузырьки воздуха во избежание повреждения капсул под высоким давлением.

Капсулы с подготовленным биологическим материалом помещали во внутреннее пространство частично собранной камеры высокого давления, заполненное 50%-м раствором глицерина при комнатной температуре или при температуре 4°С (в зависимости от схемы эксперимента). Камеру собирали в рабочее положение и помещали под поршень децимального пресса (рис. 1, позиция 10). Давление нагнетали со скоростью 150 бар/мин до уровня, указанного в эксперименте, выдерживали пробы при максимальном давлении 10 или 30 мин, после чего начинали снижение давления. До 100 бар скорость снижения давления составляла 150 бар/мин, последующее снижение давления вплоть до атмосферного давления осуществляли со скоростью 60 бар/мин. После этого доставали капсулы из камеры, извлекали из них клеточную суспензию и проводили анализ клеток на жизнеспособность.

Криоконсервация под давлением. Для криоконсервации образцы клеточной суспензии помещали в капсулы, затем капсулы переносили в камеру высокого давления, как описано в предыдущем разделе. После достижения необходимого давления фиксировали поршень 8 фиксирующей гайкой 9 и переносили камеру либо непосредственно в низкотемпературный холодильник с температурой -130°С (охлаждение со средней скоростью 2°С/мин), либо сначала помещали камеру в термоизолирующий пенопластовый контейнер, в котором переносили ее в низкотемпературный холодильник (охлаждение со средней скоростью 0.5°С/мин). Скорость охлаждения замеряли в пробных экспериментах в диапазоне от 20°С до -100°С с помошью термометра АТТ-2004 («АКТАКОМ», Россия). Хранение при температуре –130°С проходило в течение 20 ч.

Оттаивание. Процедуру оттаивания проводили в двух модификациях. В первом варианте оттаивание, как и замораживание, проводили под высоким давлением. Камеру с зафиксированным поршнем (рис. 1, позиция *8*) помещали в водяную баню 30°С. После разогрева камеру перемещали под пресс, нагнетали давление, соответствующее давлению замораживания, и отпускали фиксирующую гайку 9. С помощью пресса плавно снимали давление до 100 бар со скоростью 150 бар/мин и далее до атмосферного давления со скоростью 60 бар/мин. Извлекали поршень 8 и доставали капсулы с биологическим материалом. Во втором варианте оттаивание проводили при атмосферном давлении, для этого отпускали фиксирующую гайку 9 на охлажденной камере, после чего помещали камеру в водяную баню 30° С для оттаивания. Скорость оттаивания биоматериала составляла 20° С/мин.

Определение жизнеспособности клеток проводили двумя способами: 1) подсчитывали количество живых клеток в суспензии с помощью витального красителя трипанового синего, 2) анализировали функциональное состояние клеток методом их культивирования in vitro.

Краситель трипановый синий использовали в виде 0.4%-го раствора, приготовленного на основе фосфатного солевого буфера (Sigma Aldrich, США). Для окрашивания к 20 мкл клеточной суспензии добавляли 20 мкл раствора красителя и выдерживали 1 мин при комнатной температуре. Подсчет окрашенных (нежизнеспособных) и неокрашенных (живых) клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess II Fl (Life Technologies, Великобритания). Жизнеспособность рассчитывали как соотношение неокрашенных (живых) клеток к общему количеству клеток в суспензии и выражали в процентах.

Для культивирования размороженных клеток использовали шестилуночные планшеты (Costar, США). В каждую лунку вносили по 50 мкл клеточной суспензии в 2 мл среды ДМЕМ с 10% ЭТС. Клетки инкубировали при 37°С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 5 ч, затем проводили полную смену инкубационной среды для удаления не прикрепившихся мертвых клеток. Далее через 11 ч оценивали количество клеток в каждой лунке с помощью CloneSelect Imager (Genetix, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние высокого гидростатического давления 1.0, 1.5 и 2.0 кбар на жизнеспособность клеток HeLa. Прежде чем приступить к экспериментам по криоконсервации, мы оценили чувствительность клеточной культуры HeLa к воздействию высокого гидростатического давления в пределах 1.0–2.0 кбар. Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, давление в 1.0 кбар не только не оказывало негативного воздействия на клетки, а, напротив, стимулировало их развитие в культуре. Экспозиция клеток под более высоким давлением (1.5 кбар) приводила к увеличению количества клеток с поврежденными мембранами и снижению показателей развития клеток в процессе культивирования. При этом негативное

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК НеLa

Параметры воздейст	вия давлением	Жизнеспособность клеток			
Давление, кбар	Длительность экспозиции под давлением, мин	Окрашивание трипановым синим, % живых клеток ± SD	Количество развивающихся клеток в культуре через 16 ч после воздействия, тыс.кл/см ² ± <i>SD</i>		
Атмосферное (контроль)	_	98 ± 2	254 ± 22		
1.0	60	95 ± 5	318 ± 9		
1.5	60	40 ± 17	70 ± 6		
	10	87 ± 12	98 ± 13		
2.0	10	5 ± 5	0		

Таблица 1. Жизнеспособность клеток линий HeLa после воздействия гидростатического давления

Примечание. Гидростатическое давление 1.0-2.0 кбар, температура 22° С (n = 5).

воздействие давления усиливалось как при увеличении давления, так и при увеличении длительности экспозиции клеток под давлением. После воздействия гидростатического давления 2.0 кбар даже в течение относительно короткого промежутка времени (10 мин) клетки в культуре не развивались, а небольшое количество клеток, оставшихся морфологически нормальными, деградировали и разрушались в течение нескольких часов.

Токсичность криопротекторов при давлении 1 кбар. Давление оказывает воздействие не только на кристаллизацию воды, но и на взаимодействие различных веществ между собой. Соответственно, давление может оказывать влияние на взаимодействие криопротекторов с клеточной мембраной, белками и другими структурами клетки и усиливать токсичность криопротекторов. Воздействие глицерина мы проверяли при комнатной температуре, так как для данного криопротектора токсичность слабо зависит от температуры, в то время как проницаемость глицерина через клеточные мембраны кардинально снижается при охлаждении растворов [19, 20], и в действие могут вступать негативные осмотические эффекты. Токсичность этиленгликоля оценивали как при комнатной температуре, так и при температуре 0°С в связи с тем, что в соответствии с разными методиками криоконсервации добавление и отмывание этого криопротектора может происходить как при комнатной, так и при пониженной температуре [21]. Остальные криопротекторы добавляли и отмывали при 0°С, как это принято в практике криоконсервации. В табл. 2 представлены результаты воздействия криопротекторов на клетки HeLa при нормобарии и под давлением 1 кбар, не оказывающим негативного влияния на

Таблица 2. Жизнеспособность клеток линий HeLa при нормобарии и после воздействия гидростатического давления

V puoting average u	Жизнеспособно экспозиции под д (Ог	сть клеток после цавлением 1.0 кбар цыт)	Жизнеспособность клеток после экспозиции при нормобарии (Контроль)		
температура экспозиции, °С	Окрашивание трипановым синим, % живых клеток ± SD	Количество развивающихся в культуре клеток через 16 ч после тыс.кл/см ² ± SD	Окрашивание трипановым синим, % живых клеток ± SD	Количество развивающихся в культуре клеток через 16 ч после тыс.кл/см ² ± SD	
Контроль без криопротекторов	96 ± 4	299 ± 12	98 ± 2	260 ± 25	
Глицерин 10%, 22°С	95 ± 3	168 ± 19	99 ± 1	191 ± 20	
Этиленгликоль 10%, 22°С	99 ± 1	88 ± 32	98 ± 1	180 ± 26	
Этиленгликоль 10%, 0°С	89 ± 5	$72,5 \pm 16$	99 ± 1	195 ± 17	
1,2-Пропандиол 10%, 0°С	98 ± 1	40 ± 17	99 ± 1	152 ± 22	
ДМСО 10%, 0°С	99 ± 1	44 ± 18	99 ± 1	203 ± 25	
ДМСО 6.6% + формамид 3.4%, 0°С	81 ± 8	11 ± 3	95 ± 2	217 ± 22	

Примечание. Гидростатическое давление 1.0 кбар в течение 10 мин при 22° С или 0° С в присутствии криопротекторов (n = 5).

		Жизнеспособность клеток после экспозиции под давлением			
Криопротектор	Давление, кбар	Окрашивание трипановым синим, % живых клеток ± SD	Количество развивающихся в культуре клеток через 16 ч после воздействия, тыс.кл/см ² ± <i>SD</i>		
Контроль (без криопротекторов)	Нормобария	98 ± 2	224 ± 41		
Контроль (без криопротекторов)		90 ± 10	102 ± 14		
Глицерин 10%	1,5	95 ± 4	168 ± 39		
Этиленгликоль 10%		90 ± 9	87 ± 30		
Контроль (без криопротекторов)		7 ± 6	0		
Глицерин 10%	2,0	88 ± 5	51 ± 12		
Этиленгликоль 10%		90 ± 6	47 ± 9		

Таблица 3. Жизнеспособность клеток линий HeLa после воздействия гидростатического давления в присутствии криопротекторов глицерина и этиленгликоля

Примечание. Время воздействия 10 мин при температуре $22^{\circ}C$ (n = 5).

жизнеспособность интактных клеток. Глицерин, известный как ма-лотоксичный криопротектор, не проявил токсичности и в условиях давления 1.0 кбар. Экспозиция клеток в растворе прочих криопротекторов под давлением приводила к заметному угнетению последующего роста клеток в культуре. В целом токсическое воздействие криопротекторов под давлением можно расположить в следующем ряду: глицерин < этиленгликоль < 1,2пропандиол = ДМСО < ДМСО + формамид.

Баропротекторные свойства глицерина и этиленгликоля при давлении 1.5 и 2.0 кбар. Для оценки баропротекторных свойств криопротекторов мы оценивали влияние 10%-го глицерина и 10%го этиленгликоля на состояние клеток HeLa после экспозиции под давлением 1.5 и 2.0 кбар в течение 10 мин при комнатной температуре (без охлаждения и замораживания). Результаты представлены в табл. 3.

Глицерин существенно повышал выживаемость клеток, подвергшихся воздействию давления, при этом достоверно улучшалось как состояние клеточных мембран, так и развитие клеток в культуре после экспозиции под давлением. Баропротекторное действие глицерина отмечалось при разном уровне давления.

Проявление баропротекторных свойств этиленгликоля зависело от уровня приложенного давления. Добавление этиленгликоля при критическом давлении 2.0 кбар, которое вызывало гибель клеток без криопротекторов, приводило к повышению выживаемости клеток. Так после экспозиции клеток под давлением 2.0 кбар в присутствии этиленгликоля суспензия содержала 90% живых клеток, при этом в культуре часть клеток прикреплялась к субстрату, в то время как в контроле при приложении аналогичного давления в отсутствие криопротекторов наблюдали только 7% живых клеток, а при помещении их в культуру через 16 ч культивирования живых клеток в культуре не обнаруживали. Однако при экспозиции клеток под давлением 1.5 кбар этиленгликоль не оказывал какого-либо влияния на жизнеспособность клеток (см. табл. 3).

Криоконсервация клеток под давлением. Для экспериментов по криоконсервации клеток под давлением были отобраны криопротекторы глицерин и этиленгликоль в связи с тем, что эти вещества проявили наиболее низкую токсичность в условиях высокого гидростатического давления 1 кбар и проявляли баропротекторные свойства при 1.5 и 2.0 кбар. Мы тестировали два режима замораживания под давлением со скоростью замораживания 0.5°С/мин и 2°С/мин и два режима оттаивания – под высоким гидростатическим давлением и в условиях нормального атмосферного давления. Последний вариант криоконсервации (замораживание под давлением, оттаивание при нормобарии) был включен в схему экспериментов на основании работы [12], так как именно при такой схеме авторы получили наиболее высокую сохранность замороженно-оттаянных эритроцитов. Однако скорость замораживания в нашей работе отличалась, так как для клеточных культур оптимальными являются более медленные скорости замораживания, чем для эритроцитов [22,

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК HeLa

	Скорость охлажде-	Давление	Давление	Выживаемость культуры клеток экспериментальной группы		Выживаемость клеток контрольной группы (замораживание и размораживание при нормобарии по идентичному температурному протоколу)	
Криопротектор	ния при замора- живании, °С/мин	при замора- живании, кбар	при размора- живании, кбар	Окраши- вание трипано- вым синим, % живых клеток ± SD	Количество развивающи хся клеток через 16 ч культивиров ания, тыс.кл/см2 ± SD	Тест на окрашивание трипановым синим, % живых клеток	Количество разви- вающихся клеток через 16 ч культиви- рования, тыс.кл/см ² ± SD
Контроль без криопротектора	2	1.0	1.0	0	0	53 ± 15	26 ± 20
Этиленгликоль,	0.5	1.0	1.0	0	0	00 ± 1	185 ± 40
10%	0.5	1.5	1.5	0	0	99 ± 1	
Этиленгликоль, 10%	2	1.0	1.0	0	0	99 ± 1	162 ± 10
Глицерин, 10%	0.5	1.0	1.0	30 ± 10	41 ± 30	00 ± 1	174 ± 27
	0.5	1.5	1.5	78 ± 6	20 ± 18	99 ± 1	1/4 ± 2/
Глицерин, 10%	2	1.0	1.0	28 ± 25	10 ± 10	90 ± 5	181 ± 30
Глицерин, 10%	0.5	1.0	Нормобария	80 ± 20	60 ± 19	00 + 1	160 + 37
	0.5	1.5	Нормобария	10 ± 9	0	77 ± 1	107 ± 37
Глицерин, 10%	2	1.0	Нормобария	83 ± 16	165 ± 27	99 ± 1	147 ± 60

Таблица 4. Жизнеспособность клеток НеLa после криоконсервации под гидростатическим давлением

Примечание: n = 5.

23]. Результаты экспериментов по криоконсервации клеточной культуры представлены в табл. 4.

Криоконсервация клеток линии HeLa по медленному протоколу замораживания под давлением 1.0 и 1.5 кбар не привела к повышению выживаемости клеток HeLa по сравнению с классической криоконсервацией при атмосферном давлении. При испытании режимов, предусматривающих как замораживание, так и размораживание под давлением, наиболее высокую степень жизнеспособности демонстрировали клетки, замороженные в присутствии 10%-го глицерина со

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

скоростью замораживания 0.5° С/мин. После криоконсервации под давлением 1.5 кбар тест с трипановым синим выявлял 70—80% живых клеток, при этом клетки частично сохраняли способность прикрепляться к субстрату и пролиферировать — через 16 ч культивирования замороженнооттаянных проб наблюдали морфологически нормальную развивающуюся культуру с плотностью 20 ± 18 тыс. кл./см². Тем не менее эти показатели были значительно ниже в сравнении с развитием клеток, криоконсервированных по аналогичному протоколу под атмосферным давлением.



Рис. 2. Культура HeLa через 16 ч культивирования: (а) – нативная культура; (б) – после криоконсервации под давлением с 10%-м глицерином, замораживание под давлением 1 кбар со скоростью 2°С/мин, размораживание при нормобарии; (в) – после криоконсервации при нормобарии, другие параметры протокола замораживания/оттаивания аналогичны группе «б».

Наиболее высокая выживаемость клеток НеLа была выявлена при их криоконсервации под защитой 10% глицерина по гибридному протоколу: замораживание под высоким гидростатическим давлением, размораживание при амбиентном давлении (рис. 2). В экспериментах мы зафиксировали, что развитие клеток линии HeLa в культуре после замораживания под давлением 1.0 кбар со скоростью 2°С/мин и оттаивании без приложения давления была несколько выше, чем в контрольной группе с аналогичным режимом замораживания/оттаивания без применения давления. Однако улучшение выживаемости клеток при применении давления было небольшим и статистически недостоверным. При этом хотя развитие клеток в культуре было сопоставимо с контролем, тест на целостность клеточных мембран по окрашиванию с трипановым синим выявил негативное влияние давления на состояние клеточных мембран.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши эксперименты показали, что клетки линии HeLa обладают довольно высокой устойчивостью к воздействию высокого гидростатического давления. Толерантность животных клеток разного происхождения к давлению порядка 1.0 кбар может довольно существенно отличаться. Например, воздействие давлением выше 700-800 бар даже в течение нескольких минут вызывает необратимые изменения в культуре фибробластов эмбриональной ткани сердца цыпленка [24]. В то же время ряд других клеточных культур (клетки эндотелия пупочной вены, клетки гладкой мускулатуры, культура 3NIH/3T3) легко переносит давление до 1.0 кбар при условии, что экспозиция под высоким давлением длится не более 10 мин [25]. Давление 1,0 кбар может инициировать клеточный апоптоз, что приводит к угнетению или гибели клеточной культуры при дальнейшем культивировании. Такое воздействие зафиксировано для ряда клеточных линий, включая лимфобласты человека и ганглионарные клетки сетчатки [26-28].

В наших экспериментах давление 1.0 кбар не только не угнетало клетки HeLa, но и оказывало на них стимулирующее воздействие. Повышение же давления до более высоких значений (1.5 кбар) вызывало в процессе культивирования снижение скорости прикрепления клеток к субстрату и задержку роста клеточной культуры (табл. 1).

Исследование воздействия криопротекторов в условиях высокого гидростатического давления на клетки HeLa выявило, что высокое гидростатическое давление оказывает существенное влияние на проявление токсичности. После экспозиции клеточной культуры с криопротекторами под давлением 1.0 кбар, которое само по себе не оказывало негативного воздействия на клетки HeLa (см. эксперимент 1), выживаемость клеток в целом оказалась значительно ниже, чем при экспозиции с криопротекторами при нормобарии

(табл. 2). При этом токсичность криопротекторов под давлением изменялась в разной степени. При нормобарии такие криопротекторы, как глицерин, ДМСО и этиленгликоль, проявляли приблизительно одинаковую токсичность в отношении клеток HeLa. Однако при экспозиции под давлением 1.0 кбар выживаемость клеточной культуры в присутствии этиленгликоля была вдвое хуже, чем в присутствии глицерина, а в присутствии ДМСО и 1,2-пропандиола – почти вчетверо. Интересно, что негативное воздействие этиленгликоля на клетки практически не зависело от температуры. Экспозиция с этим криопротектором под давлением при температуре 22°С и 0°С приводила к последующему замедлению роста клеточной культуры приблизительно в равной степени (табл. 2).

Следует обратить особое внимание на смесь криопротекторов ДМСО и формамида. Считается, что эти два криопротектора обладают свойством частично нейтрализовать токсическое воздействие друг друга на клетки млекопитающих [29–31]. Такое сочетание криопротекторов часто применяют в витрифицирующих растворах, где требуется крайне высокая концентрация стеклующих агентов [30, 32, 33]. Действительно, в наших экспериментах при атмосферном давлении такое сочетание криопротекторов не оказывало токсического воздействия на клетки HeLa. Однако в условиях повышенного гидростатического давления смесь ДМСО и формамида оказала крайне негативное воздействие на жизнеспособность клеток. Выживаемость после экспозиции под давлением в присутствии смеси 6.6% ДМСО и 3.4% формамида была вчетверо хуже, чем после экспозиции под давлением в присутствии 10% ДМСО (табл. 2). В последующих работах по исследованию криоконсервации биоматериала под высоким гидростатическим давлениеми необходимо с особой осторожностью вводить в состав криозащитных сред формамид, а возможно, и другие карбоксамиды.

Считается, что все или большинство криопротекторов обладают баропротекторными свойствами [34] и могут повышать выживаемость биологических объектов под высоким гидростатическим давлением. В связи с высокой толерантностью клеток HeLa к высокому гидростатическому давлению мы исследовали баропротекторные свойства криопротекторов только при давлении 1.5 и 2.0 кбар. Для исследований были отобраны криопротекторы, показавшие низкую токсичность под давлением. Глицерин проявлял баропротекторные свойства и способствовал выживанию клеток после воздействия высокого

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

гидростатического давления, что согласуется с литературными данными [34—36]. Этиленгликоль в качестве баропротектора проявил себя неоднозначно. Этот криопротектор способствовал выживанию клеток HeLa при воздействии давления 2.0 кбар, но не оказал защитного воздействия при экспозиции клеток под давлением 1.5 кбар (табл. 3). Это говорит о том, что, вопреки мнению некоторых авторов [34], не всегда криопротекторы проявляют защитный эффект при воздействии высокого давления на животные клетки.

Для экспериментов по криоконсервации под давлением мы отобрали глицерин и этиленгликоль как самые перспективные в связи с низкой токсичностью, которую эти криопротекторы проявили под давлением без замораживания. Кроме того, глицерин обладает выраженным баропротекторным действием, что делает применение этого криопротектора для криоконсервации с использованием высокого гидростатического давления особенно привлекательным. Криоконсервацию проводили либо под давлением 1.0 кбар, т.е. применяли тот уровень давления, который в предварительных экспериментах не оказал негативного воздействия на клетки, либо под давлением 1.5 кбар. Криоконсервация под давлением по медленному протоколу в наших экспериментах не привела к повышению выживаемости биологического материала по сравнению с традиционной криоконсервацией при амбиентном давлении. Более того, замораживание под давлением чаще всего приводило к резкому ухудшению выживаемости клеток по сравнению с контролем. Исключением оказался вариант, предусматривающий смешанный протокол применения давления (замораживание под давлением 1.0 кбар, размораживание при атмосферном давлении) и глицерин в качестве криопротектора. Выживаемость клеток HeLa при криоконсервации по такому протоколу была сравнима с выживаемостью в контроле, после криоконсервации без применения высокого давления. Следует отметить, что этот режим наиболее близок к тому, что использовался в работе [12] для замораживания эритроцитов. В этой работе использование высокого гидростатического давления в технологии криоконсервации эритроцитов существенно повысило их сохранность после замораживанияоттаивания. Возможно, это объясняется тем, что эритроциты являются безъядерными клетками и по физиологии существенно отличаются от использованной нами культуры клеток HeLa. Единственная известная из литературных данных попытка замораживания клеток HeLa под давлением [13], так же как и в наших экспериментах, не

выявила положительного эффекта от применения высокого гидростатического давления в процессе криоконсервации клеток.

В целом можно заключить, что в наших экспериментах использование высокого гидростатического давления при криоконсервации не привело к повышению выживаемости биологического материала после замораживания-оттаивания. В то же время нужно отметить, что мы работали по методу медленной или классической криоконсервации. Механизмы, обеспечивающие сохранность биологического материала при медленной криоконсервации и при витрификации существенно отличаются. Использование высокого гидростатического давления для замораживания биоматериала методом витрификации практически не исследовано и может привести к другим результатам.

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. H. Kanno, R. J. Speedy, and C. A. Angell, Science **189**, 880 (1975).
- H. Kanno and C. A. Angell, J. Phys. Chem. 81, 2639 (1977).
- 3. K. Miyata, S. Hayakawa, K. Kajiwara, and H. Kanno, Cryobiology **65**, 113 (2012).
- 4. M. D. Persidsky, Cryobiology 8, 380 (1971).
- 5. А. М. Воротилин, С. Д. Корчиков и Л. В. Гордиенко, Криобиология и криомедицина **2**, 65 (1976).
- X. Yu Zhang, Z. Chen, and G. Chen, Cryobiology 66, 186 (2013).
- G. M. Fahy, D. I. Levy, and S. E. Ali, Cryobiology 24, 196 (1987).
- A. Aertsen, F. Meersman, M. E. Hendrickx, et al., Trends Biotechnol. 27 (7), 434 (2009).
- А. В. Карнаухов, Э. Н. Гахова и Е. В. Карнаухова, в кн. Консервация генетических ресурсов. Материалы XV рабочего совещания, под ред. Э. Н. Гаховой, В. Н. Карнаухова и В. К. Утешева. (Пущино, 1998), сс.104–111.
- R. Dahl and L. A. Staehelin, J. Electron. Microsc. Tech. 13 (3), 165 (1989).

- D. Vanhecke, W. Graber, and D. Studer, Methods Cell Biol. 88, 151 (2008).
- 12. N. Greer, Cryobiology 70, 66 (2015).
- 13. J. Huebinger, H. M. Han, and M. Grabenbauer, PLoS One **11** (10), e0164270 (2016).
- 14. H. Mikus, A. Miller, G. Nastase, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **477** (3), 401 (2016).
- 15. M. J. Powell-Palm, Y. Zhang, J. Aruda, and B. Rubinsky, Cryobiology **86**, 130 (2019).
- L. Wan, M. J. Powell-Palm, C. Lee, A. Gupta, B. P. Weegman, M. G. Clemens, B. Rubinsky, Biochem. Biophys. Res. Commun. 496 (3), 852 (2018).
- 17. L. Wan, M. J. Powell-Palm, M. G. Clemens, and B. Rubinsky, CryoLett. **40** (1), 64 (2019).
- R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (5th Ed.)*, (Hoboken, John Wiley & Sons, Inc, New York, 2005).
- S. Jackowski, S. P. Leibo, and P. Mazur, J. Exp. Zool. 212 (3), 329 (1980).
- 20. J. Wang, K. Zhu, G. Zhao, et al., PLoS One. 8 (9), e72836 (2013).
- 21. E. C. Rivas Leonel, C. M. Lucci, and C. A. Amorim, Transfus. Med. Hemother. **46** (3), 173 (2019).
- 22. C. Philippeos, R. D. Hughes, A. Dhawan, and R. R. Mitry, Methods Mol. Biol. **806**, 1 (2012).
- 23. J. M. Baust, G. C. Buehring, L. Campbell, et al., In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. **53** (8), 669 (2017).
- 24. J. V. Landau, Exp. Cell Res. 21, 78 (1960).
- 25. A. Mahara, N. Morimoto, T. Sakuma, et al., Biomed. Res. Int. **2014**, 379607 (2014).
- 26. K. J. Takano, T. Takano, Y. Yamanouchi, and T. Satou, Exp. Cell Res. **235**, 155 (1997).
- A. Agar, S. Li, N. Agarwal, et al., Brain Res. (2006) 1086, 191 (2006).
- 28. T. Yamaguchi, K. Hashiguchi, S. Katsuki, et al., Cell Mol. Biol. Lett. **13**, 49 (2008).
- 29. S. Baxter and G. Lathe, Biochem. Pharmacol. **30**, 1079 (1971).
- G. M. Fahy, T. H. Lilley, H. Linsdell, et al., Cryobiology 27, 247 (1990).
- 31. G. M. Fahy, Cryobiology. 60 (Suppl. 3), S45 (2010).
- 32. G. M. Fahy, B. Wowk, J. Wu, and S. Paynter, Cryobiology 48, 22 (2004).
- G. M. Fahy and B. Wowk, Methods Mol. Biol. 1257, 21 (2015).
- 34. А. Е. Крисс, Жизненные процессы и гидростатическое давление (Наука, М., 1973).
- 35. L. F. Onuchic and F. Lacaz-Vieira, Cryobiology **22** (5), 438 (1985).
- A. C. Oliveira, L. P. Gaspar, A. T. Da Poian, and J. L. Silva, J. Mol. Biol. 240, 184 (1994).

Cryopreservation of HeLa Cells under High Hydrostatic Pressure of 1.0–1.5 kbar

S.V. Ugraitskaya, N.V. Shishova, E.R. Valeeva, S.A. Kaurova, N.E. Shvirst, and E.E. Fesenko (Jr.)

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

The idea of using high pressure to reduce the freezing damage has been thoroughly theorized thus far, but there is little experimental evidence on cryopreservation of living systems under high hydrostatic pressure. We investigated the viability of HeLa cells under pressure of 1.0-2.0 kbar, the toxic effects of five classical cryoprotectants under these conditions, as well as the viability of HeLa cells during slow (conventional) cryopreservation under pressure of 1.0 and 1.5 kbar. High resistance of HeLa cells to hydrostatic pressure was experimentally shown: 100% cell survival upon exposure to 1.0 kbar of pressure for 60 min of incubation. The toxic effects of cryoprotectants under pressure can be arranged in the following order: glycerol < ethylene glycol < 1,2-propanediol = DMSO < DMSO+formamide. Glycerol and ethylene glycol were the least toxic agents, which also exerted pronounced baroprotective effects. During cryopreservation under pressure of 1.0 kbar a high survival rate of $83 \pm 16\%$ according to fluorescent staining data was achieved using 10% glycerol, but it did not exceed the survival rates obtained in control normobaric experiments. Freezing was carried out by the method of slow conventional cryopreservation. Using high pressure to freeze biomaterial by vitrification may lead to different results.

Keywords: cryopreservation, hydrostatic pressure, cryoprotectants, baroprotectors, glycerol, formamide

———— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 519.876.5

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВРЕМЕНИ ЦВЕТЕНИЯ ДИКОГО НУТА С УЧЕТОМ ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА

© 2021 г. А.Ю. Агеев*, Э.Дж. Бишоп-фон Веттберг**, С.В. Нуждин*, ***, М.Г. Самсонова*, К.Н. Козлов*

> *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29 **Университет Вермонта, 05405, Берлингтон, США ***Университет Южной Калифорнии, 90089, Лос-Анжелес, США *E-mail: kozlov_kn@spbstu.ru* Поступила в редакцию 20.11.2020 г. После доработки 20.11.2020 г. Принята к публикации 27.11.2020 г.

Точный прогноз времени цветения помогает селекционерам создавать новые сорта, которые могут достичь максимальной эффективности в условиях меняющегося климата. На основе построенной ранее модели проведено сравнение влияния ежедневных погодных факторов на время цветения образцов дикого нута, собранных в различных географических точках Турции. Обнаружено, что растения из высокогорных районов адаптированы к более низким температурам и длинному дню, чем собранные на меньших высотах. С использованием модели и прогнозов изменения климата в виде сгенерированной программным обеспечением «МаркСим» ежедневной погоды в Анкаре построены прогнозы изменения времени цветения для исследуемых образцов. Средняя длина периода «посев–цветение» для временных интервалов 2020–2039 гг., 2040–2059 гг. и 2060–2080 гг. изменилась для 21 сочетания сценария развития и места сбора. Это составляет примерно половину от 40 случаев, что говорит об умеренном влиянии изменения климата на время цветения исследуемых образцов дикого нута.

Ключевые слова: климатические факторы, нут, математическое моделирование. **DOI:** 10.31857/S0006302921010142

Нут (наиболее известный вид – *Cicer* arietinum L.) — одна из важнейших зернобобовых культур, которая выращивается более чем в 50 странах мира. Нут имеет особое значение для обеспечения продовольственной безопасности в развивающихся странах, где семена нута являют-ся основным источником пищевого белка [1]. Дикий нут *Cicer reticulatum* представляет собой растение длинного дня и проявляет чувствительность к яровизации [2, 3]. Одомашнивание привело к широкому распространению на ранних этапах истории генотипов, пригодных для весеннего посева, в результате чего сильно пострадало генетическое разнообразие [3, 4].

Температурный режим, доступность воды, продолжительность светового дня и другие факторы устанавливают предел времени для достижения нутом репродуктивной фазы [2, 5]. Для достижения стабильного урожая продолжительность роста должна точно соответствовать доступному вегетационному периоду [6]. Селекция нута была сосредоточена на выведении сортов, различающихся по продолжительности роста, чтобы иметь возможность адаптироваться к разным широтам и режимам посева [3, 7–9].

Изменение климата, возникающее в результате увеличения выбросов парниковых газов, в настоящее время оказывает все более сильное воздействие на выращивание культурных растений, в том числе и нута, из-за комбинированного воздействия более высоких температур, меньшего количества доступной воды в регионах, где это больше всего необходимо, и более частых и интенсивных экстремальных погодных явлений [10].

Математические модели бобовых культур SSM [11, 12], DSSAT [13–17], APSIM [18], и др. [19, 20] основаны на описании биофизических и биохимических процессов, таких как фотосинтез, поглощение воды и т. д., с помощью дифференциальных уравнений. Влияние погодных условий на ежесуточную скорость перехода к следующей фенологической фазе количественно характеризуется с использованием таких понятий, как индекс тепловых единиц (HUI) [20], единицы тепла (CHI), тепловые дни (DD) или биологические дни (BD) [21]. И DD, и BD могут зависеть от температуры, содержания воды и фотопериода. Использование существующих моделей ограничено необходимостью значительных манипуляций, необходимых для адаптации к новым условиям и сортам [22–26]. Следовательно, высок спрос на новые гибкие модели культур, которые могут адаптироваться к постоянно меняющимся сортам.

Недавнее сравнение моделей сельскохозяйственных культур в рамках Проекта взаимного сравнения и улучшения сельскохозяйственных моделей (AgMIP) [27, 28] показало, что одной модели недостаточно для прогнозирования изменения климата из-за возрастающей неопределенности прогнозов моделей с повышенными будущими температурами [29, 30]. Следовательно, необходимы исследования с использованием ансамблей моделей сельскохозяйственных культур, которые дают ценную информацию о точности и неопределенности моделей.

В этой работе мы использовали модель времени цветения дикого нута, построенную ранее [31], для исследования зависимости влияния ежедневных погодных факторов на время цветения от места сбора образцов. Мы также использовали построенный ранее ансамбль моделей [31] для прогнозирования времени до цветения на 2020–2080 гг., используя сгенерированную данные по суточной погоде в Турции.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Коллекция образцов дикого нута видов Cicer reticulatum L. и Cicer echinospermum была собрана в 21 географической точке вокруг десяти населенных пунктов в пяти регионах Турции Э. фон Веттбергом с коллегами [32]. Набор данных охватывает большой градиент высот, так что популяции C. echinospermum обычно встречаются на более низких высотах, чем C. reticulatum, при этом температуры выше, а количество осадков в среднем ниже на низких участках по сравнению с более высокими. Три наиболее восточных и высокогорных участка отличаются самыми низкими среднемесячными температурами (от -4.8 до -2.2°С по сравнению с -2.2 до -0.6°С) зимой, а весной на этих участках чаще бывают заморозки в вегетационный период. Фенотипические данные для 2174 образцов были получены в ходе полевых экспериментов в Шанлыурфе и Анкаре, Турция, с посевом в 290, 294 или 339 сутки года. Время цветения для этого набора данных колеблется от 117 до 221 суток. Данные для анализа были объединены в 10 групп по населенным пунктам: Эгил (Egil), Бешевлер (Besevler), Джуди (Cudi), Кешен-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

таш (Kesentas), Баристепе (Baristepe), Калкан (Kalkan), Оялы (Oyali), Каятепе (Kayatepe), Сирнак (Sirnak) и Сарыкая (Sarikaya).

Данные о климатических условиях на каждый день в период полевых экспериментов взяты с общедоступного сайта «Радар погоды» (https://rp5.ru/Weather_in_the_world) и проекта POWER исследовательского центра NASA в Лэнгли (LaRC) [33]. Были задействованы следующие параметры: D – длина светового дня, T_n – минимальная температура, T_x – максимальная температура, P – количество осадков, S – солнечное излучение.

МОДЕЛЬ ДЛИНЫ ПЕРИОДА «ПОСЕВ– ЦВЕТЕНИЕ»

В данной работе мы воспользовались моделью, построенной ранее с помощью метода грамматической и разностной эволюции [31]. Модель описывает время цветения в зависимости от ежедневных погодных факторов:

v(i, t) = 4.92F0 + 7.88F1 + 2.59F2 + 1.13F3 + 9.35F4

где $F0 = T_n/S$, $F1 = T_n - 13.5616$, F2 = D - 7.2458, $F3 = T_n/(D(T_x - 19.6387))$, $F4 = 1/(T_n 1 - 3.5616)$.

Данная модель с оптимизированными параметрами описывает данные обучения и проверки с коэффициентом корреляции Пирсона, равным приблизительно 0.98.

Используемая модель аналогична разработанной в работе [12] из-за отсутствия зависимости от осадков в период посева-цветения и возможности оценки накопления ресурсов. В модели [12] используется линейная функция для интервала «посев—всходы» и мультипликативная — для интервала от всходов до цветения. Используемая модель представляет собой комбинацию двух типов функций для интервала «посев—цветение». Преимуществами нашей модели являются автоматически построенная аналитическая форма функциональной зависимости.

Для получения более надежных прогнозов изменения времени цветения в условиях изменения климата в 2020—2080 гг. мы воспользовались ансамблем из восьми моделей, построенным ранее методом «бутстрап» [31]. Вкратце: была выполнена адаптация модели для B = 500 наборов данных, полученных из исходного набора выборкой с повторениями. Аналитическая форма климатических управляющих функций была зафиксирована. В ансамбль были отобраны восемь моделей, имеющие высокую точность, среднее отклонение модельного решения от экспериментальных данных составляет менее шести суток.



Рис. 1. Влияние климатических факторов на время цветения диких видов нута в различных географических пунктах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДЕЛИ ПО ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ КЛИМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВРЕМЯ ЦВЕТЕНИЯ

Анализ вклада климатических факторов T_x , T_n , P, S и D в изменение времени цветения был проведен с помощью теста пермутации. Суть метода состоит в том, чтобы переставить данные интересующего фактора между датами и проанализировать изменение ошибки. Таким образом, влияние климатического фактора представляет собой увеличение средней ошибки по всем перестановкам. Затем воздействия нормализуются и преобразуются в проценты по всем факторам (см. рис. 1).

В большинстве групп влияние длины дня колеблется между 11.72 и 18.42%, а минимальной температуры — между 81.44 и 88.18% соответственно. Однако для группы «Кешенташ» влияние минимальной температуры оказалось значительно меньше, а длины дня — больше, 72.16 и 27.64% соответственно. Противоположный результат получен для группы «Сирнак»: влияние температуры — 91.50%, а длины дня — только 8.36% (см. рис. 1).

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВРЕМЕНИ ЦВЕТЕНИЯ



Рис. 2. Прогноз времени цветения нута в Баристепе для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

Такие результаты могут быть обусловлены значительной разницей в высоте над уровнем моря, которая составляет 891 м и 1659 м для Кешенташа и Сирнака соответственно. Растения высокогорных районов лучше адаптированы к более низким температурам и длинному дню, чем собранные на меньших высотах.

ПРОГНОЗЫ ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА

Ежедневные прогнозы погоды в 30 повторах для Анкары (Турция) с 2020 по 2080 гг. были составлены с использованием программы-генератора погоды MarkSim [34-38]. Были учтены социоэкономические сценарии развития, которые описываются четырьмя характерными профилями концентрации углекислого газа (Representative Concentration Pathways, RCPs), принятыми IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change -Межправительственная группа экспертов по изменению климата) для пятого оценочного отчета (Assessment Report, AR5) в 2014 г. Профили соответствуют широкому кругу возможных изменений будущих антропогенных выбросов парниковых газов и называются гср26, гср45, гср60 и гср85 в соответствии с возможными значениями нарушения радиационного баланса Земли в 2100 г. относительно прединдустриальной эры (+2.6, +4.5, $+6.0 \text{ u} + 8.5 \text{ Bt/m}^2$ cootBettctBetho) [39].

Наиболее безопасный сценарий (благодаря предлагаемым природоохранным мероприятиям) называется RCP26, а RCP85 — наиболее опасный

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

сценарий, в то время как RCP45 и RCP60 находятся между этими крайностями. Следуя работе [40], мы использовали модели GFDL-ESM2M [41] и HadGEM2-ES [42] для прогноза климата в Анкаре.

Между 2020 и 2099 гг. ожидается повышение максимальной температуры: для RCP26 — на 0.7°С, RCP45 — на 1.5°С, RCP60 — 2.5°С, RCP85 — 5.0°С. Минимальная температура увеличится: для RCP26 — на 0.5°С, RCP45 — 1.0°С, для RCP60 — 1.5°С, RCP85 — 2.5°С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДЕЛИ

Для исследования влияния изменения климата на изменение времени цветения нута мы провели моделирование с использованием сгенерированных ежедневных климатических факторов и ансамбля из восьми моделей, которые были получены ранее [31]. Результаты в виде прогноза числа дней от посева до цветения для каждой группы рассматривались отдельно для каждого сценария изменения климата на трех интервалах: с 2020 по 2039 гг., с 2040 по 2059 гг. и с 2060 по 2080 гг. Распределения времени цветения на каждом интервале характеризуются гистограммами и средним значением в днях.

Такое представление результатов позволяет нивелировать за счет усреднения влияние колебаний, вызванных стохастичностью процесса генерации климатических факторов, и выявить долговременные тенденции (см. рис. 2–11). АГЕЕВ и др.



Рис. 3. Прогноз времени цветения нута в Бешевлере для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

Средняя длина периода «посев—цветение» для исследованных временных интервалов изменилась для 21 сочетания сценария развития и места сбора, что составляет примерно половину от 40 случаев. Заметных изменений среднего времени цветения для сценария RCP26 не зафиксировано. Небольшие изменения времени цветения фиксируются для сценария RCP45 и групп



Рис. 4. Прогноз времени цветения нута в Джуди для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВРЕМЕНИ ЦВЕТЕНИЯ



Рис. 5. Прогноз времени цветения нута в Эгиле для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

«Эгил», «Бешевлер», «Джуди», для сценария RCP60 и групп «Кешенташ», «Бешевлер», «Кал-

кан», «Оялы», «Джуди», «Каятепе» и «Сарыкая», а для сценария RCP85 — во всех группах.



Рис. 6. Прогноз времени цветени нута в Калкане для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

АГЕЕВ и др.



Рис. 7. Прогноз времени цветения нута в Каятепе для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

Более заметное сокращение среднего времени для достижения цветения фиксируется для сценария RCP45 в группах «Сирнак» и «Каятепе», для сценария RCP60 — в группах «Сирнак» и «Эгил», также в группе «Каятепе» сильные изменения происходят с учетом сценария RCP85.



Рис. 8. Прогноз времени цветения нута в Кешенташе для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВРЕМЕНИ ЦВЕТЕНИЯ



Рис. 9. Прогноз времени цветения нута в Оялы для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

Такие результаты, скорее всего, объясняются увеличением влияния антропогенных факторов на изменение климата в сценариях от RCP26 до

RCP85. При этом заметное снижение среднего времени цветения в группе «Сирнак» уже в сценарии RCP45 может объясняться повышенной чув-



Рис. 10. Прогноз времени цветения нута в Сарыкая для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.



Рис. 11. Прогноз времени цветения нута в Сирнаке для четырех характерных профилей концентрации углекислого газа – rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

ствительностью к минимальной температуре (см. рис. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование математических моделей для прогнозирования хозяйственно ценных характеристик растений, таких как длины периодов между такими фенологическими фазами, как посев и цветение должно являться научной основой селекционного улучшения сортов в условиях глобальных изменений климата.

В данной работе была рассмотрена построенная ранее модель времени цветения дикого нута, которая использует новейшие подходы математического моделирования, такие как стохастическая оптимизация и грамматическая эволюция. Расчеты по имеющимся экспериментальным данным показали высокую точность моделирования.

Жизненный цикл нута и его фенология в значительной степени определяются географическим происхождением и местными экологическими факторами [9]. Понимание роли температуры и продолжительности дня в адаптации к различным типам среды обитания все еще неполное [43]. Результаты моделирования показали различное влияние минимальной температуры и длины дня на время цветение для групп из различных географических точек, что поддерживает гипотезу об адаптации к окружающей среде в местах отбора проб. Такое разнообразие реакций на климатические факторы у разных генотипов может быть полезным для программ селекции, нацеленных на разные среды.

Мы использовали прогнозы погоды генератора MarkSim для Анкары на каждый год с 2020 по 2080 гг. и для четырех репрезентативных профилей концентрации углекислого газа (RCP), чтобы предсказать время до цветения для десяти групп с использованием ансамбля моделей. Ускорение наступления цветения можно объяснить потеплением климата и сокращением продолжительности вегетационного периода за счет увеличения суммарного испарения [43]. Значительные различия в реакции сельскохозяйственных культур на климат в будущем были описаны в предыдущих исследованиях для Южной Азии и Восточной Африки [44].

выводы

Наши результаты подтверждают влияние географического места происхождения на фенологию нута и одновременно разнообразие поведения групп, происходящих из близко расположенных мест. Время до цветения сокращено в построенных прогнозах на 2020–2080 гг. и при

изменении климата. Хотя в прогнозах есть общие тенденции, некоторые группы имеют четкие траектории. Фенотипическое разнообразие дикого нута можно использовать в программах селекции для получения сортов с желаемым временем цветения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А. Кахраману, А. Айдогану, Д. Куку, А. Сингх, Й. Бергеру и М. Вишняковой. Вычисления были проведены в Суперкомпьютером центре «Политехнический» СПбПУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда № 16-16-00007.

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

- R. K. Varshney, C. Song, R. Saxena, et al., Nature Biotechnol. 31 (3), 9.2 (2013)
- J. Smithson, J. Thompson, and R. Summerfield, in Grain Legume Crops, Ed. by R. Summerfield and R. Roberts (Collins, London, UK, 1985), pp. 312–390.
- 3. S. Abbo, J. Berge, and N. Turner, Function. Plant Biol. **30** (2003).
- 4. J. Kumar and S. Abbo, Adv. Agron. 72, 107 (2001).
- 5. E. Roberts, P. Hadley, and R. Summerfield, Ann. Botany 55 (6), 881 (1985).
- R. H. Ellis, R. J. Lawn, R. J. Summerfield, et al., Exp. Agriculture **30** (3), 271 (1994).
- H. D. Upadhyaya, D. Bajaj, S. Das, et al., Plant Mol. Biol. 89 (4), 403 (2015).
- V. Kumar, A. Singh, S. V. A. Mithra, et al., DNA Research 22 (2), 133 (2015).
- 9. J. Berger, S. Milroy, N. Turner, et al., Euphytica **180**, 1 (2011).
- 10. X. Zhang and X. Cai, Environ. Res. Lett. 6 (1), 014014 (2011).
- 11. A. Soltani, G. Hammer, B. Torabi, et al., Field Crops Res. 99 (1), 1 (2006).
- A. Soltani, M. Robertson, Y. Mohammad-Nejad, and A. Rahemi-Karizaki, Field Crops Res. 99 (1), 14 (2006).

- J. W. Jones, J. M. Antle, B. Basso, et al., Agricult. Syst. 155, 269 (2017).
- J. W. Jones, J. M. Antle, B. Basso, et al., Agricult Syst. 155, 240 (2016).
- 15. J. Jones, G. Hoogenboom, C. Porter, et al., Eur. J. Agronomy **18** (3–4), 235 (2003).
- K. J. Boote, J. Jones and N. Pickering, Agronomy J. 88, 704 (1996).
- K. J. Boote, J. W. Jones, J. W. White, et al., Plant Cell Environ 36, 1658 (2013).
- 18. B. Keating, P. Carberry, G. Hammer, et al., Eur. J. Agronomy **18**, 267 (2003).
- 19. R. Battisti, P. C. Sentelhas, and K. J. Boote, Int. J. Biometeorol. **62** (5), 823 (2018).
- 20. J. R. Williams, C. A. Jones, J. R. Kiniry, and D. A. Spanel, Trans. ASAE **32** (2), 497 (1989).
- V. Vadez, A. Soltani, and T. Sinclair, Field Crops Res. 146, 1 (2013).
- 22. M. Lal, K. Singh, G. Srinivasan, et al., Agricult. Forest Meteorol. 93 (1), 53 (1999).
- 23. U. Chung, K. Yu, B. S. Seo and M. C. Seo, Agrotechnology, **6** (2), 1000158 (2017).
- 24. A. Mohammed, T. Tana, P. Singh, et al., Agricult. Water Management **194**, 68 (2017).
- 25. D. Patil and Patel, Int. J. Agricult. Sci. 9 (27), 4342 (2017).
- 26. J. Urgaya, Pet. Environ. Biotechnol. 7, 288 (2016).
- 27. C. Rosenzweig, J. Jones, J. Hatfield, et al., Agricult. Forest Meteorol. **170**, 166 (2013).
- 28. S. Asseng, F. Ewert, C. Rosenzweig, et al., Nature Climate Change **3** (9), 827 (2013).
- 29. P. Martre, D. Wallach, S. Asseng, et al., Global Change Biol. **21** (2), 911 (2015).
- 30. S. Asseng, F. Ewert, P. Martre, et al., Nature Climate Change 5 (2), 143 (2015).
- 31. A. Ageev, A. Aydogan, E. J. von Wettberg, et al., Comput. Electron. Agriculture (submitted).
- 32. E. J. von Wettberg, P. L. Chang, F. Basdemir, et al., Nature Commun. 9 (1), (2018).
- P. W. Stackhouse, R. Perez, M. Sengupta, et al., In Proc. Solar 2016 Conf. Int. Solar Energy Soc. (San Francisco, 2016), pp. 1–6.
- M. Srinivasa Rao, P. Swathi, C. A. Rama Rao, et al., PLoS One 10 (2), e0116762 (2015).
- 35. P. Jones and P. Thornton, Agricult. Forest Meteorol. **86** (1–2), 127 (1997).
- P. Jones and P. Thornton, Agricult. Forest Meteorol. 97 (3), 213 (1999).
- 37. P. G. Jones and P. K. Thornton, Agronomy J. 92, 9 (2000).
- P. G. Jones and A. L. Jones, Centro Internacional de Agricultura Tropical MarkSim: A computer tool that generates simulated weather data for crop modeling and risk assessment (2002).

- 39. D. P. van Vuuren, J. Edmonds, M. Kainuma, et al., Climatic Change **109** (1–2), 5 (2011).
- 40. M. Demircan, G. H. Gurkan, O. Eskioglu, et al., Turk. J. Water Sci. Management **1** (1), 22 (2017).
- 41. J. P. Dunne, J. G. John, E. Shevliakova, et al, J. Climate **26** (7), 2247 (2013).
- 42. W. Collins, N. Bellouin, M. Doutriaux-Boucher, et al., Geosci. Model Dev. 4, 1051 (2011).
- 43. V. Vadez, J. D. Berger, T. Warkentin, et al., Agronomy for Sustainable Development **32** (1), 31 (2012).
- 44. P. Singh, S. Nedumaran, K. Boote, et al., Eur. J. Agronomy 52, 123 (2014).

Forecasting the Timing of Floral Initiation in Wild Chickpeas under Climate Change

A.Yu. Ageev*, E.J. Bishop-von Wettberg**, S.V. Nuzhdin*, ***, M.G. Samsonova*, and K.N. Kozlov*

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

** University of Vermont, Burlington, Vermont, VT 05405, United States of America

*** University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, United States of America

Precise prediction of the timing of floral initiation helps breeders create new varieties that can achieve maximum efficiency under the influence of changing climate. A previously constructed model was used to compare the impact of daily weather parameters on flowering time of wild varieties of chickpeas collected in different geographic locations in Turkey. We found that plants from the high altitude areas unlike plant samples from lower altitudes can adapt to lower temperatures and longer days. With the model used and climate change predictions using MarkSim software to generate daily weather data for Ankara, the forecasts of changes in time to flowering in the studied wild chickpea varieties were made. The mean thresholds for the sowingflowering period for the time periods: 2020–2039, 2040–2059 and 2060–2080 shifted for 21 combinations of the scenarios of plant growth and development and plant collecting sites, accounting for about half the 40 cases, thereby suggesting a moderate effect of climate change on flowering time in the studied varieties.

Keywords: weather parameters, chickpea, mathematical modeling

—— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 57-013

РОЛЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КОРНЕЙ В ПОГЛОЩЕНИИ МЕДИ РАСТЕНИЯМИ ВИКИ НАРБОНСКОЙ

© 2021 г. Н.Р. Мейчик, Ю.И. Николаева, О.В. Никушин, М.А. Кушунина

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

E-mail: mkushunina@gmail.com Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 08.06.2020 г. Принята к публикации 14.09.2020 г.

Проведен сравнительный анализ накопления меди корнями растений вики нарбонской (*Vicia narbonensis* L.) и изолированными из них клеточными стенками. Установлено, что основным местом накопления ионов меди у интактных растений является корневая система, а клеточные стенки корней характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, что обуславливает их высокую связывающую способность в отношении ионов меди. Полученные результаты показывают, что основной стратегией защиты растений вики нарбонской от повышенных концентраций меди в окружающей среде является предотвращение накопления ионов этого металла в цитоплазме клеток корня путем депонирования их в клеточную стенку.

Ключевые слова: клеточная стенка, адсорбция, ионообменные группы, тяжелые металлы **DOI:** 10.31857/S0006302921010154

В настоящее время загрязнение почв тяжелыми металлами (ТМ) является серьезной экологической проблемой. Для растений ТМ в высоких концентрациях становятся мощными ингибиторами жизненных процессов, вызывают множественные нарушения метаболизма, снижение продукционного потенциала и даже гибель. Избыток ТМ в растительных клетках вызывает широкий спектр токсических реакций: деструкцию клеточных мембран, нарушение организации цитоскелета и ингибирование ферментов и, как следствие, ингибирование процессов фотосинтеза, дыхания, клеточного деления, ионного транспорта и т.д. [1-3]. В то же время некоторые из ТМ являются необходимыми для жизнедеятельности растений элементами. Так, медь является микроэлементом для всех растений. В качестве кофактора она входит в состав многих ферментов и белков, таких как цитохромоксидаза электронтранспортной цепи митохондрий, пластоцианин, некоторые формы супероксиддисмутаз.

Внутриклеточные защитные механизмы, реализуемые у растений в ответ на «металл-стресс» (Ме-стресс), широко изучаются и обсуждаются научным сообществом, и освещены в достаточном количестве обзоров [4, 5]. Многие исследователи полагают, что в ответе на Ме-стресс внутриклеточные механизмы защиты играют главенствующую роль. Эти механизмы включают метаболическую инактивацию ионов ТМ путем их хелатирования и/или компартментализации в вакуоли [6]. Как правило, в подобного рода исследованиях растения помещают на среду с повышенной концентрацией металла и исследуют ответы растений на действие Ме-стресса, избавляясь каким-либо способом от клеточной стенки, чтобы устранить ее влияние.

В то же время проблема детоксикации меди в апопласте изучена недостаточно, хотя клеточная стенка (КС) клеток корня первой вступает в контакт с ионами ТМ почвенного раствора и является первым барьером на пути их проникновения в протопласт. Наличие у КС способности к связыванию ионов ТМ, зависящей от физико-химических свойств этого компартмента клетки, может быть движущей силой их поступления в корень из почвенного раствора и создавать конкуренцию поглощению симпластом, особенно при низких концентрациях металла [7, 8].

Для оценки роли апопласта корней в поглощении TM растениями используются различные методы, включая физико-химическое фракционирование ионов TM [7, 9], энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию [10], дифференциальное поглощение при разных температурах

Сокращения: ТМ – тяжелые металлы, Ме-стресс – металлстресс, КС – клеточная стенка, ПГК – полигалактуроновая кислота.

[11] и метод сравнительной оценки поглощения металла корнями транспирирующих растений и выделенной из них КС при одинаковых условиях внешней среды [12].

Как было показано ранее, изолированная КС корней вики нарбонской характеризуется самым высоким содержанием карбоксильных групп в составе пектинов [13] по сравнению с другими бобовыми, однако роль КС в поглощении Cu²⁺ этими растениями не установлена.

Цель работы состояла в определении ионообменной способности клеточных стенок, изолированных из корней вики нарбонской, в отношении ионов меди при разных концентрациях металла в среде и в оценке роли апопласта в поглощении Cu^{2+} этими растениями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения вики нарбонской (*Vicia narbonesis* L.) сорта Sel2384. Растения выращивали в водной культуре в климатической камере (24°С, интенсивность света ~110 мкмоль/м²×с, 14-часовой световой день) при постоянной аэрации растворов и их замене каждые семь суток. В экспериментах использовали 9(10)-дневные растения, выращенные на растворе с низким содержанием элементов минерального питания (~0.2 мМ K⁺, NO₃⁻ и PO₄³⁻) и 14(15)-дневные растения, выращенные на 0.1 среды Прянишникова (в мМ: NH₄NO₃ – 3.0, MgSO₄ – 0.5, KCl – 2.0, CaSO₄ · 2H₂O – 2.0, CaHPO₄ · 2H₂O – 1.0, FeCl₃ – 0.15).

Выделение полимерного матрикса клеточных стенок. Проводили из интактных корней по описанному ранее методу [14]. Навески корней (~1 г) помещали в колбы и промывали последовательно 1%-м раствором NaOH (~0.3 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании), Н₂О (~2 л), 1%-м раствором HCl (~0.3 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании) и дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах хлоридионов. Затем определяли сырую и сухую (после высушивании при 60°С) массу препарата КС. Данный метод стандартизации, т.е. переведения всех имеющихся в структуре КС катионообменных групп в H⁺-форму, а анионообменных – в форму свободного амина, позволяет проводить сравнительное исследование сорбционных свойств ионообменных материалов с различной структурой функциональных групп [14, 15]. Долю сухой массы КС (G_{KC}) в сухой массе корней (%) определяли по формуле:

$$G_{\rm KC} = (G_{\rm KC}/G_{\rm K}) \times 100, \tag{1}$$

где $G_{\rm K}$ и $G_{\rm KC}$, соответственно, сухая масса корней и выделенных из них КС, г.

Исследование ионогенных групп в составе клеточных стенок корней проводили методом потенциометрического титрования, как описано ранее [16], при постоянной ионной силе раствора (100 мМ), которую создавали добавлением NaCl. Число типов ионообменных групп в КС (*j*), а также их количество (ΔS^{j}) определяли по дифференциальным кривым (dS_i/dpH_i) = $f(pH_i)$, как описано ранее [16]. Степень ионизации (α_i) для каждой группы рассчитывали по формуле:

$$\alpha_i = S_i^J / \Delta S', \tag{2}$$

где S_i^j — количество диссоциированных групп *j*-го типа при р \mathbf{H}_i .

Чтобы рассчитать константу ионизации для каждой ионообменной группы, использовали модифицированное Грегором уравнение Хендерсона– Хассельбаха:

$$pH = pK_a + nlg(\alpha/(1-\alpha)), \qquad (3)$$

где р K_a — кажущаяся константа ионизации ионообменной группы полимера, α — степень ее ионизации, *n* — константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона [17].

Используя установленные значения параметров (ΔS^{j} , p K_{a}^{j} , n^{j}), рассчитывали S_{i}^{pac} по суммарному уравнению [16]:

$$S_{i}^{\text{pac}} = S_{o}^{\text{Kar}} - \sum_{j,i=1}^{k,m} \frac{\Delta S^{j}}{1 + 10^{\frac{pK_{a}^{j} - pH_{i}}{n^{j}}}},$$
 (4)

где S_i^{pac} — расчетное значение ионообменной способности КС при соответствующем значении рH_i; $S_o^{\text{кат}}$ — максимальная катионообменная способность КС; ΔS^j — количество ионообменных групп *j*-го типа; $S_o^{\text{кат}}$, ΔS^j и S_i^{pac} выражены в мкмоль/г сухой массы КС; р K_a^j — кажущаяся константа ионизации ионообменных групп *j*-го типа; n^j — константа уравнения (3) для ионообменных групп *j*-го типа; k — число точек на потенциометрической кривой, m — число типов ионообменных групп.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_i^{\text{pacy}} = B \times S_i^{\text{эксп}} + A, \tag{5}$$

где $S_i^{\text{расч}}$ и $S_i^{\text{эксп}}$ – рассчитанная по уравнению (4) и экспериментально определенная ионооб-

менная способность при соответствующем значении pH_i, мкмоль/г сухой массы KC; *A* и *B* – параметры регрессии.

Поглощение ионов меди транспирирующими растениями. Растения вики 9- или 14-дневного возраста, выращенные как указано выше, переносили в сосуды объемом 150 мл (по три растения в каждом сосуде) с растворами CuCl₂ с концентрацией 10, 50 или 100 мкМ (pH 5.0 ± 0.1) и выдерживали в климатической камере 24 ч при непрерывной аэрации растворов (опытные растения). Контрольные растения выдерживали 24 ч на исходных питательных растворах без добавления CuCl₂ (концентрация Cu²⁺ \leq 0.5 мкМ).

По истечении 24 ч половину опытных и контрольных растений извлекали из раствора, разделяли на надземную часть и корни, взвешивали, а затем высушивали в термостате при температуре 60° С до постоянного веса, после чего определяли сухую массу частей растений и рассчитывали оводненность корней и надземной части ($K_{\rm H_2O}$) по формуле:

$$K_{\rm H_2O} = \frac{(m_{\rm cup} - m_{\rm cyx})}{m_{\rm cuy}},$$
 (6)

где $m_{\rm сыр}$ и $m_{\rm суx}$ – соответственно сырая и сухая масса (г) корней или поебга.

Затем сухие навески измельчали, помещали в фарфоровые тигли, смачивали концентрированной азотной кислотой и озоляли в муфельной печи при 420°С в течение 10-15 ч. Золу растворяли в концентрированной соляной кислоте, затем раствор разбавляли дистиллированной водой и определяли в нем концентрацию Cu²⁺ колориметрическим методом [18].

Другую половину опытных и контрольных растений использовали для выделения из корней клеточной стенки, как описано выше, при этом корни и полученные из них препараты КС не подвергали термообработке.

Поглощение ионов меди изолированными клеточными стенками. Препараты клеточных стенок, изолированных из корней трех опытных или контрольных растений вики 10- или 15-дневного возраста, переносили в сосуды объемом 150 мл с растворами CuCl₂ с концентрацией CuCl₂ 10, 50 или 100 мкM, pH 5.0 \pm 0.1 и выдерживали в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Затем образцы КС отделяли от раствора, определяли в нем концентрацию ионов Cu²⁺ и рассчитывали ионообменную способность КС по формуле:

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

$$S_{\rm Cu} = \frac{(C_0 - C_i) \times V}{g},\tag{7}$$

где S_{Cu} – сорбционная способность КС в отношении ионов Cu²⁺, мкмоль/г сухой массы КС; C_0 и C_i – исходная и конечная концентрации Cu²⁺ в растворе, мМ; V – объем раствора, мл; g – сухая навеска образца КС, г.

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в трех-шести биологических повторностях для каждой концентрации CuCl₂. Обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Приведены средние значения и их стандартные отклонения или ошибки. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли с помощью двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование ионогенных групп в составе клеточных стенок корней. Экспериментальные кривые потенциометрического титрования имели сложную полисигмоидную форму, что свидетельствует о наличии нескольких типов ионообменных групп в составе структурных полимеров КС. При рН 10.8 значения катионообменной способности КС по Na⁺ достигали максимального уровня ($S_0^{\text{кат}}$, табл. 1). Это означает, что все ионогенные группы заняты Na⁺. S₀^{кат} характеризует общее количество кислотных групп, которые имеются в полимерной структуре КС исследуемых растений. Эти группы могут включаться в реакции ионного обмена при соответствующих значениях рН среды. Следует отметить, что анионообменные группы, которые, как правило, обнаруживаются на потенциометрических кривых КС корней растений других видов [16], не выявлены у растений вики, что может быть обусловлено большим содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в стенках, которые экранируют диссоциацию аминогрупп.

Расчеты кривых потенциометрического титрования препаратов изолированных КС свидетельствуют, что у растений 10- и 15-дневного возраста качественный (pK_a^{j}) и количественный (ΔS^{j}) состав ионообменных групп не отличаются (табл. 1), а также показывают, что рассчитанные (уравнение 4) значения полностью соответствуют полученным экспериментальным данным, о чем свидетельствуют величины коэффициентов корреляции (r^2) и коэффициенты регрессии *B*, близкие к единице (уравнение 5) и для 10-дневных (B = 1.03; $r^2 = 0.991$), и для 15-дневных (B = 1.04; $r^2 = 0.990$) растений.

Возраст растений, сутки	j	p K_a^j	n ⁱ	$(r_{\rm corr}^j)^2$	ΔS^{i}	S _o ^{kat}
	1	4.09 ± 0.04	1.08	0.996	600 ± 10	
15	2	7.40 ± 0.15	0.99	0.931	550 ± 11	1620 ± 35
	3	10.0 ± 0.35	0.93	0.908	470 ± 14	
	1	4.06 ± 0.03	1.27	0.997	610 ± 20	
10	2	7.26 ± 0.20	1.11	0.925	550 ± 10	1645 ± 45
	3	10.3 ± 0.20	0.83	0.960	485 ± 15	

Таблица 1. Параметры модифицированного Грегором уравнения Хендерсона—Хассельбаха (уравнение 3) для ионогенных групп в полимерном матриксе клеточных стенок корней растений вики разного возраста

Примечание. *j* – Тип группы (1 – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты, 2 – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот, 3 – фенольные ОН-группы); S_o^{kat} – суммарное количество катионообменных групп; n^j – константа уравнения (3); $(r_{corr}^i)^2$ – коэффициент корреляции зависимости pH_i = $f(\lg[\alpha_i/(1-\alpha_i)])$; ΔS^i – количество ионогенных групп*j*-го типа. S_o^{kat} , S'выражены в мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартные отклонения.

Ростовые характеристики растений при разных концентрациях меди в растворах. В исследуемом диапазоне концентраций ионов меди в растворе сухая масса корня и 10-, и 15-дневных растений не изменялась в ответ на увеличение концентрации меди в среде, при этом сухая масса побега десятидневных растений увеличивалась на 10% (p < 0.05, табл. 2). Токсическое действие меди на растения вики проявлялось только в изменении содержания воды: у 10-дневных растений этот показатель снижался как в корнях, так и в побегах, а у 15-дневных — только в надземной части (табл. 2). Массовая доля клеточной стенки корней достоверно различалась (p < 0.05) у 10- и

15-дневных контрольных растений и составляла 47.5 \pm 0.4 и 51.8 \pm 1.6%, соответственно (табл. 3). Независимо от возраста растений значение этого показателя возрастало в ответ на присутствие меди в среде, при самой высокой обработке оно достигало 59.3 \pm 2.2 и 61.7 \pm 0.3% у 10- и 15-дневных растений соответственно.

Накопление Cu^{2+} в органах растений вики при различной концентрации Cu^{2+} в среде. С увеличением концентрации Cu^{2+} в среде от 10 до 100 мкМ содержание меди в корнях и 10-, и 15-дневных растений возрастало от 10 до 65 мкмоль/г сухой массы (табл. 4). При этом уже при 10 мкМ Cu^{2+} в

Возраст растений, дни	<i>С</i> _{Си} , мкМ	Сухая масса одного корня, мг	К _{Н2О} ^{корень} , г Н2О/г сухой массы	Сухая масса одного побега, мг	<i>К</i> _{Н2О} ^{побег} , г Н2О/г сухой массы
	0.5 (контроль)	$16.6 \pm 0.9^{\mathrm{a}}$	$15.7 \pm 0.2^{\circ}$	$32.8 \pm 1.2^{\rm g}$	11.1 ± 0.3^{a}
10	10	$18.6\pm0.5^{\rm a}$	13.9 ± 0.2^{d}	$41.6\pm1.5^{\rm h}$	10.4 ± 0.4^{ab}
	50	17.1 ± 1.1^{a}	13.3 ± 0.1^{d}	$38.2 \pm 1.9^{\rm h}$	10.3 ± 0.3^{ab}
	100	$16.5\pm0.6^{\rm a}$	14.0 ± 0.2^{d}	$38.7 \pm 1.4^{\rm h}$	$10.2\pm0.2^{\mathrm{b}}$
	0.5 (контроль)	26.4 ± 1.8^{b}	$17.6 \pm 0.3^{\mathrm{f}}$	$56.2 \pm 1.9^{\text{j}}$	11.4 ± 0.1^{a}
15	10	$27.3\pm1.4^{\rm b}$	$17.0 \pm 0.3^{\mathrm{f}}$	$59.7\pm2.3^{\rm j}$	11.0 ± 0.2^{ab}
	50	$25.7\pm4.3^{\mathrm{b}}$	$16.6\pm0.2^{\rm f}$	$58.9\pm5.5^{\rm j}$	$10.8\pm0.2^{\mathrm{b}}$
	100	29.1 ± 3.3^{b}	$17.8\pm0.4^{\mathrm{f}}$	$63.0 \pm 2.6^{\mathrm{j}}$	$10.7\pm0.1^{\mathrm{b}}$

Таблица 2. Сухая масса корня и побега и содержание воды в органах ($K_{H_2O}^{\text{корень}}$ и $K_{H_2O}^{\text{побег}}$) растений вики разного возраста после 24 ч экспозиции на растворах с разной исходной концентрацией CuCl₂

Примечание. Приведены средние значения из трех-десяти биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с одинаковыми буквами не отличаются в соответствии с *t*-критерием для независимых выборок с уровнем вероятности p < 0.05. Значения с разными буквами достоверно различаются при p < 0.05.

	<i>С</i> _{Си} , мкМ	10-дневные растения	15-дневные растения
Контроль	1 (0.5 мкМ)	$47.5 \pm 0.4^{\mathrm{a}}$	$51.8 \pm 1.6^{\circ}$
Опыт	2 (<i>C</i> _{Cu} 10 мкМ)	$49.0 \pm 0.6^{\mathrm{a}}$	$58.3\pm0.8^{\circ}$
	2 (<i>C</i> _{Cu} 50 мкМ)	$55.7 \pm 1.4^{\mathrm{b}}$	$56.0 \pm 1.0^{\circ}$
	2 (<i>C</i> _{Cu} 100 кМ)	$59.3 \pm 2.2^{\rm b}$	61.7 ± 0.3^{d}

Таблица 3. Массовая доля (в %) клеточных стенок от сухой массы корней вики в зависимости от возраста растений и концентрации Си в экспериментальном растворе

Примечание. Контроль – клеточную стенку выделяли из корней растений, которые не подвергались действию Cu^{2+} ; опыт – клеточную стенку выделяли из корней растений после 24 ч экспозиции на растворах с разной исходной концентрацией $CuCl_2$ (C_{Cu}). Приведены средние значения из трех (опытные растения) и пятнадцати (контрольные растения) биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с одинаковыми буквами не отличаются в соответствии с *t*-критерием для независимых выборок с уровнем вероятности p < 0.05. Значения с разными буквами достоверно различаются при p < 0.05.

среде оно было почти в 40 раз больше по сравнению с содержанием Си в корнях контрольных растений.

При всех обработках в надземных частях 10-дневных растений вики содержание меди также увеличивалось, однако отличия от контрольных растений были незначительными: при 100 мкМ Cu^{2+} в среде содержание меди в побегах было лишь в полтора раза больше по сравнению с побегами контрольных растений (табл. 4). У 15-дневных растений содержание меди в надземных органах опытных и контрольных растений было приблизительно одинаковым (p < 0.05) и составляло 0.574 ± 0.037 и 0.520 ± ± 0.060 мкмоль/г сухой массы побега соответственно.

Независимо от концентрации меди в растворе увеличение содержания меди в корнях было намного значительнее, чем в побегах (табл. 4). Эти результаты согласуются с известными данными о том, что большинство видов растений накапливают Си в тканях корня с незначительной транслокацией в надземную часть [3, 19]. Отсутствие снижения массы корней и надземных органов по сравнению с контролем предполагает, что поглощенные за 24 ч ионы меди не оказывают значительного токсического действия на растения вики, хотя и наблюдается небольшое снижение оводненности тканей корня и побега (табл. 2).

Таблица 4. Содержание меди в корнях (S_{Cu}^{Kophu}) и побегах (S_{Cu}^{nober}) в зависимости от возраста растений и концентрации Cu²⁺ в растворе

Возраст, дни	<i>С</i> _{Си} , мкМ	S _{Cu} ^{корни} , мкмоль/г сухой массы корней	S _{Cu} ^{побег} , мкмоль/г сухой массы побегов
	0.5	1.57 ± 0.18	$0.523 \pm 0.030^{\circ}$
10	10	10.8 ± 0.3	$0.604 \pm 0.040^{\rm c}$
10	50	39.1 ± 1.4	0.683 ± 0.071^{d}
	100	68.1 ± 3.4	0.798 ± 0.037^{d}
15	0.5	1.57 ± 0.18	$0.529 \pm 0.032^{\rm a}$
	10	9.71 ± 1.12	0.416 ± 0.023^{b}
	50	32.1 ± 3.45	$0.652\pm0.052^{\rm a}$
	100	65.7 ± 8.90	$0.622 \pm 0.042^{\mathrm{a}}$

Примечание. Приведены средние значения из трех-десяти биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с одинаковыми буквами не отличаются в соответствии с *t*-критерием для независимых выборок с уровнем вероятности p < 0.05. Значения с разными буквами указывают на значительные различия с p < 0.05.

		$S_{\rm Cu}{}^{\rm KC}$, мкмоль/г сухой массы корня		$S_{\mathrm{Cu}}{}^{\mathrm{KC}}$, мкмоль	/г сухой массы КС
<i>С</i> _{Си} , мкМ		10-дневные растения	15-дневные растения	10-дневные растения	15-дневные растения
10	1	19.8 ± 0.5	18.6 ± 2.0	41.3 ± 1.2	35.8 ± 4.2
10	2	19.4 ± 0.6	15.5 ± 1.1	43.0 ± 2.3	27.7 ± 1.2
50	1	$91.5\pm4.8^{\mathrm{a}}$	85.1 ± 5.8	181 ± 7	165 ± 13
	2	120 ± 9^{b}	80.5 ± 8.5	188 ± 7	143 ± 14
100	1	$130 \pm 5^{\circ}$	140 ± 4	285 ± 10	273 ± 5
	2	166 ± 6^{d}	156 ± 9	289 ± 16	253 ± 12

Таблица 5. Содержание меди в клеточной стенке, изолированной из корней 10- и 15-дневных растений вики в зависимости от концентрации Cu²⁺ в растворе

Примечание. S_{Cu}^{KC} – содержание меди в клеточной стенке. 1 – Контроль, КС выделяли из корней растений, которые не подвергались действию Cu²⁺; 2 – опыт, КС выделяли из корней растений после Cu-обработки с разными начальными концентрациями Cu²⁺ в течение 24 ч. Приведены средние значения из трех-шести биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с разными буквами указывают на достоверные различия в соответствии с *t*-критерием для независимых выборок с уровнем вероятности *p* < 0.05. Отсутствие букв – нет достоверных отличий между контролем и опытом (*p* < 0.05).

Связывание Cu²⁺ изолированными клеточными стенками при разной концентрации Cu²⁺ в среде. Сравнительный анализ адсорбирующей способности в отношении ионов меди КС, изолированных из контрольных и опытных растений, показывает, что у 15-дневных растений нет отличий в этом показателе (табл. 5) ни в расчете на единицу сухой массы корня, ни в расчете на единицу сухой массы КС. У 10-дневных растений при 10 мкМ Cu²⁺ в среде Си-связывающая способность КС опытных растений не отличалась от значений для контрольных растений (p < 0.05, табл. 5), однако при повышении концентрации меди в растворе до 50 и 100 мкМ она увеличивалась в расчете на единицу сухой массы корня, но оставалась неизменной в расчете на единицу сухой массы КС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследованном диапазоне концентраций медь не оказывает значительного ингибирующего действия на рост растений вики десяти- и пятнадцатидневного возраста, так как не наблюдалось снижения сухой массы как корней, так и побегов относительно контроля. Токсическое действие меди выражалось в некотором снижении содержания воды в корнях у 10-дневных растений и побегах у растений обоих возрастов. Следует также отметить, что в наших условиях эксперимента отсутствовали внешние проявления токсичности меди, которые наблюдали другие авторы (развитие межжилкового хлороза листьев,

коричневый цвет корней, угнетение роста корней и побегов) у родственного растения Vigna unguiculata при концентрации меди ≥ 1.7 мкМ [19]. Несоответствие известных данных и наших результатов о токсическом действии Cu²⁺ в определенных концентрационных пределах обусловлено разными условиями постановки эксперимента. Имеет значение не только концентрация меди в растворе, но и соотношение количества используемых растений к объему раствора, содержащего токсичный металл, а также продолжительность токсического действия Cu²⁺. Так, например, авторы работы [19] использовали в эксперименте четыре проростка V. unguiculata, которые выращивали в течение 14 дней в сосуде, содержащем 21 л раствора с концентрацией Cu^{2+} 1.7 мкМ (C_{Cu}), при этом концентрацию меди поддерживали на постоянном уровне в течение всего эксперимента. Таким образом, токсическая нагрузка (объем раствора × C_{Cu}/количество растений) без учета продолжительности обработки составляла 9.5 мкмоль Cu²⁺ на одно растение. В наших экс-периментах мы использовали три растения вики, объем раствора с концентрацией Cu^{2+} 10, 50 или 100 мкМ составлял 0.15 л, а начальная токсическая нагрузка на одно растение - 0.5, 2.5 или 5.0 мкмоль Cu²⁺ соответственно. При этом токсическая нагрузка не была постоянной и уменьшалась к концу опыта на 90-99%. Таким образом, в наших экспериментах начальная токсиче-



Рис. 1. Содержание меди в корнях ($S_{корни}$, мкмоль/г сухой массы корней) десятидневных растений вики при разных начальных концентрациях Cu^{2+} в растворе и разном количестве растений в эксперименте: темные столбики — семь растений; светлые столбики — три растения в объеме раствора 150 мл. Приведены средние значения из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки.

ская нагрузка на одно растение даже при самой высокой концентрации меди была в два раза меньше, чем в цитированном выше исследовании.

Эксперименты с разным количеством растений вики подтверждают эти рассуждения (рис. 1). С увеличением количества растений, находящихся в одинаковом объеме раствора Cu^{2+} , от трех до семи уменьшается содержание металла в корнях во всем исследуемом дискретном концентрационном диапазоне, т.е. токсическое действие Cu^{2+} снижается. Так, при увеличении количества растений в 2.33 раза содержание меди в корнях уменьшилось приблизительно во столько же: в 2.23, 2.52 и 2.27 раза при концентрации Cu^{2+} в растворе 10, 50 и 100 мкМ соответственно.

Клеточные стенки корней растений V. narbonensis характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты (табл. 1), что обуславливает их высокую связывающую способность в отношении ионов меди (табл. 5). Известно, что в КС растений имеется два типа сайтов связывания ионов меди: карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты (ПГК) и карбоксильные группы гидроксикоричных кислот [13]. Можно полагать, что у вики основным сайтом связывания меди являются карбоксильные группы ПГК, так как pK_a этих групп ниже, чем карбоксильных групп гидроксикоричных кислот (табл. 1), а количество адсорбированной в КС меди меньше, чем содержание карбоксильных групп ПГК. Расчеты показывают, что всего лишь 10% групп ПГК участвуют в свя-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

зывании меди при 10 мкМ Си в среде, а при 100 мкМ этот показатель возрастает до 90%.

Известно, что в ответ на избыток ТМ в среде растения могут реализовывать две стратегии изменения содержания и состава пектинов в КС корня. Первая из них заключается в увеличении массовой доли деметилированных пектинов в КС при воздействии таких TM, как Pb, Cd и Cu [20-22], а также алюминия [23]. Вторая, напротив, заключается в увеличении степени метилирования пектинов в КС в ответ на избыток металла в среде [20, 23]. В зависимости от вида, экотипа или сорта растения каждая из стратегий может являться либо механизмом устойчивости к воздействию ТМ, либо, наоборот, приводить к развитию Ме-стресса. Так, в клетках корней растений Silene paradoxa из устойчивой популяции в ответ на Cu-стресс было обнаружено усиление синтеза пектинов с высокой степенью метилирования. Формирование таких «исключающих» металл клеточных стенок является одним из факторов, гарантирующих низкое апопластное накопление меди и, вероятно, ограничивающих также и симпластное поглощение меди клетками корня [20]. Напротив, у Elsholtzia splendens возрастание доли деметилированных пектинов в КС корня являлось механизмом устойчивости к Ме-стрессу [24].

Ранее было показано, что у бобовых Си-связывающая способность КС увеличивается или уменьшается в соответствии с содержанием в ней карбоксильных групп ПГК, которые являются основными сайтами связывания Cu²⁺ у этих растений [13]. На этом основании возможно полагать, что изменения Cu-связывающей способности КС в ответ на воздействие Cu²⁺ отражают различия в содержании карбоксильных групп ПГК и/или степени их метилирования между контрольными и обработанными Cu (опытными) растениями.

Тот факт, что в расчете на единицу сухой массы КС ее Си-связывающая способность у опытных растений не изменяется по сравнению с контрольными, свидетельствует о том, что присутствие меди в среде в повышенной концентрации не приводит к изменению степени метилирования пектиновых полимеров. Однако увеличение Си-связывающей способности КС в расчете на единицу сухой массы корня (табл. 5) при концентрации меди в растворе 50 мкМ, а также данные об увеличении массовой доли стенки в общей массе корня (табл. 3) дают основание полагать, что в корнях вики в ответ на действие Cu^{2+} стратегия защиты с участием КС обусловлена усилением в равной мере биосинтеза всех компонентов КС, в том числе и пектинов с таким же содержанием свободных карбоксильных групп, как у контрольных растений, так как Си-связывающая способность КС в расчете на единицу ее сухой массы не изменяется (табл. 5). Такая же стратегия защиты была выявлена у растений маша (Vigna radiata) в аналогичных условиях эксперимента при ≥50 мкМ Cu²⁺ в среде [12].

Сравнительная оценка Си-связывающей способности КС и корней растений показывает (табл. 4 и 5), что в исследуемом дискретном диапазоне концентраций Cu²⁺ изолированные КС корней связывают в два раза больше металла, чем корни интактных растений. Этот результат может быть обусловлен несколькими причинами: 1) некоторая часть Cu^{2+} проходит в побеги растений. В соответствии с результатами, действительно, при ≥50 мкМ Cu²⁺ в среде мы наблюдали некоторое увеличение в содержании Си в надземной части опытных растений (в 1.2 (15-дневные растения) и в 1.5 раза (10-дневные растения, табл. 4) по сравнению с контрольными); 2) используемый в настоящей работе метод выделения КС приводит к получению препарата, в котором не нарушена архитектура полимерной сети [16], но значительно облегчена диффузия к ионообменным группам полимеров по сравнению с КС в интактном корне: 3) часть сайтов связывания металлов в КС в интактном корне может быть занята ионами Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ и т.д. [25], которые отсутствуют в препаратах изолированной стенки и экспериментальных растворах; 4) корни растений в присутствии повышенных концентраций тяжелых металлов могут выделять в среду органические хелаторы, главным образом, аминокислоты (гистидин, глутамин) и фитосидерофоры (производные мугеновой кислоты), образующие прочные комплексы с ионами меди [26], что может препятствовать поглощению металла корнями растений.

Полученные нами данные об адсорбирующей способности изолированных КС (табл. 5), о сравнительной оценке Си-связывающей способности КС и корней растений (табл. 4 и 5) дают нам основания полагать, что депонирование меди в КС корня является физиологическим ответом растений вики нарбонской на повышенные концентрации этого металла в окружающей среде, предотвращающим поступление ионов Cu²⁺ в симпласт корня, а на уровне целого растения – в надземные органы. Наши данные о преимущественной локализации Cu²⁺ в КС корня согласуются с результатами других авторов, которые использовали другие методы исследования и показали, что апопласт корней играет важную роль в поглощении и накоплении металлов как у чувствительных, так и у устойчивых видов растений. Так, например, используя физико-химическое фракционирование содержащегося в корнях Ni после экспозиции растений на растворах с избыточной концентрацией Ni, исследователи показали, что апопластное поглощение ответственно за 81.3-88.0% и 90.6-95.5% от общего поглощения корнями кукурузы и Leptoplax emarginata (гипернакопителя Ni) соответственно [9]. Более того, поскольку данные виды растений сильно различаются по способности к накоплению никеля, эти авторы полагают, что симпластное поглощение не является основным фактором гипернакопления. В работе [27] было показано, что депонирование Си в КС у твердой пшеницы ответственно за 50-80% от общего поглощения Си корнями. Аналогично, ~60% от общего количества Си в корнях Lolium multiflorum и Trifolium pratense [7] было связано клеточными стенками. Однако некоторые исследования предполагают преобладающую роль внутриклеточных механизмов в поглощении и накоплении Си и других ТМ [28, 29]. Например, было обнаружено, что Сисвязывающая способность корней пшеницы и томатов в 3.4 раза выше, чем у изолированных КС корня [29]. В данном случае Си-связывающая способность КС могла быть недооценена из-за малой продолжительности поглощения металла (30 мин). Различия также могут обусловлены применением разных экспериментальных методов, а также видом и возрастом растений, количеством металла в растворе на одно растение, объемом раствора с токсичной концентрацией металла и т.д.

выводы

Наши исследования показали, что КС корней растений *V. narbonensis* характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, что обуславливает их высокую связывающую способность в отношении ионов
Cu^{2+} . Было установлено, что в исследованном диапазоне концентраций медь не оказывает токсического действия на рост растений десяти- и пятнадцатидневного возраста, так как не происходит снижения сухой биомассы ни корней, ни побегов относительно контроля. Токсическое действие меди проявляется только в некотором снижении оводненности, что свидетельствует о том, что накопление Си в КС корней у вики может являться механизмом защиты от неблагоприятного воздействия этого металла. Основным местом накопления Си в интактных растениях является корневая система. При этом содержание Си в тканях корня зависит не только от концентрации металла в среде выращивания, но и от количества растений, используемых в экспериментах, из чего следует, что при оценке токсического действия металла на растительный организм важно принимать во внимание соотношение объема раствора к количеству растений.

Используемый в нашей работе подход к исследованию поглощения Си растениями позволяет оценить вклад как вне- так и внутриклеточных механизмов накопления металла [12]. Однако в выбранных условиях эксперимента накопления меди в симпласте не было обнаружено даже при самой высокой концентрации этого металла в среде. Полученные нами данные об адсорбирующей способности изолированных КС дают нам основания полагать, что основной стратегией защиты растений вики нарбонской от повышенных концентраций меди в окружающей среде является предотвращение поступления ионов этого металла в клетку путем депонирования их в клеточные стенки корня, а также, возможно, выделения хелаторов в среду выращивания, что снижает поступление ионов меди в корни.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом МГУ имени М.В. Ломоносова для поддержки ведущих научных школ МГУ «Депозитарий живых систем Московского университета» в рамках Программы развития МГУ и выполнена в соответствии с НИР кафедры физиологии растений МГУ (№ АААА-А16-116021660106-0).

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.

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. Ouzounidou, M. Ciamporova, M. Moustakas, and S. Karataglis, Env. Exp. Bot. 35, 167 (1995).
- E. Gajewska, M. Sklodowska, M. Slaba, and J. Mazur, Biol. Plant. 50, 653 (2006).
- 3. H. Lequeux, C. Hermans, S. Lutts, and N. Verbruggen, Plant Physiol. Biochem. 48, 673 (2010).
- 4. J. L. Burkhead, K. A. Reynolds, S. E. Abdel-Ghany, et al., New Phytol. **182**, 799 (2009).
- S. Klaumann, S. D. Nickolaus, S. H. Fürst, et al., New Phytol. **192**, 393 (2011).
- 6. J. L. Hall, J. Exp. Bot. 53, 1 (2002).
- 7. K. Iwasaki, K. Sakurai, and E. Takahashi, Soil Sci. Plant Nutr. **36**, 431 (1990).
- V. P. Kholodova, E. M. Ivanova, and V. V. Kuznetsov, in *Detoxification of Heavy Metals*, Ed. by I. Sherameti and A. Varma (Springer, Berlin, Heidelberg, 2011), pp. 143–167.
- 9. T. Redjala, T. Sterckeman, S. Skiker, and G. Echevarria, Env. Exp. Bot. 68, 99 (2010).
- 10. P. M. Kopittke, N. W. Menzies, M. D. de Jonge, et al., Plant Physiol. **156**, 663 (2011).
- F. J. Zhao, R. E. Hamon, E. Lombi, et al., J. Exp. Bot. 53, 535 (2002).
- 12. N. Meychik, Y. Nikolaeva, M. Kushunina, and I. Yermakov, Funct. Plant Biol. **43**, 403 (2016).
- 13. N. Meychik, Y. Nikolaeva, M. Kushunina, and I. Yermakov, Plant Soil. **381**, 25 (2014).
- N. R. Meychik and I. P. Yermakov, Plant Soil. 217, 257 (1999).
- Н. Р. Мейчик, С. И. Степанов и Ю. И. Николаева, Журн. физ. хим. 92, 251 (2018).
- N. R. Meychik and I. P. Yermakov, Plant Soil. 234, 181 (2001).
- 17. Л. А. Шатаева, Н. Н. Кузнецова и Г. Е. Елькин, Карбоксильные иониты в биологии (Наука, Л., 1979).
- 18. 3. Марченко, Фотометрическое определение элементов (Мир, М., 1971).
- P. M. Kopittke and N. W. Menzies, Plant Soil. 279, 287 (2006).
- 20. I. Colzi, M. Arnetoli, A. Gallo, et al., Env. Exp. Bot. **78**, 91 (2012).
- 21. L. Parrotta, G. Guerriero, K. Sergeant, et al., Front. Plant Sci. 6, 1 (2015).
- 22. M. Wierzbicka, Plant Sci. 133, 105 (1998).
- 23. D. Eticha, A. Stass, and W. J. Horst, Plant Cell Env. 28, 1410 (2005).
- 24. T. Liu, C. Shen, Y. Wang, et al., PLoS One 9, e109573 (2014).
- 25. H. Marschner, *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd ed. (Acad. Press, London, 1995).
- 26. R. Qin, Y. Hirano, and I. Brunner, Tree Physiol. 27, 313 (2007).
- M. Bravin, B. Le Merrer, L. Denaix, et al., Plant Soil. 331, 91 (2010).
- 28. D. Liu and I. Kottke, Cell Biol. Toxicol. 19, 299 (2003).
- 29. S. Guigues, M. Bravin, C. Garnier, et al., Plant Soil. 381, 367 (2014).

МЕЙЧИК и др.

The Role of Physochemical Properties of the Root Cell Walls in Copper Uptake by Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L.)

N.R. Meychik, Yu.I. Nikolaeva, O.V. Nikushin, and M.A. Kushunina

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

The comparative analysis of copper accumulation in narbon vetch (*Vicia narbonensis* L.) roots and isolated root cell walls is presented. Our results demonstrate that intact plants accumulate Cu predominantly in the root system. The root cell walls are characterized by high content of polygalacturonic acid carboxyl groups, which determines their high Cu-binding capacity. We conclude that copper sequestration in the root cell walls is the main defense strategy employed by narbon vetch plants in response to Cu excess in the medium, which prevents Cu accumulation in the cytoplasm.

Keywords: cell wall, adsorption, ion-exchange groups, heavy metals

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 577.322.9; 577.359

АНТИОКСИДАНТНАЯ СПОСОБНОСТЬ ВОДНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ ЙЕРБА МАТЕ (*Ilex paraguariensis*)

© 2021 г. Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, Л.А. Павлова, А. Ли, А.А. Кочетова, А.Н. Осипов, Ю.А. Владимиров

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

E-mail: teselkin-box@mail.ru Поступила в редакцию 13.05.2020 г. После доработки 17.06.2020 г. Принята к публикации 18.06.2020 г.

Исследована антиоксидантная способность водных извлечений из йерба мате и некоторых полифенольных компонентов мате — кверцетина, рутина, хлорогеновой и кофеиновой кислот. Водные извлечения из мате дозозависимым образом обесцвечивали катион-радикалы 2,2'-азинобис(3этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) и вызывали появление латентного периода хемилюминесценции люминола, индуцированной 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом. Исследованные вещества в порядке уменьшения антиоксидантной способности, представленной в виде тролокс-эквивалентов, в обеих модельных системах составили следующую последовательность: кверцетин — рутин — хлорогеновая кислота — кофеиновая кислота. Антиоксидантная способность кверцетина была выше, чем у хлорогеновой и кофеиновой кислот. С использованием хемилюминесцентной системы установлено повышение антиоксидантной способности плазмы крови у здоровых добровольцев через один и два часа после однократного употребления чайного напитка, приготовленного из 8 г мате. Полученные результаты показывают, что водные извлечения из йерба мате могут использоваться для создания фитопрепаратов с антиоксидантным действием.

Ключевые слова: йерба мате, Ilex paraguariensis, полифенольные соединения, хлорогеновая кислота, кофеиновая кислота, антиоксиданты, антиоксидантная способность, плазма крови, хемилюминесценция, тролокс-эквивалент антиоксидантной способности.

DOI: 10.31857/S0006302921010166

Роль оксидативного стресса в патогенезе многих заболеваний человека хорошо известна [1-3]. В связи с этим важной задачей является разработка новых лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище, обладающих антиоксидантными свойствами. Применение в качестве антиоксидантов биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения открывает большие перспективы, поскольку природные антиоксиданты менее токсичны, чем синтетические [4-6].

Одним из растений, обладающих уникальными свойствами, является падуб парагвайский (*Ilex paraguariensis*), произрастающий в ряде стран Южной Америки (Бразилии, Аргентине, Парагвае и

Уругвае), листья и стебли которого, обработанные по традиционной технологии для изготовления коммерческого продукта, получили название «йерба мате» [7, 8]. Такое же название имеет соответствующий чайный напиток – йерба мате (мате). Установлено, что водные извлечения из мате (водные экстракты мате) содержат большое количество БАВ. К ним относятся кофеиновая кислота и ее производные (моно- и дикофеоилхинные кислоты), метилксантины (кофеин, теобромин, теофиллин), флавоноиды (кверцетин, кемпферол, рутин), тритерпеновые сапонины, аминокислоты, минералы (фосфаты, железо, кальций), витамины (С, В₁, В₂) [7–9]. БАВ определяют широкий спектр биологической активности чая мате: стимулирующее действие на центральную нервную систему, положительное влияние на сердечно-сосудистую систему, гипохолестеринемические, гепатопротекторные, диуретические, противовоспалительные, антибактериальные, антидиабетические, антиоксидантные и другие свойства [4, 7, 10]. Полагачто антиоксидантные свойства водных ЮΤ,

Сокращения: БАВ — биологически активные вещества, ТБК-РП — продукты пероксидного окисления липидов, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, АОС — антиоксидантная способность, АБАП — 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, АБТС — диаммониевая соль 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты).

экстрактов мате обусловлены соединениями полифенольной природы [5, 10, 11, 12]. Среди них выделяют прежде всего кофеиновую кислоту, моно- и дикофеоилхинные кислоты, а также рутин, кверцетин, кемпферол [6,13,14].

В экспериментах *in vitro* показано, что водные экстракты мате ингибировали процесс пероксидного окисления липидов [13, 15], обладали антирадикальным действием по отношению к 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилу [6, 11, 13], проявляли каталазоподобную [6] и супероксидперехватывающую способность [15], тормозили окисление липопротеинов низкой плотности плазмы крови [16, 17], защищали ДНК Saccharomyces cerevisiae от двухцепочечных разрывов, индуцированных пероксидом водорода [17].

Антиоксидантные эффекты водных излечений из мате были также подтверждены в экспериментах на животных. Пероральное введение чая мате мышам приводило к понижению содержания продуктов пероксидного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), в печени и сыворотке крови [18]. У крыс с гиперхолестеринемией употребление чая мате в качестве питья оказывало выраженное гиполипидемическое действие и снижало в сыворотке крови уровень одного из продуктов пероксидного окисления липидов - малонового диальдегида [19]. При моделировании инфаркта миокарда на изолированном сердце крысы водные экстракты мате уменьшали размер зоны некроза и содержание в миокарде ТБК-РП [20]. Внутрижелудочное введение водных извлечений из мате крысам с иммобилизационным стрессом вызывало снижение интенсивности свободнорадикальных реакций в разных структурах мозга по сравнению с контрольными животными [21].

В работах, выполненных с участием здоровых волонтеров, обнаружено, что употребление ими чая мате или водных экстрактов мате сопровождалось увеличением антиоксидантного потенциала плазмы/сыворотки крови и уменьшением показателей оксидативного стресса, характеризующих степень выраженности окислительной модификации биомолекул [22, 23]. Результаты этих и других [24] исследований показывают, что на основе водных экстрактов мате могут быть разработаны новые лекарственные средства для профилактики и лечения заболеваний, протекающих с участием оксидативного стресса.

В то же время следует отметить, что антиоксидантные (в частности, антирадикальные) свойства водных извлечений из мате, а также обнаруженных в их составе полифенольных соединений исследованы в основном с использованием стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила [5, 6, 11–13, 25] и в меньшей степени – с применением других методических подходов [25, 26]. Между тем дальнейшее изучение этих свойств в различных модельных системах позволит сделать более обоснованные предположения о механизмах антиоксидантного действия водных экстрактов мате *in vivo*.

Цель исследования — изучить антиоксидантную способность (АОС) водных извлечений из мате и некоторых индивидуальных полифенольных компонентов мате *in vitro*, а также изменение АОС плазмы крови добровольцев после однократного употребления чая мате.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применяли реактивы: 2,2'-азобис(2амидинопропан)дигидрохлорид (АБАП), диаммониевую соль 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС), кверцетин, кофеиновую кислоту, хлорогеновую кислоту, динатриевую соль ЭДТА, тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту), диметилсульфоксид, неорганические соли (все – производства Sigma-Aldrich, США), люминол (Fluka, Швейцария), рутин (Acros Organics, США).

В качестве объекта исследования использовали мате торговой марки Amanda категории Desplada (La Cachuera S.A., Аргентина). Для приготовления водного извлечения к навеске сырья добавляли бидистиллированную воду (из расчета 1 мг/мл), образец перемешивали и инкубировали в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Затем образец выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин, охлаждали в холодной воде, восстанавливали общий объем бидистиллированной водой и фильтровали через бумажный фильтр. Приготовленное водное извлечение из мате хранили при 4°С в течение эксперимента.

Для получения сухого экстракта мате на первом этапе готовили водное извлечение согласно описанной выше процедуре. При этом соотношение количества сырья и воды составляло 1:10, т.е. из одной массовой части сырья получали 10 объемных частей водного извлечения. На следующем этапе водное извлечение упаривали до содержания влаги 40% на роторном испарителе BUCHI (Германия) при разряжении 70-74 мбар и температуре холодильника 10-12°С. Далее его замораживали при температуре -23...-25°С и высушивали в сублимационной сушилке Heto Dry Winner (Дания) при остаточном давлении 0.07-0.13 мбар и комнатной температуре в течение 22-24 ч. Полученный лиофилизат водного извлечения из мате использовали для дальнейшего исследования.

АОС водного извлечения из мате и сухого экстракта мате, а также антиоксидантов (кверцетина, рутина, хлорогеновой и кофеиновой кислот) изучали с помощью двух модельных систем: 1) по восстановлению ими катион-радикалов АБТС

(АБТС^{•+}), образующихся при ее окислении в присутствии персульфата калия; 2) по торможению окисления люминола, индуцированного АБАП (система «АБАП–люминол»).

Способность БАВ восстанавливать АБТС^{•+} исследовали по методу [27] с небольшими модификациями. Основной раствор АБТС^{•+} готовили путем смешивания растворов АБТС и персульфата калия в фосфатном буфере (136.7 мМ NaCl, 2.7 мМ КСІ, 8.1 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ КH₂PO₄, рН 7.4). Конечные концентрации АБТС и персульфата калия составляли 7 мМ и 2.45 мМ соответственно. Полученную смесь выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 12-16 ч. Рабочий раствор АБТС^{•+} получали разведением основного раствора в пять раз фосфатным буфером. При приготовлении контрольной пробы (общий объем – 1.0 мл, среда – фосфатный буфер) в нее добавляли такое количество рабочего раствора АБТС^{•+}, чтобы после инкубации пробы в темноте в течение 4 мин при 30°С оптическая плотность, измеренная при длине волны 734 нм (D_{734}) , находилась в интервале значений 0.700 ± 0.020. Согласно нашим исследованиям. указанное время инкубации необходимо для стабилизации оптической плотности. В течение следующих 4 мин инкубации при тех же условиях значения D₇₃₄ оставались в пределах обозначенного диапазона. Измерение D₇₃₄ проводили на спектрофотометре Cary 60 (Agilent Technologies, США) против фосфатного буфера в кюветах с длиной оптического пути 1.0 см. При определении АОС БАВ их добавляли в разных концентрациях в опытную пробу через 4 мин после введения в нее АБТС^{•+} (общий объем пробы – также 1.0 мл). Объем добавки составлял не более 50 мкл, для этанолсодержащих образцов – не более 20 мкл. Измерение D₇₃₄ в опытной пробе осуществляли против буферного раствора спустя 4 мин инкубации при описанных выше условиях. Далее оценивали процентное уменьшение D_{734} в опытных пробах по отношению к ее значению в контрольной пробе через 8 мин инкубации. В случае, если растворы БАВ готовили в этиловом спирте, вклад последнего в уменьшение D₇₃₄ определяли, добавляя к раствору АБТС^{•+} соответствующее количество разбавленного буферным раствором этанола. Результаты по ингибирующему эффекту БАВ приведены с учетом этого вклада, который составлял не более 1-2%.

При изучении АОС БАВ с использованием АБТС^{•+} раствор тролокса (1 мМ) готовили на фосфатном буфере. Растворы хлорогеновой и кофеиновой кислот (0.04 М), а также кверцетина (0.01 М) готовили в этаноле. Полученные раство-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

ры разводили в 50 раз фосфатным буфером. Рутин (0.1 мМ) растворяли непосредственно в буфере, который перемешивали и слегка подогревали на магнитной мешалке. Растворы сухого экстракта мате готовили с использованием фосфатного буфера.

АОС исследуемых объектов определяли также с использованием модифицированного хемилюминесцентного метода на основе системы «АБАП-люминол» [28]. Измерения проводили на 12-канальном хемилюминометре Lum-1200 (ООО «ДиСофт», Россия) с оригинальным программным обеспечением PowerGraph 3.3 Professional (www.powergraph.ru). Реакционная среда имела следующий состав: 10 мкМ люминола и 1 мМ ЭДТА в 50 мМ трис-НСІ-буфере, содержащем 0.14 M NaCl, pH 8.0. Исследуемые пробы предварительно инкубировали в измерительной ячейке хемилюминометра в темноте в течение 5 мин для достижения температуры 37°С. Затем индуцировали окисление люминола добавлением АБАП в конечной концентрации 1 мМ. Водные извлечения из мате и антиоксиданты добавляли в реакционную среду после выхода кинетики свечения модельной системы на стационарный уровень (через 10–15 мин с момента инициирования окисления люминола) и регистрировали латентный период хемилюминесценции. Основной раствор тролокса (2 мМ) готовили с использованием 5% (по объему) раствора диметилсульфоксида в 50 мМ трис-HCl-буфере, содержащем 0.14 М NaCl, pH 8.0. Перед определением АОС основной раствор тролокса разводили буферным раствором до концентрации 25 мкМ. Исходные растворы кверцетина, хлорогеновой и кофеиновой кислот готовили в этаноле в концентрации 0.01 М. Рабочие растворы антиоксидантов (10 мкМ) получали разведением исходных растворов буфером. При постановке контролей на диметилсульфоксид и этанол появления латентного периода хемилюминесценции не наблюдалось. Растворы рутина (0.1 мМ) и сухого экстракта мате готовили с использованием упомянутого выше буферного раствора.

Влияние чая мате на АОС плазмы крови было исследовано с участием восьми практически здоровых добровольцев мужского пола в возрасте 34—50 лет. За три дня до употребления напитка добровольцам было предложено перейти на диету, обедненную полифенольными соединениями, витамином С и другими природными антиоксидантами: не употреблять чайных напитков, приготовленных на основе растительного сырья, исключить кофе, красное вино, фрукты, фруктовые соки, овощи (кроме бананов и картофеля), цельнозерновые продукты (кроме белого хлеба), а также ограничить потребление бобовых, оливкового масла и сухофруктов [29]. Добровольцы были разделены на две группы по четыре человека



Рис. 1. Восстановление АБТС⁺⁺ в присутствии водных извлечений из мате. (а) — Водное извлечение. Уравнение прямой: y = 4.002x + 0.440, $r^2 = 0.999$. (б) — Сухой экстракт. Уравнение прямой: y = 7.188x + 0.347, $r^2 = 0.999$.

в каждой. Первая группа натощак принимала чайный напиток, приготовленный из 4 г мате, вторая — из 8 г мате. Для приготовления чайного напитка соответствующее количество сырья заливали 330 мл кипятка, накрывали крышкой и помещали в водяную баню с температурой 80°С на 30 мин. Затем напиток охлаждали при комнатной температуре в течение 15 мин. Приготовленный напиток испытуемые выпивали в течение 10 мин. Взятие крови (0.4 мл) проводили из пальца до приема чайного напитка, а также через 1 и 2 ч после его употребления. В качестве антикоагулянта применяли ЭДТА из расчета 1.5 мг/мл крови. Плазму крови получали центрифугированием в течение 10 мин при 2000 g и 4°С. Для анализа АОС использовали 10 мкл плазмы крови. Подробное описание методики определения АОС плазмы крови с использованием системы «АБАП-люминол» представлено в работе [28].

Результаты исследований были обработаны с применением стандартных методов вариационной статистики и представлены в форме средней величины и стандартной ошибки среднего $(M \pm m)$, рассчитанных по данным трех и более отдельных экспериментов. Оценку достоверности различий между сравниваемыми показателями проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования была изучена АОС водных извлечений из мате с использованием АБТС^{•+}. Указанный радикал в течение длительного времени остается стабильным в водных растворах, в некоторых органических раствори-

телях (например, в этаноле) и хорошо поглощает в длинноволновой области спектра (более 600 нм) [27], в которой не поглощают большинство БАВ. Восстановление АБТС • + антиоксидантами приводит к снижению оптической плотности исследуемого раствора. На рис. 1 видно, что степень восстановления АБТС^{•+}, представленная как процентное уменьшение D_{734} , увеличивалась прямо пропорционально количеству добавляемого в модельную систему водного извлечения из мате или сухого экстракта мате. Полученные результаты, по-видимому, обусловлены присутствием в водных извлечениях из мате БАВ полифенольной природы, обладающих антирадикальными свойствами [5, 6, 12, 25]. Нами была исследована в тех же условиях АОС некоторых БАВ: кверцетина, рутина, хлорогеновой и кофеиновой кислот, которые обнаружены в водных извлечениях из мате [14]. В качестве стандартного антиоксиданта использовали тролокс. Добавление в модельную систему тролокса и индивидуальных антиоксидантов вызывало дозозависимое восстановление $A Б T C^{++}$ (рис. 2).

АОС БАВ можно определить, используя уравнения линейной регрессии (y = ax + b), описывающие зависимость процентного уменьшения D_{734} раствора АБТС^{•+} от концентрации исследуемого вещества и тролокса. Если при концентрации вещества $C_{\rm B}$ и концентрации тролокса $C_{\rm трол}$ ингибирующие эффекты равны, а коэффициенты *b* в этих уравнениях достаточно малы, справедливо следующее уравнение:

$$a_{\rm B}/a_{\rm TPOJ} = C_{\rm TPOJ}/C_{\rm B},$$

где *a*_в и *a*_{трол} – коэффициенты *a* в уравнениях линейной регрессии для вещества и тролокса соот-

ветственно. Это позволяет рассчитать концентрацию тролокса в мМ (тролокс-эквивалент), которая проявляет такую же антирадикальную активность, как изучаемое вещество в концентрации 1 мМ [30], по формуле:

 $AOC (MM) = (a_{\rm B}/a_{\rm TDOJ})C_{\rm B}.$

В литературе этот показатель антирадикальной активности БАВ, основанный на определении степени обесцвечивания ими АБТС^{•+}, обозначается термином «TEAC» (Trolox equivalent antioxidant capacity) [27]. Данный полход хорошо зарекомендовал себя при оценке АОС экстрактов растительного сырья [30]. Полученные значения АОС водного извлечения из мате и сухого экстракта мате, а также индивидуальных антиоксидантов указаны в таблице. Поскольку концентрации БАВ в водном извлечении и сухом экстракте неизвестны, их АОС представляли в миллимолях тролокса на 1 г сухого растительного сырья или на 1 г сухого экстракта соответственно. Среди исследованных БАВ наибольшую способность к восстановлению АБТС^{•+} проявили кверцетин и ру-тин. Значения АОС у этих флавоноидов практически не различались и были в 3.0-4.5 раза выше, чем у хлорогеновой и кофеиновой кислот (p < 0.05). Указанные пары антиоксидантов обладают сходной молекулярной структурой. Рутин – это гликозид кверцетина с замещенной 3-гидроксигруппой (кверцетин-3-О-рутинозид), тогда как хлорогеновая кислота (5-кофеоилхинная кислота) является сложным эфиром кофеиновой и хинной кислот. Согласно работе [13], существенный вклад в антиоксидантную активность водных экстрактов мате вносит хлорогеновая кислота. Показано, что последняя обладала большей спо-



Рис. 2. Восстановление АБТС^{•+} в присутствии антиоксидантов: *1* – кверцетин, уравнение прямой: *y* = = 17.522*x* + 0.285, $r^2 = 0.998$; *2* – рутин, уравнение прямой: *y* = 16.275*x* + 0.031, $r^2 = 0.997$; *3* – хлорогеновая кислота, уравнение прямой: *y* = 5.524*x* + 0.145, $r^2 = 0.999$; *4* – кофеиновая кислота, уравнение прямой: *y* = 3.898*x* + 0.273, $r^2 = 0.999$; *5* – тролокс, уравнение прямой: *y* = 3.605*x* + 0.031, $r^2 = 0.999$.

собностью к ингибированию пероксидации линолевой кислоты и обесцвечиванию раствора 1,1дифенил-2-пикрилгидразила по сравнению с кофеиновой кислотой и рутином в концентрациях, соответствующих их концентрациям в водных экстрактах мате.

Введение водного извлечения из мате и сухого экстракта мате в модельную систему «АБАП—люминол» приводило к ингибированию свечения и

Значения АОС БАВ и водных извлечений из мате в тролокс-эквивалентах, полученные с использованием АБТС^{•+} и системы «АБАП-люминол»

Объект исследования	AOC (АБТС ^{•+})	АОС (АБАП-люминол)	
Кверцетин	4.86 ± 0.27	4.52 ± 0.20	
Рутин	$4.52 \pm 0.25 \qquad \qquad 4.25 \pm 0.22$		
Хлорогеновая кислота	1.53 ± 0.08	3.81 ± 0.15*	
Кофеиновая кислота	1.08 ± 0.5	3.61 ± 0.15*	
Водное извлечение из мате	1.11 ± 0.07 1.31 ± 0.08		
Сухой экстракт мате	1.99 ± 0.09	2.28 ± 0.11	

Примечание. Значения АОС БАВ представлены в виде концентраций тролокса (мМ), АОС водного извлечения из мате – в миллимолях тролокса на 1 г сухого растительного сырья, АОС сухого экстракта мате – в миллимолях тролокса на 1 г сухого экстракта; * – p < 0.05 по отношению к соответствующему значению АОС (АБТС^{•+}).



Рис. 3. Влияние тролокса и водных извлечений из мате на хемилюминесценцию системы «АБАП-люминол»: 1 – водное извлечение (0.33 мкг сухого растительного сырья/мл); 2 – сухой экстракт (0.4 мкг/мл); 3 – тролокс (2 мкМ). T и $T_{\text{трол}}$ – латентные периоды хемилюминесценции в присутствии исследуемого образца и тролокса соответственно. Стрелкой отмечен момент введения образца или тролокса.

возникновению латентного периода (рис. 3). Появление латентного периода хемилюминесценци, вероятно, обусловлено тем, что антиоксиданты, присутствующие в исследуемых образцах, перехватывают образующиеся в системе водорастворимые радикалы-инициаторы окисления люминола, в качестве которых выступают пероксильные радикалы [31]. Добавление в систему «АБАП—люминол» тролокса также индуцировало появление латентного периода. Наблюдаемый латентный период увеличивался прямо пропорционально количеству вводимого водного извлечения из мате или сухого экстракта (рис. 4). Сходные зависимости были получены при изучении АОС БАВ (рис. 5). Для сравнения на рис. 5 показано изменение латентного периода свечения модельной системы в присутствии тролокса.

Значения АОС исследуемых веществ, водного извлечения из мате и сухого экстракта мате в системе «АБАП—люминол» были представлены в виде тролокс-эквивалентов (таблица), рассчитанных с использованием подхода, описанного для системы с АБТС^{•+}. Вычисляли концентрацию тролокса в мМ, которая вызывает латентный период хемилюминесценции той же длительности, что и изучаемое вещество в концентрации 1 мМ. АОС кверцетина и рутина не различалась. Также не различалась АОС хлорогеновой и кофеиновой кислот. При этом АОС кверцетина была в 1.2–1.3 раза выше по сравнению с хлорогеновой и кофеиновой кислотами (p < 0.05).

Представление АОС БАВ в виде тролокс-эквивалентов позволяет провести сравнение данного показателя не только в пределах одной модельной системы, но и в разных системах. Изученные вещества в порядке уменьшения АОС в обеих модельных системах (АБТС^{•+} и АБАП-люминол) образуют следующий ряд: кверцетин, рутин, хлорогеновая кислота, кофеиновая кислота. Конечно, неправильно ожидать полного совпадения значений АОС исследованных объектов, полученных с помощью этих двух методов. В настоящее время существующие методы определения АОС БАВ разделяют на две группы: 1) основанные на переносе атома водорода от изучаемого ингибитора на радикал (например, метод TRAP – Total radical-trapping antioxidant parameter); 2) oc-



Рис. 4. Изменение латентного периода хемилюминесценции системы «АБАП-люминол» при добавлении в нее водных извлечений из мате. (а) – Водное извлечение. Уравнение прямой: y = 1612.53x + 8.72, $r^2 = 0.999$. (б) – Сухой экстракт. Уравнение прямой: y = 2806.59x + 3.08, $r^2 = 0.999$.



Рис. 5. Влияние антиоксидантов на латентный период хемилюминесценции системы «АБАП—люминол»: *1* – кверцетин, уравнение прямой: y = 5552.83x + 2.67, $r^2 = 0.999$; *2* – рутин, уравнение прямой: y = 5224.75x + 2.15, $r^2 = 0.999$; *3* – хлорогеновая кислота, уравнение прямой: y = 4676.75x + 4.70, $r^2 = 0.999$; *4* – кофеиновая кислота, уравнение прямой: y = 4428.95x + 2.15, $r^2 = 0.999$. На врезке – тролокс, уравнение прямой: y = 1228.55x + 5.62, $r^2 = 0.999$.

нованные на переносе электрона от антиоксиданта на радикал (например, метод FRAP – Ferric reducing antioxidant power). Иногда эти два механизма не могут быть четко дифференцированы. Последнее относится к методу определения антирадикальной активности веществ с использованием $A \ensuremath{\mathsf{BTC}}^{\, \bullet\, +}$, в котором, по мнению некоторых авторов, задействован смешанный механизм [32, 33]. Тем не менее в обеих модельных системах АОС флавоноидов, водного извлечения из мате и сухого экстракта мате имела близкие значения, в то время как значения АОС хлорогеновой и кофеиновой кислот в системе «АБАП—люминол» были соответственно в 2.5 и 3.3 раза больше (p < 0.05), чем в системе с АБТС^{•+}. АОС сухого экстракта мате в системе с АБТС^{•+} и в системе «АБАП—люминол» была в 1.7–1.8 раза выше по



Рис. 6. Влияние однократного употребления чая мате на антиоксидантный потенциал плазмы крови добровольцев. (а) – Изменение АОС плазмы крови через один и два часа после употребления напитка, приготовленного из 4 г (n = 4) и 8 г (n = 4) мате; * – p < 0.05 по отношению к исходному значению. (б) – Изменение кинетики хемилюминесценции системы «АБАП-люминол» при добавлении в нее плазмы крови добровольца, употребившего чай мате (8 г): 1 – исходная кинетика; 2 и 3 – через один и два часа после употребления чая мате. Стрелкой отмечен момент введения плазмы крови.

сравнению со значениями АОС водного извлечения (p < 0.05).

Обнаруженная нами и другими авторами [5, 6, 11-13] антирадикальная активность водных извлечений из мате позволяет предположить, что содержащиеся в них вещества будут проявлять эти свойства при поступлении в организм человека. Нами было изучено изменение АОС плазмы крови у здоровых добровольцев после однократного употребления напитка, приготовленного из 4 и 8 г мате (рис. 6а). В первом случае (4 г) через наблюдалась тенденция к повышению 1ч этого показателя по отношению к исходному значению – прирост АОС составил 7.4%. Во втором случае (8 г) через 1 ч АОС плазмы крови увеличилась на 14.5% (*p* < 0.05), через 2 ч увеличение составило 8.9% (*p* < 0.05). На рис. 6б показаны кинетики хемилюминесценции системы «АБАП-люминол» в присутствии плазмы крови добровольца до и после однократного употребления чая, приготовленного из 8 г мате. Видно, что добавление в модельную систему плазмы крови, полученной через 1 и 2 ч после употребления напитка, привело к увеличению латентного периода хемилюминесценции. Наблюдаемый во второй группе эффект, вероятно, обусловлен повышением в плазме крови добровольцев содержания полифенольных антиоксидантов, при этом основная роль, по-видимому, принадлежит кофеиновой кислоте и ее метаболитам. В экспериментах на крысах показано [34], что кофеиновая кислота была основным соединением, обнаруживаемым в плазме крови в течение первых двух часов после внутрижелудочного введения животным чая мате. Это может быть связано не только с прямой абсорбцией кофеиновой кислоты в желудке, но и с ее образованием в результате ферментативного расщепления в желудке моно- и дикофеоилхинных кислот. В работе [29] определяли концентрацию полифенольных соединений и их метаболитов в плазме крови здоровых людей после однократного употребления чая мате (4.91 г мате на порцию чая). Среди наиболее ранних метаболитов обнаружены сульфатные конъюгаты кофеиновой и феруловой кислот, максимальная концентрация которых наблюдалась через 1-2 ч после употребления напитка. Следует отметить, что по данным того же исследования на долю моно- и дикофеоилхинных кислот приходится более 80% от всех полифенольных соединений, обнаруженных в водных извлечениях из мате. Полученные нами результаты находятся также в хорошем соответствии с работами [16, 22], авторы которых наблюдали усиление торможения Cu²⁺-индуцированного процесса пероксидного окисления липидов липопротеинов низкой плотности в цельной плазме крови добровольцев через 1 ч после приема чая мате.

Следует отметить, что в исследованиях, посвященных изучению влияния чая мате на АОС плазмы/сыворотки крови человека, увеличение этого показателя было зарегистрировано только при длительном употреблении чая [22, 24], тогда как после однократного употребления напитка достоверных изменений АОС установлено не было [22, 35]. В работе [22] показано, что после 7-дневного употребления здоровыми женщинами чая мате происходило повышение АОС плазмы крови (определяли методом ТЕАС), уменьшение содержания в плазме крови ТБК-РП, увелигенов антиоксидантных чение экспрессии ферментов – глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы. Увеличение АОС сыворотки крови (определяли методом FRAP), а также уровня восстановленного глутатиона в крови выявлено у лиц с дислипопротеинемией, употреблявших чай мате в течение 90 дней [24]. При этом для приготовления одной порции чая брали близкое к используемому нами количество мате -5.0-6.6 г. В отличие от перечисленных выше исследований мы обнаружили увеличение АОС плазмы крови добровольцев после однократного употребления чая мате. Возможно, это связано с тем, что определение АОС плазмы крови проводилось другим методом – регистрацией хемилюминесценции люминола, индуцированной АБАП.

В настоящее время применение сухих экстрактов мате в качестве биологически активной добавки к пище рассматривается в качестве альтернативы употреблению чайного напитка [23, 36]. Такая биологически активная добавка, содержащая комплекс природных полифенольных соединений, может быть полезной для профилактики заболеваний сердечно-сосудистой системы [24, 37]. Кроме того, использование сухих экстрактов мате имеет ряд преимуществ перед чайным напитком. К ним относится возможность хранения, а также дозированного применения выделенных БАВ. В работе [23] было исследовано влияние длительного приема здоровыми добровольцами капсул, содержащих сухой экстракт мате, полученный с помощью распылительной сушилки. Прием капсул добровольцами (2.25 г в день в течение 60 дней), с одной стороны, сопровождался увеличением биомаркеров антиоксидантной защиты – АОС сыворотки крови (определяли методом FRAP), уровня восстановленного глутатиона крови, активности некоторых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, па-

раоксоназы-1), с другой стороны, уменьшением биомаркеров оксидативного стресса — содержания в плазме крови липидных гидропероксидов и ТБК-РП. Важно отметить, что при приеме капсул с экстрактом мате основные клинико-инструментальные (ЭКГ, артериальное давление крови) и лабораторные показатели у испытуемых оставались в пределах нормы в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, водные извлечения из мате, а также некоторые соединения полифенольной природы, содержащиеся в составе этих извлечений, проявляли *in vitro* антирадикальные свойства в отношении АБТС^{•+} и водорастворимых пероксильных радикалов. Методом кинетической хемилюминесценции с применением системы «АБАП—люминол» установлено повышение АОС плазмы крови добровольцев после однократного употребления чая мате. Полученные результаты показывают, что на основе водных извлечений из йерба мате могут быть изготовлены эффективные фитопрепараты для профилактики и лечения заболеваний, ассоциированных с оксидативным стрессом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От всех участников предварительно было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- L. Zuo, E. R. Prather, M. Stetskiv, et al., Int. J. Mol. Sci. 20 (18), 4472 (2019).
- A. Singh, R. Kukreti, L. Saso, and S. Kukreti, Molecules 24 (8), 1583 (2019).
- 3. I. Uchmanowicz, Adv. Exp. Med. Biol. **1216**, 65 (2020).
- A. Chandrasekara and F. Shahidi, J. Tradit. Complement. Med. 8 (4), 451 (2018).
- S. Dudonné, X. Vitrac, P. Coutière, et al., J. Agric. Food Chem. 57 (5), 1768 (2009).
- K. A. Berté, M. R. Beux, P. K. Spada, et al., J. Agric. Food Chem. 59 (10), 523 (2011).
- 7. C. I. Heck and E. G. de Mejia, J. Food Sci. **72** (9), R138 (2007).
- 8. N. Bracesco, A. G. Sanchez, V. Contreras, et al., J. Ethnopharmacol. **136** (3), 378 (2011).

- A. T. Valduga, I. L. Gonçalves, E. Magri, and J. R. Delalibera Finzer, Food Res. Int. 120, 478 (2019).
- 10. R. Y. Gan, D. Zhang, M. Wang, and H. Corke, Nutrients **10** (11), 1682 (2018).
- 11. D. H. Bastos, L. A. Saldanha, R. R. Catharino, et al., Molecules **12** (3), 423 (2007).
- M. Bixby, L. Spieler, T. Menini, and A. Gugliucci, Life Sci. 77 (3), 345 (2005).
- C. Anesini, S. Turner, L. Cogoi, and R. Filip, LWT Food Science and Technology 45, 299 (2012).
- M. Bojić, V. Simon Haas, D. Sarić, and Z. Maleš, J. Anal. Methods Chem. 2013, 658596 (2013).
- 15. G. R. Schinella, G. Troiani, V. Dávila, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **269** (2), 357 (2000).
- A. Gugliucci, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 (2), 338 (1996).
- 17. N. Bracesco, M. Dell, and A. Rocha, J. Altern. Complement. Med. 9 (3), 379 (2003).
- F. Martins, A. J. Suzan, S. M. Cerutti, et al., Br. J. Nutr. 101 (4), 527 (2009).
- 19. L. Bravo, R. Mateos, B. Sarriá, et al., Fitoterapia **92**, 219 (2014).
- 20. L. F. González Arbeláez, J. C. Fantinelli, A. Ciocci Pardo, et al., Food Funct. 7 (2), 816 (2016).
- A. C. Colpo, M. E. de Lima, M. Maya-López, et al., Appl. Physiol. Nutr. Metab. 42 (11), 1172 (2017).
- R. L. Matsumoto, D. H. Bastos, S. Mendonça, et al., J. Agric. Food Chem. 57 (5), 1775 (2009).
- 23. A. M. Becker, H. P. Cunha, A. C. Lindenberg, et al., Plant Foods Hum. Nutr. **74** (4), 495 (2019).
- B. C. Boaventura, P. F. Di Pietro, A. Stefanuto, et al., Nutrition 28 (6), 657 (2012).
- W. Y. Huang, P. C. Lee, J. C. Hsu, et al., Sci. World J. 2014, 768742 (2014).
- R. G. Peres, F. G. Tonin, M. F. Tavares, and D. B. Rodriguez-Amaya, Molecules 18 (4), 3859 (2013).
- R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., Free Radic. Biol. Med. 26 (9-10), 1231 (1999).
- Yu. O. Teselkin, I. V. Babenkova, and A. N. Osipov, Biophysics 64 (5), 708 (2019).
- M. Gómez-Juaristi, S. Martínez-López, B. Sarria, et al., Food Chem. 240, 1028 (2018).
- 30. N. Erkan, G. Ayranci, and E. Ayranci, Food Chem. **110** (1), 76 (2008).
- 31. L. M. Magalhaes, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. Lima, Anal. Chim. Acta **613** (1), 1 (2008).
- R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, J. Agric. Food Chem. 64 (5), 997 (2016).
- R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, J. Agric. Food Chem. 64 (5), 1028 (2016).
- D. M. de Oliveira, C. B. Pinto, G. R. Sampaio, et al., J. Agric. Food Chem. 61 (25), 6113 (2013).
- B. C. B. Boaventura, E. L. da Silva, R. H. Liu, et al., LWT – Food Sci. Technol. 62, 948 (2015).
- S. Y. Kim, M. R. Oh, M. G. Kim, et al., BMC Complement. Altern. Med. 15, 338 (2015).
- 37. S. Yu, S. W. Yue, Z. Liu, et al., Exp. Gerontol. **62**, 14 (2015).

Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Yerba Mate (Ilex paraguariensis)

Yu.O. Teselkin, I.V. Babenkova, L.A. Pavlova, A. Lee, A.A. Kochetova, A.N. Osipov, and Yu.A. Vladimirov

Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

The antioxidant capacity of aqueous extracts from yerba mate and some polyphenolic components of mate (quercetin, rutin, chlorogenic and caffeic acids) was studied. Aqueous extracts from the mate in a dose-dependent manner had discolored 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) radical cations and had caused the appearance of the latent period of luminol chemiluminescence induced by 2,2'-azobis(2amidinopropane)dihydrochloride. The studied substances, in the order of decreasing of antioxidant capacity, the which was presented as trolox equivalent, in both model systems made up the following sequence: quercetin, rutin, chlorogenic acid, caffeic acid. Quercetin had better antioxidant capacity than chlorogenic and caffeic acids. Using a chemiluminescence-based assay, it was found that the antioxidant capacity of blood plasma in healthy volunteers increased one and two hours after one intake of tea beverage made from 8 g mate. The results show that aqueous extracts from yerba mate can be used to create herbal drugs with antioxidant effects.

Keywords: yerba mate, Ilex paraguariensis, polyphenolic compounds, chlorogenic acid, caffeic acid, antioxidants, antioxidant capacity, blood serum, chemiluminescence, TEAC

УДК 57.05, 577.353, 539.3

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СТЕНКИ РЕЗИСТИВНОГО МОЗГОВОГО СОСУДА КРЫСЫ

© 2021 г. Н.Х. Шадрина

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6 E-mail: nkhsh@yandex.ru Поступила в редакцию 01.09.2020 г. После доработки 01.09.2020 г. Принята к публикации 10.09.2020 г.

Представлена математическая модель механических свойств стенки мелкой мозговой артерии крысы. Предполагается, что активная составляющая напряжения имеет окружное направление и является функцией концентрации активатора сокращений гладкомышечных клеток и окружного и радиального растяжений, продольные растяжения не рассматриваются. Расчеты показали существенное снижение как окружного напряжения, так и окружного растяжения в сосудистой стенке после активации, распределение этих величин в трансмуральном направлении становится более однородным. Активная составляющая оказывает преобладающее влияние на формирование общего напряжения. Окружная компонента напряжения в несколько раз превышает радиальную и продольную. Модуль отношения радиальной компоненты напряжения к окружной в результате активации увеличивается, прослеживается тенденция к уменьшению его величины с ростом окружного растяжения. Численный анализ выявил высокую чувствительность и радиуса, и напряжения даже к небольшому изменению значений параметров, входящих в функциональную зависимость напряжения от концентрации активатора сокращений гладких мышц.

Ключевые слова: резистивный сосуд, напряжение в сосудистой стенке, сокращение гладких мышц, концентрация свободных ионов кальция.

DOI: 10.31857/S0006302921010178

Гладкомышечные клетки в сосудистой стенке играют важную роль в регуляции кровотока и оказывают существенное влияние на механические свойства как крупных, так и мелких (резистивных) артериальных сосудов [1]. К настоящему времени имеется достаточно много математических моделей, описывающих механические свойства крупных артерий на основе экспериментальных данных (см., например, работы [2-4], также обзоры [5-7]). В неактивированном состоянии материал стенки считается гиперупругим, напряжение в активированном сосуде представляется суммой активной и пассивной составляющих. Пассивная часть напряжений описывается с помощью функции плотности энергии деформаций, активная – функцией растяжений и концентрации кальция, основного активатора сокращений гладкомышечных клеток. Зависимость активных напряжений от растяжений исследовалась в экспериментах на сегментах крупных артериальных сосудов [2, 4, 8]. Существующие модели с разной степенью подробности описывают внутреннюю структуру сосудистой стенки. При двухслойном описании отдельно рассматриваются напряжения в адвентиции и

среднем слое (медии) [4], при трехслойном – в рассмотрение вводится также внутренний слой (интима) [9, 10]. Часть исследований учитывает ориентацию волокон эластина, коллагена и гладкомышечных клеток [3, 7, 11]. Однако зависимость активных напряжений от концентрации кальция в приведенных публикациях не рассматривалась. Этот параметр присутствовал в качестве постоянного множителя, чаще всего активные напряжения рассматривались при максимальной активации гладких мышц. Другой подход к моделированию активных напряжений при рассмотрении толстостенных сосудов состоит в использовании многомасштабного моделирования [11–14]. Модели этой группы включают кинетические уравнения, описывающие четыре состояния головок миозина в сократительной единице гладкомышечной клетки. В более простом случае переход от микромасштабного уровня к макромасшабному осуществляется введением доли присоединенных мостиков в качестве одного из множителей функции энергии деформаций [11]. При более сложном описании кроме молекулярного и тканевого уровней вводится промежуточный, клеточный уровень, описывающий процесс прикрепления миозиновых головок к актиновым нитям [15]. Все упомянутые исследования используют экспериментальный материал, полученный на сегментах крупных со-судов.

Цель представленной работы состояла в описании механических свойств малого артериального сосуда. Именно в таких сосудах происходит наибольшее падение артериального давления [16]. В этих сосудах, называемых резистивными, наблюдается миогенный эффект Остроумова-Бейлисса [17], характеризующийся наличием палаюшего участка на статической кривой «радиус-давление». Из-за трудностей в проведении необходимых измерений число экспериментальных исследований механических свойств мелких артерий весьма ограничено. Этим объясняется использование тонкостенной постановки задач при рассмотрении регуляции в мелких артериях [18, 19], тогда как геометрические параметры резистивных сосудов требуют рассмотрения, учитывающего конечную толщину стенок. На основе имеющихся в литературе экспериментальных данных [20] ранее нами было представлено описание распределения напряжений в стенке дистальной ветви задней мозговой артерии крысы [21, 22]. Поскольку результаты измерений активной составляющей напряжения в церебральном сосуде крыс удалось обнаружить только в исследовании [23], где полученный материал представлен в виде зависимости активного напряжения от эффективного сосудистого радиуса, в работах [21, 22] активную составляющую напряжения полагали зависящей от нормированной радиальной координаты и концентрации кальция в гладкомышечных клетках. При таком предположении с использованием данных экспериментальной работы [20] была получена зависимость активной составляющей напряжения от концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток (C_{Ca}). Авторы работы [20] в деактивированном сосуде регистрировали диаметр дистальных ветвей задней мозговой артерии крысы, а в активированном сосуде дополнительно измеряли концентрацию кальция в цитоплазме и мембранный потенциал гладкомышечных клеток при разных значениях внутрисосудистого давления (*p*) в диапазоне 0÷100 мм рт. ст. Другую часть экспериментов проводили при фиксированном значении p = 60 мм рт. ст., но варьировали значение мембранного потенциала, регулирующего поступление кальция в клетку. Был сделан вывод, что повышение давления снижает мембранный потенциал, в результате чего открываются кальциевые каналы и кальций поступает из внеклеточного пространства, что приводит к активации и сокращению гладкомышечных клеток.

Ниже предлагается физически более естественный по сравнению с работами [21, 22] подход, при котором активные напряжения определяются растяжениями и концентрацией активатора сокращений гладкомышечных клеток. В качестве активатора выступают свободные ионы кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток. В рассматриваемой здесь задаче предполагается, что концентрация активатора сокращений определяется трансмуральным давлением (разностью давлений на внутренней и внешней стенке сосуда), а участие мембранного потенциала в явном виде не учитывается.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Рассмотрим сосуд, форма которого мало отличается от цилиндрической, стенка считается однослойной, материал стенки — несжимаемым. Вводим цилиндрическую систему координат: r, θ , z — радиальная, окружная и продольная (вдоль оси сосуда) координаты. Перемещения в стенке считаются осесимметричными и описываются тензором деформаций Грина:

$$\varepsilon_{ii} = \frac{1}{2} (\lambda_{ii}^2 - 1), \ i = r, \theta, z, \ \varepsilon_{ij} \equiv 0$$
 при $i \neq j,$ (1)

$$\lambda_{\theta\theta} \equiv \lambda_{\theta} = \frac{r}{r_0}, \ \lambda_{rr} \equiv \lambda_r = \frac{dr}{dr_0}, \ \lambda_{zz} \equiv \lambda_z = \frac{z}{z_0},$$
(2)

где λ_{ii} — растяжения в соответствующем направлении, r_0 и z_0 — радиальная и продольная координаты в ненагруженном ненапряженном состоянии. Из-за отсутствия данных о геометрических параметрах малых артериальных сосудов в ненапряженном состоянии остаточные напряжения не учитываются, полагается, что ненапряженное состояние совпадает с ненагруженным, т.е. с состоянием при p = 0. По той же причине не рассматриваем продольные растяжения, т.е. $\lambda_{zz} = 1$.

Полное напряжение в сосудистой стенке равно сумме пассивной и активной составляющих. Материал стенки при отсутствии активации полагается гиперупругим. Активное напряжение развивается в направлении ориентации миозиновых нитей в гладкомышечных клетках. В резистивных сосудах они ориентированы преимущественно в окружном направлении [24, 25], поэтому будем считать, что гладкомышечные сокращения дают вклад только в окружное напряжение, а активная составляющая напряжения в двух других направлениях пренебрежимо мала, т.е. компоненты напряжения имеют вид:

$$\sigma_{rr} \equiv \sigma_r = q + \sigma_r^{(p)}, \ \sigma_{\theta\theta} \equiv \sigma_{\theta} = q + \sigma_{\theta}^{(p)} + \sigma_{\theta}^{(a)}, \ \sigma_{zz} \equiv \sigma_z = q + \sigma_z^{(p)}.$$
(3)

Верхние индексы (*p*) и (*a*) обозначают пассивную и активную составляющую напряжения соответственно, *q* — множитель Лагранжа, имеющий смысл гидростатического давления. Компо-

ненты пассивной составляющей напряжения Коши, как и в [22], определяются из функции энергии деформаций *W*:

$$\sigma_r^{(p)} = \lambda_r^2 \frac{\partial W}{\partial \varepsilon_{rr}}, \ \sigma_{\theta}^{(p)} = \lambda_{\theta}^2 \frac{\partial W}{\partial \varepsilon_{\theta\theta}}, \ \sigma_z^{(p)} \equiv 0,$$
(4)

$$W = \frac{A}{2} \exp(Q), \ Q = \exp\left(a_1 \varepsilon_{\theta\theta}^2 + a_2 \varepsilon_{rr}^2 + 2a_3 \varepsilon_{rr} \varepsilon_{\theta\theta}\right).$$
(5)

Поскольку $\lambda_{zz} = 1$, соответствующая компонента деформации $\varepsilon_{zz} = 0$, она не входит в число аргументов функции *W*.

Активная составляющая напряжения $\sigma_{\theta}^{(a)}$ представляется произведением двух функций. Одна из них зависит от растяжений, вторая — от концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток:

$$\sigma_{\theta}^{(a)} = S_{\rm sm} f(\lambda_r, \lambda_{\theta}) \Psi(C_{\rm Ca}), (6)$$
(6)

где $S_{\rm sm}$ — константа, равная доле площади поперечного сечения сосуда, приходящейся на гладкомышечный слой. Функциональная зависимость $f(\lambda_r, \lambda_{\theta})$ записывается аналогично той, которая была найдена в экспериментах на сегментах коронарных артерий свиньи [4, 26]:

$$f = g_1 \lambda_\theta \exp\left(-\left(\frac{\lambda_\theta}{g_2} + \frac{\lambda_r}{g_3} - g_4\right)^2\right), \quad (7)$$

где g_i — постоянные параметры.

Если не учитывать влияние радиального растяжения на $\sigma_{\theta}^{(a)}$, то при замене λ_{θ} на относительный радиус соотношение (7) совпадает с функцией f(r) в работах [21, 22], полученной в результате аппроксимации зависимости активной части среднего окружного напряжения от «эффективного» радиуса. Эта зависимость является результатом исследований, проводившихся на сегментах церебральной артерии крысы [23].

Вид функции $\Psi(C_{Ca})$ для рассматриваемого сосуда был получен в предыдущих работах [21, 22]:

$$\Psi = 1 - \frac{g_5}{1 + \exp(g_6(C_{\text{Ca}} - g_7))}.$$
 (8)

Коэффициенты g_i (*i*=1,...,7) в уравнениях (7) и (8) – константы, которые предстоит определить.

Для статической задачи уравнения равновесия и несжимаемости для материала стенки суть:

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

$$\frac{\partial \sigma_r}{\partial r} + \frac{\sigma_r - \sigma_{\theta}}{r} = 0, \tag{9}$$

$$\lambda_r \lambda_0 \lambda_z = 1. \tag{10}$$

Без ограничения общности можно считать, что внешнее давление на стенке сосуда равно нулю, а трансмуральное давление равно внутрисосудистому. Граничные условия на стенках сосуда запишутся как

$$\sigma_r = -p, r = r_i; \sigma_r = 0, r = r_i + h,$$
 (11)

где r_i и h — текущие значения внутреннего радиуса и толщины стенки, p — внутрисосудистое давление.

МЕТОД РЕШЕНИЯ И ЧИСЛЕННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ

Вычисления проводили с использованием экспериментальных данных, полученных на ветвях задней мозговой артерии крысы авторами работы [20]. Других работ, содержащих измерения необходимых для построения модели параметров, нам не удалось обнаружить. При нулевом внутрисосудистом давлении внутренний радиус рассматриваемого сосуда $r_{0_i} = 35$ мкм, толщина стенки $h_0 = 16.5$ мкм. Значение r_{0_i} получено аппроксимацией зависимости радиуса пассивного сосуда от внутрисосудистого давления.

Из уравнений (2) и (10) следует равенство:

$$r^2 = r_0^2 + C, (12)$$

где C — скалярная величина, меняющая свое значение с изменением трансмурального давления, ее предстоит определить.

Для определения значений параметров *A* и a_i (*i* = 1, 2, 3) в соотношении (5) решается уравнение (9) для пассивного сосуда при $\sigma_{\theta}^{(a)} = 0$ (см. работу [22]). С учетом равенств (1)–(5) и граничного условия на внешней стенке сосуда имеем:

$$\sigma_{r_{\text{pas}}} = \frac{A}{2C} \left\{ \left(r_{0_i} + h_0 \right)^2 \exp\left(Q\left(r_{0_i} + h_0 \right) \right) - r_0^2 \exp\left(Q\left(r_0 \right) \right) - \int_{r_0}^{r_{0_i} + h_0} \exp\left(Q\left(r_0 \right) \right) dr_0^2 \right\},\tag{13}$$

$$Q(y) = \frac{C^2}{4} \left(\frac{a_1}{y^4} + \frac{a_2}{\left(y^2 + C\right)^2} - \frac{2a_3}{y^2 \left(y^2 + C\right)} \right).$$
(14)

Далее используется граничное условие на внутренней стенке. Минимизация суммы квадратов отклонений вычисленных $\sigma_{r_{\text{pas}}}$ на внутренней стенке сосуда ($r_0 = r_{0_i}$) от соответствующих экспериментальных значений дав-

ления в работе [20] приводит к следующему результату: A = 44.5 кПа, $a_1 = 0.1423$, $a_2 = 0.0142$, $a_3 = 0.045$.

Решение уравнения (9) для активного сосуда представляется как

$$\sigma_r = \sigma_{r_{\text{pas}}} + S_{\text{sm}} g_1 \left(1 - \frac{g_5}{1 + \exp\left(g_6(C_{\text{Ca}} - g_7)\right)} \right) \int_{r_{0_1 + h_0}}^{r_0} \frac{r_0}{r_0^2 + C} \lambda_\theta \exp\left(-\left(\frac{\lambda_\theta}{g_2} + \frac{\lambda_r}{g_3} - g_4\right)^2\right) dr_0.$$
(15)

Значения неизвестных коэффициентов g_i (i = 1,...,7) в этих соотношениях определяются с использованием того же граничного условия (11) на внутренней стенке и экспериментальных значений *C* и *C*_{Ca} для активного сосуда. В результате минимизации суммы квадратов разностей между σ_r на внутренней стенке и соответствующим значением *p* получены следующие значения: $g_1 =$ = 752.7 кПа, $g_2 = 1.49, g_3 = 6.65, g_4 = 2.49, g_5 = 1.02,$ $g_6 = 0.036$ нМ⁻¹, $g_7 = 187.34$ нМ. Все вычисления проведены с помощью программы MatLab. Поиск неизвестных значений численных параметров осуществляли с использованием MatLab Global Optimization Toolbox.

После того как значения параметров в $\sigma_{\theta}^{(a)}$ были определены, из уравнения (2.4) и усло-

вия равенства радиального напряжения на внутренней стенке внутрисосудистому давлению вычисляли значения C для активного сосуда. Имея значения C, можно вычислить радиальную координату любой точки в стенке и распределение радиального напряжения σ_r в стенке активного сосуда. Из соотношений (3)–(5) с использованием равенств (1) и (2) определяется множитель Лагранжа:

$$q = \sigma_r - \frac{AC}{2} \left(\frac{a_3}{r_0^2 + C} - a_2 \frac{r_0^2}{\left(r_0^2 + C\right)^2} \right) \exp Q. \quad (16)$$

Окружная составляющая напряжения из соотношений (3) – (7) вычисляется по формуле:

$$\sigma_{\theta} = q + \frac{AC}{2} \left(a_1 \frac{r_0^2 + C}{r_0^4} - \frac{a_3}{r_0^2} \right) \exp Q + S_{\rm sm} g_1 \lambda_{\theta} \exp \left(- \left(\frac{\lambda_{\theta}}{g_2} + \frac{\lambda_{\rm r}}{g_3} - g_4 \right)^2 \right) \Psi(C_{\rm Ca}). \tag{17}$$

Значение $S_{\rm sm}$ полагали равным 0.694, исходя из данных гистологических исследований, приведенных в работе [27].

При исследовании чувствительности модели к изменениям значений коэффициентов b_i в функциональной зависимости $\Psi(C_{Ca})$ сначала из первого граничного условия (11) определяли значения C для измененного значений b_i . Поскольку в данной модели значение C_{Ca} жестко связано с трансмуральным давлением, в вычислениях при фиксированном p использовали и соответствующее ему значение C_{Ca} , полученное в эксперименте [20]. Затем из уравнений (12) и (17) вычисляли *r* и σ_{θ} .

На приводимых ниже рисунках, демонстрирующих изменения вычисленных величин по толщине стенки, по оси абсцисс отложена нормированная радиальная координата $\xi = (r_0 - r_{0_i}) / h_0$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчеты показали, что активация гладких мышц приводит к существенному снижению как



Рис. 1. Трансмуральное распределение радиального (а), окружного (б) и продольного (в) напряжений в неактивированном (1) и активированном (2) сосудах при $p = 8 \kappa \Pi a$.

окружного напряжения, так и его градиента в радиальном направлении (рис. 1б). Распределение радиального и продольного напряжений в результате активных сокращений становится более линейным (рис. 1а,в). В рассматриваемом случае продольное напряжение совпадает с множителем Лагранжа.

Из уравнений (15) и (16) следует, что активация влияет на σ_r и гидростатическое давление q, несмотря на то что, по предположению, активная составляющая входит только в окружное напряжение. Если рассмотреть отдельно часть напряжения, обусловленную сокращением гладкомышечных клеток, и остальную часть, развиваемую пассивным материалом стенки, то оказывается, что активная часть и радиального (рис. 2а), и окружного (рис. 2б) напряжений многократно превышает пассивную. Поскольку в рассматриваемом случае изменение концентрации кальция обусловлено изменением трансмурального давления, то повышение давления сопровождается увеличением C_{Ca} . С ростом концентрации кальция увеличивается и вклад активных напряжений (ср. линии 2(I) и 2(II) на рис. 2), пассивная же



Рис. 2. Зависимости пассивной (*1*) и активной (*2*) части радиального (а) и окружного (б) напряжений от радиальной координаты. Расчеты при p = 5.3 кПа (I) и 10.7 кПа (II).



Рис. 3. Распределение окружного растяжения по толщине сосудистой стенки в пассивном (*I*) и активном (*2*) сосуде при $p = 5.3 \text{ к}\Pi a$ (I) и 10.7 к Πa (II).

часть напряжений (рис. 2, линии *l*(I) и *l*(II)) соответственно убывает.

Окружное растяжение в активированном сосуде также заметно меньше, чем в пассивном (рис. 3). В рассмотренном диапазоне давлений это различие растяжений увеличивается с ростом внутрисосудистого давления. Активация снижает степень неоднородности окружных растяжений в радиальном направлении, эта тенденция яснее прослеживается при большей степени активации (ср. линии 1(II) и 2(II) на рис. 3).

В активированном сосуде модуль отношения радиального напряжения к окружному имеет

максимальное значение на внутренней стенке, монотонно снижаясь по мере приближения к внешней стенке, с ростом давления это отношение увеличивается (рис. 4а). Результаты расчетов показали, что в неактивированном и активированном сосудах этот параметр убывает с ростом окружных растяжений (рис. 4б), но в активированном сосуде отношение σ_r/σ_θ заметно выше.

В качестве критерия чувствительности модели к варьированию значений коэффициентов g_5-g_7 , входящих в функцию $\Psi(C_{\text{Ca}})$, рассматривали соответствие зависимости статического радиуса от трансмурального давления поведению сосуда с реакцией Остроумова—Бейлисса. Расчеты с измененными значениями того или иного параметра g_i сравнивали с результатами вычислений радиуса и окружного напряжения для исходных значений параметров g_i , приведенных выше.

Чем меньше параметр g_5 , тем больше величина активных напряжений на начальном этапе развития миогенного тонуса. Численный анализ показал, что даже незначительное (на 3%) уменьшение этого параметра приводит к снижению радиуса на 15% при отсутствии нагрузки, т.е. при p = 0. Увеличение же g_5 даже на 3%, приводит к абсурдному результату: в активном сосуде в ненагруженном состоянии радиус больше, чем после нагружения, т.е. при p > 0.

Коэффициент g_6 характеризует степень сжатия/расширения диапазона значений концентрации кальция, при котором напряжение в стенке увеличивается с ростом концентрации активатора: повышение/снижение g_6 сопровождается



Рис. 4. Зависимости $|\sigma_p/\sigma_0|$ от радиальной координаты в активном сосуде (a) при p = 5.3 кПа (I) и 10.7 кПа (II) и от окружного растяжения в середине сосудистой стенки (б) в пассивном (*1*) и активном (*2*) сосудах.





Рис. 5. Влияние изменений g_6 на зависимость внутреннего радиуса (а) и окружного напряжения (б) в среднем слое сосудистой стенки от давления при расчетном значении g_6 (сплошная линия), $g_6 + 5\%$ (1), $g_6 + 20\%$ (2), $g_6 - 5\%$ (3), $g_6 - 20\%$ (4).

сужением/расширением диапазона. С ростом g₆ радиус сосуда до момента проявления миогенной реакции увеличивается быстрее, а в результате ее развития становится меньше, чем при исходном значении g_6 (см. рис. 5а). Окружное и радиальное напряжения незначительно меняются при небольших отклонениях g_6 , изменение на 20% приводит к большим различиям (рис. 5б). Наиболее отчетливо различие проявляется при малых давлениях, до развития миогенной реакции, но при *p* > 5 кПа в области давлений, где миогенная реакция «работает», относительное отклонение напряжения от исходного не превышает 5.5%. Изменение параметра g6 больше чем на 20% приводит к результатам, не соответствующим экспериментам.

Варьирование коэффициента g_7 сопровождается сдвигом диапазона значений концентрации кальция, при которых происходит рост $\sigma_{\theta}^{(a)}$. И радиус сосуда, и окружное напряжение достаточно чувствительны к изменениям этого параметра (см. рис. 6). При изменении g_7 лишь на 3% исчезает область давлений, где радиус практически не меняется (рис. 6а, линии 1 и 3). В рассмотренном диапазоне давлений 0÷13.3 кПа при росте g_7 радиус увеличивается в начале диапазона, а затем монотонно снижается (рис. 6а, линии 1 и 2), при уменьшении g_7 ниже расчетного значения область давлений, при которых сосуд сужается, сменяется диапазоном, соответствующим расширению сосуда (рис. 6а, линии 3 и 4).

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленная модель описывает активные напряжения в стенке мелкого церебрального сосуда в предположении, что удлинение вдоль сосуда отсутствует, а сокращение гладкомышечных клеток происходит в одном (окружном) направлении. Зависимость активной составляющей окружного напряжения от растяжений $f(\lambda_i)$ используется в виде, полученном из экспериментов на свиных коронарных сосудах [4, 26]. Значения входящих в нее коэффициентов установлены аппроксимацией опытных данных для рассматриваемого сосуда. В предыдущих наших работах [21, 22] удалось получить функциональную зависимость активного напряжения от Сса для малой артерии. Вид функции $\Psi(C_{Ca})$ оказался аналогичным зависимости активного напряжения от концентрации внешнего кальция, полученной в работах[11, 12] с привлечением кинетических уравнений для четырех состояний миозиновых головок. В этих работах один из коэффициентов кинетических уравнений задавали как функцию концентрации внешнего кальция, а зависимость активного напряжения от Сса получали в результате вычислений. В описываемой здесь модели коэффициенты, входящие в $\sigma_{\theta}^{(a)}$, определяли аппроксимацией опытных данных для малой артерии. Соответствие представленной модели экспериментальным данным показано на рис. 6а. Расчетная зависимость радиуса активного сосуда от давления (рис. 6а, сплошная линия) проходит через экспериментальные точки.

ШАДРИНА



Рис. 6. Зависимости внутреннего радиуса (а) и окружного напряжения в среднем слое стенки (б) от давления при расчетном значении g_7 (сплошная линия), $g_7 + 3\%$ (1), $g_7 + 7\%$ (2), $g_7 - 3\%$ (3), $g_7 - 7\%$ (4). Значками обозначены экспериментальные точки.

Расчеты показали, что в результате активации существенно снижается окружное напряжение, его распределение в трансмуральном направлении становится более однородным, что согласуется с выводами, полученными для крупных артерий [4, 7, 15, 28]. Такой же результат был получен ранее для малой артерии, когда активную составляющую напряжения представляли функцией относительного радиуса и ССа [21, 22]. Относительно знака градиента окружного напряжения в радиальном направлении выводы разных авторов не совпадают. Рис. 1б и 2б демонстрируют снижение окружного напряжения в активном сосуде по мере удаления от внутренней стенки. Аналогичный результат был получен на основе многомасштабной модели, учитывающей и продольные деформации [15]. Рассмотрение трехмерной модели, включающей описание свойств волокон эластина, коллагена и гладкомышечных клеток [3], показало, что знак радиального градиента окружного напряжения зависит от величины окружного растяжения: при $\lambda_{\theta} = 1.24$ зависимость $\sigma_{\theta}(r_0)$ возрастающая, при $\lambda_{\theta} = 1.6$ — убывающая. Вычисления проводили для коронарных артерий свиньи. Для тех же сосудов при трехмерном рассмотрении двухслойной модели сосудистой стенки получен положительный градиент окружного напряжения в радиальном направлении [4]. Заметим, что в работах [3, 4] авторы рассматривали максимально сокращенный сосуд, в нашем случае степень активации была заведомо ниже. Для малой артерии представление f в уравнении (6) как функции относительного радиуса привело к выводу о возрастании од по мере удаления от

внутренней стенки [21, 22]. В описанной здесь работе *f* является функцией растяжений λ_{θ} и λ_{r} . Если учесть, что в рассмотренном диапазоне давлений λ_{θ} и *f* изменяются однонаправлено, λ_{θ} убывает в радиальном направлении (см. рис. 3) и влияние λ_{θ} на *f*($\lambda_{\theta}, \lambda_{r}$) является преобладающим, то различное поведение $\sigma_{\theta}(\xi)$ в описанной модели и в работах [21, 22] вполне объяснимо.

Величина общего напряжения в стенке активного сосуда определяется главным образом его активной составляющей. С ростом концентрации параметра активации увеличивается вклад активной части напряжений в общее напряжение по сравнению с вкладом пассивной (рис. 2), они могут различаться на порядок (ср. линии 1(II) и 2(II) на рис. 26). По результатам расчетов для коронарных артерий [3] при $\lambda_{\theta} = 1.24$ активные напряжения играют преобладающую роль в формировании общего напряжения, но их вклад несколько меньше, что можно объяснить тем, что в крупных сосудах миогенная реакция Остроумова-Бейлисса менее значима (см. работу [29]). По результатам той же работы [3] при бо́льшем значении окружного растяжения ($\lambda_{\theta} = 1.6$) доминирует пассивная составляющая окружного напряжения, она становится больше активной. Как показано на рис. 2, модуль радиального напряжения в стенке активного сосуда существенно меньше окружного, что отмечалось и для коронарных сосудов [3, 4, 15]. Продольная составляющая напряжения, как следует из уравнений (3) и (4), в нашем случае равна множителю Лагранжа и мало отличается от

радиальной, тем не менее, выполняется неравенство $|\sigma_r| < |\sigma_z| < \sigma_{\theta}$.

В результате активации окружное растяжение в стенке уменьшается почти в два раза и становится более однородным (рис. 3). Как в неактивированном сосуде, так и после активации величина окружного растяжения снижается по мере удаления от внутренней стенки. Такой же вывод был получен для коронарных сосудов человека с помощью трехслойной анизотропной модели [10]. Учет остаточных напряжений дал противоположный результат [4]: окружное растяжение $\lambda_{\theta} = r/r_0$ увеличивается с приближением к внешней стенке. Это различие, по-видимому, связано со способом определения радиуса сосуда в ненагруженном состоянии r₀. Внутренний и внешний радиусы ненагруженного сосуда измеряются после его продольного разрезания. После «раскрывания» сосуда внутренний радиус может оказаться больше внешнего.

При фиксированной концентрации кальция в сосудистой стенке модуль отношения радиального напряжения к окружному снижается по мере приближения к внешней стенке (рис. 4а), где он равен нулю. Таким образом, в наибольшей степени влияние радиального напряжения испытывает внутренняя поверхность стенки. Обнаружено увеличение параметра $|\sigma_r/\sigma_{\theta}|$ с уменьшением окружного растяжения (рис. 4б), или с ростом радиального, поскольку при отсутствии продольного растяжения из уравнения (10) следует $\lambda_r = \lambda_{\theta}^{-1}$. Увеличение параметра активации приводит к уменьшению λ_{θ} и усилению действия радиального напряжения на внутреннюю стенку сосуда. Рост модуля отношения радиального напряжения к окружному в результате активации ранее отмечался при рассмотрении двухслойной модели для коронарной артерии [4]. Из этого следует, что с ростом степени активации увеличивается риск повреждения внутренней поверхности сосуда.

Анализ чувствительности модели к колебаниям значений коэффициентов в функции $\Psi(C_{Ca})$ относительно значений, соответствующих описанным в [20] экспериментам, проводили с точки зрения соответствия статической зависимости радиус-давление реакции Остроумова—Бейлисса, т.е. наличия «падающего» участка кривой r(p). Расчеты показали, что наибольшей чувствительностью обладает коэффициент g_5 , определяющий величину активного напряжения при очень малых нагрузках. Снижение/повышение g_5 приводит к увеличению/снижению окружной состав-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

ляющей активного напряжения в отсутствие нагрузки. Поскольку при формулировании модели полагалось, что остаточные напряжения отсутствуют, изменения g_5 приводят к результатам, не имеющим физического смысла. Варьирование коэффициента g_6 , регулирующего диапазон значений C_{Ca} , в котором активное напряжение растет с увеличением концентрации кальция, допустимо не более чем на 20%. При изменении g_6 на ±20% изменение активной составляющей радиального и окружного напряжений относительно своего значения при вычисленном g_6 составляет несколько десятков процентов для $p \le 5.5$ кПа, однако при бо́льших p отклонение не превышает 5.4%.

Даже при незначительном ($\pm 3\%$) изменении параметра g7 исчезает горизонтальный участок зависимости r(p) (рис. 6а). Увеличение g_7 приводит к снижению радиуса в диапазоне давлений 5÷13 кПа после первоначального повышения при p < 5 кПа. Отсутствие измерений при p > 13 кПа не позволяет проследить изменение радиуса при более высоких давлениях. Эксперименты на подобных сосудах показали [30], что диапазон давлений, в котором диаметр сосуда практически не меняется при продолжающемся увеличении концентрации кальция, может составлять 11÷19 кПа. При изменении g_7 на $\pm 7\%$ отклонение окружного напряжения от своего значения при g7, соответствующем экспериментальным данным, может доходить до 35% (рис. 6б). Можно сделать вывод, что и радиус, и окружное напряжение подвержены существенным изменениям даже при малых (на несколько процентов) колебаниях значений коэффициентов g_5 и g_7 в функции $\Psi(C_{Ca})$. Для g_6 допустимы отклонения до 20%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получено описание механических свойств стенки резистивной мозговой артерии крысы в предположении, что сокращения гладкомышечных клеток происходят только в окружном направлении и растяжение вдоль сосуда отсутствует. Модель представляет собой развитие предшествующих работ [21, 22] и рассматривает активное напряжение в сосудистой стенке как функцию растяжений и концентрации активатора сокращений гладкомышечных клеток.

Результаты вычисления компонентов напряжения показали преобладающую роль активной составляющей напряжения по сравнению с пассивной. Активация гладкомышечных клеток приводит к более однородному трансмуральному распределению окружного напряжения и деформаций в сосудистой стенке. Модуль отношения радиального напряжения к окружному существенно выше в активном сосуде по сравнению с пассивным. С ростом окружного растяжения этот параметр уменьшается как в пассивном, так и активном сосудах. Показано, что даже небольшие изменения параметров функции, описывающей зависимость активной составляющей напряжения от концентрации кальция, существенным образом влияют на радиус и окружное напряжение. Для более адекватного описания напряжения в стенке резистивного сосуда необходимы новые экспериментальные данные для резистивных сосудов, касающиеся как остаточных напряжений, так и измерений при разных механических и химических воздействиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013—2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

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

- В. М. Хаютин и А.Н. Рогоза, в кн. Физиология кровообращения. Регуляция кровообращения, ((Наука, Л., 1986), сс. 37–67.
- B. Zhou, A. Rachev, and T. Shazly, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 48, 28 (2015). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2015.04.004
- H. Chen and G. S. Kassab, Sci. Rep. 7 (1), 9339 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-08748-7
- Y. Lu, J.Wu, Y. Li, J. Gong, G.S. Ma, Y. Kassab, W. Huo, Y. Tan, Y. Huo, Sci. Rep. 7 (1), 13911 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-14276-1
- G. A. Holzapfel and R.W. Ogden, Proc. Roy. Soc. A 466, 1551 (2010). DOI: 10.1098/rspa.2010.0958
- J. Kim and J. E. Wagensell, Ann. Biomed. Eng. 43 (7), 1477 (2015). DOI: 10.1007/s10439-014-1201-7
- G. A. Holzapfel and R. W. Ogden, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 315: H540 (2018). DOI: 10.1152/ajpheart.00117.2018
- H. Chen, T. Luo, X. Zhao, et al., Biomaterials 34, 7575 (2013). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.035

- G. A. Holzapfel and R. W. Ogden, J. R. Soc. Interface 7, 787 (2010). DOI: 10.1098/rsif.2009.0357
- R. Sanft, A. Power, and C. Nicholson, Math. Biosci. 315, 108223 (2019). DOI: 10.1016/j.mbs.2019.108223
- M. Böl, A. Schmitz, G. Nowak, and T. Siebert, J. Mechan. Behav. Biomed. Mater. 13, 215 (2012). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.05.015.
- S. Murtada, M. Kroon, and G. A. Holzapfel, Biomech. Model. Mechanobiol. 9, 749 (2010). DOI: 10.1007/s10237-010-0211-0
- 13. S. C. Murtada, A. Arner, and G. A. Holzapfel, J. Theor. Biol. **297**, 176 (2012). DOI: 10.1016/j.jtbi.2011.11.012.
- 14. S. C. Murtada and G. A. Holzapfel, J. Theor. Biol. **358**, 1 (2014). DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.04.028
- S. C. Murtada, J. D. Humphrey, and G. A. Holzapfel, Biophys. J. 113, 714 (2017). DOI: 10.1016/ j.bpj.2017.06.017
- К. Каро, Т. Педли, Р. Шротер и У. Сид, Механика кровообращения, под ред. С. А. Регирера и В. М. Хаютина (Мир, М., 1981).
- 17. Г. П. Конради, *Регуляция сосудистого тонуса* (Наука, Л., 1973).
- B. E. Carlson, J. C. Arciero, and T. W. Secomb, Amer. J. Phys. Heart Circ. Phys. 295, H1572 (2008). DOI: 10.1152/ajpheart.00262.2008.
- E. VanBavel and B. G. Tuna, PloS One 9 (1), e86901 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0086901
- H. J. Knot and M. T. Nelson, J. Physiol. 508 (1), 199 (1998). DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.199br.x
- 21. Н. Х. Шадрина, Биофизика 63 (4), 795 (2018).
- Н. Х. Шадрина, Изв. РАН. Механика жидкости и газа, № 2, 3 (2020) DOI: 10.31857/ S0568528120020115.
- E. D. Hogestätt, K.-E. Andersson, and L. Edvinsson, Acta Physiol. Scand. 117, 49 (1983). DOI: 10.1111/j.1748-1716.1983.tb07178.x
- 24. G. Gabella, J. Ultrastruct. Res. **84** (1), 24 (1983). DOI: 10.1016/s0022-5320(83)90083-7
- 25. G. E. Sleek and B. R. Duling, Circ. Res. **59**, 620 (1986) DOI: 10.1161/01.res.59.6.620
- Y. Huo, X. Zhao, Y. Cheng, et al., J. Appl. Physiol. 114, 1451 (1985). DOI: 10.1152/japplphysiol.01237.2012 (2013)
- 27. G. L. Baumbach, J. G. Walmsley, and M. N. Hart, Am. J. Pathol. **133** (3), 464 (1988).
- M. A. Zulliger, A. Rachev, and N. Stergiopulos, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 287, H1335 (2004) DOI: 10.1152/ajpheart.00094.2004
- В. А Левтов и С. А. Регирер, в кн. Физиология кровообращения. Физиология сосудистой системы, под ред. Б. И. Ткаченко (Наука, Л., 1984), сс. 94–140.
- G. Osol, J. F. Brekke, K. McElroy-Yaggy, and N. I. Gokina, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 283, H2260 (2002).

A Mathematical Model of the Wall of a Rat Cerebral Resistance Vessel N.Kh. Shadrina

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

A mathematical model for the mechanical properties of the wall of a rat small cerebral artery is presented. It is assumed that the active component of the stress has a circumferential direction and is a function of the concentration of the activator of smooth muscle contractions and circumferential and radial stretch ratios; longitudinal stretch ratio is not considered. Calculations showed a significant decrease in both the circumferential stress and circumferential stretch ratio in the vascular wall after activation; the distribution of these values in the transmural direction becomes more uniform. The active component has a predominant effect on the formation of total stress. The circumferential stress component is several times higher than the radial and longitudinal ones. The modulus of the ratio of the radial to circumferential stress component increases as a result of activation, and a tendency to a decrease in its value with an increase in circumferential stress even to a small change in the values of the parameters included in the dependence of stress on the concentration of the activation of the activations.

Keywords: resistance vessel, vascular wall stress, smooth muscle cells contraction, concentration of free calcium ions

——— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.3

МЕТОДЫ ПОДОБИЯ И ТРЕХМЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА СЕРДЦА КРОЛИКА И СОПРЯЖЕННОГО С НИМ МИОКАРДА ПРЕДСЕРДИЯ

© 2020 г. В.В. Галанин

Медицинский университет «Реавиз», 443001, Самара, ул. Чапаевская, 227 *E-mail: galanin_v@hotmail.com* Поступила в редакцию 09.04.2020 г. После доработки 10.07.2020 г. Принята к публикации 14.07.2020 г.

Показана возможность применения методов теории подобия для трехмерного моделирования электрической активности синоатриального узла сердца кролика и сопряженного с ним сократительного миокарда предсердия. Предлагаемая математическая модель представляет собой модель иерархического типа, в которой на верхнем уровне воспроизводится процесс взаимодействия синоатриального узла и сопряженного с ним сократительного миокарда предсердия; на нижнем уровне модели отражена динамика ионных процессов на мембранах кардиомиоцитов. Приведены примеры использования данной трехмерной модели для описания: а) генерации ритма в синоатриальном узле сердца; б) явления удвоения периода следования потенциалов действия на участке сократительного миокарда предсердия с пониженной электропроводимостью межклеточных контактов; в) модулирующего влияния электрического взаимодействия фибробластов и кардиомиоцитов на электрическую активность синоатриального узла.

Ключевые слова: синоатриальный узел, кардиомиоцит, фибробласт, математическое моделирование, теория подобия, сложные системы.

DOI: 10.31857/S000630292006018X

Импульс электрического возбуждения сердца формируется в ткани синоатриального узла (САУ) в результате синхронизации спонтанной электрической активности огромного числа пейсмекерных клеток. В основе внутрипейсмекерной синхронизации лежит электротоническое взаимодействие самовозбудимых клеток посредством щелевых контактов. Такой механизм обеспечивает как синхронный переход возбуждения с САУ на окружающий сократительный миокард предсердия, так и слаженность работы последнего.

Вышеописанный процесс моделируется с помощью системы, которая может включать более тысячи взаимосвязанных дифференциальных уравнений (отметим здесь модели неоднородного САУ сердца кролика [1–4] на основе детального описания ионных процессов на мембране кардиомиоцитов). При этом связь между уравнениями системы достаточно глубокая, так как изменение параметров в уравнении для одной клетки обязательно влечет изменения в решении для остальных клеток. Как следствие, решение такой

Сокращение: САУ – синоатриальный узел.

сложной системы уравнений нельзя свести к простой сумме решений образующих ее частей.

Вместе с тем, как было показано в предыдущей нашей работе [5], применение методов теории подобия для моделирования САУ позволяет существенно уменьшить число рассматриваемых клеток, не теряя важную информацию о системе в целом. При этом новая редуцированная система уравнений на практике оказывается более удобной, поскольку теория подобия позволяет не только уменьшить число используемых дифференциальных уравнений, но и находить параметры системы как единого целого.

Более того, настоящий подход позволяет лучше понять принцип организации данной сложной биологической системы: в результате взаимодействия компоненты системы оказываются определенным образом подобными всей системе в целом. Здесь по-прежнему под подобием мы понимаем пропорциональность сходных величин и параметров сопоставляемых объектов.

Целью работы является применение методов теории подобия для трехмерного моделирования электрической активности САУ сердца кролика и сопряженного с ним сократительного миокарда предсердия.

ТРЕХМЕРНАЯ МОДЕЛЬ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА И СОПРЯЖЕННОГО С НИМ СОКРАТИТЕЛЬНОГО МИОКАРДА ПРЕДСЕРДИЯ

У кролика САУ располагается в межвенной области правого предсердия вдоль пограничного гребешка (crista terminalis) между эндокардом и эпикардом, занимая практически всю толщу стенки [6, 7]. Расстояние от центра узла (области первичного водителя ритма, leading pacemaker site) до его периферии в направлении пограничного гребешка составляет 2.0-2.5 мм, толщина стенки около 0.25-0.75 мм, длина пейсмекерных клеток CAУ > 25 мкм [8]. Тогда можно принять, что расстояние от центра узла до гребешка превышает длину клетки приблизительно в 80 раз, а толщина стенки узла – в 30 раз. С учетом этих данных представим САУ и окружающий его сократительный миокард предсердия в виде трехмерной прямоугольной клеточной сети (рис. 1) размером $M_x \times M_y \times M_z = 160 \times 170 \times 30$. Всю цен-



Рис. 1. Схема трехмерной клеточной сети САУ (Sa) и окружающего его сократительного миокарда предсердия (Atr); c – клетки центра узла, p – клетки его периферии.

тральную часть схемы заполняют пейсмекерные клетки узла (затемненная область на схеме), вокруг которого расположены сократительные клетки предсердия (светлая область на схеме). Каждая клетка контактирует с соседними клетками посредством щелевых контактов.

Колебания мембранного потенциала клеток САУ и сократительного миокарда предсердия описываются следующей системой дифференциальных уравнений:

$$C_{ijk} \frac{\mathrm{d} V_{ijk}}{\mathrm{d} t} = -I_{ijk}^{\mathrm{ion}} + g_{i-1jk}^{x} \left(V_{i-1jk} - V_{ijk} \right) + g_{ijk}^{x} \left(V_{i+1jk} - V_{ijk} \right) + g_{ijk-1}^{y} \left(V_{ij-1k} - V_{ijk} \right) + g_{ijk}^{y} \left(V_{ij+1k} - V_{ijk} \right) + g_{ijk-1}^{z} \left(V_{ijk-1} - V_{ijk} \right) + g_{ijk}^{z} \left(V_{ijk+1} - V_{ijk} \right) ,$$

$$(1)$$

где индексы $i = 1, ..., M_x, j = 1, ..., M_y, k = 1, ..., M_z$ задают положение клетки; C_{ijk} – электроемкость мембраны клетки с номером $i, j, k; V_{ijk}$ – ее мембранный потенциал; I_{ijk}^{ion} – сила тока через ионные каналы мембраны клетки (соответствующие формулы для токов приведены в работе [5]); $g_{ijk}^{x,y,z}$ – электропроводимости щелевых контактов, соединяющих данную клетку с соседними клетками по направлению осей *x*, *y* и *z* соответственно.

Будем считать, что ткань узла по своим биоэлектрическим свойствам неоднородна только в радиальном направлении [1, 2, 8, 9]. Поэтому воспользуемся следующими формулами для электроемкостей клеток и электропроводимостей межклеточных контактов, которые выражают изменение этих величин при переходе от центра узла к его периферии [1, 2, 10]:

$$C_{ijk} = C_c + \frac{C_c - C_p}{1 + \exp\left[-a\left(\sqrt{(i - M_{cx})^2 + (j - M_{cy})^2} - r\right)\right]},$$
(2)

$$g_{ijk}^{x,y,z} = g_c^{x,y,z} + \frac{g_c^{x,y,z} - g_p^{x,y,z}}{1 + \exp\left[-a\left(\sqrt{(i - M_{cx})^2 + (j - M_{cy})^2} - r\right)\right]},$$

$$i = M_{plx}, \dots, M_{p2x}, \ j = M_{ply}, \dots, M_{p2y}, \ k = 1, \dots, M_z,$$
(3)

где C_c и $g_c^{x,y,z}$ – электроемкость мембраны и электропроводимость межклеточных контактов в центре узла $(M_{cx}, M_{cy}, k), k = 1, ..., M_z; C_p$ и $g_p^{x,y,z}$ – электроемкость мембраны и электропроводи-

мость межклеточных контактов на периферии узла; *а* и *r* – параметры модели [2, 10]. Кроме того, допустим, что максимальная электропроводимость ионных каналов пейсмекерных клеток линейно зависит от электроемкости:

$$g_{ijk}^{\text{ion}} = g_c^{\text{ion}} + \frac{g_c^{\text{ion}} - g_p^{\text{ion}}}{C_c - C_p} (C_{ijk} - C_c).$$
(4)

Электроемкость всех сократительных клеток предсердия и электропроводимость их межклеточных контактов примем одинаковыми для всех таких клеток.

Исходная трехмерная модель САУ содержит сотни тысяч клеток и, соответственно, на порядок большее количество дифференциальных уравнений. С другой стороны, число элементов системы можно существенно сократить, если использовать подход, предлагаемый теорией подобия. Для этого по аналогии с предыдущей нашей работой [5] оставим в клеточной сети, например, только каждый десятый слой, отстоящий от центра узла на одинаковом расстоянии. При этом в дифференциальных уравнениях для мембранного

потенциала оставшихся клеток подберем мас-
штабные коэффициенты
$$K_{g_{ijk}^{x,y,z}}$$
 электропроводи-
мостей клеточных контактов так, чтобы компен-
сировать увеличение падения потенциала вдоль
ткани узла, возникшее вследствие изъятия части
слоев из трехмерной клеточной системы. При
этом для масштабных коэффициентов контакт-
ных электропроводимостей $K_{g_{ijk}^{x,y,z}}$ и масштабных
коэффициентов для величины падения потенци-
ала между соседними элементами $K_{(V_{i-1jk}-V_{ijk})}$,
 $K_{(V_{i+1jk}-V_{ijk})}$, $K_{(V_{ij-1k}-V_{ijk})}$, входящих в систе-
му уравнений (1) и определяющих связь между
соседними клетками, должны выполняться усло-
вия:

$$\begin{split} K_{g_{i-1jk}^{x}} \cdot K_{(V_{i-1jk}-V_{ijk})} &= 1, \ K_{g_{ijk}^{x}} \cdot K_{(V_{i+1jk}-V_{ijk})} &= 1, \\ K_{g_{ij-1k}^{y}} \cdot K_{(V_{ij-1k}-V_{ijk})} &= 1, \ K_{g_{ijk}^{y}} \cdot K_{(V_{ij+1k}-V_{ijk})} &= 1. \end{split}$$
(5)

Использование методов подобия для моделирования сложных систем позволяет представить отдельные ее подсистемы, не раскрывая полностью их внутреннего строения, т.е. данный подход отражает иерархический тип организации сложных биологических систем. При этом одним из важных моментов, обеспечивающим адекватное отражение какой-либо части подсистемы по



Рис. 2. Колебания мембранного потенциала пейсмекерных клеток САУ и сократительного миокарда предсердия, расположенных вдоль медианной оси клеточной сети.

отношению к остальной части сложной системы, является правильное воспроизведение связей между величинами на границах [11]. Применительно к нашему случаю под связями на границах мы подразумеваем соотношение мембранных потенциалов взаимодействующих клеток.

На рис. 2 представлены графики решений редуцированной системы дифференциальных уравнений (1) при следующих значениях параметров модели: размер сети $M_x \times M_y \times M_z = 16 \times 17 \times 3$ (243 пейсмекерные клетки и 573 сократительные клетки); координаты центральных клеток (M_{cx} , M_{cy} , k) = (8, 9, k); крайних периферических – (M_{p1x} , M_{p1y} , k) = (4, 5, k) и (M_{p2x} , M_{p2y} , k) = (12, 13, k), k = 1, ..., 3 (рис. 1); $K_{syk}^{-1} = 35$; a = 2; r = 1.9.

Выбор масштабных коэффициентов в трехмерной модели определялся также следующими требованиями: а) в окружающем узел сократительном миокарде возбуждались потенциалы действия; б) расчетный период следования потенциалов действия T = 320 мс соответствовал экспериментально наблюдаемому значению интактного САУ 348 ± 50 мс [12]; в) наблюдалось постепенное изменение формы потенциала действия при переходе от центра узла к периферии,

характерное для интактного САУ [8, 9] (максимальный диастолический потенциал становился более негативным, скорость нарастания потенциала действия увеличивалась). В нашей трехмерной модели максимальный диастолический потенциал уменьшается от -70 мВ до -77 мВ; величина скорости нарастания переднего фронта потенциала действия увеличивается от 19 В/с в центральной части до 31 В/с на периферии. В одномерных моделях данное изменение формы потенциала действия более выражено. В модели [2], содержащей цепочку из 50 пейсмекерных клеток и 150 сократительных клеток предсердия, скорость нарастания переднего фронта увеличивалась от 7 В/с в центре до ≈ 60 В/с на периферии. В одномерной неоднородной модели (non-uniform model) [1] из 15 пейсмекерных клеток центрального типа и 15 клеток периферического типа для данной величины были получены следующие значения: 8.4 В/с (центр) и 60.7 В/с (периферия). Можно предположить, что различие в степени трансформации формы потенциалов действия клеток при переходе от центра САУ к периферии в настоящей трехмерной модели менее выражено по сравнению с одномерными цепочками вследствие более значительного взаимного электротонического влияния, которое возникает между клетками в трехмерных сетях. Как представляется, по этой же причине овершут потенциала действия типичных клеток предсердия в нашей мо-



Рис. 3. Схема трехмерной клеточной сети редуцированного пейсмекера (Sa) и сопряженного с ним сократительного миокарда предсердия (Atr).

дели оказался в два раза меньше, чем в модели изолированной клетки предсердия [13].

Для характеристики эффективности передачи генерируемого в САУ потенциала действия на сопряженный с ним сократительный миокард предсердия был проведен расчет так называемого фактора надежности *SF* (safety factor). Фактор надежности определяется как отношение суммы зарядов Q_c , произведенного данной клеткой в фазу деполяризации, и Q_{out} , отданного следующей клетке посредством щелевых контактов, к заряду Q_{in} , полученному ею от предыдущей деполяризованной клетки:

$$SF = (Q_{\rm c} + Q_{\rm out})/Q_{\rm in} = \left(\int_{\rm A} I_{\rm c} dt + \int_{\rm A} I_{\rm out} dt\right) / \int_{\rm A} I_{\rm out} dt, \qquad (6)$$

где $I_{\rm c} = CdV/dt$ — емкостный ток, обусловленный изменением плотности ионов на поверхности мембраны клетки, $I_{\rm in}$ и $I_{\rm out}$ – входящий и выходящий через щелевые контакты ионные токи, А – интервал времени от момента, когда скорость возрастания потенциала действия достигает 1% от максимального значения, до момента, когда мембранный потенциал достигает максимума [14, 15]. Проще говоря, фактор надежности показывает, во сколько раз пороговый уровень, необходимый для деполяризации данной клетки, превышает порог деполяризации соседней с ней клетки, которая ее активизировала. Эффективная передача потенциала действия с клетки на клетку означает, что SF > 1. В нашей модели вычисления, выполненные для пейсмекерных клеток, расположенных на границе с сократительными клетками, дают величину фактора надежности SF = 1.91.

5

Далее, развивая наш подход, с помощью подбора масштабных множителей для мембранного

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

потенциала К_{V_{ijk}}, контактной электропроводимости $K_{g_{ilk}^{x,y,z}}$, максимальной электропроводимости соответствующих ионных каналов $K_{g_{ik}^{ion}}$ и постоянных времени кинетических переменных $K_{ au_{v}}$ удалось заменить весь узел небольшим пейсмекером, состоящим из трех клеток периферического типа (рис. 3). Этот редуцированный пейсмекер генерировать потенциалы булет действия (рис. 4а) в окружающем сократительном миокарде аналогично тому, как это происходит в случае узла, размер которого составлял $9 \times 9 \times 3$ (рис. 4б). Общее число и порядок расположения сократительных клеток остался прежним.

Процедура подбора масштабных множителей состояла в следующем. Непосредственная замена пейсмекера тремя клетками периферического типа приводит к значительному изменению всего паттерна электрической активности как в клетках самого узла, так и в клетках сократительного мио-



Рис. 4. Сравнение потенциалов действия, возбуждаемых редуцированным (а) и многоэлементным (б) пейсмекером в сократительных клетках, расположенных вдоль медианной оси клеточной сети. Потенциалы действия редуцированной модели (а) рассчитаны при следующих значениях масштабных коэффициентов: $K_V = 1.07$; $K_{gNa} = 0.6$; $K_{gCa} = 0.4$; $K_{gK} = 0.6$; $K_{gfNa} = 0.1$; $K_{\tau Ca} = 0.2$; $K_{\tau K} = 2.8$; $K_{\tau f} = 4.0$; K_{gx} , $z = 10^{-4}$.

карда: за счет гиперполяризующего влияния большого числа сократительных клеток (в нашей модели их число равно 573) на оставшиеся три пейсмекерные клетки в новой редуцированной клеточной системе потенциалы действия не возбуждаются. Поэтому, чтобы существенно уменьшить данное влияние и создать условия для генерации потенциала действия, в уравнениях для мембранного потенциала оставшихся пейсмекерных клеток был введен масштабный множитель контактной электропроводимости $K_{g_{c}^{x,y,z}} << 1.$ Затем с помощью выбора масштабных множителей, соответствующих мембранному потенциалу и максимальной проводимости ионных каналов, достигается равенство амплитуды потенциала действия редуцированной и многоэлементной моделей. Наконец, для совпадения периодов возбуждаемых потенциалов действия в уравнениях для кинетических переменных ионных каналов были подобраны соответствующие значения масштабных множителей постоянных времени.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СОКРАТИТЕЛЬНОГО МИОКАРДА ПРЕДСЕРДИЯ ПРИ НАЛИЧИИ В НЕМ НЕОДНОРОДНОСТИ ПО КОНТАКТНОЙ ЭЛЕКТРОПРОВОДИМОСТИ

Смоделируем участок, обладающий пониженной электропроводимостью межклеточных контактов в области сократительного миокарда предсердия (наиболее темный участок на рис. 5, обозначенный «block»). В расчетах использовалась описанная выше модель размером 16 × 17 × 3. При снижении контактной электропроводимости на данном участке до 5.05% от проводимости между остальными сократительными клетками в нем возникают потенциалы действия с удвоенным периодом (рис. 6). Данный феномен можно объяснить тем, что при увеличении межклеточной проводимости происходит фазовый сдвиг мембранного потенциала. В результате импульс одной из клеток попадает в рефрактерный период соседней с ней и потенциал действия для нее не возникает. Эффекты, подобные тем, что описаны выше, отмечались и в работе [16].



Рис. 5. Схема трехмерной клеточной сети САУ (SA) и окружающего его сократительного миокарда предсердия (Atr) с участком (Block), обладающим пониженной электропроводимостью межклеточных контактов. Участок block электрически изолирован от клеток предсердия, расположенных слева от него.



Рис. 6. Изменение формы потенциала действия сократительных клеток предсердия, расположенных вдоль правой границы клеточной сети (i = 16, j = 1...9, k = 2). Участку block соответствуют клетки с номерами i = 16, j = 1...3, k = 2,

УЧЕТ НАЛИЧИЯ СЕРДЕЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ТКАНИ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА. МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИБРОБЛАСТОВ И КАРДИОМИОЦИТОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА

Ткань САУ пронизана сетью сердечных фибробластов (их доля составляет более 50% от общего количества клеток узла), являющихся электроневозбудимыми клетками и взаимодействующими друг с другом через щелевые контакты [17, 18]. Кроме того, между фибробластами и кардиомиоцитами также имеются щелевые контакты, и ионные токи через мембраны фибробластов напрямую влияют на электрическую активность близлежащих кардиомиоцитов [18, 19].

Воспользуемся нашей трехмерной прямоугольной клеточной схемой САУ и сократительного миокарда, включив в нее сеть фибробластов в виде многоуровневой решетки (рис. 7).

Дифференциальные уравнения для мембранного потенциала фибробластов имеют вид, аналогичный уравнениям (1). Электроемкость мембраны фибробласта 6.3 пФ, электропроводимость щелевых контактов, соединяющих фибробласты с соседними кардиомиоцитами, примем равной

2.5 нСм [20, 21]. Выражения для силы тока I_{ijk}^{ion} через ионные каналы мембраны фибробластов, а также величины остальных параметров ионных каналов соответствуют модели, предложенной в работе [20].

Фибробласты отвечают на механическое воздействие генерацией механоиндуцированного потенциала [22]. Его появление обусловлено наличием в мембране фибробластов механочувствительных ионных каналов (stretch-activated channel). Поэтому дополним используемую электрофизиологическую модель мембраны фибробластов слагаемым, описывающим ионный ток через механочувствительные ионные каналы: $I_{sac} = g_{sac} (V - E_{rev})$, где g_{sac} – электропроводимость механочувствительных каналов, E_{rev} – потенциал реверсии.

Рис. 8 иллюстрирует решение системы дифференциальных уравнений для мембранного потенциала, соответствующего узловым и сократительным клеткам трехмерной модели с номерами i = 1, ..., 9, j = 9, k = 2, в отсутствие деформации мембраны фибробластов ($g_{sac} = 0$). Результатом взаимодействия фибробластов и кардиомиоцитов является замедление ритма электрической активности САУ. Период колебаний мембранного потенциала клеток увеличился с 320 мс в отсутствие фибробластов до 340 мс при их наличии.

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021



Рис. 7. Схема трехмерной сети клеточных элементов САУ (Sa) и окружающего его сократительного миокарда предсердия (Atr) с включением сети сердечных фибробластов (Fibr).



Рис. 8. Колебания мембранного потенциала клеток САУ и окружающего миокарда предсердия, взаимодействующих с сетью сердечных фибробластов.

Далее рассмотрим влияние, оказываемое сжатыми фибробластами, на электрическую активность кардиомиоцитов САУ и окружающего сократительного миокарда с помощью следующего численного эксперимента. Уменьшим электропроводимость контактов между кардиомиоцитами настолько, чтобы в ткани САУ не могли возникнуть повторные потенциалы действия (рис. 9а). Этого можно достигнуть, если уменьшить контактную электропроводимость в нашей модели в 1.23 раза.

Затем создадим условие, соответствующее сжатию фибробластов ткани синусного узла. Вследствие активации механочувствительных ионных каналов на мембране фибробластов появляется деполяризующий механоиндуцированный потенциал. Например, сжатие фибробласта на величину 4 мкм приводит к возникновению электропроводимости механочувствительных каи потенциала реверсии, налов равных g_{sac} = 5.6 нСм и *E*_{rev} = 16.0 мВ [22]. При этом, как показали результаты проведенных расчетов, смещение мембранного потенциала фибробластов в сторону деполяризации создало условие для возникновения повторных потенциалов действия в ткани САУ и сопряженного с ним сократительного миокарда (рис. 9б). Таким образом, сеть фиб-



Рис. 9. Мембранные потенциалы клеток САУ и окружающего миокарда предсердия в сети с фибробластами при низкой контактной электропроводимости в отсутствие (а) и при наличии (б) механического сжатия фибробластов.

робластов оказывает модулирующее действие на электрическую активность кардиомиоцитов ткани САУ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная в настоящей работе математическая модель ткани САУ сердца кролика показала, что использование подхода теории подобия это действенный метод для моделирования данной сложной биологической системы, позволяющий значительно уменьшить объем вычислений при сохранении наиболее существенных свойств и параметров модели. При таком подходе появляется больше возможностей для предсказания новых свойств моделируемой системы, что способствует лучшему пониманию механизмов, лежащих в основе изучаемых процессов.

Результаты, приведенные в работе, показывают, что данная модель воспроизводит наблюдаемые процессы генерации ритма в САУ сердца, явление удвоения периода следования потенциалов действия на участке сократительного миокарда предсердия с пониженной электропроводимостью межклеточных контактов, модулирующее влияние электрического взаимодействия фибробластов и кардиомиоцитов на электрическую активность САУ. Кроме того, используемый в работе подход можно будет применить к моделям, предназначенным для изучения разнообразных эффектов электромеханического сопряжения в миокарде, а также для исследования возможных нарушений сердечного ритма.

Несмотря на то что в настоящей трехмерной модели использовались данные для сердца кролика, наш метод можно обобщить для моделирования процессов электрической активности в предсердиях и других видов теплокровных животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор сердечно благодарит к.б.н. А.И. Сироту за неустанное внимание, поддержку и полезные обсуждения ряда вопросов, затрагиваемых в статье.

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

- R. V. Oren and C. E. Clancy, PLoS Comput. Biol. 6 (12), e1001041 (2010). DOI: 10.1371/journal.pcbi. 1001041
- S. Inada, H. Zhang, J. O. Tellez, et al., PLoS One 9 (4), e94565 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0094565
- 3. C. Ly and S. H. Weinbergb, J. Theor. Biol. **439**, 35 (2018).
- Р. А. Сюняев и Р. Р. Алиев, Биофизика 54 (1), 77 (2009).
- 5. В. В. Галанин, Биофизика 64 (3), 578 (2019).
- 6. T. Opthof, Cardiovasc. Drug. Ther. 1, 573 (1988).
- 7. Д. В. Абрамочкин, Г. С. Сухова и Л. В. Розенштраух, Успехи физиол. наук **40** (4), 21 (2009).
- 8. W. K. Bleeker, A. J. C. Mackaay, M. Masson-Pevet, et al., Circ. Res. 46, 11 (1980).
- 9. M. R. Boyett, H. Honjo, M. Yamamoto, et al., Am. J. Physiol. **276**, H686 (1999).
- H. G. Zhang, A. V. Holden, I. Kodama, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279, 397 (2000).
- В. А. Веников и Г. В. Веников, *Теория подобия и моделирования (применительно к задачам электроэнергетики)* (УРСС, М., 2014).

- C. J. H. J. Kirchhof, F. I. M. Bonke, M. A. Allesie, and W. J. E. P. Lammers, Pflugers Arch. 410, 198 (1987).
- 13. B. Wohlfart and G. Ohlen, Clin. Physiol. 19, 11 (1999).
- 14. R. M. Shaw and Y. Rudy, Circ. Res. 81 (5), 727 (1997).
- 15. Y. Wang and Y. Rudy, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **278**, H1019 (2000).
- P. Ostborn, B. Wohlfart, and G. Ohlen, J. Theor. Biol., 211, 201 (2001).
- 17. P. Camelliti, G. R. Green, I. Le Grice, and P. Kohl, Circ. Res. **98** (6), 828 (2004).
- 18. P. Kohl, P. Camelliti, F. L. Burton, and G. L. Smith, J. Electrocardiol. **38**, 45 (2005).
- 19. А. С. Толстокоров, Р. А. Сюняев и Р. Р. Алиев, Биофизика **60** (2), 322 (2015).
- K. A. Mac Cannell, H. Bazzazi, L. Chilton, et al., Biophys. J. 92, 4121 (2007).
- 21. P. Kohl, A. G. Kamkin, I. S. Kiseleva, and D. Noble, Exp. Physiol. **79**, 943 (1994).
- A. G. Kamkin, I. S. Kiseleva, and G. Isenberg, Cardiovasc. Res. 57, 793 (2003).

Similitude Methods and Three-Dimensional Simulation of the Electrical Activity of the Rabbit Sinoatrial Node and Adjacent Atrial Myocardium

V.V. Galanin

Medical University «Reaviz», Chapayevskaya ul. 227, Samara, 443001 Russia

This study focuses on possible applications of similitude design methods for three-dimensional simulation of the electrical activity of the sinoatrial node of the rabbit heart and adjacent atrial myocardium. The proposed mathematical model is hierarchy-shaped where the relationship between the sinoatrial node and adjacent atrial myocardium is at the top and the dynamics of ion processes on the cardiomyocytes membranes is at the lower level of the model. Examples of using this three-dimensional model are given for the description of: a) rhythm generation in the sinoatrial node of the heart; b) the effect of doubling the action potential duration in the site of the atrial myocardium with reduced electrical intercellular conductivity; c) the modulating effect of the electrical fibroblast-cardiomyocyte relationship on the pacemaker activity.

Keywords: sinoatrial node, cardiomyocyte, fibroblast, mathematical simulation, similitude design method, complex systems УДК 517.3

ОСОБЕННОСТИ НЕЛИНЕЙНОЙ ДИНАМИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ВЕРХНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ВОЗМУЩАЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

© 2021 г. Л.В. Мезенцева

Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, 125315, Москва, Балтийская ул., 8 E-mail: l.v.mezentseva@mail.ru Поступила в редакцию 21.05.2020 г. После доработки 08.06.2020 г. Принята к публикации 16.06.2020 г.

Изучена нелинейная динамика флуктуаций микрокровотока симметричных областей верхних конечностей человека в исходном и возмущенном состоянии. Возмущением являлись физические нагрузки, которые представляли собой махи левой или правой рукой в положении стоя в течение 1 мин. Измерения показателей микроциркуляции были проведены у пяти здоровых добровольцев методом лазерной допплеровской флоуметрии. Флоуметрические датчики фиксировали на наружной поверхности симметричных областей нижних частей правого и левого плеча в точках, расположенных на 3 см выше локтевого сгиба. Оценивали: показатель Херста, размерность Хаусдорфа, геометрические характеристики фазовых портретов, а также статистические показатели перфузии. Было показано, что возмущающие воздействия приводят к изменениям параметров нелинейной динамики микроциркуляции верхних конечностей, которые характеризуются повышением уровня персистентности той стороны, на которой совершались возмущающие воздействия, повышением фрактальной размерности хаоса при левых возмущениях, а также инверсной динамикой лево-правосторонней асимметрии аттракторов.

Ключевые слова: нелинейная динамика флуктуаций кровотока, персистентность, микроциркуляция. **DOI:** 10.31857/S0006302921010191

Известно, что кровоток в микроциркуляторном русле подвержен спонтанным флуктуациям, вследствие чего колебания перфузии в различных органах и тканях регистрируются в виде сложных, непериодических процессов, для анализа которых применяются методы теории детерминированного хаоса [1-5]. Одним из важных показателей, используемых для анализа хаотических процессов различной природы (биологических, экономических и других), является индекс Херста [6, 7]. Этот показатель позволяет оценивать персистентность (трендовость) исследуемых процессов, дифференцировать персистентные временные ряды от случайных и выполнять классификацию различных временных рядов по их трендовости. Наши предыдущие исследования [8, 9] показали эффективность использования д-показателя Херста для анализа реакции микроциркуляций левой и правой почки крысы на возмущающие воздействия (введение аспирина). Целью настоящего исследования явилось использование методов нелинейной

динамики для изучения реакции микроциркуляций симметричных областей верхних конечностей человека на возмущающие воздействия.

МЕТОДИКА

Измерения показателей микроциркуляций проводились у пяти здоровых добровольцев (мужчины 50-70 лет) методом лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью двухканального прибора «ЛАКК-02» (НПП «ЛАЗМА», Россия) [10]. Датчики ЛДФ-сигнала фиксировали на наружной поверхности симметричных областей нижних частей правого и левого плеча в точках, расположенных на 3 см выше локтевого сгиба. Синхронные измерения показателей микроциркуляций слева и справа выполнены в дневное время суток через каждые 3 ч в течение 5 суток. Измерения проводили в исходном и возмущенном состоянии микрокровотока, где возмущением являлись асимметричные физические нагрузки, которые представляли собой махи левой или правой рукой в положении стоя в течение 1 мин. Первая серия экспериментов включа-

Сокращения: ЛДФ – лазерная допплеровская флоуметрия, ПМ – параметр микроциркуляции.

ла в себя только махи левой рукой, вторая серия экспериментов — только махи правой рукой. Обе серии были независимые и проводились в разные дни. Записи ЛДФ-сигнала проведены с частотой 20 Гц в течение 1 мин с интервалом отсчетов 0.05 с (число точек периодограмм — более 1000).

Математическая обработка результатов измерений включала в себя:

— оценку статистических характеристик параметров микроциркуляций каждого временного ряда: среднего значения $\Pi M[i]$, стандартного отклонения $\Pi M[i]$, максимального MAX($\Pi M[i]$) и минимального MIN($\Pi M[i]$) значения, а также вариационного размаха (*BP*);

 – оценку исходных и возмущенных временных рядов микроциркуляций как нелинейных динамических процессов с помощью размерности Хаусдорфа (D0);

— оценку персистентности исследуемых временных рядов путем расчета безразмерного показателя в виде отношения размаха (R) накопленного отклонения от среднего значения соответствующего временного ряда к среднеквадратичному отклонению (S) этого ряда. Зависимость параметра (R/S) от времени наблюдения, построенную в двойном логарифмическом масштабе, аппроксимировали прямой линией и оценивали персистентность исследуемого временного ряда путем расчета углового коэффициента H, называемого показателем Херста [6, 7].

Расчеты всех показателей микроциркуляций проводили в условных (перфузионных) единицах с помощью программного обеспечения, прилагаемого к ЛДФ-анализатору. Статистический анализ изменений показателей микроциркуляций проводили с помощью стандартных статистических методов, входящих в пакеты прикладных программ Excel for Windows (v. 6.0). Значимость различий между данными, полученными в исследуемых временных рядах, оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований показали, что асимметричные физические нагрузки вызывают изменения показателей микроциркуляций не только одноименной, но и противоположной стороны измерения. Это иллюстрирует рис. 1, на котором показаны фрагменты записи флуктуаций микрокровотока симметричных областей верхних конечностей в исходном состоянии (рис. 1а, в) и сразу после махов левой (рис. 1б) и правой (рис. 1г) рукой. Можно видеть, что оба вида возмущающих воздействий приводили к изменениям параметров микроциркуляций как левых ($\Pi M_{\rm лев}$), так и правых ($\Pi M_{\rm пр}$) временных рядов. После левых махов наблюдалось увеличение, а

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

после правых - снижение амплитуды этих временных рядов. Вариабельность (величина стандартного отклонения) исследуемых процессов увеличивалась после левых и оставалась без изменения после правых махов. Результаты статистического анализа (таблица) показали, что характеристики исходных и возмущенных временных рядов левой стороны наблюдения отличаются от соответствующих характеристик правой стороны наблюдения. Имело место превышение среднего значения $\Pi M_{\rm лев}$ по сравнению с $\Pi M_{\rm прав}$ как в исходном, так и в возмущенном состоянии. Стандартное отклонение $\Pi M[i]$ слева как исходных, так и возмущенных временных рядов также превышало соответствующие значения для правой стороны измерения. Аналогичные изменения имели место для MAX(ПМ[i]): более высокие средние значения этой величины для ПМлев по сравнению с ПМ_{прав} как для исходного, так и для возмущенного ряда. Что касается $MIN(\Pi M[i])$, то имело место увеличение этого параметра в возмущенных временных рядах при левых махах и уменьшение при правых.

Следующим этапом исследований явилось сравнительное изучение персистентности исследуемых процессов микроциркуляций. На рис. 2 для исходных и возмущенных левыми махами рядов показаны зависимости отношения размаха накопленного отклонения от среднего значения к среднеквадратичному отклонению (R/S) от номера точки ряда (n), построенные в двойном логарифмическом масштабе. Результаты линейной аппроксимации для исходных рядов (рис. 2a,6):

 $Y_{\text{лев}} = 0.632X + 0.003, Y_{\text{прав}} = 0.678X - 0.133, (1)$

а для возмущенных рядов (рис. 2в,г):

 $Y_{\text{лев}} = 0.984X - 0.362, \ Y_{\text{прав}} = 0.785X - 0.152, \ (2)$

где $Y = \log(R/S), X = \log(n).$

Поэтому в случае левых махов показатели Херста исходных и возмущенных рядов слева были равны соответственно $H_{\text{исх.лев}} = 0.632 \pm 0.071$ и $H_{\text{возм.лев}} = 0.984 \ 0.082$, а справа $H_{\text{исх.пр}} = 0.678 \pm 0.079$ и $H_{\text{возм.пр}} = 0.785 \pm 0.081$. Согласно общепринятой интерпретации [6, 7], процессы, фрактальные линии которых расположены в области $0 \le H \le 0.5$, — антиперсистентные, для них характерна знакопеременная тенденция, т.е. отсутствие трендовости в сочетании с относительно высоким уровнем зашумленности, а процессы, для которых $0.5 \le H \le 1$, — персистентные, для них характерно сохранение наблюдаемой тенденции в сочетании с относительно низким уровнем зашумленности. Результаты исследований показали, что если исходные ряды показателей микроциркуляций в случае левых махов находятся в пограничной области между антиперсистентной и персистентной зонами (показатель Херста незна-



Рис. 1. Динамика синхронных изменений перфузии ΠM (пф. ед.) правой и левой руки одного испытуемого: (а) – исходное состояние до махов левой рукой, (б) – возмущенное состояние сразу после махов левой рукой, (в) – исходное состояние до махов правой рукой, (г) – возмущенное состояние сразу после махов правой рукой. Темные линии – $\Pi M_{\text{лев}}$, светлые линии – $\Pi M_{\text{пр}}$.

чительно превышает 0.5), то возмущенные левыми махами ряды обеих сторон измерения – персистентные.

Для экспериментов с правыми махами результаты линейной аппроксимации для исходных рядов были:

 $Y_{\text{neb}} = 0.637X + 0.002, Y_{\text{прав}} = 0.533X + 0.205, (3)$

а для возмущенных рядов:

 $Y_{\text{JeB}} = 0.590X + 0.081, Y_{\text{IIDBB}} = 0.824X - 0.167.$ (4)

Поэтому в случае правых махов показатели Херста исходных и возмущенных временных рядов слева были равны соответственно $H_{\text{исх.лев}} = 0.637 \pm 0.081$ и $H_{\text{возм.лев}} = 0.590 \ 0.075$, а справа

 $H_{\rm исх.пр} = 0.533 \pm 0.051$ и $H_{\rm возм.пр} = 0.824 \pm 0.078$. Таким образом, результаты исследований показали, что исходные ряды микроциркуляций также находились в пограничной области между антиперсистентной и персистентной зонами, однако реакция на возмущающие воздействия была различной в случае левых и правых махов. Если в случае левых махов величина показателя Херста после нанесения возмущающего воздействия имела тенденцию к возрастанию, то в случае правых махов величина показателя Херста после нанесения возмущающего воздействия имела тенденцию к возрастанию, то в случае правых махов величина показателя Херста после нанесения возмущающего воздействия возрастала только с правой стороны измерения, а с левой наблюдалось незначительное снижение этого показателя, причем его значение как в исходном, так и

ОСОБЕННОСТИ НЕЛИНЕЙНОЙ ДИНАМИКИ

	Симметричная сторона	Левые махи		Правые махи	
		Исходный ряд	Возмущенный ряд	Исходный ряд	Возмущенный ряд
Среднее значение ПМ[i], усл. ед.	левая	6.82 ± 0.02*^	$8.27 \pm 0.03*$	6.91 ± 0.01*^	6.27 ± 0.01*
	правая	$5.92\pm0.01^{\circ}$	6.45 ± 0.02	5.51 ± 0.01	5.42 ± 0.01
Станд.отклонение ПМ[i], усл. ед.	левая	0.60 ± 0.01*^	$0.84\pm0.01^*$	$0.41\pm0.01^*$	$0.45 \pm 0.01*$
	правая	$0.38 \pm 0.01^{\circ}$	0.59 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01
МАХ(ПМ[i]), усл. ед.	левая	8.30 ± 0.02*^	11.42 ± 0.03	$8.00\pm0.01^*$	7.55 ± 0.01*
	правая	7.27 ± 0.01^	11.18 ± 0.02	6.05 ± 0.01	6.10 ± 0.01
MIN(<i>ПМ</i> [<i>i</i>]), усл. ед.	левая	5.40 ± 0.02*^	6.67 ± 0.03*	5.90 ± 0.01*	$5.25\pm0.01^*$
	правая	$5.02\pm0.01^{\circ}$	5.37 ± 0.02	4.90 ± 0.01	4.70 ± 0.01
Вариационный размах (<i>BP</i>), усл. ед.	левая	$2.90\pm0.04^{\scriptscriptstyle\wedge}$	$4.75 \pm 0.06*$	$2.10\pm0.02^*$	$2.30\pm0.02*$
	правая	$2.25 \pm 0.02^{\circ}$	5.81 ± 0.04	1.15 ± 0.02	1.45 ± 0.02

Статистические характеристики временных рядов показателей микроциркуляций симметричных областей левой и правой верхних конечностей до (исходный ряд) и после (возмущенный ряд) физических нагрузок

Примечание. N = 1000; данные представлены в виде $M \pm m$; * – p < 0.01 ($\Pi M_{\text{лев}}$ по сравнению с $\Pi M_{\text{пр}}$); ^ – p < 0.01 (исходный ряд по сравнению с возмущенным).

в возмущенном состоянии находилось в пограничной области между антиперсистентной и персистентной зонами. Следует также отметить, что в случае левых махов реакция микроциркуляций на возмущающие воздействия с левой стороны была более выраженной, чем с правой. Поэтому можно заключить, что возмущающие воздействия приводят к увеличению уровня персистентности в большей степени на той стороне измерения, на которой совершались эти воздействия.

Одновременно с уровнем персистентности под влиянием возмущающих воздействий изменялась и размерность Хаусдорфа: (*D*0) увеличивалась при левых махах (с 1.00 ± 0.03 до 1.36 ± 0.05 для $\Pi M_{\rm лев}$ и с 1.09 ± 0.03 до 1.37 ± 0.04 для $\Pi M_{\rm прав}$). В случае правых махов достоверных изменений величины *D*0 не выявлено ($D0_{\rm лев-исх} = 1.10 \pm 0.09$, $D0_{\rm лев-возм} = 1.22 \pm 0.08$; $D0_{\rm пр-исx} = 1.03 \pm 0.05$, $D0_{\rm пр-возм} = 1.03 \pm 0.04$). Таким образом, результаты исследований показали, что изменения величины размерности Хаусдорфа более выражены для левых махов по сравнению с правыми.

На рис. 3 показаны фазовые портреты аттракторов исходных и возмущенных рядов. Можно видеть, что как исходные, так и возмущенные ряды имеют овалообразную форму аттрактора, вытянутую вдоль диагонали фазовой плоскости сле-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

ва направо. Интересно отметить, что переход от левых к правым махам характеризуется инверсной динамикой лево-правосторонней асимметрии. Так, сравнивая рис. За с рис. Зв, можно видеть, что если в условиях левых махов облако исходного аттрактора (ПМ_{лев-исх}) локализовано ближе к левой нижней части фазовой плоскости, а возмущенного (ПМ_{лев-возм}) – ближе к ее правой верхней части, то в условиях правых махов наблюдается противоположная картина: облако исходного аттрактора (ПМ_{лев-исх}) локализовано в правой верхней части фазовой плоскости, а облако возмущенного аттрактора (ПМ_{лев-возм}) – в ее левой нижней части. Аналогичная инверсная динамика перехода от левых к правым махам наблюдалась и для правой стороны измерения, что можно видеть на рис. 3б и рис. 3г.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что возмущающие воздействия в виде асимметричных физических нагрузок на верхние конечности приводят к изменениям параметров нелинейной динамики временных рядов, описывающих микроциркуляторные процессы в них. Оказалось, что асимметричные физические нагрузки вызывают изменения статистических показателей перфузии МЕЗЕНЦЕВА



Рис. 2. Зависимость параметра (R/S) от времени наблюдения, построенная в двойном логарифмическом масштабе, для исходных (a,б) и возмущенных левыми махами (в,г) временных рядов микроциркуляций. Ось абсцисс $X = \log(n)$, ось ординат $Y = \log(R/S)$.

не только одноименной, но и противоположной стороны измерения. Характер и направленность этих изменений были специфичными для каждого отдельного испытуемого. В ответ на возмущающие воздействия изменялись и показатели нелинейной динамики микроциркуляций, причем эти изменения были характерны для всех испытуемых и характеризовались повышением уровня персистентности той стороны измерения, на которой совершались возмущающие воздействия, повышением размерности Хаусдорфа для случая левых махов и инверсной динамикой лево-правосторонней асимметрии геометрических форм аттракторов исходных и возмущенных временных рядов микроциркуляций. Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о существовании общих закономерностей праволевосторонней регуляции регионарного кровообращения симметричных областей верхних конечностей. Физиологический смысл полученных результатов очевиден: регуляция физиологических показателей всегда направлена на сохранение устойчивости физиологических функций, т.е. при любом внешнем возмущении, приводящем к отклонению от исходного устойчивого состояния, процессы восстановления всегда характеризуются трендовостью, т.е. являются персистентными, что объясняется усилением ауторегуляторных механизмов, направленных на поддержание устойчивости процессов микроциркуляций. Эти ауторегуляторные процессы есть проявления детерминированного хаоса, когда в основе хаотической динамики лежат детерминированные математические закономерности, которые в принципе могут быть описаны системами дифференциальных уравнений. Результаты настоящего исследования показали, что переход от ле-


Рис. 3. Фазовые портреты амплитуд флуктуаций микрокровотока исходных и возмущенных временных рядов левой (а,в) и правой (б,г) сторон измерения в условиях левых (а,б) и правых (в,г) махов. Оси абсцисс – амплитуда предыдущей точки $\Pi M[i]$ (пф. ед.) ряда, ось ординат – амплитуда последующей точки $\Pi M[i+1]]$ (пф. ед.) ряда

вых к правым махам характеризуется инверсной динамикой лево-правосторонней асимметрии.

В работе [11] авторы приводят данные относительно лево-правосторонней асимметрии показателей микроциркуляций лица человека. Показано, что суммарные спектральные амплитуды вейвлет-преобразования ЛДФ-сигнала в лобных областях лица были достоверно выше справа, чем слева. Авторы связывают эту асимметрию с морфологичеческой, вегетативной и лицевой нейропсихологической асимметрией. Наличие элементов лево-правосторонней асимметрии показателей микроциркуляций различных парных органов у животных также было отмечено ранее многими исследователями [12, 13]. Однако все эти исследования касались лишь спектральных характеристик сосудистого тонуса микроциркуляций в покое. Принципиальная новизна настоящих исследований состоит в том, что нами впервые изучены особенности реакции нелинейной

динамики микрососудистого русла на возмущающие воздействия. Именно эти характеристики необходимо учитывать в ходе работ над формулировкой математических моделей, описывающих протекание ауторегуляторных процессов в системе микроциркуляций. Результаты настоящего исследования могут быть использованы для дальнейших работ по математическому моделированию регионарного кровообращения. Эти работы могут найти применение в клинической практике, так как математическая модель позволяет исследовать условия устойчивости лежащих в ее основе дифференциальных уравнений и прогнозировать риски возникновения критических состояний у больных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИИНФ им. П.К. Анохина.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- M. Thanaj, A. J. Chipperfield, and G. F. Clough, Comput. Biol. Med. 1 (102), 157 (2018).
- 2. А. Н. Герасимов, Л. А. Михайличенко и М. И. Шпитанков, в кн. Исследование операций (модели, системы, решения) (ВЦ РАН, М., 2008), сс. 140–146.
- 3. J. B. Geddes, R. T. Carr, F. Wu, et al., Chaos, **20** (4), 045123 (2010).

- F. Esen, S. Cağlar, N. Ata, et al., Microvasc. Res. 82 (3), 291 (2011).
- O. Forouzan, X. Yang, J. M. Sosa, et al., Microvasc. Res. 84 (2), 123 (2012).
- Г. Г. Малинецкий, А. Б. Потапов и А. В. Подлазов, Нелинейная динамика. Подходы, результаты, надежды (Либроком, М., 2011).
- 7. Э. Петерс, *Фрактальный анализ финансовых рынков* (Интернет-Трейдинг, М., 2004).
- L. V. Mezentseva, S. S. Pertsov, and V. K. Hugaeva, Biophysics 60 (6), 988 (2015).
- L. V. Mezentseva, S. S. Pertsov, and V. K. Hugaeva, Biophysics 61(4), 656 (2016).
- Лазерная допплеровская флоуметрия микроциркуляции крови, под ред. А. И. Крупаткина и В. В. Сидорова (Медицина, М., 2005)
- 11. M. Benedicic, A. Bernjak, A. Stefanovska, and R. Bosnjak, Microvasc. Res. **74** (1), 45 (2007).
- 12. Л. А. Михайличенко, Регионарное кровообращение и микроциркуляция **6** (1(21)), 164 (2007)
- Л. А. Михайличенко и И. А.Тихомирова. Бюлл. эксперим. биологии и медицины 151 (1), 21 (2011).

Features of Nonlinear Dynamics of Microcirculation Parameters of the Upper Limbs under Perturbation

L.V. Mezentseva

P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

This study aimed to explore the nonlinear dynamics of the variability of microcirculatory blood flow signals in symmetrical areas of human upper limbs in the resting state and during pertubation. The perturbation arose from physical activity such as left or right arm swings in the upright position for 1 min. Laser Doppler flowmetry was used to measure microflow in 5 healthy volunteers. Signal sensors were fixed symmetrically on the lower parts of the right and left shoulders (3 cm above the elbow bend). The following parameters were estimated: the Hurst index, the Hausdorf dimension, the geometric properties of the phase portraits, and perfusion statistical characteristics. Overall, the findings indicate that perturbation effects lead to changes in the parameters of the nonlinear dynamics of the microcirculation in the upper limbs, which are characterized by increased level of persistence of the arm side that experienced a perturbation; by increased fractal dimension of chaos in the left arm when perturbations occur, as well as the inverse dynamics of left-right asymmetry of the attractors.

Keywords: nonlinear dynamics of blood flow oscillations, persistence, microcirculation

——— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.3

ГАЗООБРАЗНЫЙ ОКСИД АЗОТА И ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, СПОСОБНЫЕ КУПИРОВАТЬ COVID-19

© 2021 г. А.Ф. Ванин^{*, **}, А.В. Пекшев^{***}, А.Б. Вагапов^{***}, Н.А. Шарапов^{***}, В.Л. Лакомкин^{****}, А.А. Абрамов^{****}, А.А. Тимошин^{****}, В.И. Капелько^{****}

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

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

имени II.III. Сеченови III $T \Psi$, 119991, Шоскви, ул. Трубецкия, 6/2

***«Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана» (национальный исследовательский университет)», 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., 5/1

****Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ,

121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

E-mail: vanin.dnic@gmail.com Поступила в редакцию 02.12.2020 г. После доработки 02.12.2020 г. Принята к публикации 03.12.2020 г.

Показано, что ингаляционное введение животным и человеку газообразного NO или распыленных водных растворов биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом или N-ацетил-Lцистеином не оказывает на них заметного гипотензивного действия, что делает возможным их предполагаемое использование при лечении COVID-19. Установлено, что по мере повышения концентрации NO в газовом потоке, создаваемым аппаратом «ПЛАЗОН», с 100 до 2100 ppm уровень NO, включавшегося в комплексы с гемоглобином в крови, начинал снижаться, так что при 2000 ррт более половины этого газа включалось в динитрозильные комплексы, возникавшие в ткани легких и дыхательных путей. Таким образом ингаляционное введение газообразного NO может приводить к тому же, что и аналогичное введение растворов динитрозильных комплексов железа – к появлению в тканях легких и дыхательных цепей динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами. Поскольку эти комплексы как доноры катионов нитрозония могут (как это было предположено ранее – Биофизика, т. 65, с. 818, 2020) подавлять репликацию коронавируса, не исключено, что газообразный NO и синтезированные химическим путем биядерные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут оказаться полезными при лечении COVID-19. При испытаниях на добровольцах (соавторах статьи) максимальная безопасная концентрация вдыхаемого в течение 15 мин газообразного NO составляла ~2000 ppm, при испытаниях на крысах при вдыхании ими распыленных водных растворов динитрозильных комплексов железа испытанная в опытах максимальная безопасная доза этих комплексов составляла ~0.4 ммоля/кг массы животного.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа, COVID-19. **DOI:** 10.31857/S0006302921010208

К настоящему времени показано, что для большинства патологий, вызванных в организме животных и человека вирусной инфекцией, характерно резкое повышение в клетках и тканях хозяина уровня одного из универсальных регуляторов метаболических процессов — оксида азота (NO), а также активных форм кислорода и разнообразных цитокинов [1—7]. При этом именно повышение уровня NO обеспечивает в большинстве случаев защиту клеток и тканей хозяина от этой инфекции (2, 5—12). В частности, эта защита достигается дезактивацией важнейших вирусных белков, необходимых для репликации вирусов, таких как вирусные протеазы, обратные тран-

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ – моноядерные и биядерные формы ДНКЖ, GSH – восстановленный глутатион, NAC – N-ацетил-L-цистеин, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные ДНКЖ с глутатионом, Б-ДНКЖ-NAC – биядерные ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином.

скриптазы, факторы транскрипции и др., причем в большинстве случаев подавление активности всех этих белков вызывается S-нитрозированием в них функционально важных тиоловых групп [2, 4–12]. Вместе с тем при некоторых вирусных инфекциях, например при гриппе или вирусном иммунодефиците человека, NO может усиливать заболевание [13, 14].

Интерес к роли NO в вирусных инфекциях резко возрос в условиях пандемии COVID-19. Было предположено, что ингаляция газообразного NO может явиться спасительной терапией в преодолении этой патологии [15-20]. Действительно, такой результат был получен при лечении шести беременных женщин с COVID-19 путем их ежедневной 30- и 60-минутной ингаляции потоком газообразного NO при концентрации 160-200 ррт в течение соответственно пятнадцати первых и пятнадцати последующих суток [20]. При меньшей концентрации газообразного NO (30 ррт), использованной в работе [21], при лечении больных с COVID-19 отмечалось только улучшение функционирования кровеносных сосудов из-за вазодилатирующего действия на них NO, а также из-за блокирующего действия последнего на агрегацию тромбоцитов. Таким образом, есть основание предполагать, что ингаляция пациентам газообразного NO при повышенных дозах этого агента может оказаться одним из подходов к лечению COVID-19.

Наряду с возможностью использования газообразного NO при лечении коронавирусной инфекции вполне естественным представляется возможность использования с той же целью соединений-доноров нейтральных молекул NO. Такого рода предположение о целесообразности проверки противовирусного действия широкого класса производных оксида азота – динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами - было высказано недавно одним из авторов настоящего сообщения [22]. Эти комплексы, моноядерные и биядерные формы которых (М- и Б-ДНКЖ) характеризуются резонасными структурами $[(RS^{-})_2Fe^{2+}(NO^{+})(NO)]^+$ и $[(RS^{-})_2Fe^{2+}_2(NO^{+})_2(NO)_2]^{4+}$, способны в соответствии с этими структурами выступать в живых организмах не только в качестве доноров нейтральных молекул NO, но и в качестве доноров окисленной формы NO - катионов нитрозония (NO⁺) [23–28]. Тем самым ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут воздействовать на разнообразные метаболические процессы, ответственные за проникновение коронавирусов во внутриклеточную среду и репликацию в ней этих вирусов. Что касается доставки ДНКЖ до тканей, инфицированных коронавирусом, наиболее оптимальной представляется ингаляции пациентам

с COVID-19 распыленных водных растворов этих комплексов [22].

В пользу того, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут подавлять репликацию вирусов, причем именно как доноры катионов нитрозония, в работе [22] приводится ссылка на результаты работы [29], в которой было продемонстрировано такого рода действие ДНКЖ с цистеином на репликацию вируса Coxsackie-B, инфицирующего ткани миокарда у крыс. Катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ, вызывали S-нитрозирование тиоловых групп вирусной протеазы 2А, что приводило к подавлению активности этого формента и как следствие этого к блокированию репликации вируса Coxsackie-B [29, 30]. Аналогичное цитотоксическое действие на опухолевые клетки Jurkat, обусловленное S-нитрозированием тиолсодержащих белков, расположенных на клеточной поверхности этих клеток, при их обработке ДНКЖ с тиосульфатом было продемонстрировано в работе [31].

Таким образом, не исключено, что подавление репликации коронавируса может быть обеспечено ингаляцией пациентов распыленными водными растворами ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при соответствующем выборе оптимальной дозы этих комплексов, оптимальном выборе тиолсодержащих лигандов и времени ингаляции.

Препятствием для использования газообразного NO и распыленных водных растворов ДН-КЖ с тиолсодержащими лигандами может оказаться следующее. При повышенной дозе этих агентов в ходе их ингаляции пациентам с COVID-19 поступление в организм газообразного NO может приводить как к значительному снижению артериального давления в малом и большом круге, так и к окислению значительной части гемоглобина до метгемоглобина [32–36], тогда как при введении ДНКЖ, характеризующихся чрезвычайно высокой гипотензивной активностью [37–40], их поступление в кровь может приводить к выраженной гипотонии. В связи с этим цель настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, действительно ли эти факторы могут существенно затруднить использование газообразного NO и распыленных водных растворов ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами для лечения COVID-19?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат (FeSO₄·7H₂O) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH) и N-ацетил-L-цистеин (NAC) (Sigma, США). Газообразный NO, использовавшийся при синтезе ДНКЖ, получали в реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0.1 M HCl с последующей очисткой газооб-

разного NO методом низкотемпературной сублимации в вакуумированной камере [25].

Синтез биядерных ДНКЖ с глутатионом или Nацетил-L-цистеином. Оба типа Б-ДНКЖ (Б-ДН-КЖ-GSH и Б-ДНКЖ-NAC соответственно) синтезировали в аппарате Тунберга в реакции ферросульфата и глутатиона или N-ацетил-L-цистеина с газообразным NO при давлении 150 мм рт. ст. и молярном соотношении Fe²⁺ : GSH или Fe^{2+} : NAC, равным 1 : 2, в соответствии с методом, описанным в работе [25]. После растворения ферросульфата в 0.5 мл дистиллированной воды и глутатиона или N-ацетил-L-цистеина в 4.5 мл 15 мМ раствора HEPES-буфера при рН 7.4 приготовленные растворы помещали соответственно в верхнюю и нижнюю часть аппарата Тунберга с последующей его откачкой и напуском в него NO. После этого оба раствора смешивали в присутствии NO и встряхивали в течение 5 мин с последующей откачкой NO из аппарата. Концентрацию синтезированных таким путем Б-ДНКЖ оценивали оптическим методом по интенсивности характерных для этих комплексов полос поглощения на 310 и 350 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (при расчете на один железо-динитрозильный фрагмент в Б-ДНКЖ) [25]. Концентрация полученных Б-ДНКЖ определялась уровнем ферросульфата (5 мМ), использованным при синтезе этих комплексов.

Получение NO-содержащего газового потока и мониторинг NO, NO₂, O₂, давления крови, степени насыщения (сатурации) крови (гемоглобина) кислородом у добровольцев. Потоки газообразного NO, использовавшиеся для ингаляции животных (крыс) и добровольцев, получали на серийных образцах аппарата «ПЛАЗОН» с заводскими номерами 450 и 492 производства компании ООО «ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана» (Москва). Формирование NO-содержащих газовых потоков осуществлялось из атмосферного воздуха манипуляторами - плазмохимическими генераторами оксида азота, конструкции которых описаны в работах [41-43].

Для измерения параметров NO-содержащей газовой среды при ингаляционном воздействии использовали газовый анализатор ОРТІМА 7 производства компании MRU GmbH (Германия), позволяющий измерять в газовых потоках температуру в диапазоне 0-650°С (погрешность 1%), содержание оксида азота $C_{\rm NO}$ и двуокиси азота $C_{\rm NO_2}$ в диапазоне 0–5000 ppm и 0–1000 ppm соответственно с погрешностью 5%, а также содержание в потоке кислорода в диапазоне 0-21.0 об. % с погрешностью ±0.2% об. %.

Измерение артериального давления и пульса у добровольцев осуществляли с помощью автома-

БИОФИЗИКА том 66 **№** 1 2021 тического монитора кровяного давления ОМ-RON M3 Expert (OMRON Healthcare Co., Япония), позволяющим определять систолическое и дистолическое давление в диапазоне 0-299 мм рт. ст. с абсолютной погрешностью ±3 мм рт. ст. и частоту пульса в диапазоне 40-180 ударов/мин с относительной погрешностью ±5%.

Уровни насыщения крови кислородом у добровольца при ингаляции оксидом азота определяли оксиметром C101A2 (Medical Technology Со., Китай), позволяющим измерять насыщение гемоглобина кислородом (сатурацию SpO₂) в диапазоне 70-100% с точностью 2%.

Ингаляция газообразного NO добровольцам. При ингаляции двух здоровых добровольцев (соавторов настоящей статьи – А.В.П. и А.Б.В., возраст 45 и 55 лет соответственно) использовали аппарат «ПЛАЗОН» с заводским номером 492, для получения различных концентраций оксида азота в ингаляционной области NO-содержащего газового потока, снабженный двумя различными типами манипуляторов. Использование манипулятора, описанного в работе [42], позволяло при изменении расстояния от выходного канала манипулятора от 120 до 400 мм получать в области дыхания на оси потока концентрацию оксида азота соответственно от 600 до 100 ppm с температурой в диапазоне 50-20°С. Использование манипулятора, описанного в работе [43], позволяло при изменении расстояния от 60 до 100 мм получать в области дыхания на оси потока концентрации оксида азота соответственно от 1000 до 2100 ppm с температурой в диапазоне 50-25°С.

Доброволец, удерживая манипулятор на определенном расстоянии от носа, осуществлял вдох через нос, а выдох через рот в гофрированную трубку с внутренним диаметром 16 мм, содержащую внутри себя датчик газового анализатора ОРТІМА 7. Измерения содержания оксида азота $(C_{\rm NO}^{\rm out})$, двуокиси азота и кислорода в выдыхаемой газовой смеси производилось в течениt 3 мин через каждые 30 с. Измерение содержания оксида азота ($C_{\rm NO}^{\rm in}$), двуокиси азота и кислорода во вдыхаемой газовой смеси проводили на работающем манипуляторе до и после ингаляции. Таким образом было проведено девять процедур в диапазоне изменения содержания оксида азота $C_{\rm NO}^{\rm in}$ от 100 до 2100 ррт.

Интенсивность поглощения оксида азота в дыхательной системе при частоте дыхания 12 вдохов/мин и объеме вдыхаемого воздуха 1 литр/вдох определяли по формуле:

$$\dot{m}_{\rm NO} = 2.89 \cdot 10^{-4} (C_{\rm NO}^{\rm in} - C_{\rm NO}^{\rm out}), \tag{1}$$

где $C_{\rm NO}^{\rm in}$ и $C_{\rm NO}^{\rm in}$ измерены в ppm, — в мг/с [43]. До и после ингаляции в течение 15 мин при содержании оксида азота во вдыхаемой газовой смеси 500 и 1000 ppm у добровольцев было проведено измерение артериального давления и пульса. Измерения сатурации крови кислородом у добровольца проводили в восьми экспериментах при длительности ингаляции 4 и15 мин и при содержании оксида азота во вдыхаемом NO-содержащем газовом потоке, равном 164, 500, 1008 и 2090 ppm. Измерения проводили каждую минуту закрепленным на среднем пальце левой руки добровольца пульсоксиметром до (в течениt 5– 6 мин), во время (4 и 15 мин) и после ингаляции в течение времени, при котором величина сатурации возвращалась к начальному значению.

Ингаляция NO животным. Ингаляцию газообразным оксидом азота животных (крыс) осуществляли NO-содержащим газовым потоком, формируемым стандартным манипулятором [42] аппарата «ПЛАЗОН» с заводским номером 450. Ингаляцию проводили в течении 1 ч областью NO-содержащего газового потока, находившейся на расстоянии 180–200 мм от выходного канала манипулятора до экспериментального животного, осевые параметры ингаляционного потока в этой области: содержание оксида азота $C_{NO} = 400$ ppm, содержание двуокиси азота $C_{NO_2} = 30$ ppm, тем-

пература 38°С.

Ингаляция животных распыленными водными растворами Б-ДНКЖ с глутатионом или с NAC. Эксперименты проводили на нормотензивных крысах-самцах Вистар массой 300–400 г. Животных анестезировали путем внутривенного введения им 5%-го раствора кетамина (100 мг/кг массы). Поскольку кетамин оказывает анестезирующее действие лишь на сравнительно короткое время, крысам через каждые 30-40 мин этот анестетик вводили дополнительно в дозе 5–10 мг/кг.

Среднее артериальное давление измерялось с использованием катетера, вводившегося в яремную артерию, с последующим его подключением к электроманометру P23 Db (Gould Statham, США), на котором регистрировали среднее артериальное давление на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский госуниверситет аэрокисмического приборостроения, Санкт-Петербург). Запись на компьютер выполняли с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы Data Acquisition, модифицированной д.б.н. Е.В. Лукошковой для обработки физиологических сигналов.

Ингаляцию распыленных растворов Б-ДНКЖ с GSH или с NAC проводили, используя для этой цели небулайзер фирмы Micrilife (Италия), который заполняли 10 мл 5 мМ раствора этих комлексов. Получаемый при этом поток этого распыленного раствора, включавший в себя микрокапли диаметром 2–3 мкм, направляли через специальную иглу в носовую полость животных, что и приводило к поступлению всего 10-мл раствора Б-ДНКЖ в дыхательные пути животных и в ткань легких. В таком объеме, т.е. в дозе 50 микромолей, животным в течение часа вводили Б-ДНКЖ-NAC, тогда как Б-ДНКЖ-GSH вводили в дозе 100 микромолей в течение 2 ч (дважды по 10 мл раствора этого комплекса).

ЭПР-измерения на тканях животных. Спектры ЭПР замороженных препаратов тканей крыс регистрировали на ЭПР радиоспектрометре Model 109Е (Varian, США) Х-диапазона при 77 К. Образцы крови, печени и почек крыс перед замораживанием помещали в ампулы диаметром 4 мм с последующим быстрым замораживанием в жидком азоте. Для оценки концентрации парамагнитных центров, ответственных за регистрируемые в этих образцах сигналы ЭПР, применяли метод двойного интегрирования этих сигналов, в качестве стандартного образца использовали замороженный раствор парамагнитного М-ДНКЖ с глутатионом с известной концентрацией, характеризующийся сигналом ЭПР со значениями gфактора $g_{\perp} = 2.04, g_{||} = 2.014$ и $g_{cp} = 2.03 - сигна$ лом 2.03 [25], на котором мы остановимся ниже. Спектры ЭПР некоторых образцов регистрировали при комнатной температуре.

Статистический анализ результатов проводили, используя *t*-критерий Стьюдента с представлением экспериментальных данных как среднее ± *SEM*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингаляция добровольцев газообразным NO сопровождалась почти 90%-м поглощением этого газа в организме человека, о чем свидетельствуют приведенные в табл. 1 данные экспериментальной оценки соотношения между концентрациями вдыхаемого и выдыхаемого оксида азота при содержании NO во вдыхаемом воздухе 500 и 1700 ppm в течение 3 мин.

Измеренное соотношение между содержанием оксида азота во вдыхаемом и в выдыхаемом воздухе в диапазоне содержания NO во вдыхаемом воздухе от 100 до 2100 ppm показано на рис. 1, а на рис. 2 приведен пересчет по формуле (1) соотношения между количеством вдыхаемого оксида азота и интенсивностью его поглощения в дыхательной системе добровольца.

Оценка степени насыщения крови кислородом у добровольцев при вдыхании ими газообразного NO в диапазоне концентраций 164— 2090 ppm в течение 15 мин показала (рис. 3), что эта процедура приводила к быстрому снижению на несколько процентов содержания кислорода в крови, которое начинало повышаться до нормальных значений только через час и более. Обнаруженное снижение, очевидно, было обусловлено превращением гемоглобина в меттемоглобин в результате окисления гемового железа в его

Время, с	NO, ppm	NO ₂ , ppm	O ₂ , %	NO, ppm	NO ₂ , ppm	O ₂ , %	Локализация	
0	500	45	20.9	1700	211	20.8	На вдохе	
30	74	0	17.6	166	3	17.8	P purove	
60	68	0	17.7	184	3	17.8		
90	63	0	17.7	202	4	18.1		
120	64	0	17.7	215	4	18.2		
150	65	0	17.9	231	4	18.2	D выдохе	
180	67	0	17.8	243	5	18.2		
Средние значения	66.83	0	17.73	206.83	3.83	18.05		
Поглощение, %	86.61	100	3.17	87.79	98.18	2.75	Вдыхательной системе	

Таблица 1. Результаты измерений содержания газов на вдохе (через нос) и выдохе (через рот)

нитрозильном комплексе до трехвалентного состояния. Последущее восстановление гемового железа до двухвалентного состояния, в котором оно было способно оксигенироваться, происходило, судя по результатам, приведенным на рис. 3, в течение нескольких часов (в зависимости от степени насыщения крови кислородом).

Если учесть, что количество гемоглобина в 5 л крови взрослых мужчин составляет ~12 ммолей, а количество гемовых групп, способных связывать по одной молекуле NO, равно ~50 ммолей, то по степени снижения насыщения крови кислородом можно оценить количество нитрозильных комплексов гемоглобина, возникавших в крови добровольцев, в зависимости от концентрации NO в газовом потоке и времени его вдыхания. Как следует из табл. 2, количество NO, связавшегося в крови добровольцев с гемоглобином, варьировало от 6.5 до 1.5 ммолей при ингаляции добровольцу в течение 15 мин газообразного NO в концентрации соответственно 2090–164 ppm.

Встает вопрос – в какой мере эти величины соответствовали общему количеству газообразного NO, поглощенного организмом добровольцев, которое можно было оценить, используя приведенное на рис. 2 соотношение между концентрацией вдыхавшегося NO и количеством поглощенного за одну секунду NO в мг. Как следует из данных, представленных в табл. 2, количество NO, поглощенного организмом добровольцев, по мере повышения концентрации NO в газовом потоке начинало существенно превышать количество этого агента, включавшегося в комплексы с гемоглобином – в 2.3 раза при наибольшей концентрации NO (2090 ppm). И только при наименьшей концентрации NO в газовом потоке (164 ppm) весь поглощенный организмом NO оказывался связанным с гемоглобином.



Рис. 1. Соотношение между содержанием оксида азота во вдыхаемом и в выдыхаемом воздухе.



Рис. 2. Интенсивность поглощения оксида азота в дыхательной системе в зависимости от его содержания во вдыхаемом воздухе.



Рис. 3. Типичная кинетика изменения степени насыщения крови (гемоглобина) кислородом у добровольцев после вдыхания ими NO в течение 15 мин в диапазоне концентраций 164–2090 ppm.

Характерно, что, как показали соответствующие измерения, при понижении времени вдыхания газообразного NO до 4 мин различие между количеством этого агента, поглощенного организмом и включенным в гемоглобин, полностью нивелировалось даже при максимальной концентрации NO в газовом потоке, составлявшей 2100 ppm, — в обоих случаях оно снижалось до одинаковой величины ~4 ммоля.

Ясно, что молекулы NO, связавшиеся с гемоглобином с последующим их окислением до нитрата, не могли вызывать снижения артериального давления. Оно могло быть обусловлено только не связанным с гемоглобином NO, количество которого составляло при этом 8.5, 3.5 и 1.5 ммоля соответственно при вдыхании NO в концентрации 2000, 1000 и 500 ppm (табл. 2). Тем не менее оценка уровня артериального давления у добровольцев при таких сравнительно высоких концентрациях вдыхаемого NO не показала существенного снижения у них системного давления (табл. 3). При концентрации NO, равной 500 ppm, и температуре газового потока 50° С артериальное давление у первого добровольца после 15-минутной ингаляции снижалось в среднем не более чем на 10%, а у второго при той же NO и температуре газового потока 30° С оно практически не изменялось, тогда как при концентрации 1000 ppm и температуре газового потока $25-30^{\circ}$ С снижение артертального давления у обоих добровольцев не обнаруживалось (табл. 3).

Ингаляционное введение крысам газообразного NO, продуцируемого плазмохимическим генератором в течение 1 ч при содержании NO в газовой фазе ~400 ppm, также практически не сказывалась на артериальном давлении у животных (фиксировалось снижение менее чем на 5%). При этом в крови методом ЭПР обнаруживалось значительное количество нитрозильных комплексов гемоглобина (Hb-NO), обнаруживаемых по ха-

Таблица 2. Соотношение между полным количеством NO, поглощенным организмом добровольца, и количеством NO, связавшегося в крови добровольца с гемоглобином (в миллимолях) при 15-минутной ингаляции газообразным NO

Концентрация вдыхаемого NO	Полное количество поглощенного NO (A)	Количество NO, связавшегося с гемоглобином (<i>B</i>)	Соотношение А/В
2000 ppm	15	6.5	2.3
1000 ppm	7	3.5	2.0
500 ppm	4	2.5	1.6
160 ppm	1.5	1.5	1.0

Доброволец 1		Артериальное давление и пульс				
Измерение	1	2	3	Среднее		
До ингаляции <i>C</i> _{NO} = 500 ppm, <i>t</i> = 50°C	131/86, 66	127/87, 67	127/84, 66	128/85, 66		
После ингаляции сразу	128/76, 65	113/77, 68	118/74, 68	120/76, 67		
После ингаляции через 20 мин	108/76,66	118/77, 67	116/78, 66	114/77, 66		
После ингаляции через 60 мин	134/87, 65	134/88, 65	128/87, 66	132/87, 65		
До ингаляции <i>C</i> _{NO} = 1000 ppm, <i>t</i> = 30°C	127/83, 64	128/82, 63	129/86, 63	128/84, 63		
После ингаляции сразу	125/80, 64	125/79, 64	123/81, 64	124/80, 64		
После ингаляции через 20 мин	121/80, 64	123/80, 65	124/84, 65	122/81, 65		
После ингаляции через 60 мин	131/90, 65	134/87, 64	128/86, 65	131/87, 65		
Доброволец 2		Артериальное давление и пульс				
Измерение	1	2	3	Среднее		
До ингаляции <i>C</i> _{NO} = 500 ppm, <i>t</i> = 25°C	155/96, 65	151/95, 65	146/93, 65	151/95, 65		
После ингаляции сразу	149/92, 62	149/90, 62	150/91, 62	149/91, 62		
После ингаляции через 20 мин	143/91, 64	142/89, 63	143/93, 63	143/91, 63		
После ингаляции через 60 мин	148/95, 63	148/94, 63	147/91, 63	148/93, 63		
До ингаляции <i>C</i> _{NO} = 1000 ppm, <i>t</i> = 30°C	154/94, 63	154/97, 63	153/96, 65	154/96, 64		
После ингаляции сразу	145/87, 60	146/89, 63	148/89, 61	146/88, 61		
После ингаляции через 20 мин	144/90, 62	149/91, 63	150/92, 62	147/91, 62		
После ингаляции через 60 мин	156/93, 62	155/96, 65	153/95, 65	155/95, 64		

Таблица 3. Артериальное давление у добровольцев до и после 15-минутной ингаляции NO в концентрации 500 и 1000 ppm

Примечание: *t* – температура NO-содержащего газового потока в области ингаляции.

рактерному для них сигналу ЭПР со значениями *g*-фактора $g_1 = 2.07$, $g_2 = 2.01$ и $g_3 = 1.98$ с триплетной сверхтонкой структурой с центром при $g_2 = 2.01$ (рис. 4а). Концентрация этих комплексов достигала 75 микромолей/л крови или 6 микромолей на кг массы животных.

Этот стационарный по своему происхождению уровень определялся соотношением скоростей поступления газообразного NO в кровь, с одной стороны, и, с другой стороны, скоростью окисления NO в составе нитрозильных комплексов Hb кислородом воздуха, приводившего к исчезновению этих комплексов [35, 36].

Появление значительного количества комплексов Hb-NO в крови показывает, что газообразный NO при ингаляционном введении достаточно легко проникал в кровь и далее в эритоциты, в которых, связываясь с гемовыми группами гемоглобина, образовывал ЭПР-регистрируемые мононитрозильные комплексы Hb-NO. По-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

скольку заметного снижения системного артериального давления при этом не обнаруживалось, есть основание утверждать, что подавляющая часть газообразного NO, поступавшего через легкие в кровь, связывалась с гемоглобином, так что оставшейся части NO (несвязавшейся в крови с гемоглобином) было недостаточно для инициирования снижения артериального давления.

Сигнал ЭПР Hb-NO, обусловленный сохранением в органах животных остаточной крови, регистрировался практически во всех органах животных, прошедших процедуру ингаляции газообразным NO. На рис. 4 приведены такого рода сигналы, зарегистрированные в легких и почках крыс. Образование других парамагнитных нитрозильных комплексов железа, а именно М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характеризующихся сигналом ЭПР с g_{cp} =2.03, приводимым ниже на рис. 5 и 6, в исследованных препаратах крыс обнаружено не было.



Рис. 4. Спектры ЭПР замороженных препаратов крови (1), легких (2) и почек (3) крысы, взятых после одночасовой ингаляции животного газообразным NO. Условия записи: T = 77 K, амплитуда модуляции 0.4 мTл, усиление радиоспектрометра ×10⁴.

Ингаляция крыс распыленными водными растворами Б-ДНКЖ-NAC или Б-ДНКЖ-GSH соответственно в количестве 50 или 100 микромолей на животное в течение одного или двух часов приводила к появлению в ткани легких этих животных белок-связанных М-ДНКЖ, обнаруживаемых по характерному для них сигналу ЭПР со значениями *g*-фактора $g = 2.04, g_{||} = 2.014,$ $g_{\rm CD} = 2.03$, о котором упоминалось выше (называемому в соответствии со средним значением *g*-фактора сигналом 2.03) (рис. 5, спектр 3; рис. 6, спектр 1). О белковой природе М-ДНКЖ свидетельствовал факт сохранения такой же анизотропной формы сигнала 2.03 при повышении температуры его регистрации до комнатной: низкая подвижность белковой глобулы, включавшей М-ДНКЖ, была недостаточна при этой температуре для усреднения анизотропии g-фактора

Судя по интенсивности сигнала 2.03, регистрируемого в легких, концентрация М-ДНКЖ в ткани этого органа при ингаляции животным Б-ДНКЖ с GSH или с NAC составляла соответственно 70 ± 20 и 90 ± 20 мкМ/кг влажной ткани. Поскольку по отношению к исходному количеству Б-ДНКЖ, поступавшему в организм животных (соответственно 100 и 50 микромолей на животное), стационарная концентрация М-ДНКЖ в легких у животных, вдыхавших Б-ДНКЖ-NAC, была примерно в два раза выше, есть основание полагать, что эффективность взаимодействия этих комплексов с белковым материалом, приво-



Рис. 5. Спектры ЭПР замороженных препаратов крови (*1*), сердца (*2*), легких (*3*), печени (*4*) и почек (*5*) крысы при ингаляционном введении ей в течение двух часов распыленного водного раствора Б-ДНКЖ с глутатионом. Условия записи: T = 77 К, амплитуда модуляции 0.4 мТл, усиление радиоспектрометра ×10⁴.

дившего к превращению Б-ДНКЖ в белок-связанные М-ДНКЖ, была выше для Б-ДНКЖ-NAC. Не исключено, что это было обусловлено способностью NAC как тиолсодержащего лиганда более легко, чем GSH, проникать сквозь клеточные мембраны.

Сигнал 2.03 с интенсивностью, соответствующей 10 ± 5 и 30 ± 10 мкM/кг влажной ткани у крыс, ингалированных соответственно Б-ДНКЖ с GSH и с NAC, был зарегистрирован также в ткани почек (рис. 5, спектр 5; рис. 6, спектр 2). Появление М-ДНКЖ в почках свидетельствует о том, что небольшая часть Б-ДНКЖ могла через легкие поступать в кровь и затем аккумулироваться в почках с последующим удалением образовавшихся М-ДНКЖ из организма. Что касается крови, то судя по едва регистрируемому в ней сигналу 2.03 с интенсивностью, соответствующей не более 1-2 мкМ/л, стационарный уровень белоксвязанных М-ДНКЖ был незначителен и не мог инициировать заметного снижения артериального давления у животных. Действительно, при ингаляции крысам Б-ДНКЖ-GSH никакого заметного снижения артериального давления у этих животных не обнаруживалось. Небольшое (не более чем 5%-е) снижение артериального давления у животных наблюдалось при введении им Б-ДНКЖ-NAC. Судя по результатам работ [38, 39], заметное снижение артериального давления у крыс (на ~20%) имело место при внутривенном



Рис. 6. Спектры ЭПР замороженных препаратов легких (1), почек (2), крови (3), сердца (4), печени (5) и скелетной мышцы (6) крысы после одночасового ингаляционного введения ей распыленного водного раствора Б-ДНКЖ с Nрацетил-L-цистеином. Условия записи: T = 77 K, амплитуда модуляции 0.4 мТл, усиление радиоспектрометра ×10⁴.

введении им ~30 мкМ/л Б-ДНКЖ с GSH или цистеином.

Что касается интенсивности сигнала 2.03 в других тканях — в тканях печени и сердца, она, как и в крови, была незначительной и соответствовала не более 2—3 мкМ/кг влажной ткани (рис. 5, 6). Характерно, что ни в легких и почках, ни в крови, ни в других тканях крыс при введении им Б-ДНКЖ с GSH или с NAC появление Hb-NO не обнаруживалось, судя по спектрам ЭПР. Это означает, что не имело места заметное высвобождение нейтральных молекул NO из вводимых ДНКЖ.

Таким образом ингаляционное введение крысам в течение 1 или 2 ч в составе распыленных водных растворов 50 или 100 микромолей ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (0.2 или 0.4 ммоля/кг веса животных) не оказалось опасным в отношении снижения артериального давления. Подавляющая часть этих комплексов локализовалась в легких. При этом их концентрация в легких – 0.07-0.09 ммоля/кг массы ткани – была существенно ниже токсической дозы использованных комплексов согласно данным, приводимым в работе [37]. Величина LD_{50} для Б-ДНКЖ с глутатионом для крыс при внутривенном введении им этих комплексов оказалась равной 3.8 ммолей ДНКЖ /кг массы животного [37].

ОБСУЖДЕНИЕ

Неожиданный и наиболее интересный результат, полученный при изучении последствий инга-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

ляции газообразного NO на добровольцах, — что при высоких дозах этого агента, поступающего в организм человека, значительная его часть (более половины — до 8.5 ммолей при концентрации NO в газовом потоке 2100 ppm) оставалась не включенной в комплексы с гемоглобином. Встает вопрос — почему молекулы NO, поступающие в легкие, начинали задерживаться в ткани легких и, очевидно, в ткани дыхательных путей, не поступая в кровь, где они могли бы связаться с молекулами гемоглобина как ловушками NO? И второй вопрос — почему, как это следует из табл. 2, задержка NO в ткани легких усиливалась по мере повышения дозы NO, поступавшего в эти ткани?

Ответы на эти вопросы можно получить исходя из данных, полученных в работах [44, 45], в которых изучалось действие газообразного NO на культуры клеток животных. В работе [44] было достаточно убедительно показано, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами по своему количеству доминируют среди других продуктов, образующихся в реакции NO с внутриклеточным содержимым - S-нитрозотиолами, органическими и неорганическими нитритами и нитратами. Этот результат указывает на то, что именно включение NO в эти комплексы могло определять задержку NO в тканях легких и дыхательных путей при вдыхании этого агента добровольцами. Что касается работы [45], то в ней было обнаружено значительное повышение уровня слабосвязанного («свободного») железа при понижении содержания кислорода в среде культивирования клеток животных, т.е. в условиях гипоксии, которое приводило к резкому повышению количества ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, образующимися в реакции NO и тиолов со «свободным» железом. Таким образом, исходя из этих результатов, можно предположить, что обнаруженное нами усиление задержки NO в ткани легких и дыхательных путей по мере повышения дозы вдыхаемого добровольцами газообразного NO могло быть обусловлено повышением содержания ДНКЖ в этих органах, естественно, в соответствии с законом действующих масс, а также из-за повышения в них уровня свободного железа. Последнее, в свою очередь, могло определяться ослаблением оксигенации тканей легких и дыхательных путей, т.е. их гипоксией в результате включения кислорода, поступавшего в них из воздуха, в реакцию с газообразным NO с образованием диоксида азота (NO_2) .

Таким образом, ингаляция добровольцев газообразным NO могла приводить к поглощению значительной части этого агента в тканях легких и дыхательных путей в результате его включения в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Тем самым реализовалась ситуация, аналогичная ингаляционному введению распыленных растворов этих комплексов, исследованному в нашей работе. В обоих случаях как у добровольцев, так и у животных не обнаруживалось заметного влияния исходно вводимых газообразного NO и ДНКЖ с GSH или с NAC на системное артериальное давление: ДНКЖ, образующиеся после введения добровольцам NO или те же комплексы, исходно вводившиеся животным, локализовались в основном в легких.

Из результатов экспериментов на животных следует, что ингаляционно вводимые им ДНКЖ не переходили в заметном количестве в кровь. Наибольшая их концентрация в крови крыс составляла 1–2 мкМ/л, что было существенно ниже концентрации этих комплексов (30–40 мкМ/л), вводившихся нормотензивным крысам внутривенно, при которой системное артериальное давление снижалось на 20% [38, 39].

Следует отметить. что в опытах с ингаляцией крысам газообразного NO в легких и печени этих животных были зарегистрированы сигналы ЭПР, характерные только для комплексов Hb-NO (рис. 4). Сигнал 2.03, характерный для М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, даже в легких не наблюдался, что, казалось бы, не согласуется с высказанным выше предположением о возможности образования этих комплексов у таких животных. Это несоответствие снимается, если учесть, что в тканях животных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами существуют преимущественно не в ЭПР-активной, т.е. парамагнитной мономерной форме (М-ДНКЖ), а в ЭПР-неактивной, т.е. диамагнитной форме – Б-ДНКЖ [46, 47]. Поэтому отсутствие в спектре ЭПР легких

крыс (рис. 4) сигнала 2.03 не означает, что в легких у крыс, обработанных газообразным NO, не возникали ДНКЖ в их биядерной форме.

Тем не менее ясно, что вопрос о возникновении ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в органах животных (и человека) при ингаляции газообразным NO остается открытым и требует дальнейших исследований.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что преимущественная локализация ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в тканях легких и дыхательных путей при введении животным этих комплексов как предварительно синтезированных, так и (как это предполагается) возникающих в этих тканях при введении газообразного NO приводит к тому, что заметное снижение артериального давления у этих животных не имеет места. Этот результат снимает возражение против проведения ингаляционного введения газообразного NO или низкомолекулярных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами пациентам с COVID-19 с целью возможного купирования этого заболевания.

Как предполагается в работе [22], цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержашими лигандами на короновирус может определяться способностью этих комплексов выступать в качестве доноров NO⁺, обеспечивающих S-нитрозирование важнейших для репликации SARS-CoV-2 вируса и тем самым способных вызывать купирование COVID-19. Не исключено, что накопление ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в тканях легких и дыхательных путей, т.е. основных мест локализации коронавируса в организме человека, при контакте этих тканей как с газообразным NO, так и с экзогенными низкомолекулярными ДНКЖ может оказать существенное положительное действие на процесс устранения короновируса из организма человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки РФ (00008202014-00018, № АААА-А17-117040810310-8, 0082-2014-0008, и АААА-А17-1170403100008-5), спонсирована Российским академическим проектом «5-100», а также финансирована в рамках грантов Российского фонда фундаментальных исследований No. 18-04-00059а и 18-015-00027.

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. Процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Н. О. Быкова, Н. В. Горбунов, А. А. Волгарев и др., Бюлл. эксп. биол. мед. 112, 617 (1991).
- 2. G. Karupian and N. Harris, J. Exp. Med. **181**, 2171 (1995).
- 3. E. Peterhans, Biol. Trace Element Res. 56, 107 (1997).
- 4. T. Akaike and H. Maeda, Immunology **101**, 300 (2000).
- 5. S. Akerstrom, M. Mousavi-Jazi, J. Klingstrom, et al., J. Virol. **78**, 1966 (2005).
- C. J. Lowenstein, S. L. Hill, A. Lafond-Walker, et al, J. Clin. Invest. 97, 1837 (1996).
- 7. C. S. Reiss and T. Kamatsu, J. Virol. 72, 4547 (1998).
- E. Keyaerts, L. Vijgen, L. Chen, et al., Int. J. Infect. Dis. 8, 223 (2004).
- W. Xu, S. Zheng, R.A. Dweik, et al., Free Radic. Biol. Med. 41, 19 (2006).
- 10. G. Regev-Shoshani, S. Vimalanathan, B. McMullin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **31**, 48 (2015).
- 11. E. U. Uehara, B. de Stefano Shida, and C. A. de Brito, Inflamm. Res. **64**, 845 (2015).
- 12. M. Colosanti, T. Persichini, G. Venturini, et al., IUBMB Life, **48**, 25 (1999).
- L. A. Perrone, J. A. Belser, D. A. Wadford, et al, J. Infect. Dis. 207, 1576 (2013)
- 14. D. Torre and G. Ferrario, Med. Hypothesis 47, 405 (1996).
- 15. L. J. Ignarro, Br. J. Pharmacol. 177, 3848 (2020).
- 16. J. Zhang, B. Xie, and K. Hashimoto, Brain, Behavior, and Immunity **87**, 59 (2020).
- 17. A. Cavezzi, E, Troiani, and S. Corrao, Clinics and Practice 10, 1271 (2020).
- J. Kobayashi and I. Murata, Ann. Intensive Care 10, 61 (2020).
- N. A. Adusumilli, D. Chang, J. M. Friedman, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 103, 4 (2020).
- B. S. Fakhr, S. B. Wiegand, R. Pinkiroli, et al., Obstetrics & Gynecology 135 (6), 1109 (2020). DOI: 10.1097/AOG.00000000004128
- 21. R. Parikh, C. Wilson, J. Weinberg, et al., Ther. Adv. Respir. Dis. 14, 1 (2020).
- 22. А. Ф. Ванин, Биофизика 65, 818 (2020).
- 23. 23. A. F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. 21, 1 (2009).

- 24. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, J. Biophys. **2011**, 878236 (2011). DOI: 10.1155/2011/878236
- 25. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 23, 136 (2011).
- A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
- 27. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys. 77, 279 (2019).
- 28. A. F. Vanin, Appl. Magn. Res. **51**, 851 (2020). DOI: 10.1007/s00723-020-01270-6
- 29. C. F. Badorff, B. Fichtlscherer, A.Mülsch, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 6, 305 (2002).
- 30. C. F. Badorff, B. Fichtlscherer, R. E. Roads, et al., Circulation **102**, 182 (2000).
- 31. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **40**, 1340 (2006).
- 32. M.-D. Fratacci, C. G. Frostell, et al., Anesthesiology 75, 990 (1991).
- 33. C. Frostell, M.-D. Fratacci, J. C. Wain, et al., Circulation **83**, 2038 (1991).
- B. Yu, F. Iscinose, D. B. Bloch, et al., Br. J. Pharmacol. 176, 246 (2019).
- A. Wennmalm, G. Benthin, A. Edlund, et al., Circ. Res. 73, 1121 (1993).
- C. Miller, M. Miller, G. Regev, et al., J. Cystic Fibrosis 11, 324 (2012).
- 37. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **26**, 148 (2012).
- 38. V. L. Lakomkin, A. F. Vanin, A. A. Timoshin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 16, 413 (2007).
- A. A. Timoshin, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, et al., Eur. J. Pharmacol. 765, 525 (2015).
- 40. T. Liu, M. Zhang, M. H. Terry, et al., Mol. Pharmacol. **93**, 427 (2018).
- А. В. Пекшев, Н. П. Козлов, А. Б. Вагапов и др., в кн. NO-mepanus: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине, под ред. С. В. Грачева, А. Б. Шехтера и Н. П. Козлова (Издательский дом «Русский врач», М., 2001), с. 192.
- 42. A.V. Pekshev, A.B. Shekhter, A.V. Vagapov, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **73**, 74 (2018).
- A. B. Shekhter, A. V. Pekshev, A. B. Vagapov, et al, Clin. Plasma Med. **19–20**, 100101 (2020). doi.org/10.1016/j.cpme.2020.100101
- 44. J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., Free Rad. Biol. Med. 51, 1558 (2011).
- 45. Q. Li, C. Li, H. K. Mahtani, et al., J. Biol. Chem. **289**, 19917 (2014).
- 46. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **62**, 1 (2017).
- 47. В. Д. Микоян, Е. Н. Бургова, Р. Р. Бородулин и А. Ф. Ванин, Биофизика **65**, 1142 (2020).

Gaseous Nitrogen Oxide and Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Potential Medicines that Can Relieve COVID-19

A.F. Vanin^{*, **}, A.V. Pekshev^{***}, A.B. Vagapov^{***}, N.A. Sharapov^{***}, V.L. Lakomkin^{****}, A.A. Abramov^{****}, A.A. Timoshin^{****}, and V.I. Kapelko^{****}

*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

***Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia

****National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. 3-ya Chrepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

It has been shown that administration of inhaled gaseous nitric oxide (gNO) or sprayed aqueous solutions of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione or N-acetyl-L-cysteine to animals and humans was not associated with the noticeable hypotensive effects in subjects. Potentially, these attributes may be useful in treatment of COVID-19. It was found that increasing the NO concentration from 100 to 2100 ppm in the gas flow created by the Plazon system caused a decrease in the NO level in complexes with hemoglobin in the blood, so that at 2000 ppm, more than half of this gas was included into dinitrosyl complexes formed in tissues of the lungs and respiratory tract. Thus, inhalation of gNO may lead to effects similar to those observed after analogous administration of solutions of dinitrosyl iron complexes, namely, to the presence of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in lung and respiratory tissues. Taking into account the hypothesis posited earlier (Biophysics 65, 818, 2020) that these complexes as donors of the nitrosonium cation are able to suppress coronavirus replication, it is not unlikely that usage of gaseous NO and chemically synthesized dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands may help treat COVID-19.

Keywords: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, COVID-19

= ХРОНИКА =

УДК 577.3

VI СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ

© 2021 г. Г.Ю. Ризниченко*, А.А. Анашкина**, Ю.Д. Нечипуренко**, А.Б. Рубин*

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

**Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32 E-mail: anastasya.anashkina@gmail.com

> Поступила в редакцию 06.11.2020 г. После доработки 06.11.2020 г. Принята к публикации 13.11.2020 г.

Дан обзор проблем современной биофизики, которые обсуждались на VI съезде биофизиков России, Сочи, сентябрь 2019 г. (http://conf-2019.biophys.ru). На пленарных, секционных и стендовых сессиях были представлены результаты фундаментальных и прикладных исследований в области биофизики одиночных биомакромолекул и молекулярных комплексов, биофизики мембран, биофизики клетки, бионанотехнологии. Большое внимание было уделено вопросам применения информационных технологий, математического и компьютерного моделирования и методов биоинформатики как необходимого инструмента исследований на всех уровнях организации живых систем, начиная от биомакромолекул и заканчивая биогеоценозами, а также новым экспериментальным методам биофизических исследований. Наряду с фундаментальными проблемами изучения физических механизмов регуляции биологических процессов на молекулярном, субклеточном и клеточном уровне широко обсуждались вопросы применения результатов биофизических исследований в медицине и экологии. Следующий Съезд биофизиков России решено провести в 2023 г.

Ключевые слова: VI Съезд биофизиков России, молекулярная биофизика, медицинская биофизика, биофизика сложных систем, экологическая биофизика, образовательный центр «Сириус». **DOI:** 10.31857/S000630292101021X

Шестой съезд биофизиков России [1], прошедший в Сочи в 2019 г., продемонстрировал выход отечественной науки на новый уровень. В целом можно сказать, что тридцать лет с начала преобразований и смены государственного строя в нашей стране биофизика, как и другие науки, переживала нелегкие времена и приобретала новые качества. Широкий фронт исследований, который поддерживался в советской науке, сменился на какое-то время развитием узких и порой прикладных направлений, фундаментальная наука за счет многолетнего недофинансирования потеряла кадровый состав и системную организацию, были закрыты целые направления и отчасти разрушены научные школы. Однако в последние годы возобладали другие процессы – при новой системе грантового финансирования возникла новая научная реальность, в которой себя нашли и молодые исследователи, и те, кто сохранил верность науке. Большая часть исследователей, уехавших за рубеж, не стала порывать с отечественной наукой, множество совместных публикаций, которые появились отчасти благодаря грантам и мегагрантам, свидетельствуют о том, что наука в нашей стране стала более интернациональной, она в большей степени, чем когда-либо, вписана в мировой контекст.

В этом процессе есть как положительные, так и отрицательные стороны – так, роль экспертных советов теперь во многом исполняют редакции международных журналов и русский научный язык в значительной степени вытеснен из науки. Регулярное проведение съездов Российских биофизиков в данных нелегких условиях оказалось очень важным делом, позволяющим консолидировать сообщество биофизиков и не потерять связи между биофизиками как внутри страны, так и с теми, кто оказался по разным причинам за ее пределами. В шестом съезде участвовали биофизики из десяти стран, кроме России: Азербайджана, Белоруссии, Узбекистана, Эстонии, Казахстана, Армении, Украины, Великобритании, Германии и США.

Так как всего было принято более тысячи докладов (примерно половина — заочные участники), здесь не представляется возможным кратко охарактеризовать и десятую часть всего, что происходило на Съезде. Уже тот факт, что Съезд проходил в образовательный центре «Сириус», созданном в 2014 году образовательным фондом

«Талант и успех» по инициативе и при поддержке Президента РФ, многое значит – по сути, это идеальная площадка для проведения занятий со школьниками и студентами, которые здесь проходят обучение. Сотрудники физического и биологического факультетов МГУ регулярно проводят занятия в «Сириусе», знакомят учащихся с экспериментальными биофизическими методами, готовят научную смену. В рамках Молодежной школы о современной биофизике рассказывали участники Съезда профессор Бостонского университета М. Франк-Каменецкий (США), профессора МГУ имени Ломоносова С.И. Погосян и Г.Ю. Ризниченко. Особенно много вопросов слушатели задавали биофизику и писателю Ю.Д. Нечипуренко, автору популярных книг о том, как устроена живая клетка и мозг («Живой дом» и «Ключи от головы» соответственно). Практические занятия по молекулярному моделированию и экологической биофизике провели А.А. Анашкина (Институт молекулярной биологии РАН), А.Н. Дьяконова, И.В. Конюхов, С.С. Хрущев, Э.И. Никельшпарг (кафедра биофизики биологического ф-та МГУ).

В последние годы биофизика, как междисциплинарная отрасль биологии, стала особенно востребованной в области фундаментальных исследований динамического поведения биологических систем самого разного уровня организации, от молекулярного до уровня популяций и биогеоценозов. Кроме того, разработанные относительно недавно экспериментальные методы криоэлектронной микроскопии, атомной силовой микроскопии и др. позволяют изучать структуры биомакромолекул и их комплексов на масштабах десятков нанометров. Методы оптогенетики с использованием флуоресцирующих белков в сочетании с методами фемтосекундной спектроскопии позволяют проследить динамику процессов, происходящих на уровне взаимодействий отдельных макромолекул – белков и их комплексов. Именно на этих пространственновременных масштабах вся совокупность процессов взаимодействия между атомами, которые описываются физическими законами атом-атомных взаимодействий, начинает проявлять свойства, определяющие специфику биологических систем: направленный транспорт электронов и ионов, ферментативные акты. При этом биофизические методы позволяют изучать динамику процессов в структурах белков, липидов, ДНК и других макромолекул и их комплексов. Таким образом, современная биофизика получила возможность ответить на важнейший вопрос: каким образом физические взаимодействия, имеющие место в биологических, созданных в процессе эволюции структурах, в своей совокупности обеспечивают биологически целесообразные лействия.

Председатель Оргкомитета Съезда Андрей Борисович Рубин открыл съезд установочным докладом о проблемах современной биофизики. Существует несколько определений биофизики. Следуя учебнику А.Б. Рубина биофизика – это наука о механизмах фундаментальных физических взаимодействий, лежащих в основе биологических процессов. Общие законы, обнаруженные при изучении природы, и методы, развитые для анализа природных систем в физике, прилагаются для анализа и описания живых систем в биологии. Развитие физики и экспериментальной биологии, в первую очередь биофизики, происходило в тесном взаимодействии на всех этапах развития науки. Можно назвать имена Декарта, Гарвея, Ломоносова и многих других, которые благодаря своему энциклопедическому образованию и широте взглядов вносили свой вклад в междисциплинарные области науки. В биофизике благодаря этому развивались области биомеханики, биоэлектрических явлений, оптических свойств биологических объектов, процессов ионного транспорта. В основном теоретические представления современной экспериментальной биологии основаны на фундаментальных представлениях физической химии, сложившихся в конце XIX – начале XX веков. В наше время формируется качественно новый этап взаимодействия физики и биологии в биофизике. Все великие открытия в генетике и молекулярной биологии XX века были сделаны без необходимости систематического привлечения основных понятий теоретической физики. Теперь мы рассматриваем живую клетку, состоящую из организованного набора белковых «машин», взаимодействующих друг с другом. Мы знаем равновесные молекулярные структуры белков, но все еще очень далеки от полного понимания физических и физико-химических механизмов их внутримолекулярных взаимодействий, динамики их работы в гетерогенной среде живой клетки. Эти представления должны быть выработаны при помощи творческого содружества физиков, химиков, биологов и математиков. Представления о физикохимических механизмах реакций молекул в гомогенных растворах, которыми обычно пользуются исследователи, не адекватны тому, что происходит в гетерогенной системе.

Экспериментальная биофизика имеет дело с наноразмерными структурными элементами (макромолекулы, мембраны, белки), непосредственную информацию о свойствах которых мы в настоящее время можем получать благодаря новым экспериментальных методам, прежде всего радиоспектроскопии широкого диапазона. Это значит, что биологический объект становится источником информации, которая может способствовать развитию отдельных областей физики. Примером может служить действие света на фо-

точувствительные белки, когда поглощение кванта света приводит к направленным конформационным перестройкам белковой молекулы, тем самым переводя ее в активное состояние. В общих чертах этот принцип осуществляется в фотобиологии, фотосинтезе, зрительной рецепции. Проблема физики здесь состоит в том, чтобы раскрыть, каким образом «плотная» структура белка достигает определенного структурно-конформационного состояния во взаимодействии стохастических и детерминистских степеней свободы. В биофизике мы говорим условно о «целесообразном» поведении наноразмерных макромолекул, о процессах дальнего порядка взаимодействия между ними в живой клетке. Роль физики здесь состоит в выработке новых понятий, физических моделей, которые в законченном виде в настоящее время не существуют. Тем самым физика, химия и биология взаимно обогащают друг друга. Роль математики в этом процессе взаимодействия трудно переоценить. На всех этапах развития математической биологии в биофизике привлекались все новые и новые математические методы по мере углубления наших знаний об организации и взаимодействии элементов живого. Начиная с обыкновенных дифференциальных уравнений, в биофизике затем стали использовать качественную теорию дифференциальных уравнений, уравнения математической физики. В настоящее время математическое описание хаотических процессов, возникновения фрактальных структур находят свое приложение в анализе динамики биологических процессов. Все это становится доступно непосредственному экспериментальному наблюдению на молекулярном уровне организации живой материи. Это может говорить о возможных, скрытых пока от нас особенностях элементарных взаимодействий структурных элементов в живой системе, которые были выявлены и «целесообразно» использованы в биологии за миллионы лет эволюции на низших структурных уровнях организации живого.

Биология становится источником новых знаний, помогающих решению не только собственно биологических проблем, но и обогащающих те разделы физики, с которыми она взаимодействует. Таким образом, создается теоретическая основа современной биофизики. Наука развивается, это живая система, и задачи биофизики могут меняться и уточняться со временем — по сути, каждый съезд позволяет несколько по-новому взглянуть на нашу науку.

Программа Съезда включала пленарные доклады и секционные заседания с устными докладами, обсуждениями и стендовыми сессиями. Программа была сформирована в соответствии с логикой изложения биофизики как единой науки, включающей крупные разделы: биофизика сложных систем, молекулярная биофизика, био-

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

физика клетки. Исследования в области биофизики сложных систем и молекулярной биофизики обеспечивают фундаментальные теоретические основы биофизики, работы в области биофизики клетки относятся к изучению физико-химических механизмов конкретных процессов в живых системах.

Ниже мы более подробно остановимся на пленарных докладах, где были представлены современные теоретические представления о процессах в живых системах, сформировавшиеся на основе результатов изучения конкретных биологических объектов биофизическими методами. Как правило, в качестве пленарных докладчиков выступали руководители научных коллективов, представители которых выступали на соответствующих секциях с изложением результатов изучения конкретных биологических объектов.

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Этот раздел биофизики включает общетеоретические подходы к изучению биологических процессов с использованием методологии естественных наук, в первую очередь физики — науки о фундаментальных механизмах природных процессов. Во многом это пересекается с направлением наук о живом, которое называется «системная биология» (Systems Biology).

Прогресс современной биофизики и возрастание ее роли связано с развитием современных информационных технологий. Аппаратом биофизики сложных систем служит математическое моделирование, позволяющее формализовать и структурировать знания о живом объекте. До недавнего времени основным математическим аппаратом моделирования в биофизике был классический аппарат дифференциальных уравнений математической физики, в котором переменными служат концентрации взаимодействующих биохимических компонентов. Современные мощности компьютеров позволяют развивать агентные методы компьютерного моделирования, в которых имитируется поведение агентовкомпонентов системы: отдельных атомов в биомакромолекуле в методе молекулярной динамики, отдельных молекул – в методе броуновской динамики. Такие модели аккумулируют большие массивы знаний, содержащихся в международных базах данных, например таких, как Protein Data Bank. Включение в модели больших массивов данных (Big Data) позволяет использовать компьютерные модели для воспроизведения процессов в живых системах самого разного уровня, в том числе имитировать процессы в организме человека при решении вопросов персонифицированной медицины.

На секциях «Биофизика сложных систем» и «Биоинформатика и системная биология» обсуждались проблемы, общие для разнообразных макроскопических систем, состоящих из множества элементов, кооперативное поведение которых приводит к возникновению новых структур, формированию сложных функций и поведения в изменяющейся среде. В основе исследований лежит системный подход, т.е. стиль научного мышления, ориентированный на интеграцию научных знаний и совмещающий изучение проблемы на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Подходы и методы биофизики сложных систем и биоинформатики являются важной частью многих областей биологии. В экспериментальной молекулярной биологии такие методы биоинформатики, как анализ изображений и обработка сигналов, позволяют получать полезные результаты из большого количества исходных данных. В области генетики и геномики биоинформатика помогает в упорядочивании и аннотировании геномов и наблюдаемых мутаций. Она играет роль в анализе данных из биологической литературы и развитии биологических и генетических онтологий по организации и запросу биологических данных. Инструменты биоинформатики помогают в сравнении генетических и геномных данных и в целом в понимании эволюционных аспектов молекулярной биологии. В общем виде она помогает анализировать и каталогизировать биологические пути и сети, которые являются важной частью системной биологии.

Пленарный доклад Н.А. Колчанова (ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск) назывался: «Генетика, биоинформатика, системная компьютерная биология» и был посвящен кругу проблем, для решения которых необходимо использование трех перечисленных подходов: (а) – интеграция, анализ и интерпретация геномных, транскриптомных, протеомных, метаболомных данных; (б) – идентификация сайтов связывания транскрипционных факторов в регуляторных районах генов, оценка влияния мутаций в этих регуляторных районах на экспрессию генов; (в) – реконструкция генных сетей, выявление молекулярно-генетических механизмов формирования патологий, поиск генов, вносящих максимальный вклад в формирование целевых фенотипических (клинических) признаков, контролируемых генными сетями и на этой основе - предсказание наиболее перспективных мишеней для терапии заболеваний; (г) – реконструкция генетических механизмов регуляции морфогенеза растений; (д) – анализ особенностей молекулярной эволюции генных сетей и молекулярно-генетических систем; (е) – компьютерный дизайн экспериментов по созданию биотехнологически значимых продуктов.

Методы системной биологии и биоинформатики успешно применяются в направленном поиске лекарственных препаратов. Спектр биологической активности химического соединения это множество видов биологической активности, которые отражают результат взаимодействия химических соединений с различными биологическими объектами. Поскольку исчерпывающая экспериментальная оценка всех видов биологической активности химических соединений нереальна, для прогнозирования множества видов биологической активности используются методы биоинформатики. Это позволяет определить наиболее перспективные направления для тестирования фармакологического действия конкретных веществ и отсеять потенциально опасные молекулы на ранних стадиях исследований. В докладе В.В. Поройкова (Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва) «От молекулы к лекарству: медицинская биоинформатика in silico» обсуждалось современное состояние этой науки и приведены адреса электронных ресурсов, разработанных коллективом, представляемым автором. Сегодня медицинская биоинформатика перестает быть всего лишь «поставщиком» математических методов и компьютерных программ для анализа данных. Это – мультидисциплинарная область науки, интегрирующая разнородные химические, биологические и медицинские данные с целью извлечения из них полезной информации и генерации новых знаний. Сравнительное рассмотрение в биологических образцах в норме и при различных заболеваниях геномных, транскриптомных, протеомных, метаболических и других экспериментальных данных дает возможность идентифицировать биомаркеры, которые могут быть использованы для повышения качества диагностики, а также фармакологические мишени, воздействие на которые может привести к нормализации патологических пронессов

Фундаментальной проблемой биофизики сложных систем является выяснение закономерностей, лежащих в основе структурообразования в живых системах. В докладе В.А. Твердислова (физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) «Хиральные иерархии как физическая основа молекулярно-биологических структур» показано, что эволюционно сформировавшаяся и ставшая базовой система четко стратифицированных уровней макромолекулярных и надмолекулярных биологических структур основана на принципе хирального дуализма. В биологических системах автором обнаружен общий системный принцип спонтанного формирования дискретных иерархических структур в исходно гомохиральных системах. Воспроизведение характерных паттернов в самоорганизующихся иерархических структурах разного уровня с изменяющимися фи-

зическими механизмами структурообразования основывается на единых симметрийных принципах. Для всех биологических систем, от биомакромолекул до организмов, характерной особенностью является формирование череды вложенных или параллельно развивающихся структур с подобным или изменяющимся типом симметрии, возрастающим масштабом и, что принципиально важно, изменяющимся знаком хиральности при переходе на следующий уровень усложнения организации биологических систем.

Обсуждению проблем искусственного интеллекта и его применению были посвящены доклады Г.Р. Иваницкого (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН) «Робот и человек. где находится предел их сходства?» и В.А. Намиота (НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцина МГУ имени М.В. Ломоносова) «Существует ли принципиальное различие между искусственным и естественным интеллектом?». В обоих докладах рассматривалось различие между чисто алгоритмическим мышлением робота, цель работы которого сформулировал человек-творец, и естественным интеллектом человека, законы функционирования которого до сих пор до конца не ясны. Близкие проблемы рассматривал в своем пленарном докладе «Природные и технические когнитивные системы: в чем их различие?» В.Г. Яхно (Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород; Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского).

Перспективы развития современной науки о живом связаны с комплексным использованием всех имеющихся экспериментальных и теоретических методов изучения сложных многокомпонентных биологических систем организма и решения на основании полученных знаний проблем лечения связанных с этими системами болезней. В докладе Д.Э. Постнова (Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского) «Нейроваскулярные связи: функции, проблемы, моделирование» рассматривались процессы в нейроваскулярной единице мозга, которая включает нейрон, астроцит, клетки сосудистой стенки и формирует локальные физиологические ответы на изменение нейронной активности. Механизмы пространственных связей в пределах нейроваскулярной единицы (модуляция ионных концентраций и перенос веществ в межклеточном пространстве, кальциевые волны в сетях астроцитов, распространяющиеся вазомоторные реакции) лежат в основе формирования пространственно-временных паттернов активности паренхимы мозга. Эти физиологические механизмы становятся доминирующими во время экстремальных состояний коры головного мозга, таких как распространяющаяся кортикальная депрессия, мигрень с аурой, а также распространение волн деполяризации при инсульте

или в результате травмы. Коллективом автора доклада созданы как детальные модели локальных связей в пределах одиночной нейроваскулярной единицы, так и феноменологические модели отдельных механизмов формирования пространственно-временных структур. На наших глазах возникает понимание того, как клеточная «машина» паренхимы мозга (нейроны, астроциты, клетки гладкой мускулатуры и эндотелия сосудов) функционирует в комплексе как единое целое, включая согласование изменения активности клеток с модуляцией объема межклеточного пространства и интенсивностью транспорта веществ в нем. На очереди — учет различных типов связей в рамках единой математической модели.

Пример использования математических и компьютерных моделей разного типа для изучения процессов на молекулярном и клеточном уровне дал доклад Г.Ю. Ризниченко (МГУ имени М.В. Ломоносова) «Моделирование процессов в фотосинтетической мембране высших растений и микроводорослей. Молекулярные, броуновские и кинетические модели». В докладе были представлены результаты последних работ по математическому и компьютерному моделированию, выполненных на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Молекулярные и броуновские агентные модели позволяют изучать биофизические механизмы взаимодействия отдельных молекулпереносчиков электрона в ходе фотосинтетического электронного транспорта, лежащего в основе процессов запасания энергии света и биосинтеза. Кинетические модели, представляющие собой системы дифференциальных уравнений, позволяют определять участки фотосинтетической цепи ФС II, претерпевающие изменение в ходе роста культуры в различных условиях, и используются для задач экологического и биотехнологического мониторинга. Совокупность методов дает общую картину процессов фотосинтеза на разных пространственных и временных масштабах.

Характерный для биофизики сложных систем комплексный подход к решению важных практических задач продемонстрировал доклад А.А. Цыганкова (ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН») «Разработка подходов к получению энергии биологическим путем». В нем обсуждались современные достижения и направления исследований для создания биотехнологических систем получения водорода за счет энергии света. Наряду с получением водорода биологические системы способны и к его преобразованию в электричество. Для этого разрабатываются способы модификации гидрогеназ (ферментов, заменяющих платину в топливных элементах) и их иммобилизации на электродах. В докладе представлены последние результаты ис-

следований топливных элементов с использованием гидрогеназных водородных электродов.

Применение методов системной биологии и биофизики сложных систем позволяет изучать математические модели глобальных процессов. В докладе А.Г. Дегерменджи (Институт биофизики ФИЦ СО РАН, Красноярск) «Новые эффекты малоразмерных моделей системы биосфера-климат» была рассмотрена модель системы «биосфера-климат», которая включает интегрированное описание динамики содержания форм углерода в трех поясных кластерах Земли – в наземной экосистеме (растения и почва), океане и атмосфере при разных сценариях сжигания топлив и с учетом парникового механизма изменения климата. Расширенная модель учитывает выделение СО₂ и СН₄ из почвенной органики зоны вечной мерзлоты. Установлена важная роль влияния метана из почв на баланс СО₂ и создан новый класс математического описания динамики почвенной органики в координатах «уровень гумификации – глубина слоя». Получены оценки вклада зоны вечной мерзлоты и метановой ветви круговорота углерода в глобальную динамику для различных значений параметров модели, находящихся внутри интервалов оценок. Построена математическая модель тундровых экосистем Арктики и Сибири. Ее цель – предсказать будущее поведение тундровых экосистем, обусловленное глобальным изменением климата. Модель описывает основные процессы в системе (фотосинтез тундровой фитомассы, аэробное и анаэробное дыхание, влияние освещенности, температуры и водного баланса) и включает физико-химическую подмодель, описывающую динамику замерзания-таяния вечной мерзлоты, а также блок, описывающий выделение метана и углекислого газа из тундровых и лесотундровых почв вечной мерзлоты. Для верификации модели проводятся наблюдения в специально созданной герметичной вегетационной камере (миниэкосистема), в которой возможно поддерживать температуру, влажность и освещенность, приближенные к климатическим условиям северных широт. Взаимодействие глобальной малоразмерной и региональных математических моделей создает фундамент как для понимания основных механизмов изменения климата, так и для последствий его изменения.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

К разделу «Молекулярная биофизика» относятся секции по структуре и динамике белков и ДНК, а также секция «Биофизика одиночных молекул. Нанобиотехнологии». На секциях «Структура и динамика белков и их комплексов» и «Структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов» были представлены работы по изучению структур молекул белков и ДНК, их функциональных конформационных состояний, взаимодействию белков и ДНК с низкомолекулярными лигандами, с другими белками и нуклеиновыми кислотами, исследованию конформационных перестроек в структуре этих биомакромолекул, возникающих вследствие влияния различных факторов. Наряду с работами по экспериментальному исследованию свойств белков и нуклеиновых кислот растительного, животного и бактериального происхождения и их мутантных форм, на этих секциях были также представлены работы по молекулярному моделированию конформационной подвижности биомакромолекул. В последние годы методы компьютерного моделирования стали неотъемлемой частью арсенала методов изучения динамических свойств биологических систем.

В пленарном докладе «Стабильность двойной спирали ДНК» М.Д. Франк-Каменецкого, который специально прилетел на Съезд из США, рассказывалось о плавлении ДНК и роли стэкингвзаимодействий и спаривания оснований в стабильности двойной спирали ДНК. Результаты, полученные автором в этой области, стали уже классическими.

Доклад И.Ю. Петрушанко (Институт молекулярной биологии РАН) «Молекулярные механизмы редокс-регуляции транспортной и рецепторной функции Na, K-АТФазы» был посвящен изуредоксчению молекулярных механизмов регуляции белков на примере Na,K-ATФазы. Было показано, что такой механизм, как глутатионилирование, защищающий от окисления цистеины белков, одновременно влияет на активность белков и их рецепторную функцию, вплоть до инактивации. При этом в условиях сильного окислительного стресса инактивация Na,К-АТФазы способствует выживаемости клеток за счет сохранения пула АТФ.

А.К. Узденский (Ростовский государственный университет) в докладе «Многофункциональные белки» рассказывал о свойствах белков, опровергающих догму недавнего прошлого «Один ген – один белок». В последние годы было показано, что многие сигнальные белки имеют два и более реакционных центра. Например, протеинкиназы и протеинфосфотазы являются мастер-регуляторами разнообразных клеточных процессов, фосфорилируя различные белки, они активируют или ингибируют их, включают, выключают или переключают их функции.

Доклад А.П. Савицкого (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН) «Бифотохромные цветные флуоресцентные белки: феномен и перспективы использования» дает представление о быстро развивающейся области применения цветных флуоресцентных белков, свойства которых обеспечили современные возможности оптогенетики.

Коллективом автора доклада открыт новый белок SAASoti из коралла *Stylocoeniella armata*, совмещающий свойства фотоконверсии (фотохимический процесс, связанный с изменением структуры хромофора) и фотопереключения (фотофизический процесс, связанный со значительным изменением квантового выхода хромофора). Эти свойства позволяют использовать данный белок для дизайна новых сенсорных молекул, молекулярного имиджинга и, в частности, кинетической субдифракционной микроскопии, позволяющей отслеживать движение и релокализацию отдельных молекул.

В докладе В.Ю. Макеева с соавторами были представлены совместные работы нескольких коллективов (Институт общей генетики им. Вавилова РАН, Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Московский физико-технический институт). Рассматривалась биофизика ДНК-белкового взаимодействия в свете проблемы регуляции работы генов на уровне транскрипции. Регуляторные варианты влияют на развитие организма и развитие многих распространенных заболеваний, включая рак и аутоиммунные расстройства. Наличие большого числа данных о взаимодействиях «ДНК-белок» впервые позволяет приблизиться к исчерпывающему перечню мотивов связывания, распознаваемых факторами транскрипции. Разработанный авторами ресурс НОСОМОСО включает в себя ряд сервисов, предназначенных для практического анализа в области генетики и системной биологии. Подходы машинного обучения могут быть использованы для решения проблемы нормализации данных в каждом конкретном типе клеток.

Доклад Г.В. Гурского с группой соавторов из нескольких организаций (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения РФ, Кардиологический научно-производственный комплекс, Москва) «ДНК – белковые комплексы как мишени для создания новых противовирусных лекарственных агентов» был посвящен изучению противовирусного действия димерных производных антибиотика нетропсина и комплексов, которые являются для него мишенью. Результаты исследования показали, что возможно создание двух типов ингибиторов процесса инициации репликации, один из которых включает низкомолекулярные лиганды – бис-нетропсины и их аналоги. Вторая группа ингибиторов инициации репликации вирусной ДНК включает соединения, которые связываются со структурой Холлидея в «открытой» форме и подавляют миграцию точки кроссовера и АТФ-зависимый процессинг структуры Холлидея.

Доклад Ю.Д. Нечипуренко «Механохимическое расщепление ДНК и свойства регуляторных участков генома» подытожил труды международного коллектива ученых из Института молекулярной биологии РАН, Института общей генетики РАН (Москва), Института теоретической и экспериментальной биофизики (Пущино), биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и Института молекулярной генетики имени Макса Планка (Берлин). Доклад был посвящен памяти С. Гроховского, который открыл явление избирательного расщепления ДНК ультразвуком. Было показано на большой базе данных по секвенированию нового поколения, что механохимическое расщепление двойной спирали ДНК происходит преимущественно между цитозином и гуанином, и метилирование цитозина резко увеличивает вероятность такого расщепления. Так как метилирование цитозина является важнейшим маркером эпигенетических процессов, в докладе впервые были связаны эпигенетика и механохимия ДНК и показаны возможности выявления онкологических заболеваний на ранней стадии, когда происходят изменения паттернов метилирования в регуляторных участках генов так называемых GC-островах. Заметим, что уже после Съезда вышло несколько статей, где эти идеи получили неожиданное продолжение в виде гипотезы возникновения «нестабильных» GCпар ДНК.

Моделирование процессов на уровне белков и их комплексов было представлено несколькими пленарными докладами. В докладе К.В. Шайтана (биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) «Фундаментальные закономерности формирования пространственных структур конформационно подвижных молекул» рассматривались физические основы и математические идеи описания процесса формирования уникальных 3D-структур биополимеров. С использованием подходов многомерной геометрии получен фундаментальный результат, демонстрирующий выполнение двух экстремальных принципов при сворачивании полимерной цепи в вязкой среде: 1) принцип максимума скорости убыли потенциальной энергии системы и 2) принцип минимума скорости диссипации энергии при заданной скорости убыли потенциальной энергии.

В докладе В.Д. Лахно (Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН) «Теоретические основы бионаноэлектроники» рассмотрены результаты детального моделирования структуры и проводящих свойств ДНК. Наличие зонной структуры, поляронных состояний, электронных блоховских осцилляций, электронные и дырочные фазовые переходы, движение полярона в полинуклеотидной цепочке в электрическом поле позволяют рассматривать ДНК как потенциальное бионаноэлектронное устройство.

В докладе Р.Г. Ефремова (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) с интригующим названием «Путешествие в аномальные зоны клетки с помощью вычислительной биофизики» обсуждались выявленные в процессе экспериментального изучения и компьютерного моделирования детали процессов в поровых доменах клеточных мембран. Гетерогенное распределение плотности и неброуновская диффузия воды и липидов в таких доменах приводит к тому, что стохастические процессы атомарного масштаба способны вызвать макроскопические процессы – открывание и закрывание канала.

Показательно, что наряду с фундаментальными результатами все представленные в докладах компьютерные модели дают возможность также предвидеть пути практического применения моделируемых процессов в создании новых наноматериалов и устройств с необычными свойствами.

Секция «Биофизика одиночных молекул. Нанобиотехнологии» продемонстрировала работы, представляющие биофизические исследования, направленные на использование фундаментальных знаний молекулярной биофизики для практического применения в биотехнологиии и медицине. На секции обсуждались вопросы адресной доставки лекарств и генетического материала в клетки, изучения характера воздействия излучений с биологическими структурами на атомном уровне, нанотехнологии для изучения каталитических центров металлоферментов, механизмов внутри- и межмолекулярного переноса электрона, структурной организации и функционирования наноструктур. Также обсуждались (как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте) перспективы создания гибридных наноразмерных биоэнергетических и биосенсорных Фотосинтетический реакционный устройств. центр является природным наноструктурным образованием. Именно специфика протекания фотофизических и фотохимических процессов в наноразмерных структурах объясняет уникальные энергопреобразующие свойства фотосинтетических реакционных центров. Гибридные устройства типа «реакционный центр – нанотрубка» или «молекулярный провод - электрод - внешняя электрическая цепь» могут стать прообразом биоэлектрических генераторов энергии.

В пленарном докладе А.А. Красновского (Институт биохимии им. А.Н. Баха) рассматривалась фотоника и биофотоника синглетного молекулярного кислорода, определяющего фотодинамическое действие красителей. В настоящее время представления биофотоники O₂ служат основой для понимания широкого круга фундаментальных проблем фотобиологии и фотомедицины, а также для прикладных задач фото- и лазерной терапии.

Современные методы фемтосекундной лазерной спектроскопии позволяют наблюдать сверхбыстрые процессы взаимодействия света с первичными энергопреобразующими структурами в фототосинтетической и зрительной системах. В докладе В.А. Надточенко с соавторами (ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва) «Фемтосекундная спектроскопия сверхбыстрых первичных реакций в биологических системах: фотосистема 1 и ретинальсодержащие белки» сообщалось о современных достижениях фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании двух сверхбыстрых биологических процессах - в процессе первичного разделения зарядов в фотосистеме 1 природного фотосинтеза и в процессе первичных стадий изомеризации ретиналя в родопсине. Был дан сравнительный анализ данных о первичных стадиях изомеризации ретиналя в зрительном родопсине, бактериородопсине и Na⁺-родопсине. Обсуждались особенности экспериментов фемтосекундной лазерной спектроскопии и проблема интерпретации экспериментальных данных.

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Пример биофизического подхода к изучению свойств одиночных молекул и их роли в организме животных и человека дал пленарный доклад А.Ф. Ванина (ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, Москва) под названием «NO сегодня в биофизике и биомедицине». Фундаментальные биофизические исследования позволили не только установить роль молекулы монооксида азота в регулировании разнообразных биохимических и физиологических процессов, но и на основе комплексов молекул оксида азота с тиолсодержащими лигандами создать лекарственные препараты, способные оказывать дозозависимое гипотензивное действие на человека, длящееся несколько часов при одноразовом введении препарата. Такого же рода препараты способны резко ускорять заживление кожных ран, подавлять агрегацию тромбоцитов (тромбообразование), повышать эластичность эритроцитов и тем самым улучшать микроциркуляцию. Наконец, они могут полностью подавлять развитие незлокачественных эндометриоидных опухолей у животных с экспериментальным эндометриозом и даже подавлять

развитие перевивных злокачественных опухолей, производных рака простаты человека.

В пленарном докладе Е.В. Загайновой (Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород) «Оптическая когерентная томография для диагностики структуры, микроциркуляции и эластических свойств тканей человека» было рассказано о разработанном и внедренном в медицинскую практику приборе оптической когерентной томографии, позволяющем увидеть края глиальной опухоли, когда неравномерный характер роста опухоли создает трудности в поиске истинных краев с нормальной тканью мозга. Авторами были рассчитаны коэффициенты затухания и разностного затухания, построены карты с цветовой кодировкой, которые демонстрируют, как оптические коэффициенты увеличивают контраст тканей, которые необходимо отличить. Точность границы может быть определена с точностью 40-50 мкм в реальном времени, что может быть использовано для интраоперационной диагностики чистого края резекции при раке молочной железы. Этот метод позволяет также наблюдать за сосудами в опухоли и нормальной ткани и контролировать ход лечения.

Метод синхронного многоканального исследования в реальном времени организма человека был представлен в пленарном докладе Б.Г. Вайнера (Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН) «Синхронные многоканальные исследования организма человека, подверженного внешним интервентным воздействиям». Получаемые данные количественно отражают циркуляцию в периферических сосудах, динамику и нюансы легочного дыхания, кардиоритм и его вариабельность, особенности прохождения пульсовой волны по лучевой артерии, температуру ядра организма и др. Создан оригинальный автоматизированный аппаратно-программный измерительный комплекс с необходимым вспомогательным оборудованием. Такой комплекс является основой для изучения качественной И количественной взаимосвязи синхронно полученных биосигналов и, следовательно, открывает огромные возможности для последующего биомедицинского и биофизического анализа.

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

К разделу «Биофизика клетки» относятся секции «Биофизика клетки», «Мембранные процессы», «Биологическая подвижность», «Молекулярные моторы», «Механизмы трансформации энергии. Биоэнергетика», «Нейродинамика и нейробиология», «Фотобиология. Биофотоника».

Теоретическое осмысление, математическое и компьютерное моделирование конкретных процессов в живой клетке в сопоставлении с экспериментальными данными служат основой формирования теоретических основ биофизики, что и было отражено в секционных докладах и дискуссиях. Это относится к докладам на секциях по изучению структуры биологических мембран, транспорта веществ через них и механизмов трансформации энергии (Ю.Н. Антоненко, Н.А. Браже, Ю.А. Ермаков, Е.Г. Холина, Л.А. Ягужинский); на секции по фотобиологии и первичным процессам фотосинтеза (Н.Е. Беляева, В.Л. Евстигнеев, И.Б. Коваленко, Т.Ю. Плюснина, С.С. Хрущев, И.А. Ярошевич); на секции, посвященной генерации и распространения нервного импульса и активности мозга (А.Р. Браже, М.А. Павловская, И.В. Сысоев, Е.А. Туровский).

Большое число работ было посвящено явлениям биологической подвижности, непосредственно связанной с понятием биологического мотора. Биологические моторы – это, как правило, белки и белковые комплексы, генерирующие механическое усилие для осуществления движения клеток, внутриклеточного транспорта и других биологических процессов. К биологическим моторам относятся миозины, кинезины и динеины, обеспечивающие сокращение мышц, движение немышечных клеток, деление клеток, эндоцитоз, экзоцитоз, а также процессы внутриклеточного транспорта органелл и макромолекул. Перечисленные моторные белки перемещаются вдоль компонентов цитоскелета – микрофиламентов (миозины) или микротрубочек (кинезины и динеины). В качестве топлива они используют АТФ – универсальный энергетический субстрат клетки. Моторные белки регулируются клеточными системами, осуществляющими их активацию, торможение и взаимодействие с перевозимыми грузами.

Все процессы в клетке обеспечиваются энергией, преобразование которой осуществляется в системах субстратного, фото- и окислительного фосфорилирования, поставляющих энергию, необходимую для жизнедеятельности организмов. В секции «Биоэнергетика» наряду с системами фосфорилирования обсуждались процессы генерации мембранных форм энергии, а также их использования для синтеза АТФ, аккумуляции химических веществ в клетках и органеллах, подвижности бактерий, образования тепла в целях терморегуляции. Несколько докладов были посвящены изучению путей практического применения биоэнергетики для отмены программы старения организма.

В пленарном докладе А.К. Цатуряна с соавторами (НИИ механики МГУ имени М.В. Ломоно-

сова, Москва, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, Москва, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург) «Биофизические аспекты регуляции сокращения поперечно-полосатых мышц» были представлены новые результаты изучения взаимодействия сократительных белков – актина и миозина, сопровождающегося гидролизом АТФ. В поперечно-полосатых (скелетных и сердечной) мышцах актин и миозин формируют соответственно тонкие и толстые нити. Эти нити, в свою очередь, образуют гексагонально упакованную структурнофункциональную единицу мышцы – саркомер. Актин-миозиновое взаимодействие регулируется ионами Ca²⁺ при участии регуляторных белков: тропонина и тропомиозина. Чтобы выяснить связь между структурными и функциональными свойствами тропомиозина, авторами проведено комплексное исследование, включающее получение рекомбинантных форм тропомиозина, исследование их термостабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии, измерение сродства тропомиозина к актину и температурной стабильности актин-тропомиозиновых комплексов. Результаты этих исследований показали тесную связь между изгибной жесткостью тропомиозина и актин-тропомиозиновых комплексов и функциональными характеристиками системы регуляции - максимальной скоростью движения нитей, кальциевой чувствительностью и кооперативностью. Полученные результаты проливают свет на особенности развития наследственных заболеваний миопатии и кардиомиопатии и намечают путь для разработки методов борьбы с ними.

Биофизические методы позволили значительно продвинуться в изучении внутриклеточных процессов и межклеточных взаимодействий в растительных организмах. В докладе А.А. Булычева с соавторами (кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова) «Дальний транспорт и межклеточный перенос фотометаболитов у харовой водоросли» рассмотрен межклеточный транспорт у растений, который играет крайне важную роль, обеспечивая доставку ассимилятов к растущим клеткам и передачу сигнальных веществ. В многоклеточной системе транспорт включает две стадии: внутриклеточный перенос в цитоплазме и межклеточное движение через плазмодесмы - цитоплазматические тяжи, соединяющие клетки по узким отверстиям в клеточных стенках. Данный коллектив авторов изучает клетки междоузлий водоросли Chara, используя микроскопию модулированной флуоресценции хлорофилла в сочетании с локальным освещением клетки в стороне от места измерения. Показано, что метаболическая сигнализация между пространственно разобщенными хлоропластами ярко выражена в участках клетки,

где активен H^+ -насос плазмалеммы, и сильно ослаблена в зонах с высокой проводимостью плазматической мембраны для H^+ или OH^- (в области наружных щелочных зон). Распространение волны флуоресценции хлорофилла в ответ на удаленное локальное освещение проявлялось также в течение одной-двух минут после выключения фонового освещения. Результаты изучения роли течения цитоплазмы и плазмодесм во внутриклеточной и межклеточной метаболической сигнализации закладывают основы понимания механизмов сигнализации у растений, которые в настоящее время крайне слабо изучены, между тем могут стать основой для совершенно новых технических решений.

Доклад В.А. Воденеева (кафедра биофизики Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского) «Электрические сигналы растений: механизмы и функциональная роль» был посвящен изучению распространения электрических сигналов при действии локальных стимулов различной природы и интенсивности. Распространение электрических сигналов вызывает функциональные изменения в нераздраженных частях растения: изменения в экспрессии генов, активности фотосинтеза, транспирации, дыхания, изменения содержания АТФ и др. Развитие функционального ответа, по-видимому, обусловлено концентрационными сдвигами (в первую очередь Ca²⁺ и H⁺), сопровождающими генерацию электрических сигналов. Электрические сигналы растений включают типичный для различных живых организмов потенциал действия, а также специфичные электрические сигналы - вариабельный потенциал и системный потенциал. Исторически раздельно существовавшие электрическая, химическая и гидравлическая гипотезы распространения потенциалов в растении сегодня сменяются представлениями о комплексном характере этого типа сигнала. Изучение сигнальной системы растений в сравнении с распространением потенциала в нервных волокнах позволяет выявить фундаментальные механизмы распространения сигналов в живых системах.

Мезенхимальные стволовые клетки занимают одно из центральных мест в области клеточной биологии, клеточной биофизики и регенеративной медицины благодаря их чрезвычайно высокой биологической и терапевтической активности, возможности размножения данных клеток *in vitro* и использования затем накопленной клеточной биомассы в клинической практике для лечения разнообразных заболеваний. В докладе И.Д. Волотовского (Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск) «Мезенхимальные стволовые клетки. от биофизических механизмов функционирования до использования в регенеративной медицине для лечения

заболеваний» рассматривались ключевые критерии жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток в культуре и биофизические механизмы, обеспечивающие их активное состояние, к которым относятся поддержание высокой пролиферативной активности, способности продуцировать широкий набор биологически активных соединений, благодаря которым клетки оказывают противовоспалительное, иммуномодулирующее, ангиогенное и др. действия, а также дифференцироваться в соматические клетки по не-При скольким направлениям. Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси создан Республиканский научно-медицинский центр «Клеточные технологии», в котором разработаны и внедрены в практику клеточные технологии лечения трофических язв нижних конечностей с использованием мезенхимальных стволовых клеток и их смеси с фибробластами, а также пародонтитов легкой формы; завершаются проекты по разработке клеточных технологий лечения дегенеративных заболеваний роговицы глаза, ожогов и возрастных изменений кожных покровов.

В докладе В.П. Зинченко с соавторами (Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино; Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан) «Кодирование электрической активности нейронов импульсами медленной деполяризации in vitro» рассматривалась спонтанная синхронная активность нейронов мозга, которая наблюдается в развивающейся центральной нервной системе в различных разделах мозга и сопровождается пачечной активностью и синхронными импульсами Ca²⁺. В работе с помощью целого ряда экспериментальных методов исследованы закономерности изменений частоты и амплитуды потенциалов действия в зависимости от параметров Ca²⁺-импульса медленной деполяризации в нейронах гиппокампа в культуре. Индивидуальная форма Ca²⁺-импульса нейронов, отражающая индивидуальные различия в экспрессии белков Ca²⁺транспортирующих систем, представляет широкие возможности для кодирования электрической активности нейронов и реализации преимущественных путей передачи определенной информации.

В докладе С.И. Погосяна (Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) «Биофизические методы в экологических исследованиях» рассматриваются современные биофизические методы экологического мониторинга пресных и морских вод. Объектом, отражающим состояние водной среды, служит фитопланктон. Обилие фитопланктона и показатели его продукции являются основными в оценке экологического состояния акваторий. В настоящее время разработаны и широко используются флуориметрические методы оценки состояния фотосинтетического аппарата фитопланктона. Созданы приборы, позволяющие проводить измерения в пробах воды, в непрерывном потоке воды и зондировать толщу воды до глубины 200 м. Разработаны лидары (лазерные дистанционные флуорометры) для определения состояния фитопланктона при сканировании поверхностных вод с береговых вышек и с судов по их ходу. Эти методы позволяют с высокой точностью в режиме реального времена проводить детальные обследования акватории. На обширных акваториях информация об обилии фитопланктона может быть получено со спутников из космоса. Определять первичную продукцию в море можно комплексом спектральных методов по спектрам подводной облученности и параметрам флуоресценции хлорофилла. Измеряемая при этом эффективность утилизации квантов света в процессах фотосинтеза позволяет прогнозировать возможные изменения первичной продукции фитопланктонного сообщества в краткосрочной перспективе.

Роль математического моделирования в решении проблем экологического мониторинга продемонстрировал доклад А.Б. Медвинского (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино) «Нелинейный анализ временных рядов и гибридные математические модели, непосредственно включающие данные мониторинга экосистем, как путь за пределы редукционизма». Предложен подход, предполагающий прямое включение данных мониторинга природных экосистем в математические модели популяционной динамики, с целью численного анализа влияния среды обитания на процессы, которые существенно влияют на наблюдаемые изменения популяционного обилия. Этот подход может быть реализован даже в тех случаях, когда характеристики природных процессов непосредственно в ходе мониторинга не измеряются. В качестве примера даются численные оценки кросскорреляционной энтропии Шеннона как характеристики сопряженности колебаний скорости пополнения популяций фитопланктона Нарочанских озер с вариациями экзогенных факторов: температуры воды и концентрации растворенных в воде биогенов.

Традиционно на Съезде активно обсуждались вопросы воздействия физико-химических факторов на биологические системы. Секция под таким названием была посвящена вопросам изучения и применения эффектов взаимодействия с биологическими тканями животного и растительного мира электромагнитных излучений, физических полей и фотонов в широком диапазоне длин волн. Электромагнитное излучение уникально не только тем, что дает возможность зрительно наблюдать процессы, протекающие в живых систе-

мах на клеточном и молекулярном уровнях, но еще и тем, что позволяет воздействовать на них без разрушения их структуры. Эти вопросы обсуждались в пленарном докладе Л.Н. Галль (Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург) «Физические процессы при взаимодействии слабых электромагнитных полей с живой клеткой. эксперименты и теория» и вызвали большой интерес и оживленную дискуссию.

Самой многочисленной секцией Съезда была секция «Медицинская биофизика», ориентированная на обсуждение примеров успешного использования в медицине результатов фундаментальных исследований в области мембранных процессов, фотобиологии, биофизики клетки, а также связанных с этим проблем. Выработанные в процессе фундаментальных биофизических исследований представления медицина использует для познания на молекулярном уровне механизмов возникновения заболеваний, для ранней диагностики, для выработки способов воздействия на патологические процессы. Более того, в большинстве докладов, сделанных на других секциях, так или иначе обсуждалось и значение полученных результатов применительно к медицине и биотехнологии.

В пленарном докладе А.С. Соболева (биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт биологии гена РАН, Москва) «Модульная транспортная платформа – инструмент избирательного воздействия на процессы в органеллах живой клетки» был рассмотрен спектр возможных применений модульных нанотранспортеров для медицинских целей и в качестве инструмента для исследования живой клетки путем избирательного воздействия на процессы, протекающие в различных компартментах клетки. Модульные нанотранспортеры представляют собой синтетические полипептиды, придающие клеточную специфичность и высокую эффективность противоопухолевым агентам. Принцип, положенный в основу их дизайна, - использование естественных процессов клеточного транспорта, благодаря чему они способны проникать в клеткумишень, а затем в ее ядро. Различные варианты применения таких нанотранспортеров для разнообразных целей и задач позволяют рассматривать нанотранспортеры как платформу для доставки лекарств и иных биологически активных веществ, что позволяет, например, вмешиваться в процессы репарации ДНК.

Доклад Г.Т. Гурия (Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения РФ, Москва) «Кинетические аспекты процессов свертывания крови и фибринолиза» был посвящен экспериментальным исследованиям и моделированию кровотока в аномально суженных — стенозированных артериях. Стенозированные участки артерий выступают в качестве «очагов объемной активации» тромбоцитов в кровотоке. Местоположение таких участков артерий в системе кровообращения человека удается установить ангиографическими методами, а также методами магнитно-резонансной или ультразвуковой диагностики. В докладе демонстрируется, как полученные в ходе исследования механизмов гидродинамической активации тромбоцитов закономерности могут быть использованы для оценки персонализированных рисков внутрисосудистого тромбообразования и фибринолиза.

В докладе Д.Ю. Нечипуренко «Влияние механической активности тромбоцитов на структуру артериальных тромбов» (физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва) при помощи объединения подходов in vivo, in vitro и компьютерного моделирования было продемонстрировано, что в процессе сжатия тромбоцитарного агрегата происходит перераспределение клеток в составе тромба: слабо взаимодействующие с другими клетками умирающие тромбоциты механически вытесняются на поверхность агрегата. Данное перераспределение приводит к дополнительной неоднородности внешних слоев тромба, что может существенным образом влиять на динамику агрегата в условиях потока. Вместе с автором доклада на съезд приехала группа студентов, аспирантов и молодых ученых, которые в своих сообщениях представили широкий круг исследований, связанных с тромбообразованием.

В докладе Е.Е. Фесенко (мл.) с соавторами (Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино) «Перспективы новых технологий консервации органов» обсуждалась проблема консервации предназначенных для трансплантации органов и новые подходы к низкотемпературному замораживанию, суть которых заключается в крайне медленном опускании температуры от 0°С до минус 70°С. В результате морфология льда, который при этом образуется, носит щадящий для тканей характер. Эти разработки показывают важность изучения свойств воды, составляющей большую часть массы органической ткани и всегда представляющей собой раствор, содержащий ионы.

Изучению свойств воды были посвящены пленарные доклады А.В. Дроздова (Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург) «Динамика межмолекулярных взаимодействий в воде» и В.И. Лобышева (Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) «Самоорганизация и эволюция сильно разбавленных водных растворов». В докладе В.И. Лобышева были представлены результаты исследования комплексных электрических характеристик: удельного сопротивления, емкости и электропроводности сильно разбавленных растворов. Показано, что люминесцентные характеристики разбавленных водных растворов испытывают спонтанные долговременные переходные процессы, причем в начальном, далеком от равновесия состоянии, водный раствор оказывается весьма чувствительным к слабым воздействиям электромагнитной природы в диапазоне частот 20 Гц — 10 МГц.

ОТКЛИКИ О СЪЕЗДЕ

Приведем некоторые отклики участников Съезда.

Рясик Иван Олегович, врач-невролог, нутрициолог, гомеопат, член Национальной ассоциации клинического питания, Председатель Кировского региотделения Общероссийского общеонального ственного движения «За сбережение народа», Федеральный лектор Общества «Знание» России: "Хотелось выразить большую признательность за организацию VI съезда биофизиков и отдельно поблагодарить за серьезный научный уровень и широту тем секции «Структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов». Для медикогенетических исследований и практического здравоохранения доклады на секции важны с точки зрения формирования прогностического, превентивного и персонифицированного подхода к человеку, а также разработки мероприятий эпигенетической коррекции, медикаментозных и нутрицевтических вмешательств в метаболом у пациентов с учетом аллельного полиморфизма в их геноме. Большое спасибо Юрию Нечипуренко за рассказ об исследованиях, открывающих причины специфической фрагментации геномной ДНК при подготовке образцов для секвенирования и имеющие прямое отношения к вопросам канцерогенеза. Идеи, полученные в результате участия в работе съезда и секции «Структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов», будут использованы при работе с пациентами, полезны для учебной и научно-исследовательской работы в Кировском государственном медицинском университете и опорном университете (Вятский государственный университет)".

Ирина Панина (научный сотрудник ИБХ РАН): "Для меня это было второе участие в Съезде биофизиков России, и, как и в прошлый раз, очень впечатляет масштабность мероприятия. Прежде всего, это обширный тематический охват программы: от строения биомакромолекул и нанотехнологий, до биомеханики, проблем экологии

БИОФИЗИКА том 66 № 1 2021

и искусственного интеллекта. К тому же это состав и география участников и докладчиков конференции, в который, без преувеличения, входили именитые ученые-биофизики. Такое разнообразие участников и секций позволило за шесть дней участия в конференции узнать много нового и познакомиться с интересными людьми из различных уголков нашей страны.

Для меня как для молодого ученого очень ценно было получить комментарии и критические замечания по поводу моей работы от более опытных коллег, а также почерпнуть массу новых знаний и идей из других докладов, причем хочется отметить высокий уровень содержания и подачи материалов именно молодыми учеными. Кроме того, хочется отметить докладчиков, не побоявшихся вынести на общественное обозрение теории и результаты экспериментов, не являющихся «общепринятыми» (например, о влиянии электромагнитных полей на клетки или о свойствах воды) - это всегда интересно, вызывает оживленную реакцию и обсуждение, и полезно с точки зрения проверки существующей парадигмы на устойчивость.

Существенным, на мой взгляд, недостатком явилось то, что ввиду насыщенности программы мероприятия и жесткого регламента в зале заседаний практически не завязывались научные дискуссии. Выражаю благодарность организаторам за возможность участия в конференции и с нетерпением буду ждать VII съезда".

Но общем обсуждении итогов съезда прозвучали слова о том, что биофизика в России жива, более того, она переживает расцвет благодаря тому, что ученые старшего поколения смогли передать свои знания молодежи.

ПЕРСПЕКТИВЫ БИОФИЗИКИ – В ГОРИЗОНТЕ ДО СЛЕДУЮЩЕГО СЪЕЗДА.

По прошествии года после проведения съезда проясняются перспективные темы дальнейших фундаментальных (теоретических и экспериментальных) и прикладных исследований. Встречи на Съезде и публикация тезисов докладов Съезда привела к инициации целого ряда новых работ. В качестве примера можно привести продолжение работ по связи механохимического расщепления ДНК и эпигенетики; в результате интереса к работам по расщеплению ДНК ультразвуком появилось несколько новых работ с оригинальной концепцией, что повышенная вероятность расщепления ДНК обусловлена образованием неканонических пар оснований ДНК.

Одна из важных проблем состоит в выяснении фундаментальных физико-химических механизмов, определяющих взаимодействия структурных элементов и лежащих в основе поведения целостной биологической системы. На этом пути назрел переход от молекулярной динамики отдельных молекул к моделированию взаимодействия макромолекул на клеточном уровне. Кроме того, развитие теории процессов преобразования энергии в клетке и организме требует разработки новых теоретических представлений.

Съезд еще раз подтвердил, что достижения фундаментальной науки служат основой для решения прикладных задач. Для решения практических вопросов медицины, экологии и биотехнологии общесистемный подход и широкий арсенал биофизических методов уже сейчас широко используется. Сюда относится системный взгляд на механизмы развития болезней, диагностику и лечение, персонализированная медицина, методы непрерывного мониторинга биотехнологических процессов и ранней диагностики неблагополучного состояния экологической среды.

В самых разных областях науки сейчас работают биофизики — от фундаментальной медицины до экологии. Они разговаривают на одном языке языке описания фундаментальных механизмов, лежащих в основе биологических процессов. В этом заключается сила биофизического подхода мы являемся не только учеными, работающими в самых разных областях, но по сути — своего рода «переводчиками», медиаторами, посредниками, объединяющими специалистов самого разного профиля. Роль биофизики на этом пути с развитием науки будет только возрастать, что налагает на биофизиков большую ответственность.

БЛАГОДАРНОСТИ

От имени участников Съезда авторы благодарят членов Оргкомитета Съезда и его зам. председателя А.В. Дроздова, членов Программного комитета и его зам. председателя Н.Г. Есипову, а также руководителей секций за их организационные усилия по подготовке и проведению Съезда. Отдельная благодарность локальному Оргкомитету, его председателю ректору Кубанского государственного университета М.Г. Барышеву, заместителю председателя С.С Джимаку и ученому секретарю А.А. Елкиной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-20089).

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

 Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России, в 2-х томах (Издательско-полиграфическое объединение «Плехановец», Краснодар, 2019). DOI: 10.31429/SbR6.2019.001

VI Congress of Biophysicists of Russia

G.Yu. Riznichenko*, A.A. Anashkina**, Yu.D. Nechipurenko**, and A.B. Rubin*

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

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

This paper presents a survey of problems in modern biophysics that have been discussed during the VIth Congress of Biophysicists of Russia held in Sochi, September 2019 (http://conf-2019.biophys.ru). Plenary, sectional and poster sessions have been used to report the results of fundamental and applied studies covering the areas of biophysics of single biomacromolecules and molecular complexes, membrane biophysics, cell biophysics, and bionanotechnology. Much attention has been paid to the application of the information technologies, mathematical and computer modeling and bioinformatics methods as necessary research tools at all levels of organization of living systems, from biomacromolecules to biogeocenoses, as well as to new experimental methods of biophysical research. Along with the fundamental problems of studying the physical mechanisms of regulation of the results of biophysical research in medicine and ecology have been widely discussed. The Organizing Committee has decided to hold the next Congress of Biophysicists of Russia in 2023.

Keywords: VI Congress of Biophysicists of Russia, molecular biophysics, medical biophysics, biophysics of complex systems, ecological biophysics, Sirius Educational Center