

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 6, 2020

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Эффективность определения 5-метилцитозина в ДНК клеток *Escherichia coli*, несущих гены бактериальных ДНК-метилтрансфераз, с помощью установки Oxford Nanopore

В.В. Ильинский, Е.М. Козлова, С.Х. Дегтярев, Н.К. Янковский, В.Ю. Макеев 1045

Порообразующие свойства хеликазы SsoHel308 из *Saccharolobus solfataricus*

А.В. Сиунов, М.П. Борисова, Ж.И. Андреева-Ковалевская, А.С. Нагель, А.С. Колесников, А.К. Сурин, А.С. Солонин 1051

Изучение структуры ДНК в пленках методом ИК-Фурье-спектроскопии

С.В. Пастон, А.М. Поляничко, О.В. Шуленина, Д.Н. Осинникова 1058

Уровни иерархической организации белковых последовательностей.
Анализ энтропийных характеристик

А.Н. Некрасов, Ю.П. Козмин, С.В. Козырев, Н.Г. Есипова, Р.Х. Зиганишин, А.А. Анашкина 1065

Электростатическое взаимодействие глобинов с фосфолипидными мембранами

Г.Б. Постникова, Е.А. Шеховцова, В.С. Сивожелезов 1072

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Хемосенсибилизация опухолевых клеток фенольными антиоксидантами:
роль фактора транскрипции Nrf2

Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, А.В. Вчерашняя, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, С.Н. Черенкевич 1081

Цитотоксическое действие полиакрилата золота (аурумакрил)
на фибробласты кожи человека

Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, Л.А. Островская, О.О. Рябая, Н.В. Блюхтерова, К.А. Абзаева 1093

Адаптация метода интерферометрии слоя биомолекул для количественной оценки
содержания фактора роста эндотелия сосудов в кондиционированной клеточной среде

М.В. Волкова, В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, С.А. Бирюков, Е.В. Горина, Г.И. Фильков, М.О. Дурыманов 1099

Влияние микроволнового излучения на чувствительность клеток к одноатомным
спиртам в обогащенной тромбоцитами плазме

К.Д. Казаринов, В.А. Шелконогов, О.А. Баранова, А.В. Чеканов, Э.Ю. Соловьева, А.И. Федин 1107

Особенности биофизических свойств форменных элементов крови людей
пожилого возраста в условиях механического стресса *in vitro*

Е.А. Сладкова, М.Ю. Скоркина 1114

Интернализация клетками и противоопухолевая активность антител и иммунотоксинов, специфичных к β -изоформе белка теплового шока 90	
<i>М.А. Жмурина, В.В. Врублевская, Ю.Ю. Скарга, В.С. Петренко, В.К. Жалимов, О.С. Моренков</i>	1118
Влияние условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на их жизнеспособность при трансплантации в субретинальное пространство	
<i>М.А. Плахотный, А.М. Кодунов, Е.В. Горина, В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, С.А. Бирюков, Г.И. Фильков</i>	1126

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты	
<i>Л.А. Суковатый, А.Е. Лисица, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева</i>	1135
Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами в основном представлены в живых организмах их биядерной формой	
<i>В.Д. Микоян, Е.Н. Бургова, Р.Р. Бородулин, А.Ф. Ванин</i>	1142
Инфракрасная спектроскопия сыворотки крови больных онкогематологическими заболеваниями	
<i>Е.А. Тельная, Л.В. Плотникова, А.Д. Гарифуллин, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, А.М. Поляничко</i>	1154
Особенности ответной реакции сердечно-сосудистой системы на геомагнитную возмущенность на различных широтах	
<i>С.С. Паршина, С.Н. Самсонов, Т.Н. Афанасьева, П.Г. Петрова, А.А. Стрекаловская, В.Д. Петрова, А.И. Кодочигова, К.В. Комзин, Л.К. Токаева</i>	1161
Классификация адаптивных признаков и вывод критериев их эволюционной оптимальности	
<i>Л.Л. Овсянников, М.И. Шпитонков</i>	1171
О калибровке автономной модели тундровой биологической популяции леммингов	
<i>Г.К. Каменев, Д.А. Саранча, В.О. Поляновский</i>	1184
Влияние обедненного дейтерием питьевого рациона на функциональное состояние центральной нервной системы животных в условиях гипоксии	
<i>С.В. Козин, А.А. Кравцов, Э.И. Злищева, Л.В. Шурыгина, В.В. Малышко, А.В. Моисеев, А.А. Елкина, М.Г. Барышев</i>	1196
Компьютерная оценка вероятности образования метаболитов ксенобиотиков в организме человека	
<i>Д.А. Филимонов, А.В. Рудик, А.В. Дмитриев, А.А. Лагунин, В.В. Поройков</i>	1203
Определение в слезной жидкости препаратов, используемых во взрослой офтальмоанестезиологической практике, с помощью метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии	
<i>Л.М. Балашова, В.А. Намиот, И.И. Колесниченко, Н.А. Бакунина, Л.С. Коробова, А.Н. Доронин, И.А. Балашов, Д.Р. Черкашин, С.Н. Удальцов</i>	1211
Математическое моделирование динамики минерального питания растений в системе «удобрение—почва—растение»	
<i>В.А. Четырбоцкий, А.Н. Четырбоцкий, Б.В. Левин</i>	1219
Авторский указатель к 65 тому за 2020 год	1230
Содержание тома 65, 2020 г.	1240

Contents

Vol. 65, No. 6, 2020

Molecular Biophysics

- Efficiency of Identification of 5-Methylcytosine in *Escherichia coli* DNA Cells that Carry Genes of Bacterial DNA-Methyltransferases Using an Oxford Nanopore Device
V.V. Ilinsky, E.M. Kozlova, S. Kh. Degtyarev, N.K. Yankovsky, and V.J. Makeev 1045
- Pore-Forming Properties of SsoHel308 Helicase from *Saccharolobus solfataricus*
A. V. Siunov, M. P. Borisova, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya, A. S. Nagel, A.S. Kolesnikov, A.K. Surin, and A.S. Solonin 1051
- Study of DNA Structure in Films by Means of FTIR Spectroscopy
S.V. Paston, A.M. Polyanchko, O.V. Shulenina, and D.N. Osinnikova 1058
- Levels of Hierarchical Organization of Protein Sequences. Analysis of Entropy Characteristics
A.N. Nekrasov, Y.P. Kozmin, S.V. Kozyrev, N.G. Esipova, R.H. Ziganshin, and A.A. Anashkina 1065
- Electrostatic Interaction of Globins with Phospholipid Membranes
G.B. Postnikova, E.A. Shekhovtsova, and V.S. Sivozhelezov 1072
-

Cell Biophysics

- Chemosensibilization of Tumor Cells by Phenolic Antioxidants: the Role of Transcription Factor Nrf2
G.G. Martinovich, I.V. Martinovich, A.V. Vcherashniaya, N.K. Zenkov, E.B. Menshchikova, and S.N. Cherenkevich 1081
- The Cytotoxic Effect of Aurum Polyacrylate (Aurumacril) on Human Skin Fibroblasts
D.B. Korman, E.I. Nekrasova, L.A. Ostrovskaya, O.O. Riabaya, N.V. Bluhterova, and K.A. Abzaeva 1093
- Adaptation of Bio-Layer Interferometry for Quantification of Vascular Endothelial Growth Factor in Cell-Conditioned Culture Media
M.V. Volkova, V.V. Boyarintsev, A.V. Trofimenko, S.A. Biryukov, E.V. Gorina, G.I. Filkov, and M.O. Durymanov 1099
- The Effect of Microwave Radiation on the Sensitivity of Cells to Monohydric Alcohols in Platelet-Rich Plasma
K.D. Kazarinov, V.A. Shchelkonogov, O.A. Baranova, A.V. Chekanov, E.U. Solovieva, and A.I. Fedin 1107
- Peculiarities of Biophysical Properties of the Formed Elements in the Blood of the Elderly under Mechanical Stress *in vitro*
E.A. Sladkova and M. Yu. Skorkina 1114
- Internalization by Cells and Antitumor Activity of Antibodies and Immunotoxins Specific for Heat Shock Protein 90 Beta Isoform
M.A. Zhmurina, V.V. Vrublevskaya, Y.Y. Skarga, V.S. Petrenko, V.K. Zhalimov, and O.S. Morenkov 1118
- Influence of Cultivation Conditions on Viability of Mesenchymal Stem Cells after Injection into Subretinal Space
M.A. Plakhotniy, A.M. Kodunov, E.V. Gorina, V.V. Boyarintsev, A.V. Trofimenko, S.A. Biryukov, and G.I. Filkov 1126
-

Complex Systems Biophysics

The Effects of Osmolytes on the Bioluminescent Reaction of Bacteria: Structural and Dynamic Aspects	
<i>L.A. Sukovatyi, A.E. Lisitsa, V.A. Kratasyuk, and E.V. Nemtseva</i>	1135
Dinitrosil Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands are Predominantly Represented by The Binuclear Form in Living Organisms	
<i>V.D. Mikoyan, E.N. Burgova, R.R. Borodulin, and A.F. Vanin</i>	1142
Infrared Spectroscopy of Serum from Patients with Oncohematological Diseases	
<i>E.A. Telnaya, L.V. Plotnikova, A.D. Garifullin, A.Yu. Kuvshinov, S.V. Voloshin, and A.M. Polyanchko</i>	1154
Features of the Response of the Cardiovascular System to Geomagnetic Disturbance at Different Latitudes	
<i>S.S. Parshina, S.N. Samsonov, T.N. Afanasyeva, P.G. Petrova, A.A. Strekalovsky, V. D. Petrova, A.I. Kodochigova, K.V. Komzin, and L.K. Tokaeva</i>	1161
Classification of Adaptive Traits and Criteria for Optimality in Adaptive Evolution	
<i>L.L. Ovsyannikov and M.I. Shpitionkov</i>	1171
On Calibration of an Autonomous Model of Tundra Biological Population of Lemmings	
<i>G.K. Kamenev, <u>D.A. Sarancha</u>, and V.O. Polyanovsky</i>	1184
Influence of Deuterium Depleted Drinking Diet on the Functional State of the Central Nervous System of Animals in Hypoxia	
<i>S.V. Kozin, A.A. Kravtsov, E.I. Zlischeva, L.V. Shurygina, V.V. Malyshko, A.V. Moiseev, A.A. Elkina, and M.G. Baryshev</i>	1196
Computational Assessment of a Probability of Xenobiotic Metabolite Formation in the Human Body	
<i>D.A. Filimonov, A.V. Rudik, A.V. Dmitriev, A.A. Lagunin, and V.V. Poroikov</i>	1203
Determination of Anesthetics Used for Adult Ophthalmology in Tear Fluids by Multisensory Stripping Voltammetry Method	
<i>L.M. Balashova, V.A. Namiot, I.I. Kolesnichenko, N.A. Bakunina, L.S. Korobova, A.N. Doronin, I.A. Balashov, D.R. Cherkashin, and S.N. Udaltsov</i>	1211
Mathematical Modeling of the Dynamics of Plant Mineral Nutrition in the Fertilizer-Soil-Plant System	
<i>V.A. Chetyrbotskiy, A.N. Chetyrbotskiy, and B.V. Levin</i>	1219
<hr/>	
Author Index 2020	1230
Contents 2020	1240
<hr/>	

УДК 577.3

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В ДНК КЛЕТОК *Escherichia coli*, НЕСУЩИХ ГЕНЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ, С ПОМОЩЬЮ УСТАНОВКИ OXFORD NANOPORE

© 2020 г. В.В. Ильинский*, **, Е.М. Козлова*, ***, С.Х. Дегтярев****, Н.К. Янковский*, *****, В.Ю. Макеев*, ***, *****, *****, *****

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

**ООО «Генотек», 105120, Москва, Наставнический пер., 17/1

***Московский Физико-Технический Институт. 141701, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

****НПО «СибЭнзим», 630060, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

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

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

*****НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

E-mail: vsevolod.makeev@vigg.ru

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 28.08.2020 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

С помощью системы MinION (Oxford Nanopore Technologies Ltd, Великобритания) проведено прямое секвенирование геномной ДНК двух рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*. В одном случае в клетках присутствовала плаزمид с геном ДНК-метилтрансферазы M.HpaII, метилирующей второй цитозин в сайте CCGG, во втором случае штамм *E. coli* содержал ДНК-метилтрансферазу M.HpaI, модифицирующую центральный цитозин в последовательности GCGC. В обоих случаях при метилировании образуется 5-метилцитозин. Показано, что в случае высокого покрытия при секвенировании ДНК, наличие 5-метилцитозина в ДНК определяется с высокой точностью. В частности, в ДНК *E. coli* с клонированным геном ДНК-метилтрансферазы M.HpaI при прочтении с покрытием 1300× 98.9% сайтов GCGC определяются как метилированные по первому цитозину. В то же время лишь 0.09% остальных тетрауклеотидов, имеющих в середине динуклеотид CpG, дают ложноположительный результат и определяются как метилированные по центральному цитозину. В присутствии гена ДНК-метилтрансферазы M.HpaII среди позиций, покрытых более чем 700 ридами, 91.3% всех сайтов CCGG определяются как метилированные, при этом только 0.13% других тетрауклеотидов с центральным CG-динуклеотидом определяются как содержащие 5-метилцитозин во втором положении. Делается вывод, что при используемой методике для надежного определения 5-метилцитозина и исключения ложноположительных результатов покрытие должно быть не менее 700–1000×.

Ключевые слова: нанопоры, 5-метилцитозин, метилирование, *E. coli*, DeepSignal.

DOI: 10.31857/S0006302920060010

Нанопорное секвенирование — это уникальная перспективная технология определения последовательности нуклеиновых кислот, разработанная компанией Oxford Nanopore Technologies Ltd (Великобритания). Основным элементом такого секвенатора является мембрана с отверстием порядка 10^{-9} м в диаметре. Мембрана помещается в электролитический раствор. Постоянное электрическое поле прикладывается в перпендикулярном к поверхности направлении. При этом возникает ионный ток, величина которого постоянно фиксируется цифровым преобразователем. Кроме того, через это же отверстие подается од-

нопочечная ДНК, скорость подачи которой контролируется ферментативной системой, включающей хеликазу [1]. Использование хеликазы явилось ключевым изобретением при создании технологии, поскольку позволило контролировать скорость прохождения ДНК через пору. Скорость диффундирования свободной ДНК по градиенту электрического поля составляет приблизительно 10 мкс на нуклеотид и слишком велика, чтобы позволить разрешить последовательность нуклеотидов ДНК. В результате была сконструирована молекулярная машина, основанная на использовании хеликазы, фермента разделяю-

шего двунитевую ДНК на две одонитевых ДНК. В установке MinION хеликаза не только разделяет двунитевую ДНК на две одонитевых ДНК, но и разделяет нити, направляя одну нить в пору, а другую – возвращая в исходный раствор. Выбранная MinION хеликаза позволяет подавать одноцепочечную ДНК со скоростью порядка 500 нуклеотидов в секунду, что позволяет наиболее эффективно разрешать последовательность нуклеотидов [1]. Система позволяет получать очень длинные риды (одиночные прочтения, от английского «read»), до 100000 оснований, однако доля таких длинных ридов невелика, а большинство ридов не превышают по своей длине нескольких тысяч нуклеотидов.

Сила ионного тока определяется пропускной способностью отверстия, которая, в свою очередь, зависит от последовательности нуклеотидов исследуемой ДНК. Эти изменения достаточно велики, чтобы по ним можно было восстановить последовательность нуклеотидов. Таким образом, секвенаторы MinION, разработанные компанией Oxford Nanopore Technologies, осуществляют прямой анализ одноцепочечных молекул ДНК, не подвергая их амплификации и не используя химический синтез.

Последовательность импульсов, получаемая на выходе прибора, зависит не только от чередования классических оснований ДНК (аденина, гуанина, тимина и цитозина) [1], но и от наличия модификаций ДНК, таких как 5-метилцитозин [2, 3]. Возможность прямого определения 5-метилцитозина является важнейшим преимуществом нанопорных технологий и принципиально недоступна для систем, использующих технологию секвенирования на основе применения ДНК-полимеразы (sequencing by synthesis), реализованных, например, семейством установок HiSeq, созданных компанией Illumina (США).

Знание профиля метилирования ДНК чрезвычайно важно как для медицинских приложений, так и для фундаментальных исследований в области молекулярной биологии, поскольку эти модификации играют важнейшую роль в развитии, регуляции и поддержании жизнедеятельности как бактериальной, так и эукариотической клетки. В частности, они являются ключевыми элементами геномного импринтинга, инактивации X-хромосомы, репрессии ретроэлементов и процесса старения. Метилирование промоторных участков, как правило, подавляет транскрипцию, и этот механизм реализуется, в частности, при формировании различных типов клеток позвоночных. Многие заболевания имеют характерный профиль метилирования ДНК. Например, локальное 5mC-гиперметилирование и общее гипометилирование генома в целом характерно для опухолевых клеток [4], а паттерны метилирова-

ния CpG островков позволяют различить нормальные и опухолевые ткани [5].

Фирмой Oxford Nanopore Technologies и сторонними разработчиками создан ряд декодеров, позволяющих переводить последовательность электронных импульсов в последовательность оснований ДНК. Согласно обзору [1], наиболее точным декодером является программа Guppy (<https://community.nanoporetech.com>). За последние несколько лет был разработан ряд методов, позволяющих с достаточной уверенностью определять наличие 5-метилцитозина в последовательности ДНК. Для этой цели используются статистические алгоритмы [3] и, в последнее время, нейросетевые технологии, которые реализованы в программах DeepMod, DeepSignal [6, 7]. Таким образом, в распоряжении исследователей впервые появился метод прямого определения модификаций одиночных молекул ДНК, не подвергавшихся амплификации. К сожалению, несмотря на большую работу, проведенную Oxford Nanopore Technologies Ltd, точность определения как классических оснований, так и их модификаций невелика, и при одиночном прочтении не превышает 89% [1]. Такая ошибка в определении оснований до определенной степени может быть исправлена путем глубокого секвенирования и статистической обработки полученной большой выборки перекрывающихся ридов.

В настоящем исследовании было проведено прямое секвенирование двух геномов рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* с клонированными генами бактериальных ДНК-метилтрансфераз, осуществляющими высокоспецифичное метилирование сайтов GCGC и CCGG по центральному цитозину. Геномы бактерий можно секвенировать очень глубоко, и именно на геноме бактерий была впервые продемонстрирована возможность точного определения последовательности с помощью секвенатора MinION [8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *E. coli* ER2267, любезно предоставленный компанией NEB (США). Ген ДНК-метилтрансферазы M.HspAI из *Haemophilus* sp. A1 был клонирован в вектор pUC19, полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* ER2267 (<http://science.sibenzyme.com/soft-data/database/nucleotide-sequence-of-plasmid-dna-phspai2>). Ген ДНК-метилтрансферазы M.HpaII из *Haemophilus parainfluenzae* был клонирован в вектор PMTL22 и клетки *E. coli* ER2267 трансформировали этой ДНК (<http://www.sibenzyme.com/info624.php>). Геномную ДНК из полученных рекомбинантных штаммов выделяли, как описано ранее [9].

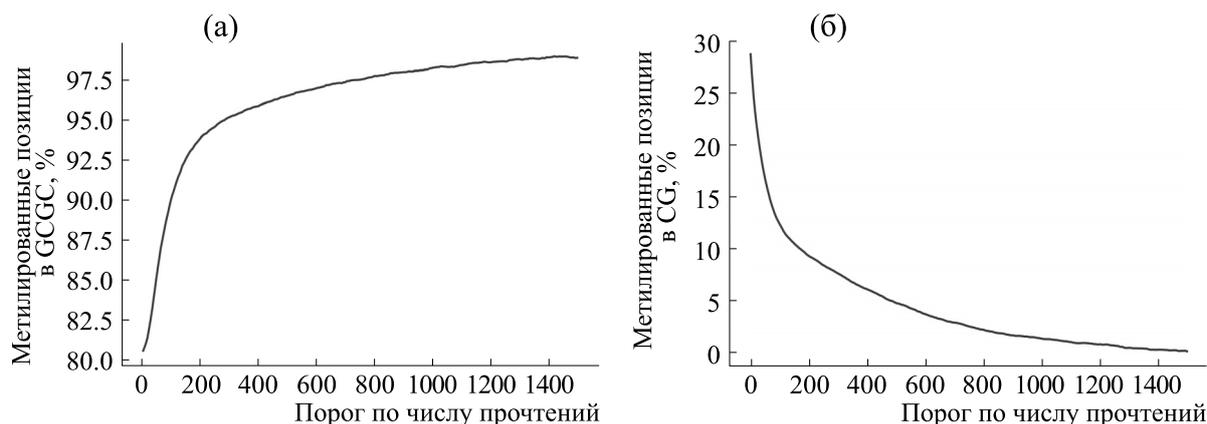


Рис. 1. Количество контекстов, определенных как метилированные, в зависимости от минимального покрытия ридами MinION: (а) – контексты GCGC, (б) – контексты NCGN, отличные от GCGC. Риды фильтрованы по индексу уверенности DeepSignal.

Оба препарата геномной ДНК были секвенированы с помощью MinION (R9.4.1) с применением протокола SQK-LSK108 и получением исходного среднего покрытия 2193 \times и 1832 \times для геномов клеток *E. coli*, несущих гены метилтрансфераз M.HpaII и M.HspAI соответственно. Риды в формате fast5 были обработаны программой Guppy. После чернового определения оснований результаты были согласованы с последовательностью генома *E. coli* штамма NRRL B-1109 с использованием программы tomlbo resquiggle (Oxford Nanopore Technologies). Этот алгоритм создает новое соответствие сигнала и нуклеотидов, используя последовательности из референсного генома. Полученные файлы с координатами ридов в референсном геноме и сигналом секвенирования использовали в качестве источника входных данных программы DeepSignal [7] для определения 5-метилцитозинов. Программа DeepSignal присваивает каждой CpG-паре индекс надежности метилирования цитозинов, представляющий собой число от 0 до 1 (0 – надежно неметилированный цитозин; 1 – цитозин надежно метилирован). Была проведена фильтрация ридов с сохранением ридов, содержащих CpG-пары с индексом менее 0.1 (неметилированные цитозины) или более 0.9 (метилированные цитозины). Среднее покрытие геномов после такой фильтрации составило 175 (M.HspAI), и 146 (M.HpaII). При этом дисперсия значений покрытия оказалась очень велика, и в геноме наблюдались участки с покрытием до 1500 ридов для отдельных CpG-пар. Цитозин, для которого после фильтрации было показано метилирование более чем в 50% покрывающих его ридов, считался метилированным. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием интерпретируемого языка Python.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование генома *E. coli* с клонированным геном ДНК-метилтрансферазы M.HspAI (контекст метилирования GCGC). Распределение ридов MinION вдоль генома *E. coli* достаточно неоднородно. Поскольку работа в первую очередь направлена на анализ метилирования, было вычислено покрытие выявленных 5-метилцитозинов ридами MinION, которое варьировало от значительной меньше 100 \times до значений, превышающих 1500 \times . Как видно из рис. 1а, доля определяемых сайтов G(5mC)GC существенно зависит от величины покрытия ридами MinION.

При покрытии 1500 \times определяется 98.9% всех сайтов G(5mC)GC (не определяется 31 сайт из 2789). Доля неопределяемых сайтов G(5mC)GC на уровне приблизительно 1% сохраняется и при дальнейшем росте покрытия. При максимальных покрытиях (больше 2000 \times) определяются как метилированные все сайты GCGC, но сайтов с таким покрытием очень мало (16). Приблизительно 2/3 цитозинов во втором положении искомого сайта имеют покрытие меньше, чем 100 ридов, однако и среди этих цитозинов более 80% определяются как метилированные.

В то же время для контекстов NCGN, отличных от GCGC, метилирование нехарактерно (рис. 1б). Низкое качество ридов приводит к тому, что такие контексты в некотором количестве определяются как метилированные. Число это не очень велико – на уровне покрытия 1500 \times имеется 59 из 3448 контекстов NCGN, отличных от GCGC и определяемых как метилированные (рис. 1б).

Индекс уверенности DeepSignal играет исключительно важную роль при определении метилирования конкретных CG-динуклеотидов. Если не фильтровать риды по этому индексу, многие кон-

Таблица 1. Процент различных контекстов NCGN, отличных от GCGC, метилированных в геноме *E. coli*, несущем рекомбинантную метилтрансферазу M.HspAI

	Контекст	Доля метилированных
0	ACGC	0.17
1	GCGT	0.16
2	CCGC	0.13
3	GCGA	0.12
4	GCGG	0.10
5	CCGG	0.07
6	CCGA	0.09
7	CCGT	0.05
8	ACGG	0.04
9	ACGT	0.03
10	ACGA	0.03
11	TCGC	0.01
12	TCCG	0
13	TCGA	0
14	TCGT	0

тексты, являющиеся мишенями ДНК-метилтрансферазы, при большом покрытии определяются как неметилированные, а с другой стороны, около 6% контекстов NCGN с высоким покрытием определяются как метилированные (данные не показаны). Подавляющее большинство этих позиций определится «правильно» (метилированными являются только сайты узнавания ДНК-метилтрансферазы) после фильтрации ридов по индексу уверенности DeepSignal.

Отдельный интерес представляет собой анализ случаев, в которых метилирование определяется вне контекстов, распознаваемых метилтрансферазой. В табл. 1 даны частоты разных контекстов NCGN, отличных от GCGC, в которых ошибочно определялось метилирование. Поскольку с ростом покрытия доля контекстов NCGN, распознаваемых как метилированные, падает практически до нуля, мы предполагаем, что имеем дело с ошибками определения сайтов метилирования, а не с aberrantным метилированием метилтрансферазой.

Из табл. 1 видно, что комплементарные тетра-нуклеотиды ACGC и GCGT имеют высокие и близкие по величине частоты ошибочно определяемого метилирования. Однако в случае других комплементарных тетра-нуклеотидов это правило

не всегда соблюдается. Например, тетра-нуклеотид TCGC почти никогда не определяется как метилированный, в то же время комплементарный ему контекст GCGA, напротив, часто выявляется как метилированный.

Данные табл. 1 показывают также, что тетра-нуклеотиды TCGN практически никогда не определяются как метилированные, а тетра-нуклеотиды ACGN показывают незначительный уровень ошибочного метилирования по сравнению с остальными сайтами. Причины такой зависимости ошибки от контекста могут быть связаны как с формированием сигнала MinION, так и с особенностями работы программы DeepSignal, определяющей метилирование цитозина.

Секвенирование генома *E. coli* с клонированным геном ДНК-метилтрансферазы M.HpaII (контекст метилирования CCGG). Покрытие генома штамма *E. coli* с ДНК-метилтрансферазой M.HpaII ридами MinION с высоким индексом уверенности DeepSignal оказалось более низким, чем у штамма, несущего ДНК-метилтрансферазу M.HspAI. Более низким оказался и уровень метилирования контекстов CCGG, являющихся мишенями M.HpaII (рис. 2a). Показательно, что даже среди сайтов, характеризующихся очень высоким покрытием ридами MinION, существует около 10% неметилированных контекстов, причем для малой доли сайтов с очень высоким покрытием процент контекстов, определенных как неметилированные, не падает, а даже растет. Так, из 47 сайтов CCGG с покрытием не менее 1700× 12 сайтов не метилированы, что составляет практически четвертую часть. Тем не менее при покрытии от 200× и более приблизительно 10% сайтов CCGG определяются как неметилированные, т. е. около 90% таких контекстов имеют последовательность C(5mC)GG (приблизительно 1400 сайтов в геноме). Для контекстов CCGG с покрытием меньше 100× как метилированные определяются приблизительно 85% сайтов. Данные рестрикционного анализа генома не показывают гидролиза геномной ДНК рестриктазой HpaII, расщепляющей неметилированные сайты CCGG (данные не показаны), причем наличие даже менее 3% неметилированных сайтов давало бы видимую картину расщепления. Таким образом, 10% неметилированных контекстов CCGG с большей вероятностью объясняются ненадежной обработкой сигнала с помощью программы DeepSignal, а не реальным недометилированием геномной ДНК.

Если рассматривать позиции в контекстах NCGN, отличных от CCGG (рис. 2b), то в геноме *E. coli*, несущей ген метилтрансферазы M.HpaII, такие контексты определяются как практически неметилированные уже при покрытии в 200×. При покрытии 700× определяются как метилиро-

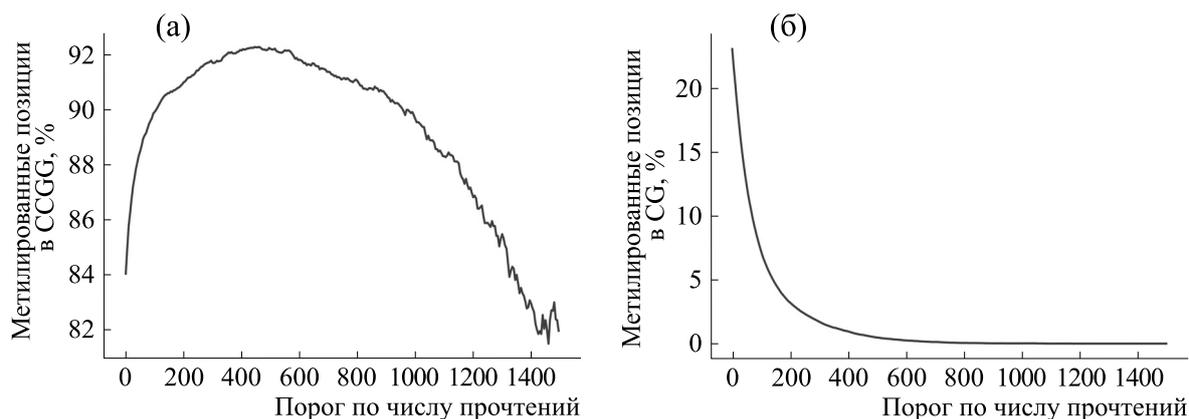


Рис. 2. Количество контекстов, определенных как метилированные, в зависимости от минимального покрытия ридами MinION: (а) – контексты CCGG, (б) – контексты NCGN, отличные от CCGG. Риды фильтрованы по индексу уверенности DeepSignal.

ванные только 0.13% контекстов NCGN, отличных от CCGG (53 контекста из 41002).

Как видно из табл. 2, контекст CCGT и комплементарный ему ACGG наиболее часто ошибочно определяются как метилированные. В случае сайта GCGC (табл. 1) максимальные значения ошибочного определения метилирования наблюдались для комплементарных тетрануклеотидов GCGT и ACGC. Таким образом, при опре-

делении метилированных сайтов GCGC (сайт узнавания M.HspAI) и CCGG (сайт узнавания M.HpaII) максимальное значение ошибочно установленного метилирования наблюдается для этих же сайтов, но с заменой последнего нуклеотида на Т (или первого основания на А в случае комплемента).

В случае M.HpaII, так же как и в случае с M.HspAI, тетрануклеотиды TCGN практически не определяются как метилированные, а тетрануклеотиды ACGN показывают незначительный уровень ошибочного метилирования по сравнению с остальными сайтами.

Таблица 2. Процент различных контекстов NCGN, отличных от CCGG, метилированных в геноме *E. coli*, несущем рекомбинантную метилазу M.HpaII

	Контекст	Доля метилированных
0	CCGT	0.27
1	ACGG	0.21
2	GCGG	0.12
3	CCGA	0.18
4	CCGC	0.05
5	GCGA	0.05
6	GCGT	0.04
7	GCGC	0.02
8	ACGC	0.02
9	ACGA	0.03
10	ACGT	0.01
11	TCGG	0.01
12	TCGC	0
13	TCGA	0
14	TCGT	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы показали, что в случае высокого уровня покрытия при секвенировании ДНК система MinION может определять наличие 5-метилцитозина в ДНК, практически исключая ложноположительные результаты. При этом определение 5-метилцитозина в различных контекстах ДНК отличается. Для сайтов G(5mC)GC доля определяемых метилированных контекстов растет с ростом покрытия практически до 100%, однако имеется некоторое количество других тетрануклеотидов NCGN, которые ошибочно определяются прибором как метилированные. В случае сайта C(5mC)GG процент ошибочного определения 5-метилцитозина в тетрануклеотидах NCGN очень мал.

Для сайтов C(5mC)GG доля определяемых метилированных контекстов растет с ростом покрытия приблизительно до 90%, причем, по-видимому, часть контекстов не определяется как метилированные из-за неудачной работы программы DeepSignal. Почему DeepSignal показывает такую разную эффективность на двух контекстах, еще предстоит узнать.

Таким образом, полученные результаты секвенирования на приборе MinION двух геномных ДНК, имеющих 5-метилцитозин в различных контекстах, позволяют говорить о возможности использования прибора для достоверного определения 5-метилцитозина в геномной ДНК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № RFMEFI60419X0218).

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. R. Wick, L. M. Judd, and K. E. Holt, *Genome Biol.* **20**, 129 (2019).
2. M. Stoiber, J. Quick, R. Egan, et al., *Biorxiv* 094672 (2017). DOI: 10.1101/094672
3. J. T. Simpson, R. E. Workman, P. C. Zuzarte, et al., *Nat. Methods* **14**, 407 (2017).
4. M. Ehrlich, *Epigenomics* **1** (2), 239 (2009).
5. G. P. Pfeifer, *Int. J. Mol. Sci.* **19** (4), 1166 (2018).
6. Q. Liu, L. Fang, G. Yu, D. Wang, et al., *Nat. Commun.* **10** (1), 2449 (2019).
7. P. Ni, N. Huang, Z. Zhang, et al., *Bioinformatics* **35** (22), 4586 (2019).
8. N. J. Loman, J. Quick, and J. T. Simpson, *Nat. Methods*, **12**, 733 (2015).
9. C. L. Smith, S. R. Kiso, and C. R. Cantor, *Genome analysis: A Practical Approach*, Ed. by K. Davis (URL Press, Oxford, UK, 1987).

Efficiency of Identification of 5-Methylcytosine in *Escherichia coli* DNA Cells that Carry Genes of Bacterial DNA-Methyltransferases Using an Oxford Nanopore Device

V.V. Ilinsky*, **, E.M. Kozlova*, ***, S. Kh. Degtyarev****, N.K. Yankovsky*, *****, and V.J. Makeev*, ***, *****, *****

*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

**Genotek, Nastavnicheskiy per. 17/1, Moscow, 105120 Russia

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

****Scientific Production Association "SibEnzyme", ul. Akad. Timakova 2/12, Novosibirsk, 630060 Russia

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

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

*****National Research Center «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA, 1-i Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 117545 Russia

The MinION system (Oxford Nanopore Technologies Limited) was used for direct sequencing of genomic DNA of two recombinant *E. coli* strains. In one case, the cells contained a plasmid with the M.HpaII gene of DNA methyltransferase, which methylates the second cytosine in CCGG site; in the second case, the *E. coli* strain contained M.HspAI DNA methyltransferase, which modifies the central cytosine in the GCGC sequence. In both cases, DNA methyltransferases methylate cytosine to 5-methylcytosine. It has been shown that when DNA is sequenced at high coverage, the presence of 5-methylcytosine in DNA can be detected with high accuracy. In particular, in *E. coli* DNA containing the cloned gene of DNA methyltransferase M.HspAI, at 1300× coverage, 98.9% of the GCGC sites are identified as methylated at the first cytosine. At the same time, only 0.09% of the remaining tetranucleotides, which have the CpG dinucleotide in the middle, give a false positive result being identified as methylated at the central cytosine. In the presence of the gene of DNA methyltransferase M.HpaII, among the positions covered by more than 700 reads, 91.3% of all CCGG sites are identified as methylated, while only 0.13% of other tetranucleotides with a central CG-dinucleotide are identified as sites containing 5-methylcytosine in the second position. Therefore, when this method is used, at least 700–1000× coverage is needed for accurate measurements of 5-methylcytosine and elimination of false-positive results.

Keywords: nanopores, 5-methylcytosine, methylation, E. coli, DeepSignal

УДК 577.3

ПОРООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА ХЕЛИКАЗЫ SsoHel308 ИЗ *SACCHAROLOBUS SOLFATARICUS*

© 2020 г. А.В. Сиунов*, М.П. Борисова**, Ж.И. Андреева-Ковалевская*, А.С. Нагель*,
А.С. Колесников*, А.К. Сурин***, ****, А.С. Солонин*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина – обособленное подразделение ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, 142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 5

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

***Филиал Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 6

****Институт белка РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 4

E-mail: solonin@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 26.08.2020 г.

После доработки 26.08.2020 г.

Принята к публикации 23.09.2020 г.

Впервые продемонстрирована порообразующая активность хеликазы SsoHel308 из экстремальной термофильной археи *Saccharolobus solfataricus*. Этот белок способен при встраивании в мембраны эритроцитов кролика обеспечивать их гемолиз. Показано, что данный фермент образует поры в плоской искусственной бислойной мембране и является мембранным трансформером. Встраиваясь в бислойные липидные мембраны, он вызывает изменение их проводимости. Суммируя полученные результаты, мы приходим к выводу, что хеликаза SsoHel308 способна образовывать поры в искусственных бислойных мембранах и в некоторых случаях ток, протекающий через мембраны, имеет особенности, характерные для работы ионных каналов. Короткое время существования пор на мембране значительно снижает токсичность хеликазы для живой клетки, а возможность направленной транслокации односторонней ДНК в присутствии АТФ позволит в будущем использовать этот фермент в качестве молекулярного шприца для инъекций односторонней ДНК в живые клетки.

Ключевые слова: хеликаза, экстратермофильные археи, гемолиз, искусственные бислойные мембраны, порообразование.

DOI: 10.31857/S0006302920060022

В последние годы внимание исследователей направлено на создание и развитие нанопоровых технологии, позволяющей прочитывать длинные последовательности ДНК и РНК с определением не только последовательности нуклеотидов, но и их модификаций [1, 2]. По этой технологии с помощью встроенных в белковую пору датчиков определяют последовательность нуклеотидов односторонней полинуклеотидной цепи при ее прохождении через поры, сформированные в искусственной бислойной мембране. Перемещение ДНК через природные нанопоры управляется внешней силой, например приложенным электрическим напряжением, в связи с этим функции нанопор в первую очередь изучали *in vitro*. Ограничения использования этой технологии определяются, во-первых, необходимостью пропускать

через пору односторонние последовательности, во-вторых, слишком высокой скоростью прохождения полинуклеотидных нитей через пору, что в значительной степени повышает ошибки в определяемых последовательностях, в-третьих, сложностью самой природной части технологии, включающей различные белковые продукты. Частично эти ограничения снимаются за счет использования фермента хеликазы, который не только расплетает двустороннюю ДНК, но и значительно замедляет прохождение ДНК через отверстие, сформированное гексамерной формой этого белка, благодаря зависимой от АТФ транслокации односторонней ДНК [3]. Практически все белки нуклеинового обмена, к которым также относятся хеликазы, функционируют на мембранах. Возможность совместимости мутантной хели-

ликазы вируса папилломы крупного рогатого скота (BPV E1) [4, 5], относящейся к SFIII-семейству хеликаз [6], с мембранами ранее была изучена на липосомных везикулах с использованием криоэлектронной микроскопии [7].

В настоящей работе мы продемонстрировали, что хеликаза экстремальной термофильной археи *Saccharolobus solfataricus* [8], встраиваясь в мембрану эритроцитов, обеспечивает их гемолиз. В то же время этот фермент способен образовывать поры в плоской искусственной бислойной мембране, свойства которых позволяют предположить их возможное потенциальное использование в нанопоровой технологии определения последовательностей ДНК и РНК.

5' CTTTATTTTCAGGGCCATATGGGTTTAGAATTAGAGTG 3' – прямой,
5' GCCGGATCCCTCGAGTTAATGAAATCTATTAAGTAATC 3' – обратный.

Аликвоты реакционной смеси анализировали на наличие фрагментов соответствующего размера электрофоретически в 1%-м агарозном геле. Полученные фрагменты ДНК были очищены при помощи QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, США). Безлигазное клонирование в ДНК pET19-mod проводили при 42°C в течение 30 мин с использованием фрагмента NdeI-XhoI вектора и ПЦР-фрагментов геномной ДНК по схеме, разработанной фирмой Clontech Laboratories Inc.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование гена *hel308*. Для создания продуцента хеликазы на основе клеток *E. coli* целевой ген *ssohel308* из геномной ДНК *Saccharolobus solfataricus* был клонирован в векторную плазмиду pET19mod [9]. Выбор рестрикционных сайтов, по которым будет осуществляться клонирование, проводили с помощью программы SnapGene. Вследствие штаммовых различий ген мог содержать сайты для любых эндонуклеаз рестрикции, используемых при клонировании, поэтому была применена тактика безлигазного клонирования. Отбор фрагментов ДНК, содержащих ген *ssohel308*, осуществляли с использованием следующих синтетических праймеров:

(США) к набору реагентов для клонирования ДНК Fusion™ CF Dry-Down PCR Cloning Kit (в молярном соотношении 2 : 1). Скрининг клонов трансформированных клеток *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, США) на наличие плазмид со вставками нужного размера проводили методом ПЦР с колоний с помощью ДНК-полимеразы TaqSE (фирмы СибЭнзим) и универсальных праймеров для векторов серии pET – T7P и T7T:

T7P: 5' TAATACGACTCACTATAGG 3' – прямой,
T7T: 5' AAGGGGTTATGCTAGTTA 3' – обратный.

Последовательность клонированного гена сравнили с базой данных EMBL (ген депонирован под номером AM778123) [8]. Рекомбинантные плазмиды, содержащие ген *ssohel308*, полностью совпадающий по последовательности нуклеотидов, трансформировали в экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagene, США). Для экспрессии использовали рекомбинантный ген *ssohel308*, содержащий сайт, узнаваемый Tev-протеазой, и шесть гистидиновых остатков на N-конце. Клон, содержащий ген *ssohel308*, использовали для получения биомассы конечного продукта при выращивании в 10-литровом ферментере в объеме 6 л при pH 7.0 и 37°C. При достижении культурой плотности 1.9 (оптическая плотность при длине волны 595 нм) для индукции синтеза SsoHel308 вносили изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 1 mM (0.8 г) и выращивали в течение 7 ч в условиях ин-

тенсивной аэрации и температуре 37°C. На 6 л среды было получено 90 г сырого веса биомассы, которую использовали для выделения и очистки хеликазы SsoHel308.

Очистка хеликазы SsoHel308. 15 г индуцированных клеток *E. coli* BL21(DE3) с геном *ssohel308*, содержащих 8.15 г белка, суспендировали в 6 мл буфера А, обработанного фенолметилсульфонил фторидом (50 mM Na₂PO₄, pH 7.4, 300 mM NaCl), заморозили при –20°C и разрушили с помощью Френч-пресса. Для эффективной экстракции белков и деградации нуклеиновых кислот полученный лизат озвучивали во льду на ультразвуковом дезинтеграторе MSPE в режиме 15 циклов по 30 с с минутными перерывами, осветляли центрифугированием (9000 g, 30 мин), фильтровали через 0.22 мкм фильтр (типе GS, Millipore, США) и разбавляли буфером А до 200 мл. Полученный препарат с концентрацией белка

40.49 мг/мл наносили на уравновешенные буфером А спаренные колонки (с целлюлозой ДЕ-52 (Whatman, США) объемом 50 мл и Ni-NTA-агарозой (Qiagen, США) объемом 10 мл. После нанесения препарата предколонку с целлюлозой ДЕ-52 удалили, колонку с Ni-NTA-агарозой промыли 20 объемами буфера Б (50 mM Na-фосфатного буфера, pH 7.4, 500 mM NaCl, 25 mM имидазола). Белок элюировали градиентом имидазола от 50 mM до 1 M в буфере Б. Собирали фракции по 5 мл. Объединенные пиковые фракции диализовали против буфера, содержащего 10 mM трис-HCl, pH 7.5 и 10 mM NaCl (буфер В) и нанесли на уравновешенную этим же буфером 50 мл колонку с ДЭАЭ-сефарозой (DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Швеция), затем промыли 10 объемами буфера В и трижды по 50 мл растворами, содержащими соответственно 0.1, 0.2 и 0.3 M NaCl в буфере В. Белки элюировали градиентом NaCl от 0.3 до 1.25 M в том же буфере в объеме 90 мл, фракции тестировали электрофоретически. Полученный препарат диализовали против буфера В и использовали в экспериментах по анализу порообразования. Для хранения при -20°C препарат фермента диализовали против 50% глицерина в буфере В.

Хромато–масс-спектрометрический анализ. Полосы белков, полученных при электрофорезе выделенных препаратов хеликазы, анализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии, как описано в работе [10]. Для этого участки гелей, содержащие белки, вырезали и обрабатывали протеиназой К. Затем полученные пептиды разделяли с помощью высокоэффективной нанопотоковой жидкостной хроматографии в обращенной фазе (Easy nLC 1000, Thermo Fisher Scientific, США), совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения (Orbitrap Elite, Thermo Fisher Scientific, Германия). Масс-спектрометрический анализ проводили при разрешении 60000 для панорамных масс-спектров ионов пептидов и 15000 для спектров фрагментации ионов, активированной соударениями с инертным газом.

Гемолитическая активность. Проведение реакции по определению гемолитической активности было описано ранее в работе [11]. В данной работе использовали эритроциты кролика и процедуру, основанную на измерении концентрации гемоглобина, высвобождаемого при лизисе эритроцитов. Эритроциты кролика промывали 74 mM Na-фосфатным буфером (pH 6.8), содержащим 74 mM NaCl, и доводили до концентрации 2% (об/об). Конечная концентрация хеликазы в пробе составила 0.15 мг/мл. Для контроля спонтанного гемолиза эритроцитов добавляли физиологический раствор. Полный лизис достигали осмотическим шоком при добавлении в реакционную среду ди-

стиллированной воды. В качестве контрольных образцов использовали значения спонтанного и полного лизиса эритроцитов. Степень лизиса определяли согласно следующему уравнению:

$$E = (A_e - A_0)/(A_{100} - A_0) \times 100, \quad (1)$$

где A_e , A_0 и A_{100} – обратные величины оптической плотности при 595 нм для образца и контролей спонтанного и полного лизиса соответственно.

Реакцию гемолиза проводили в объеме 100 мкл в течение 12 ч на планшетном ридере Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices, США) с постоянным помешиванием при 30°C , показания снимали каждые 10 мин на длине волны 595 нм.

Бислойные липидные мембраны. Мембраны на-слаивали по методу Мюллера–Рудина [12]. Для формирования мембран использовали соевый лецитин в концентрации 20 г/л (L- α -phosphatidylcholine Type IV-S, Sigma, США). Окружающий раствор содержал 1 M KCl и 5 mM трис-HCl (Sigma, США), pH 7.3. Все эксперименты проводили в условиях клемпа напряжения. *Trans*-отделение было связано с виртуальной землей через усилитель Keithle 301 (Keithle, США) в конфигурации «ток–напряжение». Мембранный потенциал поддерживали через Ag/AgCl-электроды в 3 M KCl и агаровые мостики. Регистрацию тока вели с использованием платы ЦАП/АЦП DT2801A (Data Translation, США) и специализированной программы «БЛМ», разработанной А.Я. Зильберштейном (личное сообщение). Исследуемый агент всегда вносили в отсек камеры, где находился измерительный электрод. Знак потенциала на рисунках указан для *trans*-отделения. Все измерения проводили при комнатной температуре ($22-23^{\circ}\text{C}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Очистка хеликазы SsoHel308. Схема очистки хеликазы SsoHel308 представлена на рис. 1а. После прохождения препарата фермента через колонку с целлюлозой ДЕ-52 и хроматографии на отделенной колонке с Ni-NTA-агарозой пиковые фракции элюировали при концентрации имидазола от 340 до 420 mM. Концентрация белка в пиковой фракции составила 0.9 мг/мл. Объединенные фракции общим объемом 18 мл с концентрацией 2.2 мг/мл, содержащие хеликазу, диализовали против буфера В. Затем провели хроматографию на 50 мл колонке с ДЭАЭ-сефарозой ФФ и фракции, элюированные при концентрации NaCl от 0.55 до 0.75 M в буфере В, содержащие хеликазу, объединили и диализовали против буфера В. Фракции на всех этапах очистки тестировали электрофоретически (рис. 1б). Выход очищенного белка из 15 г сырого веса рекомбинант-

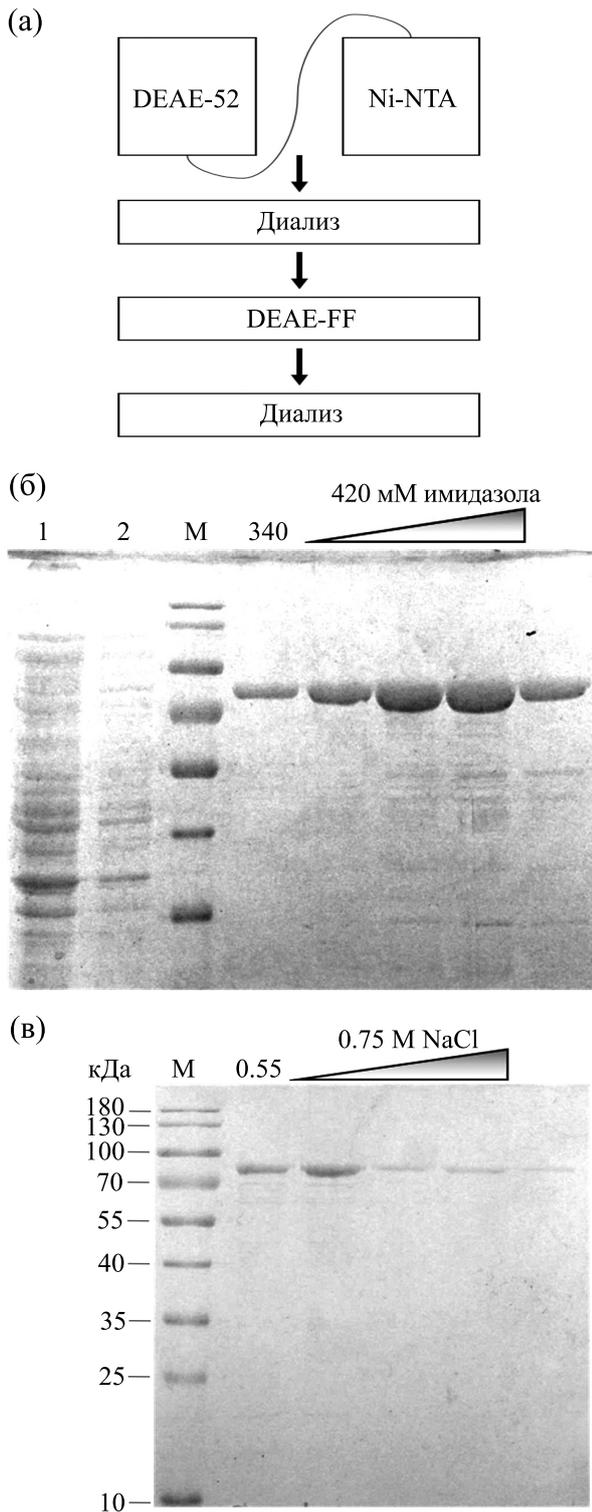


Рис. 1. Этапы очистки SsoHel308: (а) – схема очистки хеликазы SsoHel308, (б) – электрофореграмма белка при элюции с отделенной колонки Ni-NTA, (в) – электрофореграмма белка при элюции с колонки DEAE-FF.

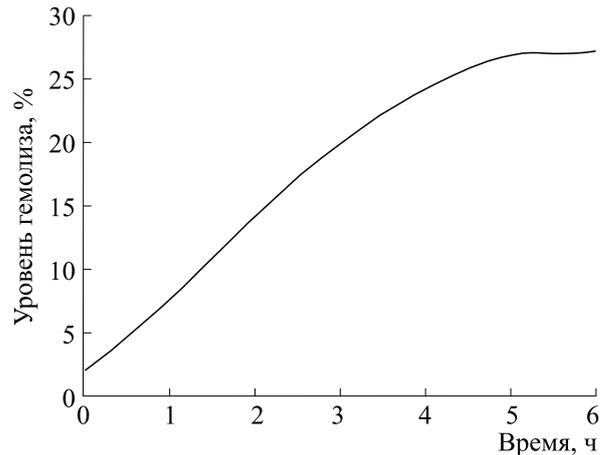


Рис. 2. Кинетика гемолитической активности хеликазы SsoHel308.

ных бактериальных клеток составил 0.73% от общего белка экстракта клеток, или 25 мл, содержащих 16 мг белка. Идентичность очищенного фермента хеликазы SsoHel308 подтвердили с использованием тандемной масс-спектрометрии (см. раздел «Материалы и методы»).

Гемолитическая активность хеликазы SsoHel308.

Хеликаза SsoHel308 способна образовывать гексамерные структуры, в центре которых образуется отверстие для транслокации однострелевой ДНК. Кроме того, необходимо учитывать, что практически все бактериальные белки нуклеинового обмена способны распознавать мембраны, так как всевозможные процессы модификации ДНК проходят на бактериальных мембранах. В связи с этим было сделано предположение, что при встраивании преобразованных гексамерных форм хеликазы SsoHel308 в мембраны возможно создание пор. Для проверки этого предположения мы использовали эритроциты, нарушение целостности мембраны которых приводит к гемолизу. Образец очищенной хеликазы SsoHel308 в концентрации 0.642 мг/мл тестировали в реакции гемолиза с использованием эритроцитов кролика.

На рис 2 продемонстрирована кинетика гемолиза эритроцитов кролика при добавлении хеликазы SsoHel308 в условиях, описанных в разделе «Материалы и методы» при температуре 25°C. В этих условиях достигался 30%-й гемолиз эритроцитов в течение трех с половиной часов, что может указывать на возможность порообразования. Однако эффективность порообразования невысока. Возможно, полученный результат связан с низкой эффективностью олигомеризации (гексамеризации) хеликазы в водном растворе в услови-

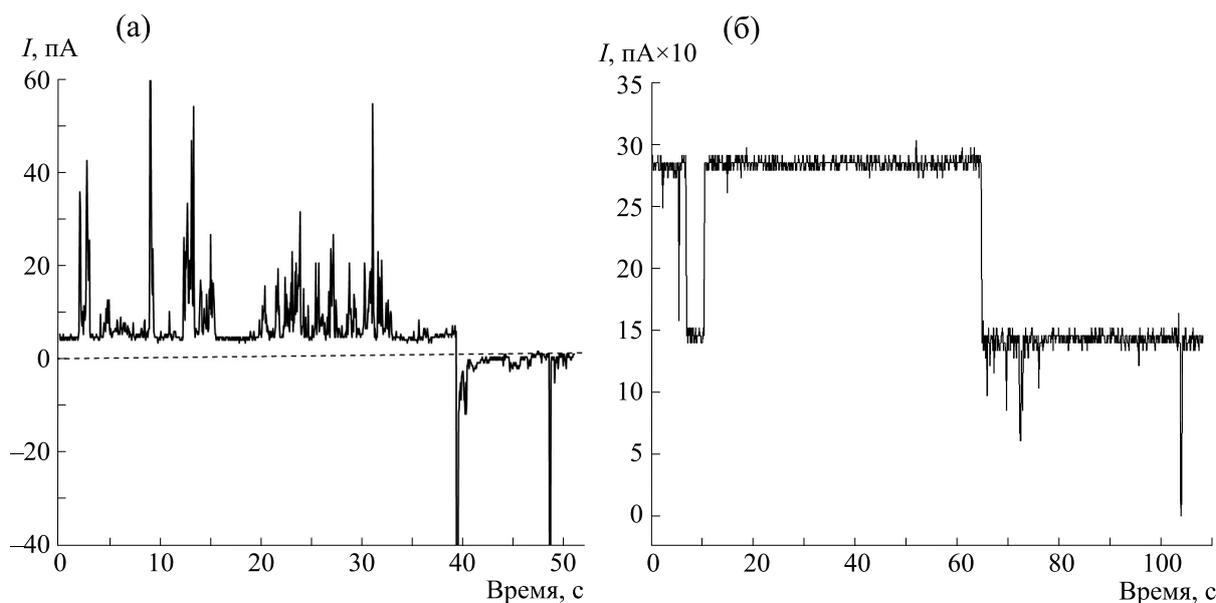


Рис. 3. Электрофизические характеристики пор, образованных хеликазой SsoHel308. (а) – Флуктуации тока при добавлении 38.52 мкг/мл хеликазы (out), напряжение ± 100 мВ. (б) – Флуктуации тока в присутствии хеликазы SsoHel308. Концентрация (out) 8.12 мкг/мл, напряжение $+100$ мВ, раствор – 1 М KCl.

ях проводимого эксперимента с последующим встраиванием в мембраны эритроцитов или с нестабильностью образуемых пор. Таким образом, показано, что хеликаза SsoHel308, которая входит в семейство хеликаз SFII, проявляет цитолитическую активность на живых эукариотических клетках, атакуя их мембрану. Ограничение времени проявления гемолитической активности может определяться стабильностью фермента в условиях эксперимента. Чтобы оценить, способна ли хеликаза SsoHel308 создавать поры в мембранах со свойствами каналов, использовали искусственные бислоиные мембраны.

Добавление хеликазы до конечной концентрации 1.93 мкг/мл к искусственным бислоиным мембранам увеличивало проводимость мембраны более чем на порядок. Изменения тока через мембрану проявляются отдельными всплесками. На рис. 3а видны хаотичные всплески тока как при положительном, так и при отрицательном потенциале со стороны белка. Изменения электропроводности мембраны, определяемой присутствием хеликазы, чаще проявляется при отрицательном потенциале со стороны белка. Всплески могут указывать на ограниченное время существования пор. В экспериментах мы использовали материал после длительного хранения в глицерине при -20°C с последующим диализом против буфера В. На рис. 3б видны изменения тока через мембрану в присутствии хеликазы и четкие и одинаковые

уровни отключения и включения тока. Такое поведение тока характерно для мембран с работающими ионными каналами. Обращает на себя внимание очень большая величина тока (около 150 пА), протекающая через такие структуры.

Встраивание очищенной хеликазы SsoHel308 в искусственные бислоиные мембраны позволяет предположить, что этот белок является мембранным трансформером, так как он вызывает изменение проводимости бислоиных липидных мембран. Суммируя полученные результаты, мы приходим к выводу, что хеликаза SsoHel308 способна образовывать поры в искусственных бислоиных мембранах, и в некоторых случаях ток, протекающий через мембраны, имеет особенности, характерные для работы ионных каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было сделано предположение, что при встраивании преобразованных гексамерных форм хеликазы SsoHel308 в мембраны возможно создание пор, которые будут способны транлоцировать ДНК через естественные или искусственные мембраны, так как модификации ДНК проходят на бактериальных мембранах. В данной работе продемонстрирована принципиальная возможность формирования поры хеликазой SsoHel308 в бислоиных и природных мембранах. Ранее авторы работы [7] показали возможность порообразования в бислоиных мембранах шести-

мерной хеликазой E1 вируса папилломы крупного рогатого скота. E1-хеликаза относится к третьему суперсемейству хеликаз (SF3), функционирует на ранних стадиях рекомбинации после остановки репликационной вилки и обладает специфичностью для удаления отстающей нити в вилках репликации модели. Авторы использовали делеционный вариант хеликазы, лишенный активности связывающей ДНК. По сравнению с другими нативными мембранными каналами нанопора хеликазы E1 показала относительно низкую эффективность направленного переноса одноцепочечной ДНК и относительно короткое время пребывания в составе бислойной мембраны.

Мы исследовали хеликазу экстремально термофильной археи *Saccharolobus solfataricus* SsoHel308, входящую во второе суперсемейство хеликаз (SF2). Описанная ранее кристаллическая структура этой хеликазы обнаруживает пятидоменную структуру с центральной порой размером 1.3 нм, выстланной необходимыми аминокислотными остатками для связывания с ДНК [8]. Анализ пор, образуемых хеликазой SsoHel308 в искусственных бислойных мембранах, с учетом ранее опубликованных данных указывает на принципиальную возможность использования этих пор в нанопоровой технологии определения нуклеотидных последовательностей, хотя на этом этапе существуют определенные ограничения из-за короткого времени существования сформированных в мембранах пор и, следовательно, уменьшения времени прохождения полинуклеотидных цепей через пору. Хеликаза вируса папилломы крупного рогатого скота E1 (суперсемейство SF3) при встраивании в искусственные бислойные мембраны сохраняет основные активности, включая способность к транслокации ДНК в присутствии АТФ. Несмотря на то что гексамерная хеликаза SsoHel308 входит в другое суперсемейство (SF2), по-видимому, при встраивании ее основные активности также должны сохраняться.

Короткое время существования пор на мембране значительно снижает токсичность хеликазы для клетки, а возможность направленной транслокации однонитевой ДНК в присутствии АТФ позволит в будущем использовать этот фермент в качестве молекулярного шприца для инъекций однонитевых ДНК в живые клетки. В зависимости от конкретной цели применения хеликазы (например, доставка лекарственных препаратов, анализ отдельных клеток, таргетная терапия опухолевых клеток и редактирование геномов на основе CRISPR Cas системы) должна быть разработана соответствующая адресная технология.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны С.В. Тищенко за предоставление геномной ДНК *Saccharolobus solfataricus*. Масс-спектрометрический анализ был проведен на базе ЦКП «Структурно-функциональные исследования белков и РНК» (ИБ РАН, Пущино Московской области).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № RFMEFI60419X0218).

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. J. Kasianowicz, A. K. Balijepalli, J. Etedgui, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1858** (3), 593 (2016). DOI:10.1016/j.bbamem.2015.09.023
2. H. Gamaarachchi, C. W. Lam, G. Jayatilaka, et al., *BMC Bioinformatics* **21** (1), 343 (2020). DOI: 10.1186/s12859-020-03697-x
3. J. M. Craig, A. H. Laszlo, I. M. Derrington, et al., *PLoS One* **10** (11), e0143253 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0143253
4. S. Castella, G. Bingham, and C. M. Sanders, *Nucl. Acids Res.* **34**, 3008 (2006).
5. C. M. Sanders, O. V. Kovalevskiy, D. Sizov, et al., *Nucl. Acids Res.* **35**(19), 6451 (2007). DOI: 10.1093/nar/gkm705
6. S. S. Patel and K. M. Picha, *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 651 (2000).
7. K. Sun, C. Zhao, X. Zeng, et al., *Nat. Commun.* **10** (1), 5083 (2019). DOI: 10.1038/s41467-019-13047-y
8. J. D. Richards, K. A. Johnson, H. Liu, et al., *J. Biol. Chem.* **283** (8), 5118 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M707548200
9. K. Alexandrov, I. Simon, V. Yurchenko, et al., *Eur. J. Biochem.* **265** (1), 160 (1999). DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00699.x
10. A. S. Syutkin, M. van Wolferen, A. K. Surin, et al., *MicrobiologyOpen* **8** (5), e00718 (2019).
11. Zh. I. Andreeva, V. F. Nesterenko, M. G. Fomkina, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1768** (2), 253 (2007). DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.11.004
12. P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. C. Westcott, *Nature* **194**, 979 (1962).

Pore-Forming Properties of SsoHel308 Helicase from *Saccharolobus solfataricus***A. V. Siunov*, M. P. Borisova**, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya*, A. S. Nagel*, A.S. Kolesnikov*, A.K. Surin***, ****, and A.S. Solonin***

*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prospekt Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

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

***Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

****Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The pore-forming activity of SsoHel308 helicase from extreme thermophilic archaea *Saccharolobus solfataricus* has been demonstrated for the first time. This protein, embedded into rabbit erythrocyte membranes, may cause erythrocyte hemolysis. It has been shown that this enzyme forms pores in a flat artificial bilayer membrane and acts as the transformer. After embedding this enzyme into bilayer lipid membranes, the membrane conductivity alters. Taken together, our results show that SsoHel308 helicase is able to form pores in artificial bilayer membranes and, in some cases, the current that flows across the membranes shares features typical of ion channels. The short lifetime of the pores in the membrane significantly reduces the toxicity of helicase for a living cell, and the possibility of directed translocation of single-stranded DNA in the presence of ATP will enable the use of this enzyme as a molecular syringe for injecting single-stranded DNA into living cells.

Keywords: helicase, extra thermophilic archaea, hemolysis, artificial bilayer membranes, pore formation

УДК 577.323

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДНК В ПЛЕНКАХ МЕТОДОМ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2020 г. С.В. Пастон*, А.М. Поляничко*, О.В. Шуленина**, Д.Н. Осинникова*

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

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

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

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

Водная среда и ионное окружение являются важнейшими факторами, определяющими конформацию ДНК и ее функционирование в клетке. Специфичность взаимодействия ДНК с катионами особенно ярко проявляется при снижении активности воды. В данной работе с помощью ИК-Фурье-спектроскопии (метод нарушенного полного внутреннего отражения) исследован В-А-переход в высокомолекулярной ДНК при уменьшении влажности в пленке с различным содержанием ионов Na^+ . ИК-спектр ДНК не только весьма чувствителен к состоянию ее вторичной структуры, но также позволяет оценить количество связанной с ДНК воды. При дегидратации пленки ДНК в спектре ИК-поглощения наблюдали изменения, характерные для В-А-перехода. С помощью термогравиметрического анализа показано, что степень гидратации ДНК достигает насыщения при относительной влажности 60% и при дальнейшем высушивании снижается незначительно. Установлено, что с ростом концентрации Na^+ снижается количество сильно связанной с ДНК воды. При этом ионы натрия разрушают гидратную оболочку ДНК и способны взаимодействовать непосредственно с фосфатными группами.

Ключевые слова: ДНК, гидратация, вторичная структура, В-А переход, ИК-Фурье-спектроскопия, термогравиметрический анализ.

DOI: 10.31857/S0006302920060034

Взаимодействие с водным окружением играет ключевую роль в структуре и функционировании нуклеиновых кислот. Гидрофобные и гидрофильные взаимодействия стабилизируют двуспиральную вторичную структуру ДНК [1]. В водной среде ДНК сильно и неравномерно гидратирована, что приводит к упорядоченному расположению молекул воды в непосредственной близости от ДНК, формируя так называемые первичную и вторичную гидратные оболочки. Первичная гидратная оболочка заполняется при относительной влажности около 80% и составляет 20 молекул воды на нуклеотид [1, 2]. В порядке уменьшения гидрофильности группы ДНК располагаются следующим образом: 1) отрицательно заряженные фосфатные группы; 2) фосфодиэфирные связи и остатки сахаров; 3) основания. Внутренний слой первичной гидратной оболочки состоит из одиннадцати-двенадцати молекул воды на

нуклеотид, которые связаны непосредственно с группами ДНК [1–3]. Этот внутренний слой сильно отличается по структуре и свойствам от обычной воды, в частности, он не замерзает при температурах значительно ниже 0°C [4, 5]. Остальные восемь-девять молекул воды первичной гидратной оболочки связаны с внутренним слоем. Вторичная гидратная оболочка связана с первичной и существенно менее структурирована [1].

Структура гидратных оболочек ДНК зависит от нуклеотидной последовательности. Методами рентгеновской кристаллографии и ЯМР было показано, что в малой бороздке В-ДНК существует так называемый «водный хребет» (spine of hydration), молекулы воды в котором менее подвижны, чем те, которые расположены в большой бороздке [6–9]. Наиболее сильно связанной оказывается вода в малой бороздке А–Т-последовательностей [9].

Изменение степени гидратации ДНК влечет за собой перестройки вторичной структуры макро-

Сокращение: НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение.

молекулы. Понижение активности воды в растворе ДНК случайной нуклеотидной последовательности при количестве молекул воды на один нуклеотид менее двадцати приводит, в зависимости от природы противоиона, к переходу В→А (между разными семействами двойных спиралей, отличающихся конформацией сахара) или внутри-семейственному переходу В→С [1, 3]. Гидратация А-формы двойной спирали более экономична, чем для В-формы, из-за сближения соседних фосфатных групп [10–12]. Сахара и основания при этом не гидратированы. В одной макромолекуле могут соседствовать участки, имеющие разные формы вторичной структуры [13]. Минимальная степень гидратации ДНК оценивается, по разным данным, от трех-шести [1] до пяти-шести [5] молекул воды на нуклеотид, при этом вся ДНК находится в А-форме.

Вторичная структура ДНК является важнейшим фактором ее функционирования. Переход В→А сопутствует многим внутриклеточным процессам, в частности, процессам репликации и транскрипции [14]. Изучать конформационные переходы в ДНК *in vitro* можно путем варьирования активности воды в образце, например, изменяя концентрации противоионов, добавляя спирты или изменяя влажность [1, 5, 13]. Катионы щелочных, щелочноземельных и переходных металлов взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, а также с кетогруппами и эндоциклическими атомами азота оснований [1]. С ростом концентрации противоионов увеличивается степень экранировки заряда ДНК, что приводит к снижению объема макромолекулярного клубка в растворе [15–17]. В разбавленном растворе контакты между одновалентными катионами и электроотрицательными группами ДНК опосредованы водой; проникновение катионов в бороздки двойной спирали определяется соответствием между размерами катиона и бороздки (причем размер последней может «подстроиться» под размер катиона) и, соответственно, зависит от нуклеотидной последовательности [18–20]. Специфичность взаимодействия ДНК с одновалентными катионами обостряется при понижении активности воды: уменьшение влажности в присутствии Na^+ индуцирует переход В→А, а в присутствии Li^+ – переход В→С во вторичной структуре ДНК [1, 13]. Двухвалентные катионы проявляют более ярко выраженную специфичность при взаимодействии с ДНК и могут образовывать даже в разбавленном растворе комплексы не только в форме гидратов, но и непосредственно с электроотрицательными группами ДНК [1, 16, 17, 21, 22]. Ионное окружение ДНК в растворе обуславливает вариации в архитектуре гидратных оболочек макромолекулы и в геометрии двойной спирали в

пределах В-семейства [18, 23–25], определяет стабильность вторичной структуры и радиочувствительность ДНК [26–29]. Взаимодействие с катионами металлов играет ключевую роль в функционировании нуклеиновых кислот, в частности, в разнообразных взаимодействиях «нуклеиновая кислота–белок» [1, 30–35].

В данной работе проводится исследование вторичной структуры высокомолекулярной ДНК со случайной нуклеотидной последовательностью в пленках с различным содержанием NaCl при снижении влажности. Для наблюдения за конформацией ДНК использован метод ИК-Фурье-спектроскопии, весьма чувствительный к форме двойной спирали. Кроме того, ИК-спектр позволяет оценить количество воды в образце. В настоящее время ИК-спектроскопия широко применяется для исследования структуры биологических макромолекул [36–38], в частности, этот метод позволяет анализировать сложные многокомпонентные системы – биологические среды [39–43], клетки и ткани [44, 45], что открывает широкие возможности для его использования не только в фундаментальных исследованиях, но и в диагностике заболеваний [39–41, 43–45]. С помощью ИК-Фурье-спектроскопии удавалось наблюдать переход В→А не только для растворов ДНК, но и для клеточных ядер, а также целых клеток [46], причем во всех этих случаях переход В→А оказывался обратимым.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали натриевую соль ДНК из эритроцитов цыплят производства фирмы Reanal (Болгария) с $M = 1.4 \pm 0.2$ МДа, химически чистый NaCl, деионизованную воду. Растворы NaCl необходимой концентрации готовили из насыщенного раствора. Разбавленные водные растворы ДНК перед измерением ИК-спектров концентрировали на концентраторе биомолекул Concentrator-plus фирмы Eppendorf (Германия), на 1100 об/мин не более 30 мин за один сеанс при комнатной температуре, до достижения концентрации ДНК в растворе 2 мМ в пересчете на нуклеотиды.

ИК-спектры. Одним из главных маркеров А- и В-формы является полоса, соответствующая асимметричным колебаниям фосфатной группы [47].

Измерения проводили на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 8700 (Thermo Scientific, США), оснащенный приставкой однократного нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на основе кристалла алмаза, а также низкошумящим детектором МСТ (HgCdTe). Оптические пути продували сухим воздухом. Регистрацию ИК-спектров исследуемых образцов осуществляли с

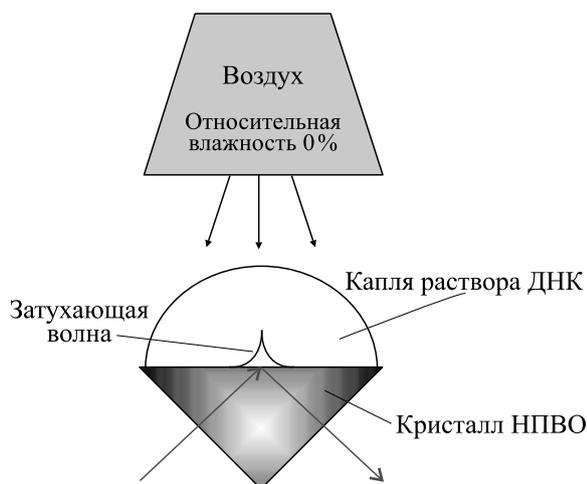


Рис. 1. Схема эксперимента.

помощью модифицированной установки (рис. 1). Над ячейкой НПВО была установлена система подачи чистого сухого воздуха (точка росы не выше -50°C). Спектры регистрировали в диапазоне $3500\text{--}600\text{ см}^{-1}$ с разрешением 2 см^{-1} . Каждый спектр усредняли по десяти накоплениям в течение 13 с. Регистрацию спектров осуществляли в непрерывном режиме в течение всего времени высушивания образца, которое в среднем составляло 10 мин. Начальный объем образца, помещаемого на кристалл, составлял 10 мкл, в концентрации $[\text{P}] = 2\text{ мМ}$ (в пересчете на фосфаты).

После высушивания образца на кристалле НПВО получали тонкую пленку. Спектр пленки регистрировали отдельно с усреднением по 100 накоплениям.

Коррекцию базовой линии спектров и обработку проводили по описанной ранее методике [48]. Каждый спектр нормировали на интенсивность полосы $963 \pm 2\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания связей С–С сахаро-фосфатного остова). Группа С–С не взаимодействует с ионами Na^+ , поэтому спектральные изменения полосы $963 \pm 2\text{ см}^{-1}$ незначительны [49]. Процедура нормировки позволила устранить влияние концентрации ДНК (которая варьируется при высушивании образцов) на интенсивность спектра.

Термогравиметрический анализ лиофилизованной ДНК проводили на сорбционном гравиметрическом анализаторе TGA Q5000SA TA Instruments (США) с высокостабильными термостатированными весами (чувствительность 0.1 мкг), в изотермическом режиме при температуре $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, точность установки относительной влажности (rh) составляла $\pm 1\%$, шаг по rh — 5% , в атмосфере азота. Содержание натрия в образце $[\text{Na}]/[\text{P}] = 1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика изменения ИК-спектров в процессе дегидратации образца, помещенного на кристалл НПВО, представлена на рис. 2. На начальном этапе дегидратации в спектрах доминируют полосы поглощения воды, соответствующие колебаниям

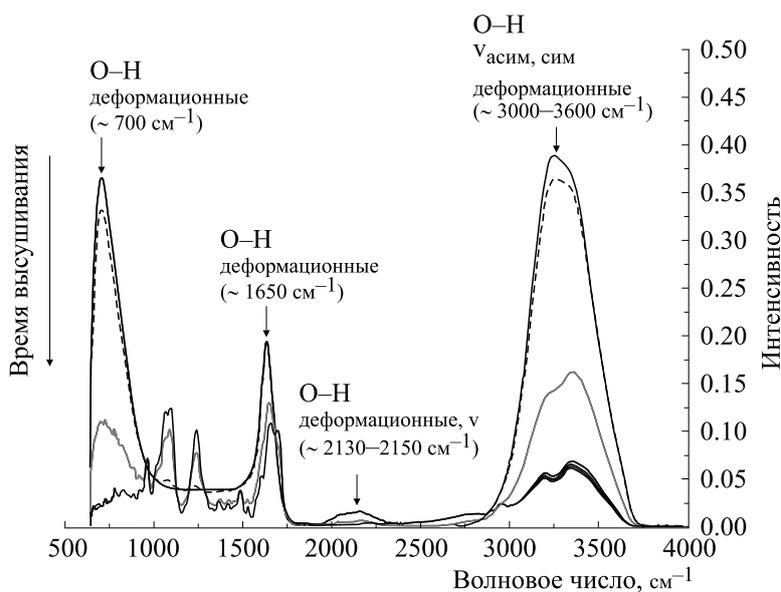


Рис. 2. Серия ИК-спектров (ненормированных) раствора ДНК, измеренных в процессе его высушивания на кристалле НПВО. Стрелками показаны области колебаний О–Н-групп во влажных образцах, которые возникают в основном за счет колебаний молекул воды; ν — валентные колебания.

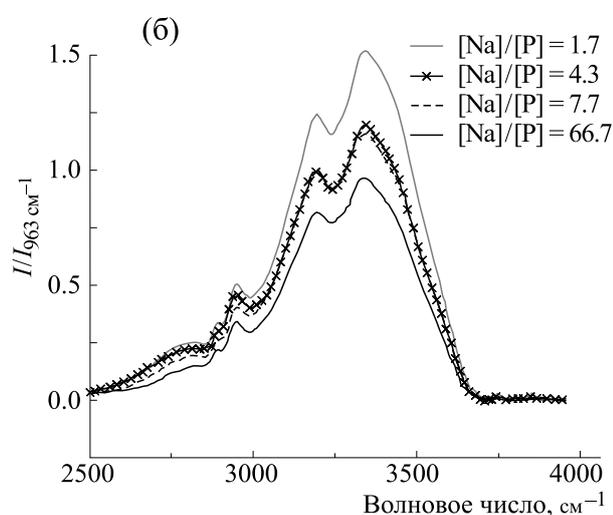
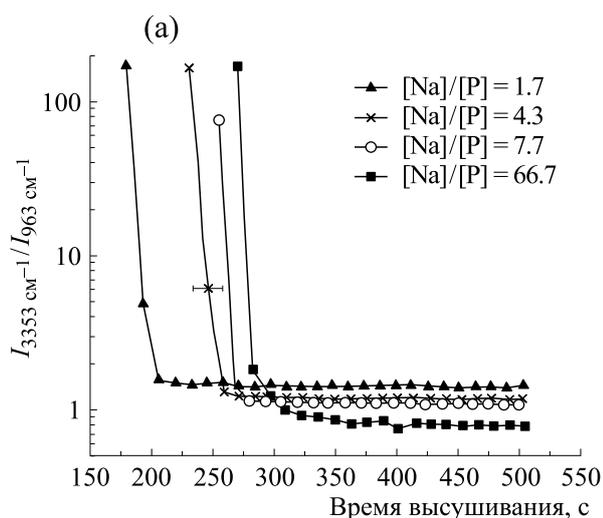


Рис. 3. (а) — Интенсивность полосы 3353 см^{-1} в зависимости от времени высушивания образца; (б) — полоса 3353 см^{-1} в полностью высушенных пленках (после насыщения).

ОН-групп. В процессе высушивания интенсивность полос, соответствующих деформационным колебаниям в молекуле воды, постепенно падает, и начинают проявляться полосы, характерные для колебаний групп в составе ДНК. Широкая полоса в области $3000\text{--}3600 \text{ см}^{-1}$ отвечает комбинации симметричных и антисимметричных валентных, а также обертона деформационных колебаний молекулы воды [50]. По интенсивности именно этой полосы можно судить о количестве воды, оставшейся в пленке. На рис. 3а представлены зависимости I_{3353}/I_{963} величины поглощения в максимуме этой полосы 3353 см^{-1} , отнесенной к величине поглощения при 963 см^{-1} , от времени высушивания образца для растворов с разным содержанием NaCl. Интенсивность по-

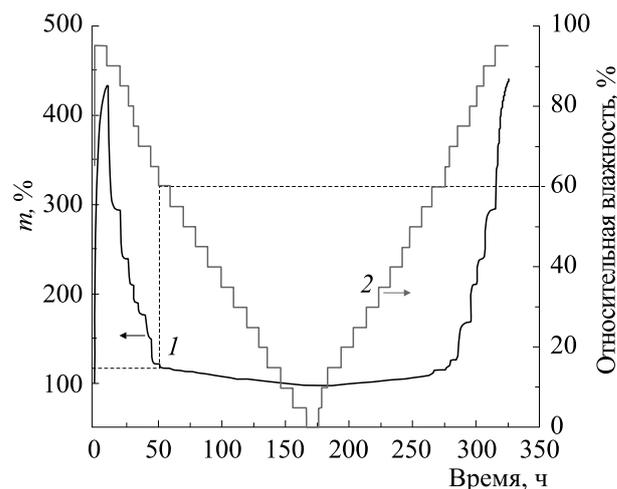


Рис. 4. Термогравиметрический анализ образца ДНК. Зависимости от времени: 1 — массы ДНК, 2 — относительной влажности в измерительной камере. Пунктиром показаны условия стабилизации массы ДНК.

лосы, соответствующей валентным колебаниям О—Н, довольно быстро снижается и выходит на плато через $200\text{--}300 \text{ с}$ после начала высушивания; дальнейшее обдувание пленки сухим воздухом не приводит к заметным изменениям интенсивности, что соответствует минимально достижимому в условиях эксперимента количеству воды в пленке. На рис. 3б представлен спектр ИК-поглощения полностью высушенных пленок в области $3000\text{--}3600 \text{ см}^{-1}$.

Для установления степени дегидратации образца обратимся к данным термогравиметрического анализа (рис. 4). На графике приведены зависимости массы образца ДНК и относительной влажности (rh) в измерительной камере от времени. При $rh = 95\%$ ДНК стремительно набухает — масса образца резко увеличивается. Затем постепенное уменьшение влажности приводит к потере массы образца — ДНК теряет воду. Это продолжается до $rh = 60\%$, когда масса ДНК достигает насыщения. Дальнейшее снижение влажности (в течение более чем 100 часов) весьма слабо влияет на массу образца. Можно считать, что это состояние соответствует минимальной степени гидратации ДНК — около шести молекул воды на нуклеотид [5]. Таким образом, можно заключить, что дальнейшее выдерживание пленки ДНК на кристалле НПВО в потоке воздуха с rh , близкой к 0% , также не приведет к заметному снижению количества воды в образце, и наблюдаемое на рис. 3а плато действительно соответствует минимально возможному количеству молекул воды в первичной (и единственной в данном случае) гидратной оболочке ДНК.

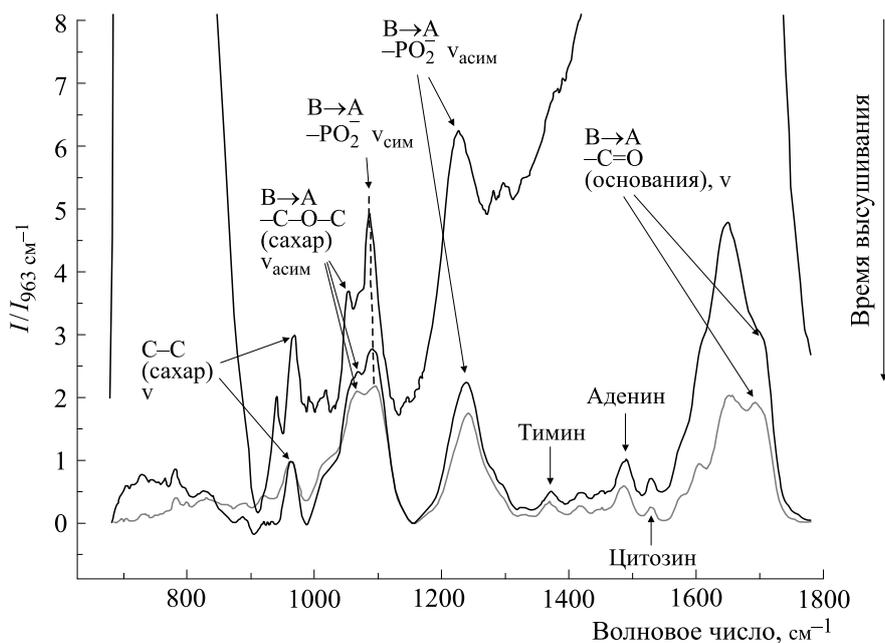


Рис. 5. ИК-спектры (нормированные) раствора ДНК, измеренные в процессе его высушивания на кристалле НПВО. Стрелками показаны полосы колебаний групп ДНК.

Рассмотрим спектральный интервал 900–1800 см^{-1} , в котором можно наблюдать полосы колебаний различных групп ДНК в процессе дегидратации пленок (рис. 5) (подробное отнесение полос в этой области спектра можно найти в работах [47, 50]). Положение и форма этих полос изменяются с уменьшением влажности пленки, что отражает изменение конформации ДНК. Наибольший интерес представляет полоса антисимметричных колебаний фосфатной группы, кото-

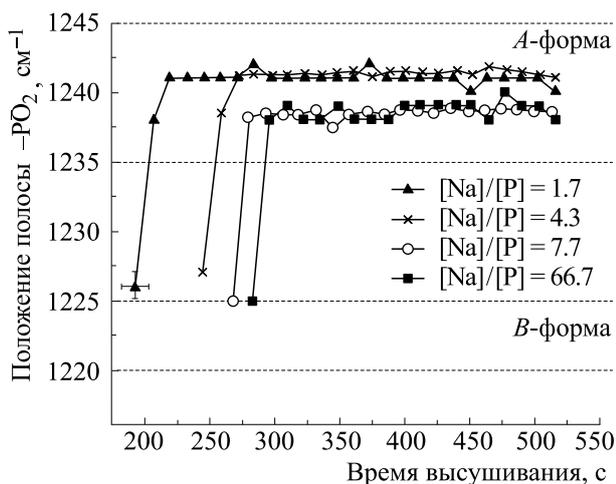


Рис. 6. ИК-спектры (нормированные) раствора ДНК, измеренные в процессе его высушивания на кристалле НПВО. Стрелками показаны полосы колебаний групп ДНК.

рая считается одним из главных маркеров перехода В→А во вторичной структуре ДНК: положение 1225–1220 см^{-1} отвечает В-форме, а 1245–1235 см^{-1} – А-форме [47]. На рис. 6 показаны зависимости положения этой полосы от времени высушивания образцов с разным содержанием NaCl. Области значений волновых чисел для данной полосы, отвечающие В- и А-формам ДНК, отмечены на рисунке. Видно, что резкое падение интенсивности полосы 3353 см^{-1} (см. рис. 3а), соответствующее быстрому снижению содержания воды в пленке, сопровождается изменением положения полосы антисимметричных колебаний PO_2^- . Выход на плато интенсивности полосы валентных колебаний О–Н (рис. 3а), отражающее полную дегидратацию пленки, соответствует окончанию смещения полосы колебаний фосфатных групп (рис. 6), которое к этому моменту прочно устанавливается в области, отвечающей А-форме ДНК. Таким образом, можно сделать вывод о том, что плато на рис. 3а, действительно, соответствует ситуации, когда в образце осталась только сильно связанная вода в первичной гидратной оболочке А-ДНК, в количестве около 6 молекул воды на нуклеотид.

Обратим внимание, что в ИК-спектрах высушенных пленок ДНК с разным содержанием NaCl увеличение концентрации соли приводит к снижению интенсивности полосы колебаний О–Н (3000–3600 см^{-1}) (рис. 3б). Иными словами, присутствие соли приводит к уменьшению количества молекул воды в первичной гидратной обо-

лочке ДНК. В литературе есть сведения о том, что одновалентные катионы могут встраиваться в гидратную оболочку ДНК, особенно в условиях низкой активности воды [15, 17, 18, 23]. Таким образом, уменьшение количества связанной воды в высушенных пленках с ростом концентрации NaCl можно объяснить нарушением первичной гидратной оболочки молекулы ДНК ионами натрия в условиях пониженной влажности. Кроме того, из графиков на рис. 6 видно влияние ионов натрия на положение полосы колебаний фосфатных групп в области, отвечающей А-форме ДНК; оно немонотонно по соотношению $[Na]/[P]$. Можно заключить, что вторичная структура, которую принимает ДНК в высушенной пленке, относится к семейству А-форм и зависит от содержания ионов Na^+ , которые, вытесняя молекулы воды из первичной гидратной оболочки, образуют непосредственные контакты с фосфатными группами ДНК.

ВЫВОДЫ

Наблюдали переход В→А во вторичной структуре высокомолекулярной ДНК со случайной нуклеотидной последовательностью в пленках с различным содержанием NaCl при уменьшении влажности. Установлено, что степень гидратации ДНК достигает постоянного значения при относительной влажности 60% и при дальнейшем просушивании снижается незначительно. Достигнутая в исследуемых образцах степень гидратации ДНК соответствует примерно 6 молекулам воды на нуклеотид. Вторичная структура ДНК при этом относится к А-семейству, но варьирует в зависимости от содержания Na^+ в пленке. С ростом концентрации NaCl в образце количество воды в нем, соответствующее предельной дегидратации, снижается. В условиях низкой влажности ионы натрия разрушают гидратную оболочку ДНК и взаимодействуют непосредственно с фосфатными группами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Зенгер, *Принципы структурной организации нуклеиновых кислот* (Мир, М., 1987).
2. J. Texter, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **33**, 83 (1979).
3. *Water and Biological Macromolecules. Topics in Molecular and Structural Biology*, Ed. by E. Westhof (Palgrave, London, 1993).
4. M. Falk, A. G. Poole, and C. G. Goymour, *Can. J. Chem.* **48**, 1536 (1970).
5. N. J. Tao, S. M. Lindsay, and A. Rupprecht, *Biopolymers* **28**, 1019 (1989).
6. H. R. Drew and R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **151**, 535 (1981).
7. M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew, and R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **163**, 129 (1983).
8. M. G. Kubinec and D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (22), 8739 (1992).
9. E. Liepinsh, G. Otting, and K. Wüthrich, *Nucl. Acids Res.* **20** (24), 6549 (1992).
10. B. Schneider, K. Patel, and H. M. Berman, *Biophys. J.* **75**, 2422 (1998).
11. M. Harmouchi, G. Albiser, and S. Premilat, *Eur. Biophys. J.* **19**, 87 (1990).
12. M. Egli, V. Tereshko, M. Teplova, et al., *Biopolymers (Nucl. Acid Sci.)* **48**, 234 (1998).
13. V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Minyat, et al., *J. Mol. Biol.* **87** (4), 817 (1974).
14. В. И. Иванов, *Биополимеры и клетка* **1** (1), 5 (1985).
15. Э. В. Фрисман и Н. А. Касьяненко, *Молекуляр. биология* **24**, 301 (1990).
16. Н. А. Касьяненко, Н. Е. Дьяконова, Э. В. Фрисман, *Молекуляр. биология* **23**, 975 (1989).
17. Н. А. Касьяненко, *Журн. структур. химии* **47** (1), 163 (2006).
18. N. V. Hud and M. Polak, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 293 (2001).
19. M. Egli, *Chemistry & Biology* **9**, 277 (2002).
20. Y. Lu and N. C. Stellwagen, *Biophys. J.* **94**, 1719 (2008).
21. A. M. Polyanichko, V. V. Andrushchenko, E. V. Chikhirzhina, et al., *Nucl. Acids Res.* **32** (3), 989 (2004).
22. A. M. Polyanichko, E. V. Chikhirzhina, V. V. Andrushchenko, et al., *Biophysics* **50** (5), 710 (2005).
23. B. Heddi, N. Foloppe, E. Hantz, and B. Hartmann, *J. Mol. Biol.* **368**, 1403 (2007).
24. M. L. Sushko, D. G. Thomas, S. A. Pabit, et al., *Biophys. J.* **110**, 315 (2016).
25. M. A. Young, B. Jayaram, and D. L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 59 (1997).

26. Z.-J. Tan and S.-J. Chen, *Biophys. J.* **90**, 1175 (2006).
27. G. L. Eichhorn and Y. A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7323 (1968).
28. S. A. Tankovskaia, O. M. Kotb, O. A. Dommes, and S. V. Paston, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy* **200**, 85 (2018).
29. S. V. Paston, I. M. Zyryanova, Yu. V. Zaichikova, and V. V. Zamotin, *J. Struct. Chem.* **48** (4) 734 (2007).
30. S. A. Mauro and G. B. Koudelka, *J. Mol. Biol.* **340**, 445 (2004).
31. A. M. Polyanichko, E. V. Chikhirzhina, V. V. Andrushchenko, et al., *Mol. Biol.* **38** (4), 590 (2004)
32. A. M. Polyanichko, E. V. Chikhirzhina, E. I. Kostyleva, and V. I. Vorob'ev, *Mol. Biol.* **38** (6) 891 (2004).
33. A. M. Polyanichko, E. U. Chikhirzhina, V. V. Andrushchenko, et al., *Biopolymers* **83** (2), 182 (2006).
34. E. V. Chikhirzhina, A. M. Polyanichko, E. I. Kostyleva, and V. I. Vorobyev, *Mol. Biol.* **45** (2), 318 (2011).
35. A. M. Polyanichko, V. I. Vorob'ev, and E. V. Chikhirzhina, *Mol. Biol.* **47** (2), 299 (2013).
36. A. Polyanichko and H. Wieser, *Biopolymers* **78** (6), 329 (2005).
37. A. M. Polyanichko and H. Wieser, in *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Vibrational Spectroscopy*, Ed. by E. Permyakov and V. Uversky (Nova Science Publishers Inc., N.-Y., 2007), pp. 267–302.
38. A. Polyanichko, V. Andrushchenko, P. Bouř, and H. Wieser, in: *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy*, Ed. by D. S. Rodgers (Nova Science Publishers Inc., N.-Y., 2012), pp. 67–126.
39. L. V. Plotnikova, M. O. Kobeleva, E. V. Borisov, et al., *Cell Tissue Biol.* **13** (2), 130 (2019).
40. L. Plotnikova, A. Polyanichko, M. Kobeleva, et al., *J. Physics: Conf. Ser.* **784** (1), 012047 (2017).
41. L. Plotnikova, A. Polyanichko, T. Nosenko, et al., *AIP Conf. Proc.* **1760**, 020052 (2016)
42. K. V. Abrosimova, O. V. Shulenina, and S. V. Paston, *J. Physics: Conf. Ser.* **769**, 012016 (2016).
43. M. Gniadecka, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, and H. C. Wulf, *J. Invest. Dermatol.* **110**, 393 (1998).
44. Z. Movasaghi, Sh. Rehman, and I. ur Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.* **43**, 134 (2008).
45. L. B. Mostaco-Guidolin and L. Bachmann, *Appl. Spectrosc. Rev.* **46**, 388 (2011).
46. D. R. Whelan, K. R. Bambery, P. Heraud, et al., *Nucl. Acids Res.* **39** (13) 5439 (2011).
47. M. Banyay, M. Sarkar, and A. Graslund, *Biophys. Chem.* **104**, 477 (2003).
48. A. M. Polyanichko, N. M. Romanov, T. Y. Starkova, et al., *Cell Tissue Biol.* **8** (4), 352 (2014).
49. J. F. Neault and H. A. Tajmir-Riahi, *Biophys. J.* **76**, 2177 (1999).
50. J. Chalmers and P. Griffiths, *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (Wiley, Chichester, 2002).

Study of DNA Structure in Films by Means of FTIR Spectroscopy

S.V. Paston*, A.M. Polyanichko*, O.V. Shulenina**, and D.N. Osinnikova*

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

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

The aqueous environment and ionic surrounding are the most important factors determining the conformation of DNA and its functioning in the cell. The specificity of the interaction between DNA and cations is especially pronounced with a decrease in water activity. In this work, we studied the B-A transition in high molecular weight DNA with a decrease of humidity in the film with different contents of Na⁺ ions using FTIR spectroscopy. The IR spectrum of DNA is not only very sensitive to the state of its secondary structure, but also allows us to estimate the amount of water bound to DNA. Upon dehydration of the DNA film, changes characteristic of the B-A transition were observed in the IR absorption spectrum. Using thermogravimetric analysis, it was shown that the degree of DNA hydration reaches the saturation level at a relative humidity of 60% and decreases slightly upon further drying. It has been established that with increasing Na⁺ concentration, the amount of water strongly bound to DNA decreases. Along with it, sodium ions destroy the hydration shell of DNA and are able to interact directly with phosphate groups.

Keywords: DNA, hydration, secondary structure, B-A transition, FTIR spectroscopy, thermogravimetric analysis

УДК 577.3

УРОВНИ ИЕРАРХИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ. АНАЛИЗ ЭНТРОПИЙНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

© 2020 г. А.Н. Некрасов*, Ю.П. Козмин*, С.В. Козырев**, Н.Г. Есипова***, Р.Х. Зиганшин*, А.А. Анашкина***

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
E-mail: alexei_nekrasov@mail.ru

**Математический институт им. В.А. Стеклова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 8

***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
E-mail: anastasya.anashkina@gmail.com

Поступила в редакцию 18.03.2020 г.

После доработки 18.03.2020 г.

Принята к публикации 15.09.2020 г.

Исследованы 24647 негомологичных белковых последовательностей. Для каждой из последовательностей построен профиль встречаемости пептапептидов и в каждом из этих профилей специальным математическим методом выявлены иерархически организованные элементы различных размеров. Исследованы корреляции между этими иерархическими элементами и показано, что в исследованном наборе белковых последовательностей существуют 11 уровней организации белков с элементами размером от 7 до 56 аминокислотных остатков. Высказано предположение, что выявленные уровни организации соответствуют различным по топологии элементам супер-вторичной структуры.

Ключевые слова: белковые последовательности, иерархическая организация, энтропия.

DOI: 10.31857/S0006302920060046

Наблюдаемое многообразие свойств белков и их функциональные характеристики обеспечиваются пространственным расположением составляющих эти белки аминокислотных остатков. Обладая различными физико-химическими свойствами, аминокислотные остатки обеспечивают существование ряда уникальных свойств белков. Одним из этих свойств является способность к самоорганизации – фолдингу. При этом для нативного фолдинга большинству белков достаточно «правильного расположения» аминокислотных остатков в первичной структуре белка, т.е. пространственная структура таких белков полностью определяется последовательностью аминокислотных остатков.

Наличие иерархической организации в пространственной структуре белков было выявлено разными авторами с привлечением различных подходов, таких как расчет локальной плотности упаковки атомов в структуре [1–3] и энергии взаимодействия внутри белковой глобулы [4]. Выявляемые иерархические элементы белков рассмат-

ривались как элементы фолдинга белков на разных стадиях [5–7]. В процессе анализа баз данных последовательностей белков был найден ряд повторяющихся элементов (паттернов) [8–10]. Такие паттерны использовались для предсказания пространственной организации и функции белков [11–13]. Однако в отличие от структурных элементов, полученных при анализе пространственных структур, паттерны, выявляемые в первичных структурах белков, не имеют установленной иерархической организации.

Ранее в работе [14] мы показали, что в белковых последовательностях наиболее низкий уровень энтропии Шеннона [15] наблюдается внутри блоков из пяти аминокислотных остатков. Подход, при котором первичная структура белков рассматривается как система из перекрывающихся или последовательно расположенных блоков из пяти аминокислотных остатков, был ранее использован для создания структурного алфавита белков [16], исследования топологически устойчивых элементов низшего уровня организации пространственной структуры белков [17], описания фолдинга белковых молекул [18, 19]. Взяв за единицу последовательности белка фрагмент из

Сокращение: ЭЛИС – элементы информационной структуры.

пяти аминокислотных остатков, мы предложили метод выявления иерархически организованных структур в белковых последовательностях (метод АНИС) [20, 21]. Этот метод выделяет в последовательности белков древовидные иерархические структуры (графы). На ряде примеров было показано, что отдельно стоящие графы соответствуют структурным доменам [22]. Впоследствии выявляемые иерархические элементы были использованы нами для дизайна белковых молекул [23–26] и для исследования механизмов функционирования белков [22, 27, 28]. В работах [23–26] экспериментально было показано, что удаление отдельно стоящих графов из нативной последовательности белка приводит к минимальным нарушениям фолдинга рекомбинантного белка, а в работах [22, 27, 28] с помощью анализа таких иерархических элементов в структуре белка были предложены механистические модели функционирования белковых молекулярных машин.

Применение метода АНИС к большому числу природных белковых последовательностей привело нас к наблюдению, что существуют характерные размеры фрагментов последовательностей, при которых древовидные графы разделяются на более мелкие иерархические элементы. Такие фрагменты меньше структурных доменов, однако больше структурного алфавита, предложенного в работе [16]. Настоящая работа посвящена анализу размеров таких выявляемых иерархически организованных элементов белковой последовательности.

ФРАГМЕНТЫ И ИНФОРМАЦИОННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

Длина структурного элемента, оптимальная для описания белковых последовательностей, может быть оценена следующим образом. Пусть x и y – суть дискретные случайные величины, принимающие конечное множество значений. В рассматриваемом случае x и y – случайно выбираемые аминокислотные остатки, расположенные в белковой цепи на некотором расстоянии друг от друга. Тогда эти остатки можно охарактеризовать вероятностями $p(x)$, $p(y)$ выпадения тех или иных аминокислот, совместным распределением вероятностей $p(x, y)$ для пар аминокислот (зависящим от расстояния между x и y вдоль цепи) и взаимной информацией (тоже зависящей от расстояния между x , y):

$$I(x, y) = \sum_{x, y=1}^{20} p(x, y) \log \frac{p(x, y)}{p(x)p(y)}. \quad (1)$$

В работе [14] было показано, что взаимная информация довольно быстро уменьшается при увеличении расстояния больше пяти между аминокислотными остатками. Таким образом, рас-

смотрение фрагментов длины пять является оптимальным для учета большей части корреляций, существующих в последовательностях белков.

Рассмотрим фрагменты длиной в пять остатков (мы рассматриваем всевозможные перекрывающиеся фрагменты, т. е. соседние фрагменты пересекаются по четырем остаткам). Каждому фрагменту I , рассматриваемому как последовательность остатков длиной пять, мы сопоставим частоту $\phi(I)$ его встречаемости в базе данных негомологичных белковых последовательностей. Для получения более надежной статистики мы рассматриваем усредненную частоту

$$\Phi(I) = \sum_{J: d(I, J) \leq \delta} \phi(J), \quad (2)$$

где усреднение идет по последовательностям J , удаленным от I на расстояние не более δ . В наших работах [20, 21] было использовано расстояние δ в метрике Хамминга, равное единице, т. е. усреднение проводили по последовательностям, отличающимся от данной заменой не более одного аминокислотного остатка.

Далее последовательности белка $I = i_1 \dots i_N$ сопоставляется последовательность фрагментов I_j длиной пять, нумеруемых центральными остатками в этих фрагментах, т. е. $j = 3, \dots, N-2$. Проанализировав встречаемость пентапептидов в базе данных белковых последовательностей NRDB, получим значение встречаемости j -го пентапептида в белке I . При анализе встречаемости эквивалентными считаются пентапептиды, отличающиеся по расстоянию Хэмминга на единицу, т. е. встречаемостью пентапептида мы называем сумму встречаемости конкретного пентапептида и всех пентапептидов, отличающихся на один аминокислотный остаток. На исследуемой белковой последовательности мы строим функцию, в которой каждый аминокислотный остаток характеризуется суммой $f_I(j) = \Phi(I_j)$ встречаемостей всех пентапептидов, в которые он вошел.

Рассмотрим гауссову функцию на вещественной оси, предложенную в работах [20, 21]:

$$g(x, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (3)$$

и введем сглаженное распределение как свертку гауссовой функции с частотами встречаемости фрагментов в белке I :

$$F_I(x) = \sum_j f_I(j) g(x - j, \sigma). \quad (4)$$

Далее будем вписывать гауссовы функции с шириной $2y > 0$ и высотой h в график функции $F_I(x)$, т. е. рассмотрим функцию

$$H_I(x, y) = \max h : \min [F_I(z) - h e^{-\frac{(z-x)^2}{2y^2}}] \geq 0, \quad (5)$$

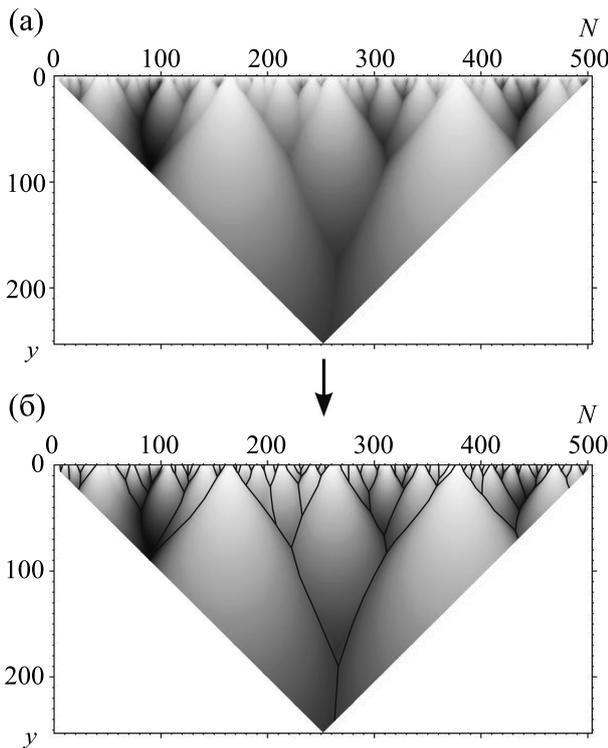


Рис. 1. (а) – Информационная структура последовательности белка 1GWE.PDB (цепь А), которая получена с помощью метода АНИС. Обозначения осей: N – номер аминокислотного остатка в первичной структуре, y – параметр из уравнения (5). (б) – Древоподобный граф, построенный по локальным максимумам функции $H_I(x, y)$, в которой выделены ЭЛИС.

измеряющую, насколько высокую гауссову функцию с центром в x и шириной $2y$ можно вписать в график функции $F_I(x)$.

Носитель такой функции будет определен на равнобедренном треугольнике на координатной плоскости (x, y) с основанием в виде отрезка $[0, N]$ на оси абсцисс и высотой $N/2$. Пример функции $H_I(x, y)$ на своем носителе показан на рис. 1а. На локальных максимумах этой функции (рис. 1б) можно построить древоподобный граф. Ветви этого графа естественно сопоставить промежуточным элементам иерархической организации белка (ЭЛИС, Элементы Информационной Структуры [20]). Полученный древоподобный граф описывает иерархическую организацию последовательности белка (рис. 1).

Любой иерархический элемент можно охарактеризовать его положением в последовательности белка и количеством слившихся ветвей, его формирующих (рангом). Рассмотрим один из иерархических элементов графика $H_I(x, y)$ с ветвлением в точке (x_0, y_0) (т.е. из этой точки вниз отходят несколько «ветвей») (рис. 2б). Точке (x_0, y_0) отвечает отрезок белка I , содержащий аминокислотные

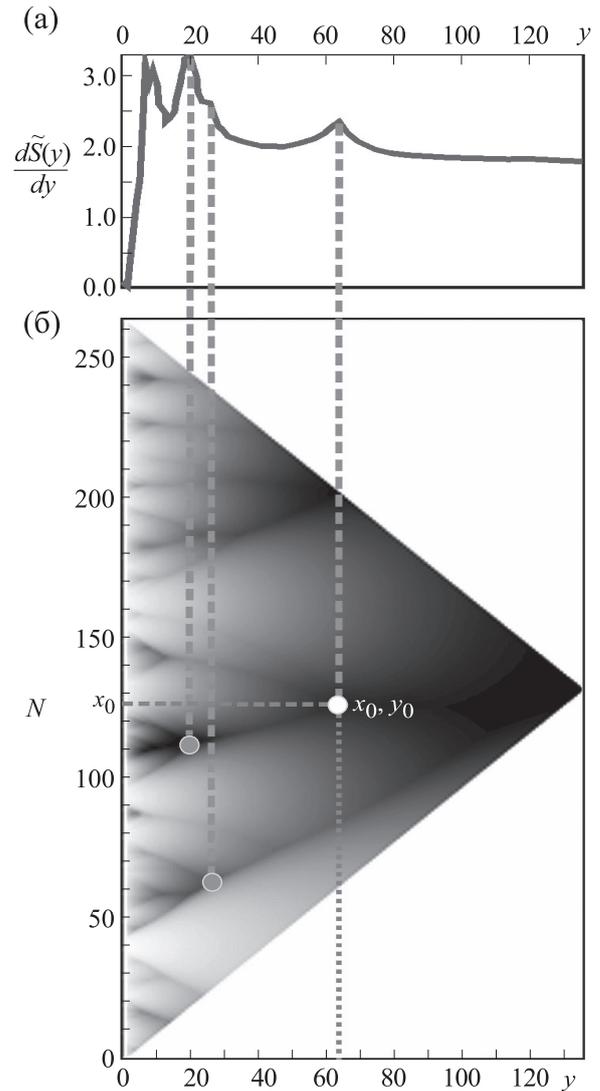


Рис. 2. Разностная производная $S'_I(y)$ по y . (а) – График первой производной от разности между реальной и модельными значениями энтропии. (б) – Иерархическая структура белка, на которой отмечены три точки слияния ветвей. Точка слияния ветвей x_0y_0 упомянута в тексте статьи и отмечена белым кружком. Две другие точки слияния ветвей отмечены серыми кружками. Пунктирными линиями показана взаимосвязь между точками слияния в иерархической структуре белка с пиками на графике первой производной.

остатки с номерами, попадающими в отрезок оси абсцисс с центром в точке x_0 и шириной $2y_0$.

ИЕРАРХИЯ СТРУКТУР В БЕЛКЕ

Рассмотрим набор из $M = 24647$ белков. Для каждого из белков из этого набора вычисляем функцию $H_I(x, y)$ (уравнение (5)). Поскольку рассматриваемые белки имеют разную длину, разме-

ры носителей таких функций для разных белков будут различаться.

Рассмотрим набор значений $y = 1, \dots, L$, используемых для построения функции $H_I(x, y)$. Величину L выбирали равной от 50 до 150.

Для белка I и фиксированного значения y рассмотрим функцию $H_I(x, y)$ как функцию распределения вероятностей, т.е. нормируем функцию так, чтобы

$$\int H_I(x, y) dx = 1. \quad (6)$$

Для такого нормированного распределения вероятностей вычислим его энтропию Шеннона:

$$S_I(y) = -\int H_I(x, y) \log H_I(x, y) dx. \quad (7)$$

Аппроксимируем равномерное распределение на отрезке $[0, 1]$ равномерным распределением на разбиении отрезка на n одинаковых частей (вероятность каждой такой части будет равняться $1/n$) и получим для энтропии следующую зависимость от разбиения:

$$-\sum_{i=1}^n \frac{1}{n} \log \frac{1}{n} = -\log \frac{1}{n} = \log n. \quad (8)$$

Вычислим регуляризованную энтропию следующим образом. Функция $H_I(x, y)$ имеет носителем отрезок длиной $N - 2y$ (где N есть длина белка I). Разделим такой отрезок на n одинаковых подотрезков, тогда энтропия Шеннона для равномерного распределения на таком разбиении будет равна $\log n$ (как показано выше). Вычислим энтропию $S_I(y)$ для нормированного распределения $H_I(x, y)$ на разбиении носителя $H_I(x, y)$ на n одинаковых подотрезков и вычтем для регуляризации энтропию для равномерного распределения:

$$\tilde{S}_I(y) = S_I(y) - \log n. \quad (9)$$

Естественно предположить, что такая функция будет испытывать скачки в точках ветвления дерева, когда происходит разделение ветвей на

ЭЛИС меньшего ранга. Вычислим для $\tilde{S}'_I(y)$ разностную производную по y , максимумы такой функции должны отвечать точкам ветвления. На рис. 2б приведен пример иерархической информационной структуры белка и рассчитанной вышеописанным способом разностной производной (рис. 2а).

Далее рассмотрим для каждого $y = 1, \dots, L$ вектор V_y , содержащий разностные производные $\tilde{S}'_I(y)$, матричные элементы вектора нумеруются белками I (в численном эксперименте мы рассматриваем, как было сказано выше, 24647 белков). Рассмотрим корреляцию таких векторов для разных y :

$$r_{yy'} = \frac{\langle V_y, V_{y'} \rangle}{\sqrt{\langle V_y, V_y \rangle \langle V_{y'}, V_{y'} \rangle}}, \quad \langle A, B \rangle = \sum_I A_I B_I. \quad (10)$$

Такая матрица корреляций ($r_{yy'}$) содержит данные о корреляциях между ЭЛИС различных размеров (y и y') в иерархической структуре белков. Эта матрица отражает совпадения размеров фрагментов белковых последовательностей, на которых метод АНИС выявил точки ветвления иерархических структур. Матрица корреляций ($r_{yy'}$) была построена для 24647 иерархических структур белковых последовательностей, размер которых лежал в интервале от 50 до 400 аминокислотных остатков из базы NRDB90 [29]. Значения элементов матрицы ($r_{yy'}$) лежат в интервале от 0.01 до 1.0. На рис. 3 представлены изображения элементов матрицы ($r_{yy'}$) (см. формулу (10)).

Если у двух исследуемых белков в иерархической структуре точки ветвления находятся на близких значениях полуширины функции сглаживания, то для матрицы $r_{yy'}$ в придиагональной области возникают утолщения (рис. 3). Такие утолщения возникают при разных дискретных значениях полуширины функции сглаживания и в пределе формируют серию дискретных квадратных областей, разделенных между собой. Можно утверждать, что таким способом удалось выявить новые уровни организации белковых молекул, меньшие, чем структурные домены белков.

На рис. 3а–д видно, как при уменьшении величины значения критерия фильтрации формируются придиагональные области и связи между придиагональными областями. На диагонали наблюдается самый высокий уровень взаимной корреляции первых производных (на рис. 3а–д они отмечены черным цветом). При снижении критерия фильтрации от 0.9 до 0.01 видно, что квадратные области на диагонали формируются и принимают максимальные размеры. Эти области отмечены на рисунке квадратами с границами серого цвета. При дальнейшем снижении величины критерия фильтрации увеличения размеров и количества придиагональных областей не происходит. Если учесть, что были исследованы 24647 негомологичных последовательностей с размером от 50 до 400 аминокислотных остатков, то можно говорить, что полученная характеристика является общей новой уникальной характеристикой белковых последовательностей.

База NRDB90 [29] включает очень разнородные последовательности, т.е. последовательности белков всех известных структурных типов и функций. В данной работе предпринята попытка получить структурные характеристики для всей совокупности этих разнородных данных. Вследствие этого для получения устойчивых результа-

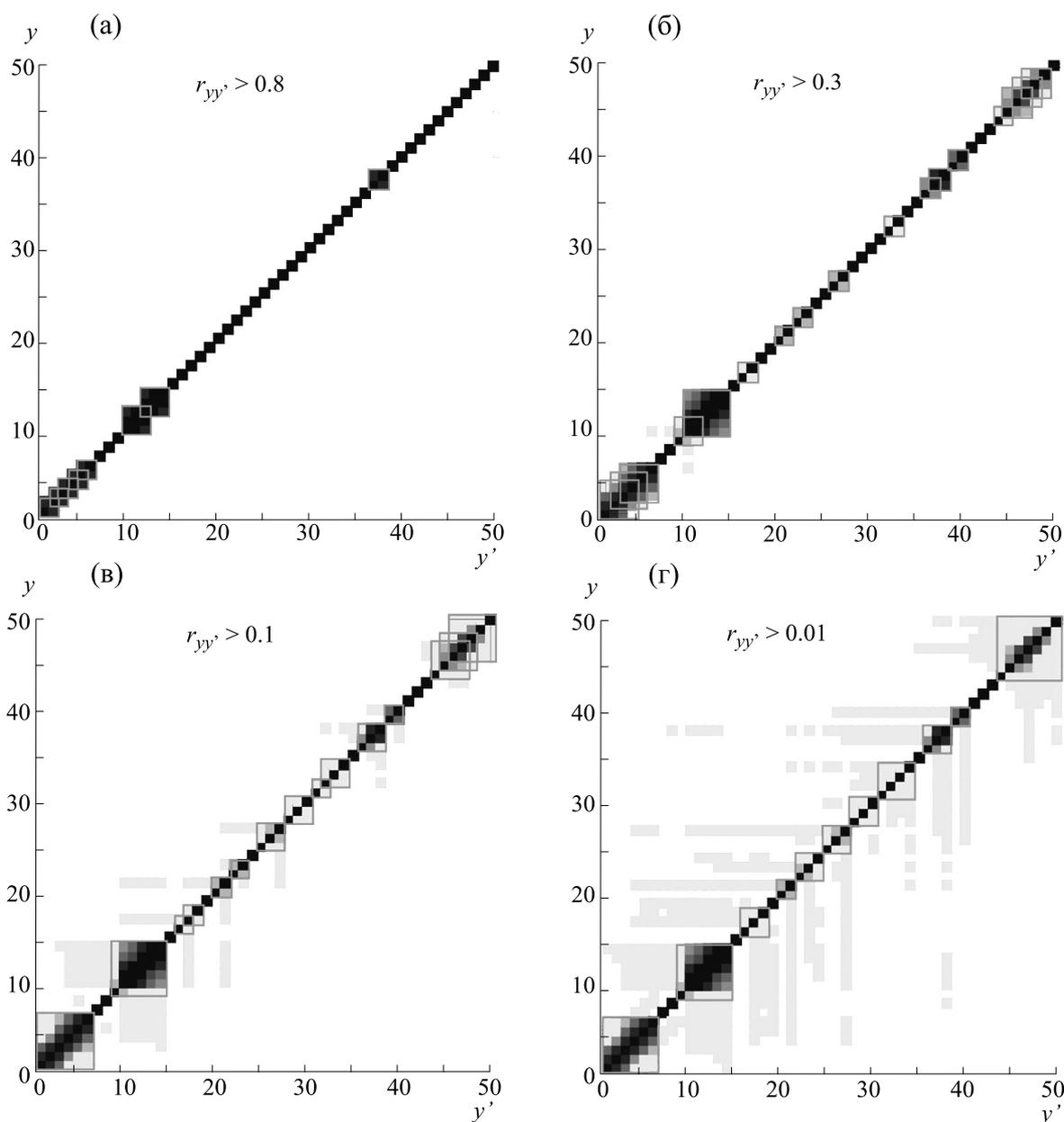


Рис. 3. Элементы $r_{yy'}$ матрицы взаимной корреляции векторов $V_{y'}$, содержащих разностные производные $\tilde{S}'_{I'}(y)$ (формула (10)) при различных значениях критериев фильтрации. Данные получены для 24647 негомологических белковых последовательностей размером от 50 до 400 аминокислотных остатков из базы NRDB90 [29].

тов потребовалось использовать столь маленькие значения критерия фильтрации.

В таблице приведены размеры придиагональных областей, размеры соответствующих им элементов структурной организации белков.

Таким образом, удалось выявить одиннадцать уровней организации белковых последовательностей. Структуры с подобными характерными размерами ранее рассматривались как элементы супер-вторичной структуры. Применение опи-

санного метода к белкам с известной пространственной структурой должно позволить выявить новые топологии структурно-устойчивых элементов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе дано описание метода исследования информационной структуры белковых последовательностей (метод АНИС), который позволяет выявить их иерархическую организацию. Приме-

Уровни организации элементов последовательности белков

Имя уровня структурной организации	Диапазон значений полуширины сглаживающей функции	Диапазон длины соответствующей последовательности белка, а.к.о.
X1	1–6	7–12
X2	9–14	15–20
X3	16–18	22–24
X4	20–21	26–27
X5	22–24	28–30
X6	25–27	31–33
X7	28–30	34–36
X8	31–34	37–40
X9	36–38	42–44
X10	39–40	45–46
X11	44–50	50–56

нение метода АНИС для исследования 24647 не-гомологических белковых последовательностей размером от 50 до 400 аминокислотных остатков из базы NRDB90 [29] позволило выявить одиннадцать уровней организации белковых последовательностей.

В дальнейшем планируется изучение фрагментов пространственной структуры белков, соответствующих элементам разных уровней иерархии, размеры которых соответствуют выявленным в этой работе интервалам. Есть предположение, что такие фрагменты будут включать как уже известные элементы супер-вторичной структуры, так и элементы пространственной организации белков, ранее не выделяемые как элементы супер-вторичной структуры. Мы предполагаем, что выявляемые фрагменты обладают повышенной структурной устойчивостью, способны к самосборке и могут являться ядрами сворачивания, начиная формирование нативной пространственной организации белков.

Полученные в этой статье результаты могут быть использованы для выявления элементов супер-вторичной структуры, из которых формируются структурные домены, исследования структурной организации доменов, для изучения молекулярной эволюции полипептидных цепей, для дизайна белков рекомбинантных белков и проектирования белков с новыми типами пространственной организации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-04-01085а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. M. Crippen, *J. Mol. Biol.* **126**, 315 (1978). DOI: 10.1016/0022-2836(78)90043-8
2. G. D. Rose, *J. Mol. Biol.* **134**, 447 (1979).
3. L. Holm and C. Sander, *Proteins* **19**, 256 (1994). DOI: 10.1002/prot.340190309
4. I. N. Berezovsky, V. G. Tumanyan, and N. G. Esipova, *FEBS Lett.* **418**, 43 (1997). DOI: 10.1016/S0014-5793(97)01346-X
5. A. M. Lesk and G. D. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4304 (1981).
6. D. B. Wetlaufer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 697 (1973).
7. M. J. Zaki, V. Nadimpally, D. Bardhan, and C. Bystroff, *Bioinformatics* **20** (Suppl. 1), i386 (2004). DOI: 10.1093/bioinformatics/bth935
8. P. Bork and E. V. Koonin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 366 (1996). DOI: 10.1016/s0959-440x(96)80057-1
9. T. P. Exarchos, C. Papaloukas, C. Lampros, and D. I. Fotiadis, *J. Biomed. Inform.* **41**, 165 (2008). DOI: 10.1016/j.jbi.2007.05.004
10. N. Hulo, A. Bairoch, V. Bulliard, et al., *Nucl. Acids Res.* **34**, D227 (2006). DOI: 10.1093/nar/gkj063
11. F. S. Domingues and T. Lengauer, *Appl. Bioinformatics* **2**, 3 (2003).
12. J. D. Watson, R. A. Laskowski, and J. M. Thornton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 275 (2005). DOI: 10.1016/j.sbi.2005.04.003
13. A. Valencia, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 267 (2005). DOI: 10.1016/j.sbi.2005.05.010
14. A. N. Nekrasov, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **20**, 87 (2002). DOI: 10.1080/07391102.2002.10506825
15. C. E. Shannon, *Bell System Techn. J.* **27**, 379 (1948). DOI: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
16. A. G. de Brevern, *Biophys. J.* **114**, 231a (2018). DOI: 10.1016/j.bpj.2017.11.1286
17. A. N. Nekrasov, L. G. Alekseeva, R. A. Pogosyan, et al., *Biochimie* **160**, 88 (2019). DOI: 10.1016/j.biochi.2019.02.006

18. W. Jurkowski, M. Brylinski, L. Konieczny, et al., *Proteins* **55**, 115 (2004). DOI: 10.1002/prot.20002
19. W. Jurkowski, T. Kułaga, and I. Roterman, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **29**, 79 (2011). DOI: 10.1080/07391102.2011.10507376
20. A. N. Nekrasov, A. A. Anashkina, and A. A. Zinchenko, in *Proc. 2nd Int. Conf. "Theoretical Approaches to Bioinformation Systems" (TABIS 2013)* (Institute of Physics, Belgrade, 2014), pp. 1–22.
21. A. A. Anashkina and A. N. Nekrasov, *Russ. J. Numeric. Analysis Math. Model.* **29**, 265 (2014).
22. A. N. Nekrasov and A. A. Zinchenko, *J. Biomol. Structure & Dynamics* **25**, 553 (2008). DOI: 10.1080/07391102.2008.10507202
23. A. N. Nekrasov, V. V. Radchenko, T. M. Shuvaeva, et al., *J. Biomol. Structure & Dynamics* **24**, 455 (2007). DOI: 10.1080/07391102.2007.10507133
24. Y. Briers, K. Miroshnikov, O. Chertkov, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 747 (2008). DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.07.102
25. A. N. Nekrasov, L. E. Petrovskaya, V. A. Toporova, et al., *Biochemistry (Moscow)* **74**, 399 (2009).
26. A. G. Mikhailova, A. N. Nekrasov, A. A. Zinchenko, et al., *Biochemistry (Moscow)* **80**, 1331 (2015). DOI: 10.1134/S0006297915100156
27. R. V. Chertkova, N. A. Brazhe, T. V. Bryantseva, et al., *PLoS One* **12** (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0178280
28. L. N. Shingarova, L. E. Petrovskaya, A. N. Nekrasov, et al., *Russ. J. Bioorg. Chem.* **36**, 301 (2010). DOI: 10.1134/S1068162010030040
29. L. Holm and C. Sander, *Bioinformatics* **14**, 423 (1998). DOI: 10.1093/bioinformatics/14.5.423

Levels of Hierarchical Organization of Protein Sequences. Analysis of Entropy Characteristics

A.N. Nekrasov*, Y.P. Kozmin*, S.V. Kozyrev**, N.G. Esipova***,
R.H. Ziganshin*, and A.A. Anashkina***

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Steklov Mathematical Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 8, Moscow, 119991 Russia

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

This research investigates 24647 non-homologous protein sequences. The occurrence profile of peptapeptides was constructed for every sequence and hierarchically organized elements of various sizes were revealed by a special mathematical method in each profile. The correlations between these hierarchical elements were analyzed and it was shown that in the tested set of protein sequences there are 11 levels of protein organization with elements ranging in length from 7 to 56 amino acid residues. It was suggested that the identified levels of organization correspond to elements of a super-secondary structure with different topology.

Keywords: protein sequences, hierarchical organization, entropy

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛОБИНОВ С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ

© 2020 г. Г.Б. Постникова, Е.А. Шеховцова, В.С. Сивожелезов

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

E-mail: gb_post@icb.psn.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.

После доработки 19.02.2020 г.

Принята к публикации 22.09.2020 г.

Проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости в структуре миоглобина кашалота (swMb) и лошади (hhMb), гемоглобина I (HbI) овода *Gasterophilus intestinalis* (giHbI) и мономерных и димерных гемоглобинов HbI и HbII моллюска *Lucina pectinata* (lpHbI и lpHbII), а также возможной ее дестабилизации при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами. Показано, что нативная конформация гемовой полости в этих глобинах, как в проксимальной, так и в дистальной ее части, поддерживается системой водородных связей с участием проксимального и дистального белковых остатков, обеих пропионовокислых групп гема и близких к ним на поверхности белка полярных аминокислот (His, Arg, Lys). Сеть водородных связей в проксимальной части гемовой полости контролирует положение атома Fe вне или в плоскости протопорфирина, которое влияет на эффективность связывания лиганда, в то время как в дистальной части гемовой полости сеть водородных связей, образованная с участием дистального остатка белка (HisE7 в swMb, hhMb и giHbI, и GlnE7 в lpHbII), очевидно, должна стабилизировать такую его конформацию, в которой тот способен донировать водород лиганду O₂. Водородная связь дистального остатка E7 с лигандом O₂ препятствует его быстрой диссоциации и играет важнейшую роль в регуляции сродства к лиганду. Найденные сети водородных связей в проксимальной и в особенности дистальной части гемовой полости, должны нарушаться при связывании оксиглобина с мембранной поверхностью из-за контакта отрицательно заряженных головок фосфолипидов с экспонированными в сторону мембраны лизинами или аргининами белка, измененного локального pH вблизи мембраны и эффекта отрицательного электростатического поля мембраны, приводя к уменьшению сродства белка к лиганду O₂ и облегчая его отщепление при физиологических значениях pO₂ в клетке.

Ключевые слова: глобины, фосфолипидная мембрана, пространственная структура, электростатические взаимодействия, водородные связи.

DOI: 10.31857/S0006302920060058

Глобины относятся к древнему семейству дыхательных глобулярных белков млекопитающих, моллюсков, членистоногих и насекомых, простетическая группа которых представлена железопорфириновым комплексом — гемом. Они способны обратимо связывать газообразные лиганды, O₂, CO и NO, обеспечивая протекание окислительных и других процессов в тканях. Несмотря на значительные различия в аминокислотных последовательностях, все глобины имеют

высокоомологичные пространственные структуры, которые включают, как правило, восемь α-спиральных фрагментов, обозначаемых латинскими буквами от A до H, а также межспиральные участки АВ, ВС, CD и т.д. Гемовая группа, протопорфирин IX, локализована в гидрофобном «кармане» между E- и F-спиралями и ориентирована таким образом, что оба пропионовокислых остатка гема направлены в растворитель.

Гемовая группа связана с белком нековалентно через ван-дер-ваальсовы или π-π-контакты между π-электронной системой протопорфирина и боковыми группами белка в гемовой полости, через аксиальную координацию гемового железа с белковыми лигандами и, наконец, через водо-

Сокращения: Mb — миоглобин; MbO₂ — оксимиоглобин; Hb — гемоглобин; swMb — миоглобин кашалота; hhMb — миоглобин лошади; giHbI — гемоглобин личинок овода *Gastrophilus intestinalis*; lpHbI — гемоглобин I моллюска *Lucina pectinata*; lpHbII — гемоглобин II моллюска *Lucina pectinata*.

родные (и ионные или солевые) связи между А- и D-пропионатами гема и ближайшими заряженными поверхностными остатками белка. Эти взаимодействия позволяют белку «узнавать» гемовую группу. Из двух аксиальных лигандов атома железа гема только пятый лиганд – проксимальный гистидин принадлежит белку, а шестое координационное место либо, как правило, свободно (дезоксиформа глобина), либо занято молекулой O_2 или другим внешним лигандом.

Со времен Хилла и Милликана [1, 2] считалось, что по аналогии с гемоглобином крови миоглобин (Mb) функционирует в соответствии с его кривой оксигенации в растворе, т. е. дезоксигенация оксимиоглобина (MbO_2) в мышечной клетке должна происходить при снижении парциального давления O_2 (pO_2) в среде до $pO_2 < 3$ мм рт. ст. и при этом не требуется какого-либо взаимодействия MbO_2 с клеточными органеллами или метаболитами. Мы впервые показали [3–5], что, вопреки давно сформированным и вошедшим в учебники представлениям, для отщепления кислорода от оксимиоглобина (MbO_2) необходимо не только снижение pO_2 в клетке, но и активное взаимодействие его с дышащими митохондриями. Если же митохондрии отделены от раствора белка полупроницаемой мембраной, то даже при близком к нулю значении pO_2 никакой дезоксигенации MbO_2 не происходит. При этом для разных состояний митохондрий (нативные сопряженные, свежемороженые и разобщенные реагентом FCCP (*n*-трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразоном) митохондрии) скорость дезоксигенации MbO_2 полностью совпадает со скоростью потребления митохондриями O_2 из раствора, т. е. полностью определяется интенсивностью их дыхания.

Проведенное нами изучение механизма миоглобин-митохондриального взаимодействия с привлечением различных физико-химических методов, использованием природных митохондриальных и искусственных нейтральных и отрицательно заряженных бислойных фосфолипидных мембран показало, что на внешней мембране митохондрий белки, специфичные к миоглобину, отсутствуют, а MbO_2 неспецифически связывается с мембранными фосфолипидами [6, 7]. Найдено также, что основной вклад в это взаимодействие вносят кулоновские электростатические взаимодействия локального характера, в которых с анионными группами (головками) отрицательно заряженных фосфолипидов наиболее вероятно взаимодействуют положительно заряженные остатки в окружении гемовой полости.

В результате взаимодействия миоглобина с фосфолипидной мембраной имеет место изменение конформации белка, в первую очередь нативной конформации гемовой полости, без заметного изменения третичной структуры, что приводит к уменьшению сродства миоглобина к лиганду и облегчает отщепление кислорода от MbO_2 при физиологических значениях pO_2 в клетке [8–10]. Полученные результаты хорошо согласуются с выводом, сделанным ранее из детального изучения функциональных свойств и пространственных структур миоглобинов млекопитающих и глобинов из других организмов, что электростатическая стабилизация является общим механизмом контроля лигандного связывания [11].

Все вышеупомянутые исследования проводились с использованием миоглобина кашалота и его модифицированных производных и митохондрий из печени крысы с сукцинатом в качестве дыхательного субстрата. Позднее была изучена дезоксигенация в присутствии митохондрий из сердца голубя (с глутаматом и малатом в качестве дыхательных субстратов) шести других оксиглобинов, миоглобина лошади и моллюска *Busucon*, мономерного леггемоглобина сои, мономерных и димерных гемоглобинов (Hb) I и II моллюска *Lucina pectinata*, а также димерного HbI насекомого *Gasterophilus intestinalis*, которые в десятки и сотни раз различаются по кинетическим и равновесным параметрам их реакции с O_2 в растворе [12]. Однако в присутствии митохондрий во всех случаях регистрировалась одинаковая скорость дезоксигенации оксиглобина, которая также соответствовала, как и для MbO_2 кашалота, скорости дыхания митохондрий, что свидетельствует в пользу взаимодействия всех изученных глобинов с митохондриями, хотя авторы работы [12] это отрицали.

В данной работе проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости и возможной ее дестабилизации при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами в структурах миоглобинов кашалота (swMb) и лошади (hhMb), димерного Hb *Gasterophilus intestinalis* (giHbI) и мономерных и димерных HbI и HbII моллюска *Lucina pectinata* (lpHbI и lpHbII)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Координаты атомов пространственных структур Mb кашалота (код структуры 1A6M, оксиформа), Mb лошади (код структуры 5D5R, дезокси-форма), HbI личинок паразитирующего овода *Gasterophilus intestinalis* (код структуры 2C0K, ок-

Таблица 1. Параметры реакции мономерных и димерных миоглобинов и гемоглобинов с кислородом (рН 7.0–7.5, 20–25°C)

Белок	$k_{\text{on}} \cdot 10^{-6},$ $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	$K = k_{\text{on}}/k_{\text{off}},$ M^{-1}	$p_{50},$ мм рт. ст.	$T, ^\circ\text{C}$	Ссылка
Мб кашалота	19	10	1.9	0.33–0.51 0.9	20 25	[12] [18]
Мб лошади	14	11	1.3	0.43–0.65	20	[12] [18]
Нб <i>Gasterophilus intestinalis</i>	10	2.4	4.2	0.15	25	[22]
НбI <i>Lucina pectinata</i>	100	61	1.6	0.34	20	[23]
НбII <i>Lucina pectinata</i>	0.39	0.11	3.5	0.16	20	[23]

си-форма), НбI моллюска *Lucina pectinata* (код структуры 1МОН, H₂S-форма) и НбII моллюска *Lucina pectinata* (код структуры 2OLP, лиганд O₂) взяты из Банка белковых данных и визуализированы в программе MolMol. Расстояния между атомами указаны в ангстремах.

Конформационный анализ аминокислот в окружении гема проводили путем сплошного перебора конформаций соответствующих аминокислот с шагом 10 градусов по каждому из двугранных углов, с оптимизацией ван-дер-ваальсовых конфликтов, электростатических (по Эвальду) и водородных связей, согласно методике, описанной в работе [13]. Учитывали взаимодействия исследуемых аминокислот со всеми атомами миоглобина, включая гемовую область. На рис. 1–3 представлены структуры, оптимальные по указанным критериям.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

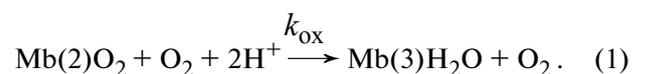
Как отмечалось выше, ранее все исследования проводили на миоглобине кашалота и его модифицированных производных с митохондриями из печени крысы с сукцинатом в качестве дыхательного субстрата. Позднее была изучена дезоксигенация других мономерных и димерных оксиглобинов, в десятки и сотни раз различающихся по кинетическим и равновесным параметрам их реакции с O₂ в растворе. Однако в присутствии митохондрий регистрировалась одинаковая скорость дезоксигенации всех оксиглобинов, соответствующая скорости дыхания митохондрий.

В данной работе проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости в структуре Мб кашалота и лошади, НбI овода *Gas-*

terophilus intestinalis и мономерных и димерных гемоглобинов НбI и НбII моллюска *Lucina pectinata*, а также возможной ее дестабилизации при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами.

Миоглобин кашалота (153 аминокислотных остатка, 17.8 кДа) – мономерный глобин, содержащий пентакоординированный атом железа гема с His93(F8) в качестве проксимального лиганда. Благодаря тому, что миоглобин может быть получен в больших количествах и легко кристаллизуется, он был первым белком, пространственная структура которого была расшифрована с атомным разрешением [14]. Миоглобин кашалота обладает очень высоким сродством к кислороду, мерой которого значение p_{O_2} , при котором дезокси-Мб(2) оксигенирован наполовину (p_{50}). Для него характерны высокая скорость ассоциации O₂ (k_{on}), низкая скорость диссоциации его из комплекса (k_{off}) и соответственно низкие значения p_{50} (табл. 1).

Свободный комплекс феррогема с O₂ в растворе нестабилен и очень быстро окисляется до ферригема, в то время как автоокисление нативного МбO₂ кашалота до окисленной мет-формы представляет собой медленный процесс, который занимает несколько суток при рН 7.2 и комнатной температуре, заметно ускоряясь при низких рН и повышении температуры [15, 16]:



Показано, что причина высокой стабильности O₂-комплекса в МбO₂ (и в оксигемоглобине) животных заключается в гидрофобном характере окружения гемовой группы в белке, а также в на-

личии водородной связи между лигандом O_2 и инвариантным дистальным His64(E7) в гемовой полости, которая играет важнейшую роль в регуляции сродства к кислороду, препятствуя его быстрой диссоциации [17]. Замена His64(E7) неполярными аминокислотными остатками, неспособными к Н-связыванию с лигандным O_2 , приводит к значительному снижению сродства к O_2 , главным образом, из-за увеличения k_{off} [15].

Показано также, что заметный вклад в стабилизацию нативной конформации гемовой полости MbO₂ вносят электростатические взаимодействия между пропионовокислыми остатками гема, А- и D-пропионатами, и близко расположенными положительно заряженными группами (Lys, Arg) белка. Электростатические взаимодействия между гем-D-пропионатом и Arg45(CD3), который в свою очередь образует Н-связь с дистальным HisE7, стабилизируют позицию дистального гистидина, в которой он способен донировать водород лиганду O_2 . Потеря положительного заряда в позиции 45, а тем более добавление туда отрицательного заряда нарушает нативную конфигурацию этой области, увеличивая доступность дистального кармана белка растворителю [15].

В данной работе проанализировано участие заряженных остатков Arg и Lys в окружении гема в CD-, D-, E- и FG-фрагментах структуры MbO₂ кашалота (использовали аминокислотные остатки с 40 по 100), а также гемпропионатов в образовании ионных и водородных связей, стабилизирующих нативную конформацию гемовой полости. Найдено, что с проксимальной стороны гема А-пропионат образует «солевой мостик» с His97(FG3), который в свою очередь участвует в сети Н-связей, включающей проксимальный His93(F8), Ser92(F7), Leu89(F4), Lys96(FG2) и Lys98(FG4) (рис. 1, табл. 2). Очевидно, что эта разветвленная сеть водородных связей с участием А-пропионата способствует нахождению проксимального His93(F8) в безлигандном дезоксиMb в конформации, аналогичной Т-форме гемоглобина с низким сродством к лиганду [18].

В дистальной части гемовой полости также обнаруживается сетка водородных связей, образованная главным образом гем-D-пропионатом, Arg45(CD3), Asp60(E3) и дистальным His64(E7) (рис. 1, табл. 2). Водородная связь между N-дельта карбонильным кислородом Asp60(E3) и His64(E7) и должна блокировать вращение дистального His64(E7) вокруг $C_\alpha-C_\beta$ -связи и стабилизировать «закрытую» конформацию этого гистидина, донирующего водород лиганду O_2 [19].

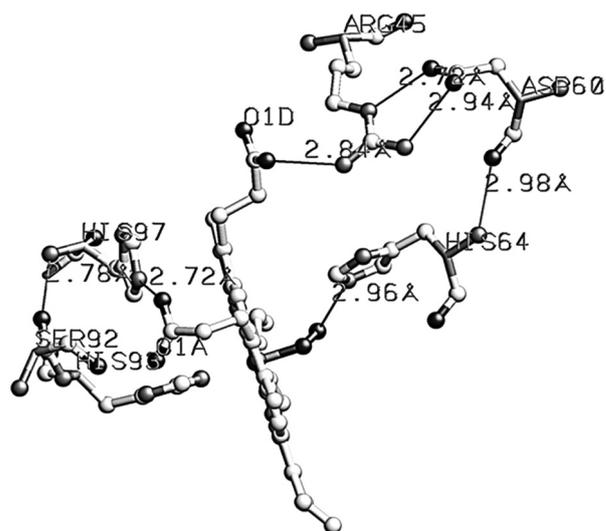


Рис. 1. Окружение гемовой группы миоглобина кашалота. Показаны водородные связи и их длина в Å. Аминокислоты надписаны при атомах C_α ; гемовые А- и D-пропионаты – при атомах первого карбоксильного кислорода O1A и O1D. Черные шарики – атомы кислорода, серые шарики – атомы азота, белые шарики – атомы углерода.

Миоглобин из сердца лошади (153 аминокислотных остатка, 17.8 кДа) по своей структуре и свойствам очень близок к Mb кашалота [20]. Наблюдается высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей обоих белков, особенно среди аминокислотных остатков, формирующих гемовый карман, где имеются всего две замены – Lys45(CD3) и Val67(E10) в миоглобине лошади вместо Arg45(CD3) и Thr67(E10) в миоглобине кашалота. Пентакоординированный атом железа гема в hhMb также содержит проксимальный His93(F8), и имеется дистальный His64(E7), способный образовать Н-связь со связанной молекулой кислорода. Замена Arg45(CD3) на Lys45(CD3) в миоглобине лошади лишь незначительно влияет на кислородсвязывающие свойства белка (табл. 1) и скорость его автоокисления, так что эта естественная мутация рассматривается как нейтральная [15].

С проксимальной стороны гема сетка из Н-связей в hhMb образована, как и в Mb кашалота, гем-А-пропионатом, His97(FG3), Ser92(F7), проксимальным His93(F8), Lys96(FG2), Lys98(FG4) и Leu89(F4), и стабилизирует нативную конформацию этой области молекулы (табл. 2). В дистальной части гемовой полости имеются определенные отличия сетки водородных связей в hhMb от Mb кашалота (табл. 2). Наряду с Н-связью гем-D-пропионата с Lys45(CD3), обнаруживается водородная связь дистального His64(E7) с пептидной NH-группой Val68(E11), а также связь Asp60(E3) с

Таблица 2. Сеть водородных связей в окружении гемовой группы глобинов

Проксимальная сторона	Расстояние, Å	Дистальная сторона	Расстояние, Å
Миоглобин кашалота, мономер, окси-форма			
Проп.А – (N)His97(FG3)	2.73	(N)His64(E7) – O ₂ -лиганд	2.97
(N)His93(F8) – (O)Ser92(F7)	2.96	Проп. D – (N)Arg45(CD3)	2.84
(N)His93(F8) – (CO)Leu89(F4)	2.94	(N)Arg45(CD3) – Asp60(E3)	2.73
(NH)Lys96(FG2) – (CO)Ser92(F7)	2.94	(N)Arg45(CD3) – Asp60(E3)	2.95
(NH)Lys98(FG4) – (CO)His97(FG3)	2.26	(NH)His64(E7) – Asp60(E3)	2.99
Миоглобин лошади, мономер, дезокси-форма			
Проп.А – (N) His97(FG3)	2.80	Проп. D – (N)Lys45(CD3)	2.97
(N) His93(F8) – (O) Ser92(F7)	2.87	(NH) Lys62(E5) – (CO)Asp60(E3)	3.55
(NH)Lys96(FG2) – (CO)Ser92(F4)	2.93	(NH)Lys63(E6) – (CO)Asp60(E3)	3.30
(NH)Lys98 (FG4)-(CO)His97(FG3)	2.25	(CO)His64(E7) – (NH)Val68(E11)	2.77
(NH)Ser92 (F4) – (CO)Leu89(F4)	3.38		
Гемоглобин овода <i>Gasterophilus intestinalis</i> , димер, цепь А, окси-форма			
Проп.А – (N)Arg65(E10)	2.91	(N)His62(E7) – O ₂ -лиганд	2.88
(N)Lys92(F3) – (O)Gln69(E14)	3.54	Проп. D – (N1)Arg58(E3)	3.50
		Проп. D – (N2)Arg58(E3)	3.38
		(NH)His62(E7) – (CO)Arg58(E3)	3.12
		(NH)Gln69(E14) – (CO)Ile66(E11)	3.43
Гемоглобин <i>Lucina pectinata</i> I, мономер, H ₂ S-форма			
Проп.А – (N)Arg99(F18)	2.91	(O)Gln64(E7) – H ₂ S-лиганд	3.34
(CO)His96(F15) – (NH)Arg99(F18)	2.94	Проп. D – (N)Gln64(E7)	3.84
		Проп. D – (N)Arg99(F18)	6.11
		(CO)Gln64(E7) – (NH)Ser67(E10)	3.26
Гемоглобин <i>Lucina pectinata</i> II, димер, цепь А, окси-форма			
Проп.А – (N)Arg100(F18)	2.71	(N)Gln65(E7) – O ₂ -лиганд	3.43
(N)His97(F15) – (CO)Met93(F11)	2.89	(O)Tyr30(B10) – O ₂ -лиганд	1.94
(NH)His97(F15) – (CO)Met93(F11)	3.12	Проп. D – (N)Lys92(F10)(цепь В)	2.63
(CO)His97(F15) – (NH)Arg100(F18)	2.99	(O)Gln65(E7) – (N)Lys92(F10)(ц. В)	2.73
		Проп. D – (N)Lys95(F13)(цепь В)	4.72

Примечание. Используемые сокращения: (N) – азот функциональной группы аминокислотного остатка, (O) – кислород функциональной группы аминокислотного остатка, (NH) – азот пептидной группы аминокислотного остатка, (CO) – кислород пептидной группы аминокислотного остатка.

соседними Lys62(E5) и Lys63(E6). Отсутствует Н-связь с лигандным кислородом, так как взята структура безлигандного белка.

Очень важную роль в сохранении нативной конформации дистальной части гемовой полости в миоглобинах играют электростатические взаимодействия между гем-D-пропионатом и Arg(Lys)45 в положении CD3. Замена Lys45 в MbO₂ свиньи на небольшой и незаряженный Ser приводит к увеличению равновесной константы диссоциации O₂ (K_{dis}) мутантного белка в 1.7 раза и скорости его автоокисления (k_{ox}) – в 6 раз, а при замещении Lys45 на Glu наблюдалось увеличение K_{dis} в 2.5 раза и почти двадцатикратное увеличение k_{ox} [15]. Прямая корреляция между k_{ox} и K_{dis} связана с тем, что оба процесса «запускаются» разрывом Н-связи дистального HisE7 с лигандом O₂ [15, 16].

На примере лошадиного Mb изучено также влияние водородного связывания с участием пропионовокислых групп гема и поверхностных аминокислотных остатков на динамику гем-белкового взаимодействия [21]. При замене Ser92(F7) на Asp или His97(FG3) на Leu, а Lys45(CD3) на Glu константа скорости диссоциации гема из миоглобина увеличивалась в три-пять раз (при pH 7.0). При этерификации же обоих пропионатов она возрастает в 20 раз [21].

Гемоглобин личинок паразитирующего овода *Gasterophilus intestinalis*, живущих в желудке лошади, содержит несколько изоформ белка, присутствующих в трахейных дыхательных клетках в миллимолярной концентрации. Гемоглобин giHbI представляет собой гомодимер (151 аминокислотный остаток в одной цепи, 37 кДа), субъединицы которого контактируют между собой в области G- и H-спиралей таким образом, что гемовые группы ориентированы в разные стороны [22]. Контактная поверхность содержит несколько полярных контактов, т. е. ассоциация димера основана на электростатических взаимодействиях.

По аминокислотной последовательности giHbI имеет только 21% гомологии с swMb, однако их пространственные структуры близки: проксимальный остаток гема представлен His97(F8), дистальный остаток – His62(E7), лигандная молекула O₂ стабилизируется Н-связью с His E7 (3.1 Å и 2.6 Å для субъединиц А и В соответственно). Константа скорости ассоциации кислорода k_{on} соответствует величине, характерной для swMb, а константа скорости диссоциации k_{off} в четыре раза меньше и, соответственно, сродство giHbI существенно выше (табл. 1). Низкое значе-

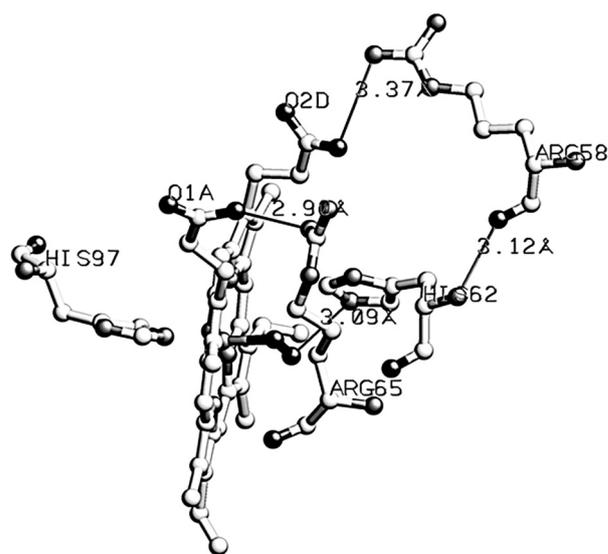


Рис. 2. Окружение гемовой группы гемоглобина овода *Gasterophilus intestinalis*. Показаны водородные связи и их длина в Å. Аминокислоты надписаны при атомах C_α; гемовые А- и D-пропионаты – при атомах первого карбоксильного кислорода O1A и O1D. Черные шарики – атомы кислорода, серые шарики – атомы азота, белые шарики – атомы углерода.

ние k_{off} отражает более высокую, чем в swMb, степень стабилизации связанного лиганда со стороны дистального His62(E7).

Поверхность giHbI богата заряженными аминокислотными остатками. С проксимальной стороны гема имеется лишь водородная связь А-пропионата с Arg65(E10), а с дистальной – гораздо более разветвленная система Н-связей с участием D-пропионата (рис. 2, табл. 2).

Гемоглобин, обнаруженный в жабрах двустворчатого моллюска *Lucina pectinata*, заселяющего богатый сероводородом тропический ил, содержит в высокой концентрации три различных белка: сульфид-реактивный мономерный lpHbI (142 аминокислотных остатка, 14.9 кДа), способный также связывать кислород, и транспортирующие кислород димерные lpHbII и lpHbIII (35 кДа), состоящие из разных мономеров А и В (151 и 152 аминокислотных остатка соответственно). Все они способствуют потоку H₂S и O₂ из окружающей морской воды к внутриклеточным H₂S-окисляющим симбионтам. Оксигенированный lpHbI реагирует с H₂S, образуя ферри-lpHbI-сульфид, а окси-lpHbII остается оксигенирован в присутствии сероводорода [23].

Первичные последовательности lpHbII и lpHbIII очень близки, но значительно отличаются от АК-состава lpHbI. Пространственная структура мономерного lpHbI и димерного lpHbII со-

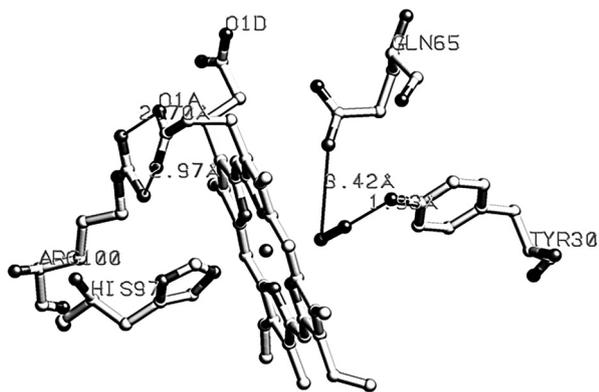


Рис. 3. Окружение гемовой группы гемоглобина II моллюска *Lucina pectinata*. Показаны водородные связи и их длина в Å. Аминокислоты надписаны при атомах C α , гемовые А- и D-пропионаты – при атомах первого карбоксильного кислорода O1A и O1D. Черные шарики – атомы кислорода, серые шарики – атомы азота, белые шарики – атомы углерода.

стоит из шести α -спиралей (А, В, Е, F, G и H), окружающих гемовый карман, и двух минорных спиральных фрагментов между В и Е спиралам [23, 24]. В димерном LpHbII пропионатные группы гемовых групп субъединиц А и В направлены в сторону контактной площадки. Оба белка содержат атом Fe в плоскости гема, более длинную F-спираль (18 аминокислотных остатков), проксимальный His96 или His97(F15) и консервативный дистальный глутамин в положении E7, Gln64(E7) в LpHbI и Gln65(E7) в LpHbII).

Для мономерного LpHbI значения k_{on} и k_{off} на порядок выше, чем у Mb кашалота, однако равновесная константа ассоциации и значения p_{50} близки (табл. 1). Для димерного LpHbII значения k_{on} и k_{off} существенно ниже, и значительно выше его сродство к лиганду O $_2$, такое же, как у giHbI овода (табл. 1), что отражает, очевидно, разную степень стабилизации кислородного комплекса в LpHbI и LpHbII. Действительно, лигандный O $_2$ тесно связан в дистальном гемовом сайте LpHbII через водородные связи с двумя аминокислотными остатками, Gln65(E7) и Tyr30(B10) (рис. 3), а в LpHbI вместо Tyr30(B10) присутствует Phe29(B10), неспособный донировать водород лиганду O $_2$ (табл. 2).

В проксимальной части гемовой полости LpHbI, позиции А-пропионата и проксимального His96(F15) стабилизируются водородными связями с Arg99(F18), а в дистальной области гема дистальный Gln64(E7) связан водородными связями с D-пропионатом и Ser67(E10). В направлении D-пропионата ориентирован также один из атомов азота Arg99(F18) (табл. 2).

В структуре димерного LpHbII, в отличие от LpHbI, присутствуют разветвленные сетки Н-связей в проксимальной и дистальной областях гемовой полости (рис. 3). В их образовании активное участие принимают проксимальный His97(F15), А-пропионат и Arg100(F11), а в дистальной области гема – соответственно D-пропионат, дистальный Gln65(E7) и Lys92(F10) соседней субъединицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хорошо известно, что даже небольшие изменения структуры гемовой полости в разных глобинах при высокой степени гомологии их третичных структур приводят к существенным различиям (в десятки и сотни раз) кинетических и равновесных параметров связывания лиганда [18]. В данной работе показано, что нативная конформация гемовой полости в глобинах животных, swMb и hhMb, насекомого, giHbI, и моллюска, LpHbI и LpHbII, как проксимальной, так и дистальной ее части, поддерживается системой водородных связей с участием проксимального и дистального белковых лигандов, обеих пропионовых групп гема, а также близко расположенных к ним на поверхности белка положительно заряженных аминокислот (His, Arg, Lys). Обычно в структурно-функциональных исследованиях гемовой полости глобинов главная роль отводится методу молекулярной динамики. Однако сети водородных связей, подобные обнаруженным нами в настоящей работе, плохо воспроизводятся этим методом из-за значительного вклада квантовых эффектов в их образование, в частности, обобществления протона между донором и акцептором. Поэтому для уточнения пространственной структуры окружения гема вместо метода молекулярной динамики был использован сплошной перебор конформаций боковых групп аминокислот гемового окружения и пропионатов гема.

Сеть водородных связей в проксимальной части гемовой полости контролирует положение атома Fe вне или в плоскости протопорфирина, которое влияет на эффективность связывания лиганда, в то время как сеть водородных связей в дистальной части гемовой полости, образованная с участием дистального остатка белка (HisE7 в swMb, hhMb и giHbI, и GlnE7 в LpHbII), очевидно, должна стабилизировать его конформацию, в которой он способен донировать водород лиганду O $_2$.

С помощью рамановской спектроскопии было изучено соотношение молекул swMb с «закрытым» и «открытым» дистальным гемовым карманом в результате вращения дистального

His64(E7) вокруг C_{α} – C_{β} -связи как функции рН [19]. Значительный рост скорости диссоциации лиганда для открытой формы обусловлен потерей Н-связи с дистальным His64(E7), который стабилизирует связанный O_2 в закрытом состоянии. Энергия стабилизации водородной связи составляет $\sim 4(\pm 3)$ ккал/моль. Отмечается, что рост «открытой» популяции миоглобина в результате протонирования дистального гистидина или взаимодействия с другими метаболическими агентами в клеточной области, где локальная кислотность и метаболизм выше, а кислород быстро истощается, может рассматриваться как потенциально важный бимолекулярный механизм для контроля за связыванием и отщеплением кислорода в мышечной клетке.

Подобная ситуация реализуется, по-видимому, при взаимодействии глобина с митохондриями в условиях гипоксии. Найденные в настоящей работе сети водородных связей в проксимальной и в особенности дистальной части гемовой полости могут нарушаться под влиянием отрицательно заряженной фосфолипидной мембраны. Механизмы такого влияния могут включать контакты отрицательно заряженных головок фосфолипидов с экспонированными в сторону мембраны лизинами или аргининами белка, измененный локальный рН вблизи мембраны и даже более дальнедействующий эффект отрицательного электростатического поля мембраны. Все эти взаимозависимые факторы могут приводить к существенному изменению сродства белка к лиганду O_2 .

В отличие от тетрамерного Hb крови, сродство которого к O_2 регулируется как самим лигандом, так и аллостерическими эффекторами – дифосфоглицератом, протонами и CO_2 , обеспечивая необходимую скорость доставки O_2 с кровью, для миоглобина были неизвестны какие-либо низкомолекулярные соединения или клеточные метаболиты, способные уменьшить его сродство к лиганду, т. е. сдвинуть кривую оксигенации Mb в сторону более высоких значений $pO_2 = 10\text{--}20$ мм рт. ст., реально наблюдающихся в мышечной клетке при гипоксии. В наших исследованиях впервые показано, что регуляция сродства Mb к O_2 , как и в случае других белков-переносчиков, осуществляется с помощью его взаимодействия с мишенью – митохондриальной мембраной, что облегчает диссоциацию O_2 в физиологических условиях и обеспечивает поступление его с нужной скоростью непосредственно в митохондрии.

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. L. Hill, *Nature* **132**, 897 (1933).
2. G. A. Millikan, *Physiol. Rev.* **19**, 503 (1939).
3. G. B. Postnikova and S. V. Tselikova, *Biophysics (Moscow)* **50**, 284 (2005).
4. G. B. Postnikova, S. V. Tselikova, and E. A. Shekhovtsova, *Biochemistry (Moscow)* **74**, 1211 (2009).
5. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *J. Phys. Chem. Biophys.* **3**, 126 (2013).
6. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Biochemistry (Moscow)* **77**, 280 (2012).
7. P. A. Grigoriev, G. B. Postnikova, and E. A. Shekhovtsova, *Biophysics (Moscow)* **57**, 55 (2012).
8. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Biochemistry (Moscow)* **83**, 168 (2018).
9. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Am. J. Biol. Chem.* **3**, 16 (2015).
10. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Physiol. Sci.* **1**, 1 (2014).
11. S. Kundu and M. S. Hargrove, *Proteins: structure, function, and genetics* **50**, 239 (2003).
12. J. B. Wittenberg and B. A. Wittenberg, *J. Experim. Biol.* **210**, 2082 (2007).
13. M. U. Johansson, V. Zoete, O. Michielin, and N. Guex, *BMC bioinformatics* **13**, 173 (2012).
14. J. C. Kendrew, R. T. Dickerson, B. E. Strandberg, et al., *Nature (Lond.)* **185**, 422 (1960).
15. R. E. Brantley, S. J. Smerdon, A. J. Wilkinson, et al., *J. Biol. Chem.* **268**, 6995 (1993).
16. K. Shikama, *Chem. Rev.* **98**, 1357 (1998).
17. J. S. Olson, A. J. Mathews, R. J. Rohlf, et al., *Nature* **336** (6196), 265 (1988).
18. E. Antonini and M. Brunori, *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands* (Amsterdam–London, 1971).
19. W. D. Tian, J. T. Sage, and P. M. Champion, *J. Mol. Biol.* **233**, 155 (1993).
20. S. V. Evans and G. D. Brayer, *J. Biol. Chem.* **263** (9), 4263 (1988).
21. Ch. L. Hunter, E. Lloyd, L. D. Eltis, et al., *Biochemistry* **36**, 1010 (1997).
22. A. Pesce, M. Nardini, S. Dewilde, et al., *Prot. Sci.* **14**, 3057 (2005).
23. D. W. Kraus and J. B. Wittenberg, *J. Biol. Chem.* **265** (27), 16043 (1990).
24. J. A. Gavira, A. Camara-Artigas, W. De Jesus-Bonilla, et al., *J. Biol. Chem.* **283** (14), 9414 (2008).

Electrostatic Interaction of Globins with Phospholipid Membranes

G.B. Postnikova, E.A. Shekhovtsova, and V.S. Sivozhelezov

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

The present study aimed to analyze the role of electrostatic interactions contributing to the stability of the native conformations of the heme group in the structure of sperm whale myoglobin (swMb), horse heart myoglobin (hhMb), hemoglobin I (HbI) from the botfly *Gasterophilus intestinalis* (giHbI) and monomeric and dimeric hemoglobins HbI and HbII from the mollusk *Lucina pectinata* (lpHbI and lpHbII) as well as investigate a possible reason of destabilization due to interaction with negatively charged phospholipid membranes. It was shown that the native conformation of the heme cavity in these globins, both in its proximal and distal sides, is sustained by a system of hydrogen bonds involving the proximal and distal protein residues, both heme propionic acid groups and the nearby polar amino acids on the protein surface (His, Arg, Lys). The hydrogen bond network in the proximal part of the heme pocket controls the position of the Fe atom outside or in the protoporphyrin plane, affecting the efficiency of ligand binding, while in the distal part of the heme cavity the hydrogen bond network formed with the participation of the distal protein residue (HisE7 in swMb, hhMb and giHbI, and GlnE7 in lpHbII) should, apparently, stabilize conformation where the protein is able to donate hydrogen to O₂ ligand. The hydrogen bond between distal residue E7 and O₂ ligand prevents its rapid dissociation and plays an important role in the regulation of ligand affinity. The hydrogen bond networks found in the proximal and, especially, distal heme environments should be disturbed when oxyglobin binds to the membrane surface due to the contact of negatively charged phospholipid heads with the lysine or arginine exposed to the membrane, the altered local pH near the membrane and the effect of the negative electrostatic field of the membrane, resulting in a decrease in the affinity of the protein to O₂ ligand and facilitating its dissociation at normal pO₂ values of the cell.

Keywords: globins, phospholipid membrane, spatial structure, electrostatic interactions, hydrogen bonds

ХЕМОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ФЕНОЛЬНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ: РОЛЬ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ Nrf2

© 2020 г. Г.Г. Мартинович*, И.В. Мартинович*, А.В. Вчерашняя*, Н.К. Зенков**, Е.Б. Меньщикова**, С.Н. Черенкевич*

*Белорусский государственный университет, 220030, Минск, просп. Независимости, 4, Республика Беларусь
E-mail: martinovichgg@bsu.by

**Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

E-mail: lemen@centercem.ru

Поступила в редакцию 18.02.2020 г.

После доработки 18.02.2020 г.

Принята к публикации 22.05.2020 г.

Фармакологическая коррекция редокс-свойств опухолевых клеток является перспективным подходом для повышения эффективности противоопухолевой терапии. В настоящее время в качестве новой мишени для разработки селективных хемосенсибилизаторов рассматривается фактор транскрипции Nrf2 – ключевой участник регуляции клеточного редокс-гомеостаза при стрессовых воздействиях и адаптационных процессах. Многие природные и синтетические фенольные антиоксиданты являются индукторами транскрипционной активности Nrf2. Вследствие различий в транскрипционной активности Nrf2 в нормальных и опухолевых клетках фенольные антиоксиданты при определенных концентрациях являются биологическими регуляторами с бинарным действием: в опухолевых клетках усиливают развитие окислительного стресса и действие противоопухолевых препаратов, в нормальных – проявляют протекторные свойства. В обзоре обсуждаются возможные молекулярные механизмы действия и перспективы клинического использования природных и синтетических фенольных антиоксидантов в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: фенольные антиоксиданты, активные формы кислорода, фактор транскрипции Nrf2, опухолевые клетки, противоопухолевая терапия, хемосенсибилизаторы.

DOI: 10.31857/S000630292006006X

Поиск эффективных методов лечения и профилактики онкологических заболеваний, несмотря на достигнутые в последние десятилетия успехи, остается одной из наиболее актуальных задач в медицине. В методах противоопухолевой терапии (химиотерапия, фотодинамическая терапия, радиотерапия и др.) применяются подходы, основанные на индуцировании гибели клеток путем повышения внутриклеточной концентрации активных форм кислорода (АФК) – высокореакционных продуктов метаболизма кислорода [1–3]. Поскольку АФК ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , ONOO^- , H_2O_2 и др.) образуются в клетках не только в результате действия внешних физико-химических

факторов, но и в процессах клеточного метаболизма, фармакологическая коррекция редокс-свойств опухолевых клеток является перспективным подходом для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Ввиду высокой реакционной способности ряда АФК, в частности синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) и гидроксильного радикала (HO^{\cdot}), их чрезмерное образование ведет к повреждению молекулярных компонентов клетки, развитию окислительного стресса и гибели клеток [4]. Стимуляция генерации АФК используется в методах фототерапии и лучевой терапии онкологических заболеваний. В химиотерапии онкологических заболеваний широко используются препараты, усиливающие продукцию АФК клетками. В последние десятилетия показано, что генерация АФК является важным этапом в процессе индуцирования апоптоза раковых клеток такими широко используемыми химиотерапевтическими агентами, как цисплатин, блеомицин и этопозид [5–7]. Генерация

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, Nrf2 – транскрипционный фактор 2 семейства NFE (NF-E2-related factor 2), ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant respons(ive) element), Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный протеин 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), Klf9 – Kruppel-подобный фактор 9 (Kruppel-like factor 9), ТС-13 – 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия.

Противоопухолевые препараты, индуцирующие окислительный стресс

Механизмы повышения продукции АФК	Препараты	Ссылки
Генерация АФК митохондриальными оксидоредуктазами	Даунорубин, доксорубин, паклитаксел, ресвератрол	[16–19]
Образование АФК с участием металлов переменной валентности	Блеомицин, артемизинин, цисплатин	[20–22]
Образование синглетного кислорода в фотохимических процессах	Фотодитазин, фотолон, фотофрин	[23–25]
Ингибирование компонентов антиоксидантной системы клеток: – тиоредоксинредуктазы – γ -глутаматцистеинлигазы – супероксиддисмутазы	Мотексафин гадолиний, ауранофин, Гризенокс (As_2O_3), Бутионин-сульфоксимин, 2-Метоксиэстрадиол	[26, 27] [28] [29] [30]

АФК в опухолевых клетках усиливается также при действии моноклонального антитела ритуксимаба [8], протеасомного ингибитора бортезомиба [9], а также противоопухолевых антибиотиков-ингибиторов гистондиацилаз SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) [10] и адафостина [11].

Для увеличения эффективности противоопухолевых соединений предлагаются подходы, направленные на индуцирование окислительного стресса в опухолевых клетках [12–14]. Участие АФК в механизмах действия многих противоопухолевых препаратов позволяет выделить отдельную область противоопухолевой терапии – «редокс-направленную терапию рака» [15]. Новый класс перспективных противоопухолевых агентов, уже продемонстрировавших эффективность в доклинических и клинических исследованиях, включает артемизинин, ауранофин, мотексафин гадолиний, ресвератрол, 2-метоксиэстрадиол и др. (см. таблицу).

В рамках современных представлений регуляция окислительных процессов может осуществляться не только редокс-активными соединениями, но и регуляторами активности АФК-продуцирующих и антиоксидантных ферментов. Так, наряду с препаратами, способными генерировать АФК в биохимических и фотохимических реакциях, разрабатываются препараты, действие которых включает ингибирование ферментов антиоксидантной системы. Например, в качестве перспективных противоопухолевых соединений рассматриваются природные и синтетические ингибиторы тиоредоксинредуктазы [31] и супероксиддисмутаза [32]. Тем не менее в разработке методов редокс-направленной терапии необходимо учитывать тот факт, что молекулярные и клеточные изменения, индуцируемые АФК, мо-

гут способствовать развитию резистентности опухолевых клеток к повреждающим факторам.

Повышение стационарной внутриклеточной концентрации АФК служит необходимым этапом передачи сигнала в регуляции широкого спектра биохимических и физиологических процессов, включая пролиферативные и адаптационные процессы [33]. Высокий уровень генерации АФК в клетках может вызвать ответ систем регуляции редокс-гомеостаза, направленный на его снижение путем увеличения концентрации антиоксидантов («редокс-адаптация»). Рост уровня антиоксидантов при редокс-адаптации усиливает резистентность клеток к ионизирующей радиации и действию ряда лекарственных соединений. В результате повышения концентрации антиоксидантов нарушается редокс-сигнализация, что способствует изменению клеточного функционирования и развитию химиорезистентности [34]. Таким образом, регуляция внутриклеточной продукции АФК является комплексным процессом, требующим учета вклада всех участников клеточного редокс-метаболизма. Для повышения селективности действия лекарственных препаратов в стратегиях противоопухолевой терапии, направленных на фармакологическую коррекцию редокс-свойств, необходимо учитывать особенности редокс-метаболизма опухолевых клеток [35].

Важными модуляторами редокс-свойств клеток выступают природные и синтетические антиоксиданты, способные индуцировать перестройки редокс-метаболизма в результате регуляции экспрессии генов белков антиоксидантной системы клеток. Выявленные отличия экспрессии генов белков антиоксидантной системы в нормальных и опухолевых клетках позволяют рассматривать использование природных и синтетических антиоксидантов для сенсibilизации опухолевых

клеток в качестве перспективного подхода повышения эффективности современной противоопухолевой терапии. В обзоре обсуждаются возможные молекулярные механизмы и перспективы клинического использования природных и синтетических фенольных антиоксидантов в противоопухолевой терапии.

РЕДОКС-СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА Keap1/Nrf2/ARE КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

В последние годы выяснено, что ключевую роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза при стрессовых воздействиях выполняет редокс-зависимая сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE [36]. Главным элементом системы является фактор транскрипции Nrf2 (транскрипционный фактор 2 семейства NFE (NF-E2-related factor 2)), контролирующей экспрессию генов, в промоторных областях которых содержится регуляторная последовательность, получившая название «антиоксидант-респонсивный элемент» (ARE) [37]. Среди Nrf2-подконтрольных генов для регуляции редокс-метаболизма важное значение имеют гены каталазы, легкой и тяжелой цепей глутаматцистеинлигазы, глутатионпероксидазы 2, глутатион-S-трансфераз, глутатионредуктазы, тиоредоксинов, глутаредоксинов, пероксиредоксинов, тиоредоксинредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [38–40]. Показано, что активация сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE посредством усиления синтеза ABCG1 (Mgp1), ключевого белка АТФ-зависимого экспорта ксенобиотиков из клеток, способствует развитию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток [41]. Под контролем системы Keap1/Nrf2/ARE находятся также ключевые белки метаболизма глутатиона, увеличение концентрации которого способствует выживанию клеток в стрессовых условиях [42].

В неактивном состоянии фактор транскрипции Nrf2 нековалентно связан со специфическим редокс-зависимым белком Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный протеин 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)). В отсутствие активаторов Nrf2, находящийся в комплексе с адаптерным белком Keap1, подвергается ферментативному убиквитинированию лизиновых остатков с последующей деградацией в 26S-протеасомах [43]. Время жизни Nrf2 ($t_{1/2}$) в клетках при нормальных условиях составляет от 7 до 20 мин [44, 45]. Ключевую роль в снятии репрессии транскрипционного фактора Nrf2 посредством убиквитинирования играют процессы модификации сульфгидрильных групп остатков цистеина в Keap1. Модификация SH-групп остатков цистеина в Keap1 за счет их окисления или электрофильного присоединения приводит к наруше-

нию убиквитинирования и стабилизации Nrf2, его транспорту в клеточное ядро и связыванию с ARE [46]. Неразрывная связь таких молекулярных структур, как Keap1, Nrf2 и ARE, при передаче внутриклеточных сигналов позволяет объединить их в единую редокс-зависимую сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является защита клеток от токсических соединений – окислителей и ксенобиотиков [45]. Нарушения в функционировании данной системы играют важную роль в патогенезе многих хронических заболеваний, включая аутоиммунные, респираторные, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные [47, 48].

Следует отметить, что экспрессия некоторых антиоксидантных ферментов может также усиливаться с участием других факторов транскрипции. Например, активация транскрипционного фактора FoxO (чаще всего через фосфорилирование киназой Akt) увеличивает экспрессию ряда антиоксидантных ферментов митохондрий (Mn-супероксиддисмутаза, пероксиредоксины 3 и 5) и пероксисом (каталаза) [49]. Активация NIF увеличивает синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, регулирующей образование низкомолекулярного компонента антиоксидантной системы НАДФН [50]. Однако наиболее комплексная перестройка антиоксидантной системы клеток осуществляется при активации Nrf2. Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о ключевой роли системы Keap1/Nrf2/ARE в сохранении здоровья [51]. Фактор транскрипции Nrf2 рассматривается как потенциальная мишень для терапии широкого спектра заболеваний, в патогенезе которых окислительный стресс играет важную роль [48, 52]. Поиск эффективных регуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE относится к актуальным задачам современной фармакологии [53, 54].

Большинство известных индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE содержат электрофильные группы (прямые активаторы) или после метаболических превращений становятся электрофилами (метаболические активаторы). К прямым активаторам относятся такие группы соединений, как акцепторы Михаэля, изотиоцианаты, геминальные дитиолы, сероорганические и селенсодержащие соединения, электрофилы с уходящей группой, соединения трехвалентного мышьяка, атомы тяжелых металлов, гидропероксиды и нитрозирующие агенты [45, 55]. Активация Nrf2 осуществляется также при действии многих природных (кумарин, ресвератрол, эпигаллокатехин-3-галлат) и синтетических (3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия, *трет*-бутилгидрохинон) фенольных антиоксидантов (рис. 1). Непрямое защитное действие антиоксидантов при окислительном стрессе, реализующееся с участием системы Keap1/Nrf2/ARE,

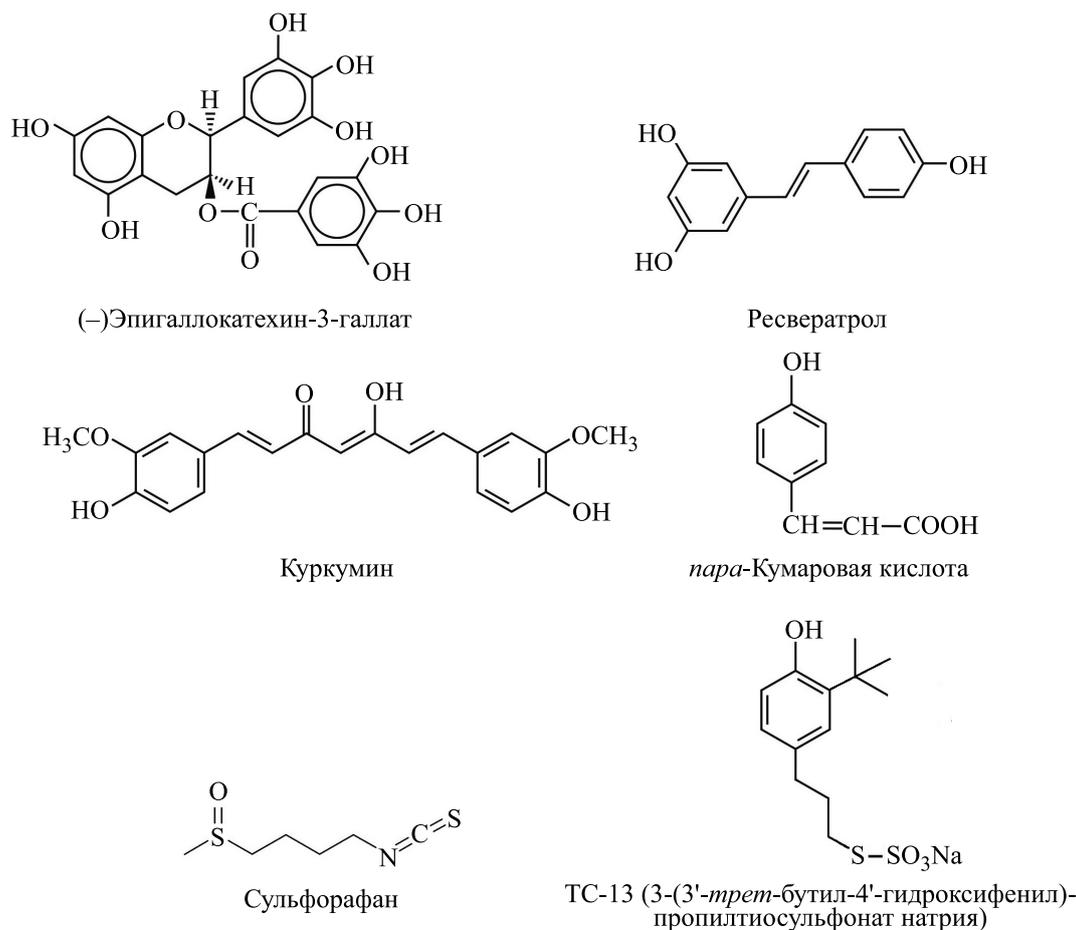


Рис. 1. Химическая структура природных и синтетических индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE.

наблюдается при более низких концентрациях соединений, чем те, которые необходимы для эффективного перехвата свободных радикалов в биологической среде [56]. Предполагается, что активация экспрессии ARE-регулируемых генов происходит в результате двухэлектронного окисления-восстановления, в котором могут участвовать полифенолы со взаимным *ortho*- и *para*-, но не *meta*-расположением гидроксильных групп [57]. Именно благодаря тому, что большинство индукторов ARE относится к группе фенольных антиоксидантов, последний получил название «антиоксидант-респонсивный элемент».

Важно отметить, что ARE-активирующие свойства проявляют только хинонные формы соединений, которые образуются при взаимодействии фенолов с внутриклеточными АФК [58]. Это позволяет рассматривать внутриклеточную продукцию АФК в качестве ключевого фактора, определяющего специфичность регуляторного действия антиоксидантов. В соответствии с современной концепцией редокс-сигнализации эффект регуляции функциональной активности клеток с участием АФК определяется не только

типом и величиной концентрации АФК, но и типом и величиной концентрации клеточных антиоксидантов, а также местом образования АФК [59, 60]. Иначе говоря, эффект действия редокс-активных соединений определяется не конкретной молекулой, а группой взаимодействующих участников, образующих электрон-транспортные цепи (редокс-цепи), и зависит от величин параметров редокс-гомеостаза [61, 62]. Близкие по структуре эндогенные и экзогенные антиоксиданты могут выступать участниками разных электрон-транспортных цепей, запуская при этом различные клеточные ответы в нормальных и опухолевых клетках.

Следует отметить, что уровень повышения активности антиоксидантной системы клетки ограничен наличием отрицательной обратной связи в системе Keap1/Nrf2/ARE. Показано, что Nrf2 наряду с регуляцией компонентов антиоксидантной системы также усиливает продукцию АФК, опосредованную митохондриями и НАДФН-оксидазой [63]. При превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экспрессия генов, продукты которых способствуют развитию

окислительного стресса. При высокой транскрипционной активности Nrf2 повышается содержание фактора транскрипции Klf9 (Kruppel-подобный фактор 9 (Kruppel-like factor 9)) [64]. Klf9 принадлежит к семейству Kruppel-подобных факторов транскрипции (KLF) и играет важную роль в онкогенезе, дифференцировке и гибели клеток [64, 65]. Взаимодействие Klf9 с сайтами связывания ДНК изменяет экспрессию ряда белков, участвующих в регуляции метаболизма АФК [64]. Вместе с тем фактор транскрипции Klf9 подавляет экспрессию антиоксидантных генов, в том числе ген пероксиредоксина 6 (*PRDX6*). Низкая активность Prdx6 в митохондриях приводит к смещению редокс-баланса в пользу окислителей и к последующей АФК-индуцированной гибели клеток. Передача сигнала через путь Nrf2/Klf9/Prdx6 рассматривается как молекулярный механизм переключения от редокс-регуляции к сверхпродукции АФК и гибели клеток [66, 67]. С использованием эпителиальных клеток хрусталика в качестве модельной системы было показано, что сульфорафан (рис. 1), один из самых «сильных» природных индукторов транскрипционной активности Nrf2, в низких микромольных концентрациях (3–6 мкМ) стимулировал рост клеток и обеспечивал цитопroteкцию при действии пероксида водорода и ультрафиолетовом облучении за счет усиления активности Nrf2, а в концентрациях выше 10 мкМ вызывал гибель клеток [67, 68]. При более высокой дозе сульфорафана избыточное количество Nrf2 приводило к активации программы клеточной гибели через индукцию Klf9 и последующее увеличение продукции АФК. Ингибирование Klf9 уменьшало продукцию АФК и способствовало выживанию клеток [67]. Таким образом, фактор транскрипции Nrf2 является важным регулятором редокс-гомеостаза клеток, способным усиливать как восстановительные, так и окислительные процессы в клетках.

Наличие порога для активации защитного действия через фактор транскрипции Nrf2 позволяет предположить, что зависимости доза-эффект для модуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE будут характеризоваться гормезисом (рис. 2). Термин «гормезис» используется для описания явлений, в которых физические или химические факторы индуцируют противоположно направленные биологические ответы при разных дозах: стимулирующие и защитные эффекты при низких дозах и токсические при высоких [69]. Поскольку антиоксидантный эффект, который индуцируется при действии модуляторов Keap1/Nrf2/ARE в клетках, опосредован активацией соответствующего сигнального пути, можно предположить отличие регуляторных ответов опухолевых и нормальных клеток на действия антиоксидантных модуляторов (рис. 2).

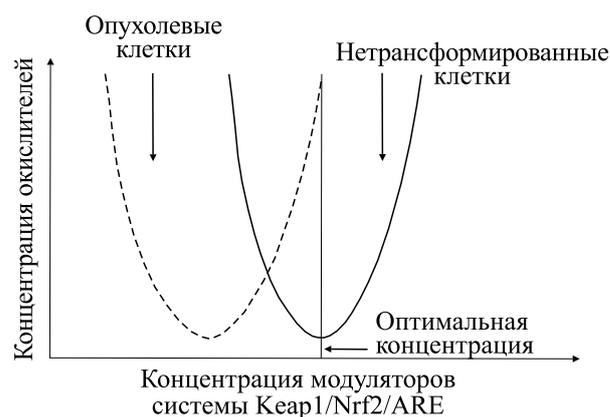


Рис. 2. Изменения редокс-гомеостаза нормальных и опухолевых клеток, индуцированные модуляторами системы Keap1/Nrf2/ARE.

Мутации Keap1, ведущие к нарушению его функционирования, обнаружены в карциномах различных органов [70]. В результате во многих опухолевых тканях и клеточных линиях опухолей наблюдается конститутивная активация Nrf2 [71], что во многом обуславливает изменения эффектов действия экзогенных регуляторов сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE и приводит к сдвигу зависимости доза-эффект в направлении более низких концентраций. Наличие аутопротекторной сверхэкспрессии Nrf2 в опухолевых клетках позволяет предположить, что при действии антиоксидантов превышение порога экспрессии Nrf2 будет приводить к усилению окислительных процессов в результате активации фактора Klf9 и повышения экспрессии АФК-продуцирующих белков. U-образная зависимость уровня внутриклеточных окислителей от концентрации модуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE также будет наблюдаться для нетрансформированных клеток. Однако в нормальных клетках защитный эффект, проявляющийся в снижении концентрации окислителей и обусловленный ростом содержания антиоксидантных ферментов, будет проявляться при тех концентрациях антиоксидантов, при которых индуцируется окислительный стресс в опухолевых клетках.

В силу специфичности регуляции Keap1/Nrf2/ARE в опухолевых клетках можно предположить, что антиоксидантные модуляторы данной системы будут сенсibilизировать действие АФК-продуцирующих противоопухолевых агентов только в трансформированных клетках. При определенных концентрациях антиоксидантов в опухолевых клетках будет наблюдаться прооксидантный эффект, тогда как в нормальных клетках — защитный. Таким образом, антиоксидантные модуляторы системы Keap1/Nrf2/ARE являются биологически активными соединениями бинарного действия, ко-

торые могут использоваться для повышения эффективности современной противоопухолевой терапии. Ниже представлен анализ собственных и литературных данных о действии природных и синтетических фенольных антиоксидантов на редокс-процессы опухолевых клеток и их роли в сенсibilизации опухолевых клеток к действию противоопухолевых препаратов.

АНТИОКСИДАНТЫ КАК ХЕМОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ

Известно несколько тысяч природных фенольных соединений [72]. Ввиду большого количества и разнообразия фенольных соединений противоопухолевые свойства многих из них не исследованы. В последние годы наиболее активно исследуются регуляторные свойства эпигаллокатехин-3-галлата — основного катехина зеленого чая, ресвератрола — одного из основных полифенолов, содержащихся в кожуре ягод винограда и красных винах, и куркумина — основного куркуминоида, входящего в состав корня куркумы *Curcuma longa* L. [73]. Действие эпигаллокатехин-3-галлата, ресвератрола и куркумина, как и других полифенолов, на клетки описывается гормоном, характеризующимся U-образной зависимостью [74]. Фенолы при низких микромолярных концентрациях вызывают защитный антиоксидантный эффект. При высоких концентрациях фенолы проявляют прооксидантные и цитотоксические свойства [75, 76]. При одинаковых концентрациях в опухолевых и нормальных клетках фенолы могут индуцировать противоположно направленные эффекты.

Эпигаллокатехин-3-галлат. Одним из наиболее изученных природных индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE, проявляющим антиканцерогенные свойства, является полифенол эпигаллокатехин-3-галлат (рис. 1) — эфир эпигаллокатехина и галловой кислоты.

Защитное действие полифенола, связанное со стимуляцией антиоксидантной системы клеток, наблюдается при многих стрессовых и повреждающих воздействиях. Так, побочным действием противоопухолевого препарата цисплатина является нефротоксичность, проявляющаяся в развитии окислительного стресса и воспаления в почках. Введение крысам вместе с цисплатином полифенола эпигаллокатехин-3-галлата индуцирует активацию Nrf2 и ингибирование NF- κ B, что приводит к снижению окислительного стресса и содержания воспалительных цитокинов в почках [77]. При индуцированном окислительном стрессе в эпителиальных клетках защитный эффект эпигаллокатехин-3-галлата опосредован увеличением антиоксидантной емкости в результате активации фактора транскрипции Nrf2 [78]. Эпигаллокатехин-3-галлат ингибирует образование АФК в нор-

мальных эпителиальных клетках, но индуцирует генерацию АФК в опухолевых клетках [79]. В трансформированных клетках эпигаллокатехин-3-галлат активирует митохондриально опосредованный путь клеточной гибели, сопровождающийся генерацией АФК, снижением трансмембранного митохондриального потенциала и высвобождением апоптотических белков [80]. Аналогичные результаты были получены в клеточных линиях рака поджелудочной железы [81], рака легкого [82], рака толстой кишки [83] и меланомы [84], а также на животных моделях ксенотрансплантата рака молочной железы [85]. В концентрациях 5–20 мкМ эпигаллокатехин-3-галлат вызывал апоптоз только в клетках меланомы, не оказывая токсического действия на нормальные меланоциты [84]. В концентрациях 10–80 мг/мл эпигаллокатехин-3-галлат вызывал апоптоз клеток гепатоцеллюлярной карциномы линии LM6, но не нормальных клеток печени (HL-7702) [86].

Сенсibilизация опухолевых клеток эпигаллокатехин-3-галлатом к действию ряда противоопухолевых препаратов показана в исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* [87]. Эпигаллокатехин-3-галлат усиливает действие доксорубина [88], 5-фторурацила (5-флюороурацила) [89], цисплатина [90], тризенокса (As₂O₃) [91], бортезомиба [92] и этопозида [93]. Среди предложенных механизмов хемосенсibilизации опухолевых клеток ключевую роль играет редокс-модуляция в результате усиления внутриклеточной продукции АФК [87, 94]. В раковых клетках яичников линий SKOV3, CAOV3 и C200 эпигаллокатехин-3-галлат увеличивал токсичность цисплатина в три-шесть раз, включая резистентные к цисплатину клетки [90]. Однако избирательность действия соединения в отношении опухолевых клеток не обоснована. Как обсуждалось ранее, сверхэкспрессия Nrf2 в опухолевых клетках может обуславливать прооксидантный эффект при более низких концентрациях агента, чем в нормальных клетках.

Показано, что через активацию фактора транскрипции Nrf2 эпигаллокатехин-3-галлат повышает чувствительность раковых клеток толстой кишки к радиационному воздействию [95]. С другой стороны, при совместном действии эпигаллокатехин-3-галлата и противоопухолевых препаратов в нетрансформированных клетках снижается токсичность последних. Эпигаллокатехин-3-галлат снижает радиационно-индуцированное метастазирование [96], оказывает защитный эффект при кардиотоксичности доксорубина [97, 98], нейротоксичности и ототоксичности цисплатина [99, 100], снижает развитие индуцированного блеомицином фиброза легких [101]. Молекулярный механизм протекторного действия эпигаллокатехин-3-галлата включает активацию системы Keap1/Nrf2/ARE [77, 102].

Куркумин. Куркумин (1,7-бис-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион) является высокоактивным биорегулятором, обладающим антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами [103, 104]. Многие биологические эффекты куркумина связаны с его способностью активировать систему антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE и индуцировать экспрессию генов антиоксидантной защиты [105]. Для активации системы Keap1/Nrf2/ARE куркумином важна электрофильная группировка с α,β -ненасыщенными карбонильными связями, которая, будучи акцептором Михаэля, взаимодействует с цистеиновыми остатками Keap1 [46].

В многочисленных исследованиях *in vitro* и *in vivo* показана высокая противоопухолевая активность куркумина [106, 107]. В клинических исследованиях фазы II куркумин тестируется в отношении множественной миеломы, рака кожи, рака шейки матки, рака поджелудочной железы [15, 108]. Биологическое действие куркумина в низких микромолярных концентрациях в опухолевых и нормальных клетках характеризуется селективностью. Например, куркумин в концентрациях 50 мкМ вызывает апоптоз в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека линии HepG2, не оказывая токсического действия на нормальные гепатоциты [109]. В опухолевых клетках куркумин усиливает действие радиации [110], гемцитабина [111], капецитабина [112], 5-фторурацила [113, 114], этопозида [115], паклитаксела [116, 117], цисплатина [118], тамоксифена [119] и иринотекана [120]. Обнаружено, что куркумин в сочетании с кверцетином снижает количество и размер аденом у пациентов с семейным аденоматозным полипозом, аутосомно-доминантным расстройством, характеризующимся развитием колоректальных аденом и в конечном итоге колоректального рака [121].

Показано, что противоопухолевые свойства куркумина реализуются с участием АФК [122, 123]. Предполагается, что куркумин вызывает АФК-индуцируемое снижение трансмембранного митохондриального потенциала, в результате активируется апоптоз [124, 125]. В ряде работ показана способность куркумина через усиление внутриклеточной продукции АФК активировать аутофагию, при этом антиоксидант N-ацетилцистеин снижал, а пероксид водорода усиливал аутофагию [126, 127]. При активации аутофагии основным источником АФК являются митохондрии [128, 129]. Функциональные отношения между апоптозом и аутофагией комплексны: в некоторых случаях аутофагия является частью клеточного адаптационного механизма, защищающего клетки от апоптоза, в то время как в других

условиях аутофагия может вызывать гибель клеток или инициировать апоптоз [130].

Следует отметить, что усиление внутриклеточной продукции АФК при действии куркумина может реализоваться через Nrf2-зависимый механизм. Показано, что ингибирование пролиферативной активности клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при действии куркумина происходит в результате Nrf2-индуцированного снижения сверхэкспрессии эндонуклеазы Fen1 (Flap endonuclease-1, флэп-эндонуклеаза-1), участвующей в развитии рака молочной железы [131]. Недавно обнаружено, что молекулярный механизм сенсibilизации клеток линии MCF-7 к действию паклитаксела и аденомина растительными полифенолами включает ингибирование эндонуклеазы Fen1 с участием АФК и Nrf2 [132].

Эксперименты на крысах показали, что куркумин снижает потерю веса и повреждения слизистой оболочки кишечника при химиотерапии 5-фторурацилом [133]. Показано, что куркумин защищает клетки печени от цисплатин-индуцированного повреждения [134], снижает окислительный стресс и апоптоз в костном мозге после химиотерапии цисплатином и карбоплатином [135, 136]. Молекулярные механизмы защитных эффектов куркумина в отношении нетрансформированных клеток также могут реализоваться с участием Nrf2 [137]. В экспериментах на мышцах с лимфомой показано, что куркумин приводит к профилактике рака, индуцируя антиоксидантные ферменты и ферменты II фазы детоксикации ксенобиотиков посредством активации передачи сигналов через Keap1/Nrf2/ARE, восстановления экспрессии гена опухолевого супрессора p53 и модуляции экспрессии и содержания медиаторов воспаления, таких как TGF- β и циклооксигеназа 2 [138]. В результате активации Nrf2 куркумин ингибирует апоптоз клеток мочевого пузыря у крыс и ослабляет цистопатию, вызванную цисплатином [139].

Ресвератрол. К природным биорегуляторам с противоопухолевыми свойствами относится также полифенольный фитоалексин ресвератрол (*транс*-3,5,4'-тригидроксистерилбен) (рис. 1) [140]. Эпидемиологические исследования показали, что у женщин, употребляющих богатый ресвератролом виноград, риск развития рака молочной железы снижается почти на 50% [141]. Ресвератрол проявляет цитотоксичность и уменьшает жизнеспособность опухолевых клеток при раке кожи, раке предстательной железы, раке полости рта, немелкоклеточном раке легкого, но обладает низкой токсичностью в нормальных клетках [142–145]. Показано, что ресвератрол индуцирует аутофагию и апоптоз в опухолевых клетках посредством увеличения продукции

АФК [146, 147]. Активация механизмов клеточной гибели при действии ресвератрола протекает с участием Nrf2 [148].

При химиотерапии ресвератрол сенсibiliзирует опухолевые клетки к действию радиации [149, 150], цисплатина [151, 152], доцетаксела [153], доксорубина [154, 155], паклитаксела [156], 5-фторурацила [157], сорафениба [158], карфилзомиба [159] и бортезомиба [160]. Синергизм действия наблюдается при совместном использовании ресвератрола и куркумина в отношении рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого и гепатоцеллюлярного рака [161–163]. Ключевую роль в механизме сенсibiliзации клеток при действии ресвератрола играет увеличение внутриклеточной продукции АФК [164, 165]. Показано, что ресвератрол повышает чувствительность раковых клеток поджелудочной железы в результате активации Nrf2 и увеличения продукции АФК [166]. Важно отметить, что при радиотерапии и химиотерапии ресвератрол защищает нормальные клетки от радиационного повреждения и токсического действия химиотерапевтических препаратов [167, 168]. Защитные биологические эффекты ресвератрола связаны с его способностью индуцировать экспрессию генов антиоксидантной защиты в результате активации системы антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE [169–171].

Синтетические монофенольные серосодержащие антиоксиданты. Наряду с природными индукторами системы Keap1/Nrf2/ARE в настоящее время активно ведется поиск синтетических регуляторов антиоксидантной системы клетки.

Исследования структурно взаимосвязанного ряда бифункциональных монофенольных соединений, содержащих разное количество *орто-прет*-бутильных заместителей, а также сульфонатные и тиосульфонатные группы в *пара*-алкильных заместителях позволили выявить новые регуляторы антиоксидантной системы клетки с выраженными противовоспалительными свойствами *in vivo* [172]. Показано, что одним из активных синтетических индукторов сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE является фенольный антиоксидант 3-(3'-*прет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), содержащий тиосульфатную группу с лабильной S—S-связью (рис. 1) [172]. Обнаружено защитное действие ТС-13 при остром [173] и хроническом воспалении *in vivo* [174]. Показано также, что ТС-13 увеличивает выживаемость разных линий *Drosophila melanogaster* в условиях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂ и паракватом [175]. При этом в нормальных условиях введение в диету фенольного антиоксиданта ТС-13 повышает продолжительность жизни у самцов и самок долгоживущей линии *D. melanogaster Canton S*, но

снижает среднюю продолжительность жизни самцов *D. melanogaster* линии *lgl⁵⁵⁸OR/Cy*, содержащей в гетерозиготном состоянии рецессивную летальную мутацию опухолевого супрессора [175]. Неоднозначность действия антиоксиданта в различных экспериментальных условиях может быть опосредована особенностями клеточного редокс-гомеостаза, который определяет протекание ряда метаболических и регуляторных процессов и может влиять на биологическое действие редокс-активных соединений.

В опухолевых клетках в сравнении с нетрансформированными клетками наблюдается значительное повышение концентрации восстановителей, в результате которого функциональный ответ трансформированных клеток на внеклеточные сигналы отличается от реакции нормальных клеток [13, 62]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что одним из ключевых механизмов, ответственных за формирование устойчивости опухолевых клеток к действию противоопухолевых соединений, является ингибирование программы клеточной гибели вследствие повышения суммарной внутриклеточной концентрации восстановителей, количественно характеризуемой редокс-буферной емкостью [34]. Нами также показано, что синтетические монофенольные серосодержащие антиоксиданты с различной структурой боковых радикалов могут разнонаправленно регулировать редокс-свойства и химиорезистентность опухолевых клеток [34, 176]. Установлено, что при использовании 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтаната калия редокс-буферная емкость и резистентность опухолевых клеток к доксорубину увеличивается. При действии ТС-13 наблюдается уменьшение редокс-буферной емкости, что приводит к снижению лекарственной устойчивости опухолевых клеток [34]. При более высоких концентрациях ТС-13 индуцирует кратковременное повышение продукции АФК и активацию митохондриально-опосредованной гибели клеток [177].

В экспериментальной модели мышей с лимфолейкозом (Р-388) ТС-13 усиливал химиотерапевтическую активность цитостатика циклофосфана, используемого в субтерапевтической дозе, увеличивая индекс средней продолжительности жизни мышей с лейкемией со 196 до 283% по отношению к контролю [178]. При моделировании роста перевиваемой карциномы легких Льюис у мышей ТС-13 усиливал действие противоопухолевого агента доксорубина и снижал воспалительные процессы [179].

Исследования синтетических водорастворимых серосодержащих монофенолов, отличающихся от ТС-13 длиной углеводородной цепи алкилтиосульфатного заместителя, находящегося в *пара*-положении по отношению к

гидроксильной группе, количеством *трет*-бутильных *орто*-заместителей и варьированием фрагмента «S–S», показали, что активация аутофагии и активация системы Keap1/Nrf2/ARE зависят от структуры соединения [180]. Показано, что структурные особенности, определяющие противоопухолевую активность гидрофильных серосодержащих фенольных антиоксидантов, связаны с наличием тиосульфонатной группы в *пара*-пропильном заместителе соединения [181, 182]. При этом фенольные антиоксиданты, содержащие тиосульфонатную группу, не только проявляют противоопухолевую активность, но также повышают структурную устойчивость эритроцитов в условиях индуцированного окислительного стресса [182].

Таким образом, исследования модуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE открывают новые возможности для развития методов противоопухолевой терапии. Специфичность редокс-регуляции в опухолевых клетках позволяет рассматривать антиоксиданты направленного действия в качестве потенциальных корректоров свойств опухолевых клеток, включая их устойчивость к противоопухолевым препаратам. В сравнении с другими хемосенсибилизаторами важным преимуществом антиоксидантов – индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE – являются протекторные свойства этих соединений, проявляемые по отношению к нетрансформированным клеткам в условиях патологии и стресса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20У-001).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Kovacic and J. Osuna, *Curr. Pharm. Design.* **6** (3), 277 (2000).
2. H. Pelicano, D. Carney and P. Huang, *Drug Resist. Updat.* **7** (2), 97 (2004).
3. J. Wang and J. Yi, *Cancer Biol. Ther.* **7** (12), 1875 (2008).
4. H. Sies, C. Berndt and D. P. Jones, *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715 (2017).
5. P. Bragado, A. Armesilla, A. Silva, et al., *Apoptosis* **12** (9), 1733 (2007).
6. E. Kucuksayan, A. Cort, M. Timur et al., *J. Cell. Bioch.* **114** (7), 1685 (2013).
7. S. Y. Oh, Y. W. Sohn, J. W. Park, et al., *Mol. Cancer Ther.* **6** (8), 2178 (2007).
8. B. Bellosillo, N. Villamor, A. López-Guillermo, et al., *Blood* **98**, 2771 (2001).
9. X. Y. Pei, Y. Dai, S. Grant, et al., *Clin. Cancer Res.* **10**, 3839 (2004).
10. J. S. Ungerstedt, Y. Sowa, W. S. Xu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 673 (2005).
11. T. D. Shanafelt, Y. K. Lee, N. D. Bone, et al., *Blood* **105**, 2099 (2005).
12. D. Trachootham, J. Alexandre, and P. Huang, *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579 (2009).
13. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Н. Голубева и др., *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук*, № 2, 85 (2012).
14. C. Gorrini, I. S. Harris, and T. W. Mak, *Nat. Rev. Drug Discov.* **12** (12), 931 (2013).
15. G. T. Wondrak, *Antiox. Redox Signal.* **11**, 3013 (2009).
16. K. L. Maliszka and B. B. Hasinoff, *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 905 (1996).
17. A. Kuznetsov, R. Margreiter, A. Amberger et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1144 (2011).
18. G. Varbio, B. Veres, F. Gallyas, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 548 (2001).
19. J. H. Ko, J. Sethi, J. Y. Um, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **18** (12), 2589 (2017).
20. J. Gutteridge and F. Ziai-Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1354 (1981).
21. W. Gao, F. Xiao, X. Wang, et al., *Apoptosis* **18** (10), 1201 (2013).
22. P. A. Ma, H. Xiao, C. Yu, et al., *Nano Lett.* **17** (2), 928 (2017).
23. A. B. Uzdensky, O. Y. Dergacheva, A. A. Zhavoronkova, et al., *Life Sci.* **74**, 2185 (2004).
24. М. А. Каплан, А. М. Шубина, И. А. Замулаева и др., *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика* **3** (4), 18 (2014).
25. S. Wu and D. Xing, *J. X-ray Sci. Technol.* **20** (3), 363 (2012).
26. S. I. Hashemy, J. S. Ungerstedt, F. Zahedi Avval, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 10691 (2006).
27. C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **42** (6), 872 (2007).
28. J. Lu, E. Chew and A. Holmgren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12288 (2007).
29. J. G. Villablanca, S. L. Volchenbom, H. Cho, et al., *Pediatr. Blood Cancer* **63**, 1349 (2016).
30. P. Huang, L. Feng, E. A. Oldham, et al., *Nature* **407**, 390 (2000).
31. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика* **64** (3), 552 (2019).
32. G. Pani, R. Colavitti, B. Bedogni, et al., *Curr. Med. Chem.* **11** (10), 1299 (2004).
33. J. Roy, J. M. Galano, T. Durand, et al., *FASEB J.* **31** (9), 3729 (2017).

34. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., *Биофизика* **62** (6), 1142 (2017).
35. Н. К. Зенков, П. М. Кожин, А. В. Вчерашняя и др., *Сиб. науч. мед. журн.* **39** (9), 11 (2019).
36. T. W. Kensler, N. Wakabayashi, and S. Biswal, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 89 (2007).
37. K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236** (2), 313 (1997).
38. M. K. Kwak, N. Wakabayashi, K. Itoh, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 8135 (2003).
39. K. C. Wu, J. Y. Cui, and C. D. Klaassen, *Toxicol. Sci.* **123**, 590 (2011).
40. Y. Mitsuishi, K. Taguchi, Y. Kawatani, et al., *Cancer Cell* **22**, 66 (2012).
41. X. J. Wang, Z. Sun, N. F. Villeneuve, et al., *Carcinogenesis* **29**, 1235 (2008).
42. E. Sun, H. Erb, and T. H. Murphy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**, 371 (2005).
43. P. Canning, F. J. Sorrell, and A. N. Bullock, *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 101 (2015).
44. K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, et al., *Genes Cells* **8**, 379 (2003).
45. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова и В. О. Ткачев, *Биохимия* **78**, 27 (2013).
46. M. Kobayashi, L. Li, N. Iwamoto, et al., *Mol. Cell Biol.* **29**, 493 (2009).
47. A. Cuadrado, G. Manda, A. Hassan, et al., *Pharmacol. Rev.* **70**, 348 (2018).
48. A. Cuadrado, A. I. Rojo, G. Wells, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **18** (4), 295 (2019).
49. L. O. Klotz, C. Sánchez-Ramos, I. Prieto-Arroyo, et al., *Redox biology* **6**, 51 (2015).
50. D. Samanta and G. L. Semenza, *Redox Biol.* **13**, 331 (2017).
51. M. Yamamoto, T. W. Kensler, and H. Motohashi, *Physiol. Rev.* **98** (3), 1169 (2018).
52. Е. Б. Меньщикова, В. О. Ткачев и Н. К. Зенков, *Молекуляр. биология* **44** (3), 389 (2010).
53. S. Crunkhorn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 96 (2012).
54. P. Deshmukh, S. Unni, G. Krishnappa, et al., *Biophys. Rev.* **9** (1), 41 (2017).
55. M. C. Lu, J. A. Ji, Z. Y. Jiang, et al., *Med. Res. Rev.* **36**, 924 (2016).
56. L. Saso and O. Firuzi, *Curr. Drug Targets* **15** (13), 1177 (2014).
57. A. T. Dinkova-Kostova, J. W. Fahey, and P. Talalay, *Methods Enzymol.* **382**, 423 (2004).
58. X. J. Wang, J. D. Hayes, L. G. Higgins, et al., *Chem. Biology* **17** (1), 75 (2010).
59. С. Н. Черенкевич, Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и др., *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук*, № 1, 92 (2013).
60. I. I. C. Chio and D. A. Tuveson, *Trends Mol. Medicine* **23** (5), 411 (2017).
61. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биофизика* **56** (3), 465 (2011).
62. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Б. Меньщикова и др., *Докл. НАН Беларуси* **59** (3), 82 (2015).
63. S. Kovacs, P. R. Angelova, K. M. Holmstrom, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 794 (2015).
64. S. N. Zucker, E. E. Fink, A. Bagati, et al., *Mol. Cell* **53**, 916 (2014).
65. M. Ying, J. Tilghman, Y. Wei, et al., *J. Biol. Chem.* **289**, 32742 (2014).
66. E. E. Fink, S. Moparthy, A. Bagati, et al., *Cell Rep.* **25** (1), 212 (2018).
67. B. Chhunchha, E. Kubo, and D. P. Singh, *Cells* **8** (10), 1159 (2019).
68. E. Kubo, B. Chhunchha, P. Singh, et al., *Sci. Rep.* **7**, 14130 (2017).
69. E. J. Calabrese, K. A. Bachmann, A. J. Bailer, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**, 122 (2007).
70. L. M. Solis, C. Behrens, W. Dong, et al., *Clin. Cancer Res.* **16**, 3743 (2010).
71. M. B. Sporn and K. T. Liby, *Nat. Rev. Cancer* **12**, 564 (2012).
72. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин и Н. В. Кандалинцева, *Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине (LAP LAMBERT)*, 2012).
73. D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. Spencer, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **18** (14), 1818 (2013).
74. T. G. Son, S. Camandola, and M. P. Mattson, *Neuro-molec. Med.* **10** (4), 236 (2008).
75. A. J. Vargas and R. Burd, *Nutr. Rev.* **68** (7), 418 (2010).
76. V. Stepanic, A. C. Gasparovic, K. G. Troselj, et al., *Curr. Top. Med. Chem.* **15** (5), 496 (2015).
77. K. Sahin, M. Tuzcu, H. Gencoglu, et al., *Life sci.* **87** (7–8), 240 (2010).
78. X. Du, J. Yu, X. Sun et al., *Mol. Med. Rep.* **17** (6), 7952 (2018).
79. T. Yamamoto, S. Hsu, J. Lewis, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307** (1), 230 (2003).
80. T. Nakazato, K. Ito, Y. Ikeda, et al., *Clin. Cancer Res.* **11** (16), 6040 (2005).
81. S. Qanungo, M. Das, S. Haldar, et al., *Carcinogenesis* **26** (5), 958 (2005).
82. G. X. Li, Y. K. Chen, Z. Hou, et al., *Carcinogenesis* **31** (5), 902 (2010).
83. C. Chen, G. Shen, V. Hebbar, et al., *Carcinogenesis* **24** (8), 1369 (2003).
84. M. Nihal, N. Ahmad, H. Mukhtar, et al., *Int. J. Cancer* **114** (4), 513 (2005).
85. M. S. Baliga, S. Meleth, and S. K. Katiyar, *Clin. Cancer Res.* **11** (5), 1918 (2005).
86. Y. Zhang, W. Duan, L. Owusu, et al., *Int. J. Mol. Med.* **35** (1), 117 (2015).
87. E. Lecumberri, Y. M. Dupertuis, R. Miralbell, et al., *Clin. Nutrition* **32** (6), 894 (2013).
88. M. E. Stearns, M. D. Amatangelo, D. Varma, et al., *Am. J. Pathol.* **177** (6), 3169 (2010).
89. J. Qiao, C. Gu, W. Shang, et al., *Food Chem. Toxicol.* **49** (6), 1410 (2011).
90. M. M. Chan, K. J. Soprano, K. Weinstein, et al., *J. Cell Physiol.* **207** (2), 389 (2006).
91. T. C. Lee, I. C. Cheng, J. J. Shue, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **250** (1), 69 (2011).
92. B. Bannerman, L. Xu, M. Jones, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **68** (5), 1145 (2011).

93. J. T. Hwang, J. Ha, I. J. Park, et al., *Cancer Lett.* **247** (1), 115 (2007).
94. J. D. Lambert and R. J. Elias, *Arch. Biochem. Biophys.* **501** (1), 65 (2010).
95. T. Enkhbat, M. Nishi, K. Yoshikawa, et al., *Anticancer Res.* **38** (11), 6247 (2018).
96. B. Annabi, Y. T. Lee, C. Martel, et al., *Cancer Biol. Ther.* **2** (6), 642 (2003).
97. W. Li, S. Nie, M. Xie, et al., *J. Agric. Food Chem.* **58** (16), 8977 (2010).
98. J. Zheng, H. C. Lee, M. M. Bin Sattar, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **652** (1-3), 82 (2011).
99. S. A. Khan, S. Priyamvada, W. Khan, et al., *Pharmacol. Res.* **60** (5), 382 (2009).
100. N. C. Schmitt, E. W. Rubel, and N. M. Nathanson, *J. Neurosci.* **29** (12), 3843 (2009).
101. N. Sriram, S. Kalayarasan, and G. Sudhandiran, *Chem. Biol. Interact.* **180** (2), 271 (2009).
102. N. Sriram, S. Kalayarasan, and G. Sudhandiran, *Pulm. Pharmacol. Ther.* **22** (3), 221 (2009).
103. S. Patel, A. Acharya, R. S. Ray, et al., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1**, 1 (2019).
104. B. Salehi, Z. Stojanović-Radić, J. Matejić, et al., *Eur. J. Med. Chem.* **163**, 527 (2019).
105. J. Wu, Q. Li, X. Wang, et al., *PLoS One* **8**, 59843 (2013).
106. B. S. Vinod, T. T. Maliekal, and R. J. Anto, *Antiox. Redox Signal.* **18** (11), 1307 (2013).
107. E. Willenbacher, S. Z. Khan, S. C. A. Mujica, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **20** (8), 1808 (2019).
108. F. Thayyullathil, S. Chathoth, A. Hago, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1403 (2008).
109. C. Syng-Ai, A. L. Kumari, and A. Khar, *Mol. Cancer Ther.* **3** (9), 1101 (2004).
110. P. Javvadi, A. T. Segan, S. W. Tuttle, et al., *Mol. Pharmacol.* **73** (5), 1491 (2008).
111. S. Lev-Ari, A. Vexler, A. Starr, et al., *Cancer Invest.* **25**, 411 (2007).
112. B. Kunnumakkara, P. Diagaradjane, P. Anand, et al., *Int. J. Cancer* **125**, 2187 (2009).
113. T. C. Hour, J. Chen, C. Y. Huang, et al., *Prostate* **51**, 211 (2002).
114. B. Du, L. Jiang, Q. Xia, et al., *Chemotherapy* **52**, 23 (2006).
115. M. A. Papież, W. Krzyściak, K. Szade, et al., *Drug Des. Devel. Ther.* **10**, 557 (2016).
116. S. V. Bava, V. T. Puliappadamba, A. Deepti, et al., *J. Biol. Chem.* **280**, 6301 (2005).
117. C. N. Sreekanth, S. V. Bava, E. Sreekumar, et al., *Oncogene* **30**, 3139 (2011).
118. B. H. Park, J. E. Lim, H. G. Jeon, et al., *Oncotarget* **7** (39), 63870 (2016).
119. S. J. Chatterjee and S. Pandey, *Cancer Biol. Ther.* **11**, 216 (2011).
120. Y. F. Huang, D. J. Zhu, X. W. Chen, et al., *Oncotarget* **8** (25), 40264 (2017).
121. M. Cruz-Correa, D. A. Shoskes, P. Sanchez, et al., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 1035 (2006).
122. S. Fujisawa, T. Atsumi, M. Ishihara, et al., *Anticancer Res.* **24**, 563 (2004).
123. K. Mortezaee, E. Salehi, H. Mirtavoos-Mahyari, et al., *J. Cell Physiol.* **234** (8), 12537 (2019).
124. Q. Chen, Y. Wang, K. Xu, et al., *Oncol. Rep.* **23** (2), 397 (2010).
125. Z. Chang, J. Xing, and X. Yu, *Tumor Biol.* **35** (1), 753 (2014).
126. J. Y. Kim, T. J. Cho, B. H. Woo, et al., *Arch. Oral Biol.* **57**, 1018 (2012).
127. Y. J. Lee, N. Y. Kim, Y. A. Suh, et al., *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **15**, 1 (2011).
128. Y. Chen, E. McMillan-Ward, J. Kong, et al., *J. Cell Sci.* **120**, 4155 (2007).
129. M. B. Azad, Y. Chen, and S. B. Gibson, *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 777 (2009).
130. M. C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **8** (9), 741 (2007).
131. B. Chen, Y. Zhang, Y. Wang, et al., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **143**, 11 (2014).
132. M. Mileo, D. Di Venere, S. Mardente, et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020** (3), 1 (2020).
133. Q. Yao, X. Ye, L. Wang, et al., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 2342 (2013).
134. S. Palipoch, C. Punsawad, P. Koomhin, et al., *Tract. BMC Complement. Altern. Med.* **14**, 111 (2014).
135. X. Chen, J. Wang, Z. Fu, et al., *Sci. Rep.* **7** (1), 17724 (2017).
136. N. I. Said Salem, M. M. Noshay, and A. A. Said, *Food Chem. Toxicol.* **105**, 370 (2017).
137. M. Ashrafizadeh, Z. Ahmadi, R. Mohamamdinejad, et al., *Curr. Mol. Med.* **20** (2), 116 (2020).
138. L. Das and M. Vinayak, *PLoS One* **10** (4), 1 (2015).
139. Y. P. Shao, Q. Zhou, Y. P. Li, et al., *NeuroUrol. Urodyn.* **37** (8), 2470 (2018).
140. C. K. Sing, M. A. Ndiaye, and N. Ahmad, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* **1852** (6), 1178 (2015).
141. F. Levi, C. Pasche, F. Lucchini, et al., *Eur. J. Cancer Prev.* **14** (2), 139 (2005).
142. M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, et al., *Science* **275** (5297), 218 (1997).
143. C. H. Chang, C. Y. Lee, C. C. Lu, et al., *Int. J. Oncol.* **50** (3), 873 (2017).
144. D. Martinez-Martinez, A. Soto, B. Gil-Araujo, et al., *Food Chem. Toxicol.* **124**, 273 (2019).
145. L. J. Ma, W. P. Li, R. X. Wang, et al. *Int. J. Oncol.* **47** (4), 1460 (2015).
146. F. F. Lang, Z. Y. Qin, F. Li, et al., *PLOS One* **10** (6), 1 (2015).
147. Y. Tian, W. Song, D. Li, et al., *Onco Targets Ther.* **12**, 8601 (2019).
148. L. Zhang, J. Li, J. Ma, et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1 (2016).
149. H. F. Liao, C. D. Kuo, Y. C. Yang, et al., *J. Radiat. Res.* **46** (4), 387 (2005).
150. H. Luo, L. Wang, B. A. Schulte, et al., *Int. J. Oncol.* **43** (6) 1999 (2013).
151. W. P. Li, Y. Shi, R. X. Wang, et al., *Int. J. Oncol.* **53** (5), 2123 (2018).
152. Leon-Galicia, J. Diaz-Chavez, M. E. Albino-Sanchez, et al., *Oncol. Rep.* **39** (6), 3025 (2018).

153. S. K. Singh, S. Banerjee, E. P. Acosta, et al., *Oncotarget* **8** (10), 17216 (2017).
154. S. H. Kweon, J. H. Song, and T. S. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395** (1), 104 (2010).
155. J. Díaz-Chávez, M. A. Fonseca-Sánchez, E. Arechaga-Ocampo, et al., *PLoS One* **8**, 1 (2013).
156. A. R. Jazirehi and B. Bonavida, *Mol. Cancer Ther.* **3**, 71 (2004).
157. Y. Chan, M. S. Phoo, M. V. Clement, et al., *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1305 (2008).
158. Mondal and L. L. Bennett, *Biomed. Pharmacother.* **84**, 1906 (2016).
159. Q. Li, Y. Yue, L. Chen, et al., *Front. Pharmacol.* **9**, 334 (2018).
160. R. Popat, T. Plesner, F. Davies, et al., *Br. J. Haematol.* **160**, 714 (2013).
161. D. C. Liu, B. Z. He, L. D. Lin, et al., *Drug Chem. Toxicol.* **42** (3), 328 (2019).
162. E. Talero, J. Avila-Roman, and V. Motilva, *Curr. Pharm. Design.* **18** (26), 3939 (2012).
163. Q. Du, B. Hu, H. M. An, et al., *Oncol. Rep.* **29** (5), 1851 (2013).
164. F. M. Santandreu, A. Valle, J. Oliver, et al., *Cell. Physiol. Biochem.*, **28** (2), 219 (2011).
165. H. Luo, A. Yang, B. A. Schulte, et al., *PLoS One* **8** (3), 1 (2013).
166. L. Cheng, B. Yan, K. Chen, et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018** (12), 1 (2018).
167. Mortezaee, M. Najafi, B. Farhood, et al., *Curr. Cancer Drug Targ.* **20**, 1 (2020).
168. Q. Xiao, W. Zhu, W. Feng, et al., *Front Pharmacol.* **9**, 1534 (2019).
169. Z. Ungvari, Z. Bagi, A. Feher, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299** (1), H18 (2010).
170. X. Zhou, Y. Zhao, J. Wang, et al., *Biochem. Pharmacol.* **155**, 252 (2018).
171. V. L. Truong, M. Jun, and W. S. Jeong, *Biofactors* **44** (1), 36 (2018).
172. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова, Н. В. Кандалинцева и др., *Биохимия* **72**, 790 (2007).
173. Е. Б. Меньщикова, В. О. Ткачев, Н. К. Зенков и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **155**, 344 (2013).
174. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, А. Е. Лемза и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **155**, 305 (2013).
175. Н. Я. Вайсман, Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков и др., *Успехи геронтологии* **24**, 591 (2011).
176. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **2** (1), 411 (2017).
177. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Н. К. Зенков и др., *Биофизика* **60** (1), 120 (2015).
178. Т. Н. Богатыренко, Н. В. Кандалинцева, Т. Е. Сашенкова и др., *Изв. РАН. Сер. Хим.* **4**, 700 (2018).
179. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, П. М. Кожин и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **166** (11), 592 (2018).
180. Е. Б. Меньщикова, А. В. Чечушков, П. М. Кожин и др., *Цитология* **60** (12), 1008 (2018).
181. П. И. Гайнутдинов, П. М. Кожин, А. В. Чечушков и др., *Сиб. науч. мед. журн.* **38** (1), 22 (2018).
182. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **4** (2), 253 (2019).

Chemosensibilization of Tumor Cells by Phenolic Antioxidants: the Role of Transcription Factor Nrf2

G.G. Martinovich*, I.V. Martinovich*, A.V. Vcherashniaya*, N.K. Zenkov,
E.B. Menshchikova**, and S.N. Cherenkevich***

**Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus*

***Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia*

Pharmacological modification of the redox properties of tumor cells is a promising approach to enhance the efficiency of antitumor therapy. Currently, the transcription factor Nrf2 is considered as a new target for the development of selective chemosensitizers. Nrf2 plays a key role in regulation of cellular redox homeostasis against stress and during adaptation processes. Many natural and synthetic phenolic antioxidants are inducers of Nrf2 transcriptional activity. Due to differences in Nrf2 transcriptional activity between normal and tumor cells, phenolic antioxidants at certain concentrations act as biological regulators the antioxidant activity of which has two different effects: in tumor cells they promote the development of oxidative stress and enhance the effect of antitumor drugs, in normal cells these antioxidants exhibit protective properties. The review discusses the possible molecular mechanisms of action and the prospects for the clinical use of natural and synthetic phenolic antioxidants in antitumor therapy.

Keywords: phenolic antioxidants, reactive oxygen species, transcription factor Nrf2, tumor cells, antitumor therapy, chemosensitizers

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА (АУРУМАКРИЛ) НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, Л.А. Островская*, О.О. Рябая**, Н.В. Блюхтерова*, К.А. Абзаева***

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

**Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

***Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН, 664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1
E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принята к публикации 07.08.2020 г.

Проведено исследование цитотоксического действия потенциального противоопухолевого препарата аурумакрил (полиакрилат золота) на фибробласты кожи человека (линия hFB-hTERT6) *in vitro*. Установлено, что аурумакрил обладает значительной цитотоксичностью в отношении фибробластов кожи человека. Максимальный цитотоксический эффект препарата – гибель 75% клеток – отмечается при применении аурумакрила в концентрации 0.125 мг/мл. Концентрация препарата, вызывающая гибель 50% фибробластов кожи человека (IK_{50}), составляет величину, равную 0.09 мг/мл.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), цитотоксическая активность, культура клеток фибробластов кожи человека hFB-hTERT6.

DOI: 10.31857/S0006302920060071

Как известно, практически все цитостатики, применяемые в противоопухолевой химиотерапии, обладают цитостатическим эффектом не только в отношении опухолевых клеток, но также и способностью поражать в различной степени нормальные, в основном быстро пролиферирующие клетки. В связи с этим обязательный комплекс доклинического изучения новых потенциальных противоопухолевых препаратов включает в себя изучение их цитотоксического действия на нормальные клетки.

Моделями для таких исследований, проводимых *in vitro*, служат различные линии культур нормальных клеток человека. Наиболее часто для этих целей используются культуры фибробластов кожи или легких человека.

В течение последних нескольких лет нами интенсивно исследуются противоопухолевые свойства полиакрилата золота (аурумакрила) – препарата, относящегося к золотосодержащим комплексным соединениям, представляющим новый для противоопухолевой химиотерапии класс цитостатиков. Особый интерес золотосодержащие вещества вызывают в связи с тем, что мишени, на ко-

торые направлено их действие, и механизмы его реализации отличают эти соединения от известных, клинически апробированных лекарственных средств, применяемых в онкологии [1–3].

В многочисленных экспериментальных исследованиях установлено, что аурумакрил обладает существенной противоопухолевой активностью. Препарат подавляет рост перевиваемых опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома толстой кишки Акатол, аденокарцинома молочной железы Ca-755) *in vivo* и проявляет выраженный цитотоксический эффект в отношении ряда клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы, легких, толстой кишки, меланомы) *in vitro* [4].

Показано, что цитотоксический эффект аурумакрила в основном обусловлен наличием в его молекуле иона трехвалентного золота (Au^{3+}) [5].

Полученные к настоящему времени данные можно расценивать как указание на перспективность дальнейшего экспериментального изучения аурумакрила в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

В настоящей работе, в плане продолжения доклинического изучения аурумакрила, представ-

Сокращение: ДМСО – диметилсульфоксид.

лены результаты исследования цитотоксического действия препарата на нормальные фибробласты кожи человека в опытах *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат. Исследуемый препарат с условным названием аурумакрил представляет собой неполную золотую соль полиакриловой кислоты, содержащей 8.03 масс.% Au, и отвечает общей формуле $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOO-AuCl_3H-)_m$, где $n = 1263$, $m = 124$. Препарат представляет собой стекловидные пластинки желтого цвета, ограниченно растворимые в воде.

Исследование проведено с использованием раствора аурумакрила в диметилсульфоксиде (ДМСО). Исходный раствор аурумакрила в 100%-м ДМСО (максимальная растворимость) с концентрацией 20 мг/мл разводили в среде DMEM (арт. 41965039, ThermoFisher Scientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) для достижения используемых рабочих концентраций препарата, варьируемых в пределах от 2.0 до 0.0039 мг/мл. При этом концентрация ДМСО в конечном растворе изменялась в диапазоне 10% – 0.0195% соответственно. Одновременно с действием препарата исследовали эффект растворителя (ДМСО) в тех же концентрациях.

Оценка цитотоксического эффекта аурумакрила проведена при применении препарата в концентрациях 0.25, 0.125, 0.06 и 0.03 мг/мл. Концентрация ДМСО, использованного в качестве растворителя при приготовлении растворов аурумакрила в указанных концентрациях, составляла 1.25, 0.63, 0.32 и 0.16% соответственно. Выбор использованных концентраций аурумакрила обусловлен необходимостью применения растворителя в минимально возможных концентрациях, позволяющих минимизировать цитотоксический эффект ДМСО.

Культура клеток. В качестве тест-модели в опытах *in vitro* служила культура фибробластов кожи человека линии hFB-hTERT6, полученная из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Оценка цитотоксического эффекта. Цитотоксичность аурумакрила оценивали путем определения доли выживших клеток в культуре после воздействия препарата по отношению к контрольным препаратам с использованием стандартного МТТ-теста [6].

Клетки ($8 \cdot 10^4$ клеток на лунку) вносили в 96-луночный планшет в полной среде DMEM (арт. 41965039, «ThermoFisherScientific», США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки,

2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия), в конечном объеме 200 мкл на лунку и помещали в CO₂-инкубатор.

Через 24 ч культивирования после замены среды в культуре осуществлялось внесение аурумакрила или ДМСО (в указанных выше концентрациях в квадриплетах) в содержащие клетки лунки. В контрольную группу клеток препарат или ДМСО не вносили.

Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ-реагента, представляющего собой 3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (AppliChem, Германия), в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Клетки инкубировали в присутствии МТТ-реагента в течение 3 ч, затем после отбора среды добавляли к ним по 200 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана (37°C, 10 мин при встряхивании).

В качестве показателя цитотоксического действия аурумакрила служило соотношение между числом выживших клеток в тестируемой, подвергавшейся воздействию препарата, и контрольной группах клеток, выраженное в процентах.

Доля выживших клеток определялась в соответствии с показателем оптической плотности раствора формазана, измеряемой спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе Multiscan FC (ThermoScientific, США).

Выживаемость клеток, подвергавшихся воздействию аурумакрила, определяли в соответствии с формулой: $(OP_{\text{экспериментальной группы}}/OP_{\text{контрольной группы}}) \times 100\%$, где ОП – оптическая плотность раствора.

Для оценки вклада собственной окраски аурумакрила в оптическую плотность раствора был проведен аналогичный тест с внесением препарата и всех реагентов в аналогичных условиях в среду, не содержащую клеток. Показано, что вклад препарата в оптическую плотность раствора при измерении на используемой длине волны крайне мал (около 3% от оптической плотности для контрольной группы) и не зависит от концентрации препарата, что позволяет пренебречь этой крайне малой величиной.

Для того чтобы полностью исключить из оценки цитотоксичности аурумакрила возможный цитотоксический эффект растворителя (ДМСО), были рассчитаны доли погибших клеток при изученных дозах препарата с поправкой на долю клеток, которые могли погибнуть в результате действия одного ДМСО в соответствующих концентрациях.

Результаты экспериментов представлены в виде зависимости «доза–эффект», характеризующей цитотоксическое действие аурумакрила и

Таблица 1. Влияние аурумакрила (AU) на выживаемость фибробластов кожи человека *in vitro*

Доза аурумакрила, мг/мл (концентрация ДМСО %)	Доля выживших клеток, %		Доля клеток, погибших под влиянием аурумакрила, за вычетом эффекта ДМСО, %
	Аурумакрил в растворе ДМСО	ДМСО	
0.25 мг/мл (ДМСО 1.25%)	6.0 ± 0.0	59.3 ± 18.4	53.3 ± 19.8
0.125 мг/мл (ДМСО 0.63%)	9.3 ± 2.6	84.7 ± 4.2	75.4 ± 5.0
0.06 мг/мл (ДМСО 0.31%)	67.3 ± 13.8	78.6 ± 6.0	11.3 ± 2.7
0.03 мг/мл (ДМСО 0.16%)	93.3 ± 9.1	87.7 ± 7.7	0

позволяющей определить показатель цитотоксичности препарата в отношении изучавшейся культуры фибробластов кожи человека $ИК_{50}$ (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ Statistica и Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние аурумакрила на выживаемость фибробластов кожи человека при применении различных доз препарата охарактеризовано данными, представленными в табл. 1 и на рисунке.

Как видно из представленных данных, аурумакрил обладает значительной цитотоксичностью в отношении фибробластов кожи человека. Максимальный цитотоксический эффект препарата – гибель 75% клеток – отмечается при применении аурумакрила в концентрации 0.125 мг/мл (табл. 1, рисунок).

Расчетное значение концентрации препарата, вызывающей гибель 50% клеток ($ИК_{50}$), составляет величину, равную 0.09 мг/мл (рисунок).

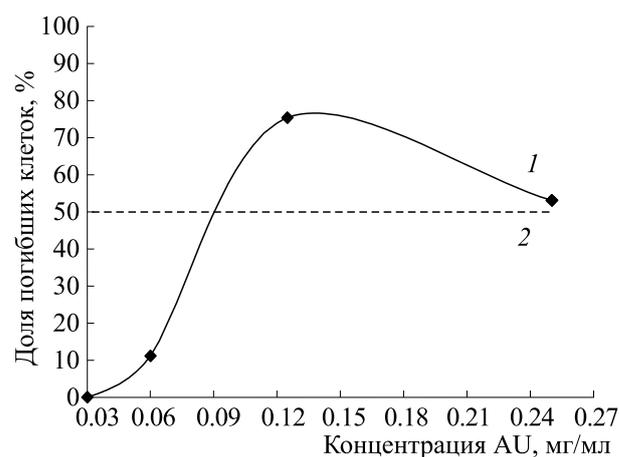
Ранее в аналогичных экспериментах нами была исследована цитотоксичность аурумакрила в отношении клеток некоторых опухолей человека (рак легкого A549, молочной железы MCF-7, толстой кишки HCT116, меланома Mel Mo). Были обнаружены существенные различия в чувствительности к аурумакрилу клеток опухолей различного гистогенеза, которая для исследовавшихся опухолей уменьшалась в ряду «рак легкого – меланома – рак молочной железы – рак толстой кишки» [7].

Цитотоксичность аурумакрила в отношении фибробластов кожи человека и исследовавшихся ранее опухолевых клеток, охарактеризованная показателем $ИК_{50}$, сопоставлена в табл. 2. Согласно общепринятым критериям оценки цитотоксического эффекта, лекарственное средство из нового класса соединений считается цитотоксическим активным при значениях $ИК_{50} \leq 100$ мкг/мл [6].

Как видно из данных, представленных в табл. 2, аурумакрил оказывает примерно одинаковое цитотоксическое действие на фибробласты кожи человека ($ИК_{50} = 90$ мкг/мл) и клетки рака молочной железы и меланомы ($ИК_{50} = 90$ и 80 мкг/мл соответственно). По сравнению с фибробластами кожи клетки рака легкого более чувствительны ($ИК_{50} = 60$ мкг/мл), а клетки рака толстой кишки – менее чувствительны ($ИК_{50} = 180$ мкг/мл) к цитотоксическому эффекту аурумакрила (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление цитотоксичности экспериментальных противоопухолевых агентов в отношении опухолевых и нормальных клеток рассматривается как один из показателей возможной селективности противоопухолевого действия ис-



Влияние аурумакрила на гибель фибробластов кожи человека *in vitro*: 1 – изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации препарата; 2 – расчетное значение концентрации препарата, вызывающей гибель 50% клеток ($ИК_{50}$). По оси абсцисс – концентрация аурумакрила, мг/мл; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

Таблица 2. Значения дозы аурумакрила, вызывающей гибель 50% клеток ($ИК_{50}$) для ряда клеточных культур опухолей человека и фибробластов кожи человека

Клеточная линия	$ИК_{50}$ (мкг/мл)
Рак легкого A549	60
Меланома Mel Mo	80
Рак молочной железы MCF-7	90
Рак толстой кишки HCT116	180
Фибробласты кожи hFB-hTERT6	90

следуемого агента на опухоль. Естественно, исследование только на фибробластах кожи не следует рассматривать как достоверный показатель цитотоксичности агента по отношению ко всем нормальным клеткам, для этого необходимо изучить действие агента на нормальные клетки разных тканей.

В то же время следует заметить, что селективность противоопухолевого действия различных соединений в значительной степени зависит не только от их непосредственной цитотоксичности, выявляемой в экспериментах *in vitro*, но и от фармакокинетики и метаболизма изучаемых агентов *in vivo*.

Установление цитотоксичности исследуемого агента в отношении любых нормальных клеток может указывать и на возможность развития нежелательных побочных явлений при применении исследуемого агента – потенциального лекарственного средства. Это следует учитывать при проведении доклинических токсикологических исследований, которые в конечном итоге и определяют вероятность и тяжесть токсических реакций на введение препарата и возможность его клинического изучения с точки зрения безопасности и переносимости.

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что аурумакрил может оказывать цитотоксическое действие на нормальные клетки.

В этом отношении аурумакрил, по-видимому, не отличается от других комплексных золотосодержащих веществ различного химического строения, которые интенсивно исследуются в последние годы в качестве новых для химиотерапии потенциальных противоопухолевых средств [1].

Так, например, препарат ауранофин (мономерный комплекс, состоящий из третичного фосфина и координированной с золотом тиоглюкозы), проходящий клинические испытания в качестве противоопухолевого препарата, обладает одинаковой цитотоксичностью по отношению к опухолевым и нормальным клеткам. Для клеток

рака молочной железы человека линии CMF-7 $ИК_{50}$ ауранофина составляет 13.1 мкМ, а для фибробластов легких человека линии GM07492 – 15.4 мкМ [8]. Следует отметить, что, несмотря на значительную цитотоксичность препарата по отношению к нормальным фибробластам, ауранофин в течение многих лет применяется в качестве лекарственного средства для лечения больных ревматоидным артритом, а с 2012 г. и для лечения амибиоза [1].

Цитотоксический эффект биядерных комплексов фосфана, включающих ион одновалентного золота, был одинаков по отношению к первичным фибробластам человека и к клеткам рака толстой кишки линии HCT116 [9].

Обращает на себя внимание значительное цитотоксическое действие DMSO, обнаруженное в наших экспериментах. Даже при концентрации DMSO в культуральной среде, равной 0.16%, которую принято считать не цитотоксической, мы регистрировали заметную гибель фибробластов. Возможно, использованная в проведенных экспериментах линия фибробластов кожи человека имеет повышенную чувствительность к цитотоксическому действию разных агентов.

Значительная цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам свойственна многим конвенциональным противоопухолевым препаратам, широко применяемым в клинической практике, причем для некоторых препаратов она может даже превосходить цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам.

Показано, что $ИК_{50}$ препарата цисплатины для клеток рака молочной железы человека CMF-7 составляет 111.3 мкМ, а для фибробластов легких человека линии GM07492-A – 69.0 мкМ [8]. Установлено также, что фибробласты периодонтальной связки гораздо более чувствительны к цитотоксическому действию цисплатины ($ИК_{50} = 0,2$ мкМ), чем клетки разных опухолей. Так, $ИК_{50}$ составляет для клеток рака молочной железы линии T47D 13.6 мкМ, для клеток рака легкого линии A549 – 3.7 мкМ, для клеток хронического лимфолейкоза линии K562 – 8.8 мкМ, для рака поджелудочной железы линии PAN – 2.1 мкМ. Только клетки рака кожи оказались сопоставимы по чувствительности к цитотоксическому эффекту цисплатины с чувствительностью фибробластов ($ИК_{50} = 0.2$ мкМ) [10].

Чувствительность к цитотоксическому действию доксорубина клеток нормального эпителия молочной железы линии MCF-10A ($ИК_{50}$ составляет 0.55 мкМ) также значительно превосходит чувствительность к этому, одному из наиболее часто употребляемых в клинике противоопухолевому препарату, разных опухолевых клеток – гепатоцеллюлярного рака линии HepG2

($IK_{50} = 28.04$ мкМ), рака молочной железы линии MCF-7 ($IK_{50} = 6.0$ мкМ), рака головы-шеи линии FaDu ($IK_{50} = 1.27$ мкМ) [11].

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают наличие значительной цитотоксичности у полиакрилата золота и при этом свидетельствуют об отсутствии преимущественной по сравнению с нормальными клетками непосредственной цитотоксичности препарата в отношении опухолевых клеток. Возникает вопрос — не является ли цитотоксичность этого соединения в отношении фибробластов указанием на вероятную бесперспективность его дальнейшего изучения в качестве потенциального противоопухолевого средства. Очевидно, что ответ на этот вопрос должен быть отрицательным, поскольку, как показано выше, цитотоксичность в отношении фибробластов не явилась препятствием для введения в широкую клиническую практику эффективных противоопухолевых препаратов, в частности таких, как цисплатина и доксорубин.

Представляется, что не следует рассматривать выявляемую в опытах *in vitro* непосредственную цитотоксичность в отношении фибробластов в качестве указания на отсутствие селективности действия препарата по отношению к опухоли *in vivo*. Известно, что важную роль в обеспечении селективности фармакологического действия лекарственного средства играет фармакокинетика препарата *in vivo*, которая может обеспечить более или менее полную селективность попадания препарата (его активной формы) в пораженную ткань и в клетки-мишени.

Ранее нами при изучении фармакокинетики аурумакрила у мышей с перевиваемой карциномой Льюис было обнаружено, что после внутрибрюшинного введения аурумакрила он значительно быстрее попадает в опухоль, по сравнению с нормальными тканями. Максимум концентрации препарата в опухоли отмечен через 24 ч после его введения, а в тканях нормальных органов — через 48 ч. Такие различия в достижении максимальной концентрации аурумакрила между опухолевыми и нормальными тканями могут оказаться существенными для реализации противоопухолевого эффекта препарата [12].

Подобное предположение обусловлено тем, что, как было показано в опытах *in vitro* с культурой клеток рака молочной железы MCF-7, цитотоксичность аурумакрила прямо пропорциональна содержанию в препарате иона трехвалентного золота [5]. Известно, что в физиологических условиях ионы одновалентного или трехвалентного золота, входящие в состав комплексных золотосодержащих соединений, обладающих противоопухолевым эффектом, подвергаются быстрому восстановлению [2]. Можно полагать, что

аурумакрил не является исключением. Очевидно, что чем раньше после введения в организм препарат попадет к клеткам — мишеням, тем больше будет концентрация в них Au^{3+} и, следовательно, более значительным цитотоксический эффект. Весьма вероятно, что реализация такого рода механизма может способствовать определенной селективности действия аурумакрила на опухоль по сравнению с нормальными тканями.

Нет оснований также рассматривать цитотоксичность в отношении фибробластов *in vitro* как указание на вероятную высокую токсичность препарата *in vivo*.

Следует отметить, что терапевтический индекс (ТИ) аурумакрила, характеризующий соотношение летальной и эффективной доз препарата при его применении на моделях солидных опухолей мышей, имеет величину, равную 2.1, что соответствует пороговому значению общепринятого критерия терапевтического индекса для цитостатиков ($ТИ_{50} \geq 2$). Установленные токсиметрические характеристики аурумакрила при исследовании его острой токсичности *in vivo* позволяют отнести препарат к веществам третьего класса токсичности [4].

Естественно, вопрос о клинической безопасности препарата может быть решен только после проведения стандартного доклинического токсикологического изучения в специальных экспериментах.

Полученные в настоящей работе результаты, подтверждающие наличие значительной цитотоксичности у полиакрилата золота, могут рассматриваться как указание на целесообразность его дальнейшего изучения в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

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. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии* **64** (6), 697 (2018).
2. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, et al., *Med. Res. Rev.* **30**, 580 (2010).
3. C. I. Yeo, K. K. Ooi, and E. R. Tiekink, *Molecules* **23**, 1410 (2018).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика* **38** (12), 64 (2019).

5. А. В. Шибаева, Н. В. Позднякова, В. В. Спиридонов и др., Вестн. РГМУ **5**, 111 (2018).
6. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 642–657.
7. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., Биофизика **64**, (6) 1138 (2019).
8. A. M. de Almeida, B. A. de Oliveria, P. P. de Castro, et al., *Biometals* **30** (6), 841 (2017).
9. N. Svahn, A. J. Moro, C. Roma-Rodrigues, et al., *Chem. Eur. J.* **24** (55), 14654 (2018).
10. M. Alkhalil, Y. Al-Hiari, V. Kasabri, et al., *Drug Develop. Res.* **81** (4), 470 (2020).
11. J. Wang, G. Vlong, G. Li, et al., *Molecules* **24** (24), 4505 (2019).
12. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Ж. П. Бурмий и др., Биофизика **63** (3), 606 (2018).

The Cytotoxic Effect of Aurum Polyacrylate (Aurumacril) on Human Skin Fibroblasts

D.B. Korman*, E.I. Nekrasova*, L.A. Ostrovskaya*, O.O. Riabaya**,
N.V. Bluhterova*, and K.A. Abzaeva***

*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

**N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

***A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia

The cytotoxic effect of the potential antitumor drug aurumacryl (aurum polyacrylate) on the hFB-hTERT6 human skin fibroblast cell line has been studied in vitro. It has been established that aurumacril exhibits substantial cytotoxicity to human skin fibroblasts. The maximum of cytotoxic effect (75% cell death) was observed when the concentration of aurumacryl was 0.125 mg/ml. The inhibitory concentration of aurumacryl causing 50% human skin fibroblast death (IC50) was 0.09 mg/ml.

Keywords: aurumacryl (aurum polyacrylate), cytotoxic activity, hFB-hTERT6 human skin fibroblast cell line

УДК 57.088.1

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ СЛОЯ БИОМОЛЕКУЛ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ

© 2020 г. М.В. Волкова, В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, С.А. Бирюков,
Е.В. Горина, Г.И. Фильков, М.О. Дурманов

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

E-mail: durmanov.mo@mipt.ru

Поступила в редакцию 12.08.2020 г.

После доработки 18.08.2020 г.

Принята к публикации 20.08.2020 г.

Количественное определение цитокинов, хемокинов, факторов роста и других растворимых белковых молекул в различных биологических жидкостях является рутинной задачей современной диагностики и биомедицины, однако существующие в настоящее время методы анализа включают в себя несколько этапов и занимают продолжительное время. В работе представлен протокол, позволяющий с помощью метода интерферометрии слоя биомолекул определить в течение нескольких минут концентрацию аналита в пробе. В качестве модельной системы были использованы кондиционированные среды, полученные от мезенхимальных стволовых клеток мыши, выращенных в условиях нормоксии и гипоксии в виде монослоя, 3D-клеточных листов или в виде 3D-сфероидов, в которых определяли концентрацию VEGF-A (фактора роста эндотелия сосудов). Метод показал высокую чувствительность (как минимум 0.10 нг VEGF-A в мл). Полученные значения концентраций VEGF-A в кондиционированных средах мезенхимальных стволовых клеток оказались близки к величинам, определенным с помощью иммуноферментного анализа. С использованием интерферометрии слоя биомолекул было обнаружено достоверное увеличение продукции VEGF-A в 2.5–3.0 раза сфероидами и клеточными листами мезенхимальных стволовых клеток по сравнению с клетками, выращенными в монослое. Таким образом, разработанный протокол позволил адаптировать метод интерферометрии слоя биомолекул для быстрого количественного анализа факторов роста в кондиционированных средах.

Ключевые слова: интерферометрия слоя биомолекул, биосенсор, мезенхимальные стволовые клетки, кондиционированная среда, 3D-культура клеток, фактор роста эндотелия сосудов.

DOI: 10.31857/S0006302920060083

В настоящее время в современной диагностике и биомедицинских исследованиях существует ряд методов для оценки количественного содержания растворимых белков в биологических жидкостях. К таким подходам относят иммуноферментный и мультиплексный анализы, а также радиоиммунный метод. Как правило, процедура детекции с помощью этих способов занимает длительное время либо подразумевает применение дорогостоящего оборудования. В связи с

этим происходит усовершенствование текущих рутинных методов анализа, а также ведется разработка новых.

Метод интерферометрии слоя биомолекул (BLI, Bio-Layer Interferometry) появился относительно недавно и с успехом был использован для количественной оценки взаимодействий «белок–нуклеиновая кислота» и «белок–белок» [1]. В данной технологии применяются оптоволоконные чипы, имеющие на конце оптический слой, на внешней поверхности которого находится связанный слой биомолекул (рис. 1). Принцип метода основан на регистрации пучков белого света, отраженных от внутренней границы раздела оптического слоя и от биомолекулярного слоя. Данные пучки интерферируют между собой, в ре-

Сокращения: BLI – интерферометрия слоя биомолекул (Bio-Layer Interferometry), BLItz – система регистрации интерферометрии слоя биомолекул, VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов А (Vascular Endothelial Growth Factor A), МСК – мезенхимальные стволовые клетки, PBS – фосфатно-буферный раствор (Phosphate Buffer Solution).

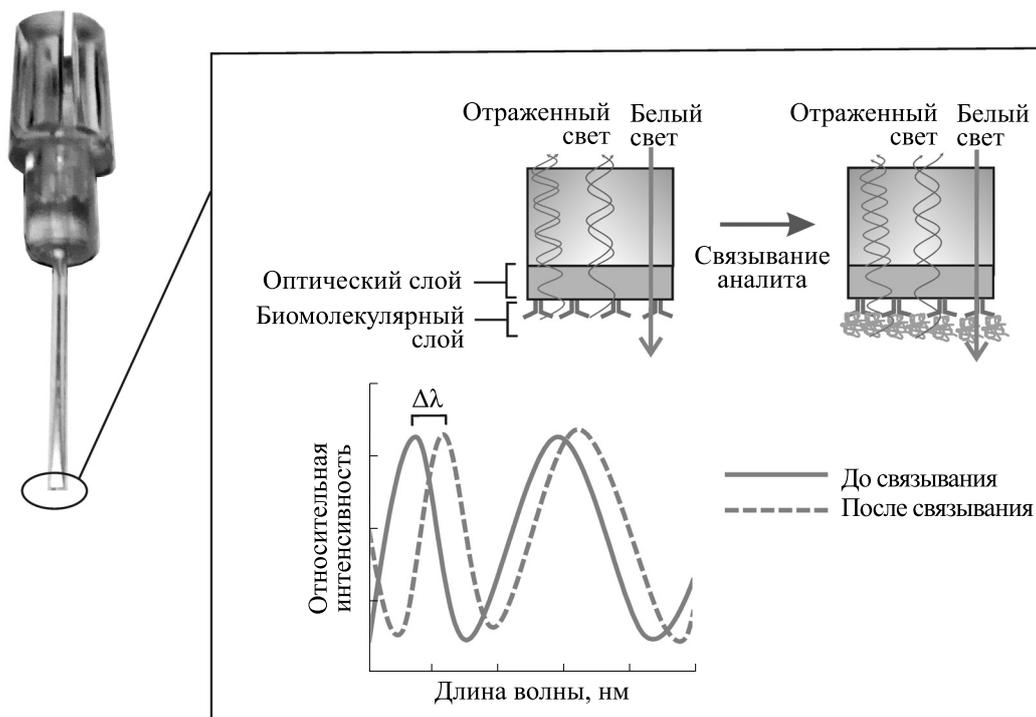


Рис. 1. Схема принципа метода BLI. Спектрометр регистрирует в реальном времени сдвиг интерферентного паттерна ($\Delta\lambda$), величина которого возрастает пропорционально утолщению биомолекулярного слоя биосенсора в результате связывания молекул анализита.

зультате чего получается характерный спектр, называемый интерферентным паттерном. При связывании молекул анализита с иммобилизованными на поверхности чипа лигандами толщина биомолекулярного слоя увеличивается во времени в соответствии с кинетикой межмолекулярных взаимодействий. Изменение толщины биомолекулярного слоя в результате связывания лиганда и анализита приводит к пропорциональному увеличению величины спектрального сдвига ($\Delta\lambda$) интерферентного паттерна, которая и регистрируется спектрометром в реальном времени [2].

Система регистрации интерферометрии слоя биомолекул (BLItz) предполагает использование оптоволоконных чипов, содержащих на своей поверхности различные варианты молекул для иммобилизации биомолекул, связывающих анализит, или для детекции анализита напрямую. Например, для присоединения аналитсвязывающих белков, имеющих в своем составе His-tag, или нуклеиновых кислот, помеченных биотином, могут быть использованы чипы с покрытием из Ni-NTA [3] или стрептавидина [4] соответственно. Если анализитом являются антитела, то для их детекции можно применить чипы, покрытые протеином А или протеином G [1]. В подавляющем большинстве случаев система BLItz используется для оценки кинетики связывания/диссоциации [5, 6], а также скрининга сродства макромолекул

аналитов к иммобилизованному на чипе белку или нуклеиновой кислоте [4, 7, 8].

В данной работе мы адаптировали метод BLI для оценки количественного содержания факторов роста в биологических жидкостях. Разработанный протокол позволил измерить содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) в кондиционированных средах от мезенхимальных стволовых клеток в течение нескольких минут в расчете на один образец.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные согласно стандартному протоколу выделения из красного костного мозга самцов мышей Balb/c (пос. Столбовая Московской области, Россия), выращивали в среде DMEM (Gibco, США) с 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), заменимыми аминокислотами (Capricorn Scientific, Германия) и 50 мкг в мл гентамицина (Дальхимфарм, Хабаровский край, Россия). Культивирование МСК в условиях нормоксии проводили при 37°C в атмосфере 21% кислорода, 5% углекислого газа и влажности 95% в инкубаторе Smart Biotherm (Biosan, Латвия). В условиях гипоксии МСК содержали в мультигазовом инкубаторе CB150 (Binder, Германия) при 37°C в атмосфере с

5% кислорода, 5% углекислого газа и влажности 95%.

3D-культуры мезенхимальных стволовых клеток. Сфероиды МСК выращивали в агарозных вставках, полученных с использованием Micro-Tissues 3D Petri dish micromolds (Z764019, Sigma Aldrich, США). В агарозные вставки вносили по 150 мкл среды, содержащей 16000 клеток. Культивирование сфероидов осуществляли в условиях нормоксии в течение четырех суток. Для получения листов из МСК клетки высевали на шести-луночные планшеты в количестве 300000 клеток на лунку и инкубировали до достижения монослоя. После этого питательную среду заменяли на среду аналогичного состава, дополнительно содержащую аскорбиновую кислоту (PanReac, Испания) в концентрации 50 мкг/мл, и культивировали еще в течение семи суток.

Получение кондиционированных сред. Для получения кондиционированных сред от МСК, культивируемых в условиях гипоксии с 5% кислорода или в условиях нормоксии с 21% кислорода, клетки высевали на шести-луночные планшеты в количестве 250000 клеток на лунку в 1 мл среды. Спустя сутки клеткам меняли среду, а затем инкубировали в течение 48 ч. После этого среды отбирали, замораживали и хранили при -20°C . Для получения кондиционированных сред от сфероидов МСК их извлекали из агарозной подложки и переносили в 96-луночный планшет в количестве 20–30 штук на лунку. Культивирование сфероидов в планшете проводили в 100 мкл питательной среды в течение 48 ч, после чего питательные среды отбирали. Листы МСК инкубировали в течение 48 ч в 1 мл среды, а затем брали ее для анализа. Для правильной оценки секреторной активности 3D-культур МСК по сравнению с клетками, выращенными в монослое, важно было нормировать измеренные величины концентраций VEGF-A на объем среды и тотальный клеточный белок. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда в лизатах, полученных из МСК в монослое, в сфероидах и в листах. В качестве лизирующего буфера применяли 0.2 мМ ЭДТА (VWR international LLC, West Chester, США) и 0.1% тритон X-100 (VWR international LLC, West Chester, США) в фосфатно-буферном растворе (PBS), pH 7.4.

Изучение секреции VEGF-A с использованием метода BLI. Концентрацию VEGF-A определяли с помощью прибора BLItz Pro (ForteBio, Pall Life Sciences, США), для чего использовали оптоволоконные биосенсоры с конъюгированным протеином А. Все измерения проводили после предварительного выдерживания чипов в фосфатном буфере в течение как минимум 10 мин (этап гидратации). Биосенсор устанавливали в прибор, погружали в пробирку с PBS на 30 с для регистрации

начальной базовой линии, а затем перемещали в каплю стокового раствора антитела против VEGF-A мыши (ab52917, Abcam, США) с концентрацией 0.296 мг в мл на 120 с (рис. 2). После загрузки биосенсор перемещали на 60 с в PBS и еще на 60 с в некondиционированную питательную среду для отмывки сенсора от неспецифически связанных антител и регистрации новой базовой линии. С целью измерения биосенсор помещали в каплю с исследуемой кондиционированной средой на 60 с. После получения профилей связывания $\Delta\lambda(t)$ была определена площадь под кривой в течение измеряемого временного интервала:

$$S_{\text{sample}} = \int_{t_1=0}^{t_2=60} \Delta\lambda(t) dt, dt = 0.2 \text{ с.}$$

Для построения калибровочного графика вместо исследуемой кондиционированной среды использовали стандарты VEGF-A в питательной среде с концентрациями 0.1, 1.0, 10, 100 и 1000 нг в мл. Процесс ассоциации антител с белком в калибровочных растворах проводили последовательно от меньшей концентрации к большей, с инкубацией на каждом шаге длительностью 60 с, после чего определяли величины площадей под кривыми связывания $S_{0.1}$, $S_{1.0}$, S_{10} , S_{100} и S_{1000} соответственно. Таким образом, калибровочный график определял зависимость площади под кривой связывания от концентрации VEGF-A и был использован для определения содержания аналита в экспериментальных образцах.

Значения констант k_a и k_d были получены с помощью аппроксимации кривых связывания и диссоциации одноэкспоненциальной функцией, выполненной в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения прибора BLItz Pro 1.3 (ForteBio, Pall Life Sciences, NY). Значения K_D были определены из соотношений k_d/k_a .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения содержания фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A в кондиционированных средах от МСК мыши были использованы оптоволоконные чипы с конъюгированным протеином А. Этот белок бактериального происхождения обладает высокой природной аффинностью к Fc-домам тяжелых цепей иммуноглобулинов типа G (IgG) человека, мыши, кролика и некоторых других млекопитающих [9]. В классическом приложении данные чипы применяются для прямого количественного определения содержания антител в очищенных препаратах или биологических жидкостях [10]. Разработанный нами протокол предполагает иммобилизацию одинакового количества антител против VEGF-A на

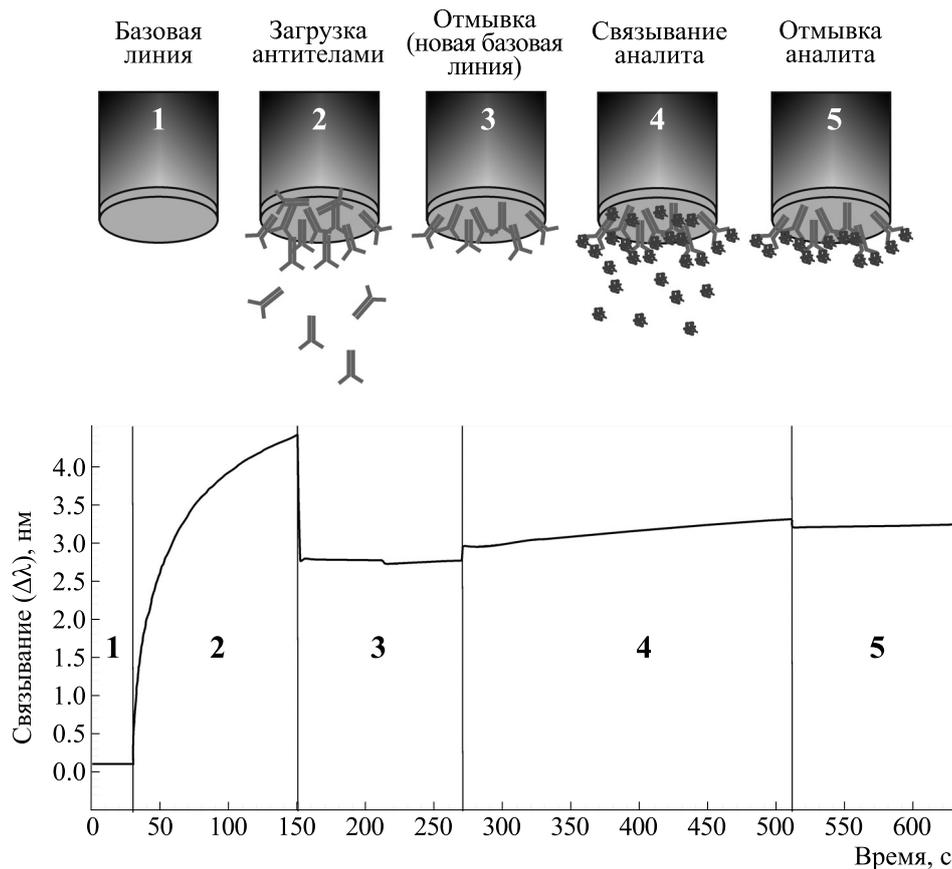


Рис. 2. Схема протокола определения концентрации растворенного фактора роста VEGF-A методом BLI. Протокол включает пять этапов: 1 – регистрация начальной базовой линии (в PBS); 2 – загрузка биосенсора с протеином А антителами против VEGF-A (стоковый раствор антител); 3 – отмывка биосенсора от слабо связавшихся антител и определение новой базовой линии (сначала в PBS, затем – в среде с сывороткой); 4 – детекция VEGF-A в образце (в кондиционированной среде с сывороткой); 5 – отмывка от VEGF-A (в среде с сывороткой).

несколько биосенсоров. Один из чипов используется для детекции возрастающей и известной концентрации VEGF-A в некондиционированной среде с целью построения калибровочного графика. С помощью других чипов проводят измерения в опытных образцах, применяя один чип для одного измерения и последующего определения концентрации VEGF-A по калибровке. На рис. 2 представлена общая схема последовательности протокола детекции VEGF-A и соответствующие каждому этапу изменения значений сдвига интерференционного паттерна $\Delta\lambda$ во времени.

Первичная загрузка биосенсоров с протеином А антителами продемонстрировала одинаковую кинетику связывания с выходом на плато в пределах очень близких значений (рис. 3а), что свидетельствует об однородности загрузки чипов антителами против VEGF-A мыши. После процедуры загрузки чипы переносили в фосфатный буфер, где они инкубировались до начала измерений концентрации VEGF-A в образцах. Отмывка чи-

пов сопровождалась частичной диссоциацией связавшихся антител (рис. 3б), что позволило оценить эффективную константу диссоциации K_D , которая составила $7.5 \cdot 10^{-7}$ М (таблица). Интересно отметить, что протеин А имеет четыре домена для связывания с IgG, и его взаимодействие с иммуноглобулинами описывается сложной кинетикой. Величина K_D , отражающая силу его взаимодействия с Fc-регионами, снижается при увеличении концентрации антител, варьируя в пределах от 10^{-10} до 10^{-6} М [11]. Полученное в нашем случае относительно высокое значение эффективной константы диссоциации можно объяснить высокой концентрацией стокового раствора антител, которая составила 0.296 мг/мл.

Как отмечалось выше, один из биосенсоров был использован для построения калибровочного графика зависимости спектрального сдвига интерференционного паттерна от количества связавшегося анализита, т.е. VEGF-A. Каждое последовательное погружение связанного с антите-

лами чипа в среды с увеличивающейся концентрацией VEGF-A приводило к связыванию дополнительного количества ростового фактора, о чем говорит выход кривой изменения спектрального сдвига на новый более высокий стационарный уровень. По значениям площади под кривой кинетики связывания был построен калибровочный график (рис. 4). Для валидации полученной калибровки были проведены измерения в средах, содержащих известные концентрации VEGF-A мыши. В результате полученные площади под кривой связывания оказывались близкими к калибровочным значениям, а полученные константы связывания, диссоциации и равновесия соответствовали значениям, описывающим кинетику взаимодействия антитело-антиген (таблица).

В качестве модельной системы нами были использованы кондиционированные среды, отобранные из культур мезенхимальных стволовых клеток мыши. Применение МСК и их производных в регенеративной медицине является перспективным подходом для лечения повреждений костной ткани, инфаркта миокарда, ожогов и механических ран [12, 13]. Значительный вклад в минимизацию повреждений тканей, вызванных воспалением, вносит паракринная активность МСК, которая выражается в продукции противовоспалительных молекул и цитокинов, включая простагландин E2 (PGE2) и интерлейкин 10 (IL-10), а также факторов роста, например, инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1), фактора роста фибробластов (FGF-2), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и других [14, 15]. Следует отметить, что на паракринную активность МСК огромное влияние оказывают условия культивирования и внешнее молекулярное окружение. Одним из таких факторов является гипоксия, которая характерна для тканей при различных патологиях, сопровождающихся воспалением. Гипоксия наряду с провоспалительными цитокинами стимулирует МСК к повышенной продукции различных молекул, в том числе VEGF-A. В свою очередь, VEGF-A способствует васкуляризации поврежденной ткани, что необходимо для ее заживления.

В условиях культивирования МСК *ex vivo* существует несколько способов обеспечить условия гипоксии и тем самым увеличить продукцию VEGF-A и других факторов роста. Во-первых, можно культивировать клетки в условиях пониженного содержания кислорода в атмосфере в специальном инкубаторе. Во-вторых, можно вырастить МСК в виде 3D-культур, например сфероидов, представляющих собой тканеподобные агрегаты клеток и содержащие включения внеклеточного матрикса, а также клеточных листов, состоящих из нескольких слоев МСК. Сначала мы с помощью метода ВЛ оценили экспрессию VEGF-A в кондиционированных средах, полу-

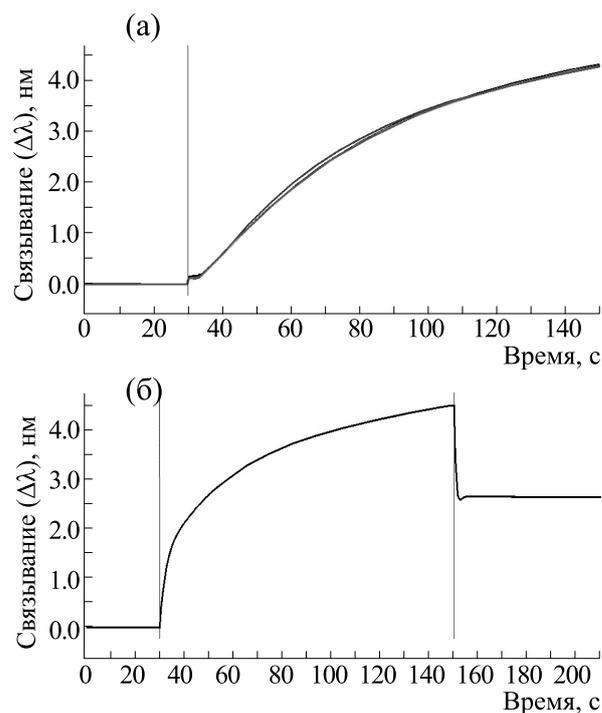


Рис. 3. Первичная загрузка биосенсоров с протеином А антителами против VEGF-A мыши. Профили связывания четырех биосенсоров с антителами (а) и вид типичной кривой связывания-диссоциации (б).

ченных от МСК при культивировании в атмосфере с нормальным содержанием кислорода, а также в атмосфере с 5% кислорода. Оказалось, что в условиях гипоксии содержание VEGF-A в средах от МСК мыши возрастает, хотя полученные различия не являются статистически значимыми (рис. 5а). Полученные значения концентрации VEGF-A согласно калибровочному графику составили порядка 0.5–1.0 нг/мл, что по порядку величины совпадает с концентрациями, измеренными в похожих условиях для кондиционированных сред от мышинных МСК с помощью иммуноферментного анализа [16].

Метод ВЛ также позволил сравнить экспрессию VEGF-A в средах от МСК, выращенных в монослое в условиях нормоксии (контроль) и в составе 3D-культур, включая сфероиды и листы. Полученные сфероиды МСК были выращены в агарозных вставках и имели диаметр 140 ± 40 мкм (среднее значение \pm стандартное отклонение). Листы МСК были получены в шестилуночных планшетах и имели толщину в два-три слоя клеток (рис. 5б). Для правильной оценки полученные величины концентраций VEGF-A были дополнительно нормированы на белок и на объем среды. Результаты измерений продемонстрировали увеличение экспрессии VEGF-A в 3D-культурах в 2.5–3.0 раза по сравнению с монослоем МСК, хотя между собой показатели для сфероид-

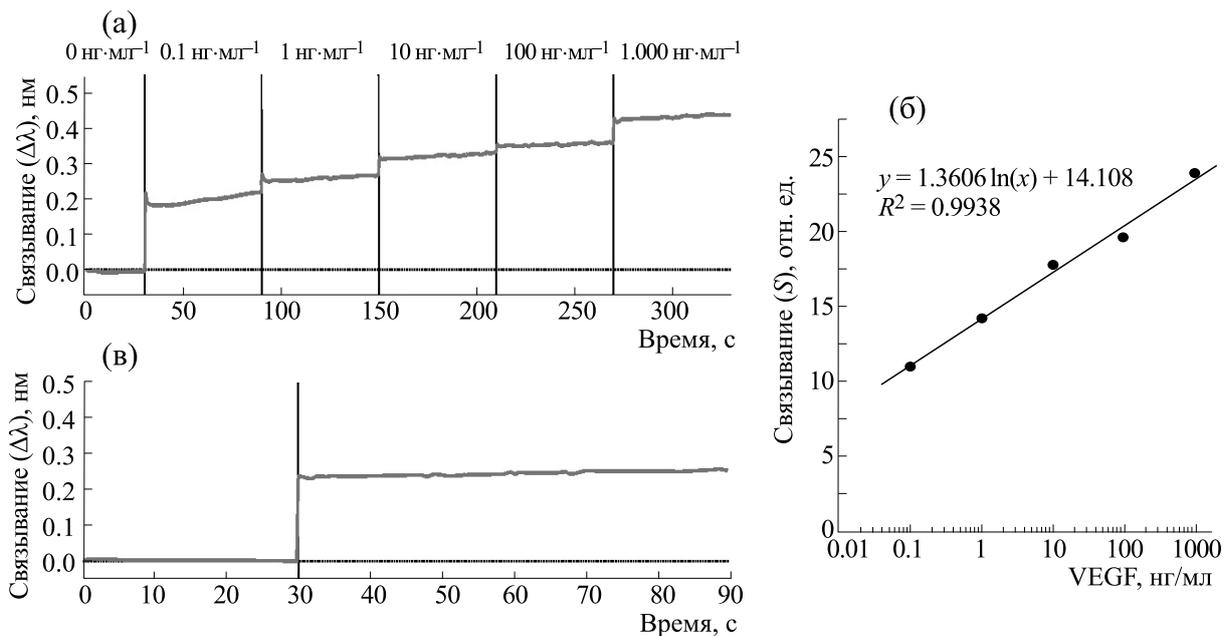


Рис. 4. Построение калибровочного графика и определение аналита в пробе. (а) – Кривые связывания загруженного антителами биосенсора возрастающих концентраций VEGF-A в калибровочных растворах, содержащих 0.1, 1.0, 10, 100 и 1000 нг VEGF-A в мл среды с сывороткой. (б) – Вид калибровочного графика, в котором значения величины связывания (S) соответствуют площади под кривой связывания в растворе с определенной концентрацией VEGF-A. (в) – Типичный вид кривой связывания загруженного антителами биосенсора с VEGF-A в образце с кондиционированной средой.

дов и листов статистически значимо не отличались (рис. 5в). Иммуноферментный анализ также ранее показал увеличение экспрессии VEGF-A МСК в составе сфероидов по сравнению с МСК в монослое в несколько раз [17].

Таким образом, с помощью метода интерферометрии слоя биомолекул можно оценивать концентрации растворимых белков в кондиционированных средах как при работе с клетками в монослое, так и в 3D-культурах клеток. Следует отметить, что при адаптации метода ВЛІ к конкретному аналиту следует принимать во внимание несколько факторов. Во-первых, используемые антитела должны обладать высоким сродством к выбранному чипу. Например, иммуноглобулины коровы будут слабо связываться с чипами с протеином А, а потому более целесообразным является использование антител кролика, обладающим гораздо более высоким сродством к протеину А [9]. Во-вторых, стоит брать в расчет и состав биологической жидкости, в кото-

рой находится измеряемый аналит. В нашем случае чипы с протеином А могут применяться для детекции VEGF-A мыши в кондиционированной среде, содержащей телячью сыворотку, но не могут быть использованы для определения VEGF-A человека в его плазме, поскольку она помимо VEGF-A содержит иммуноглобулины субтипов G1, G2 и G4, обладающих высоким сродством к протеину А [9]. Наконец, несмотря на высокую чувствительность метода, его погрешность будет увеличиваться при уменьшении количества аналита в образце, что будет создавать сложности с определением белковых молекул в очень малых концентрациях (менее 100 пг/мл). Тем не менее не исключено, что уменьшить ошибку вполне возможно при использовании других биосенсоров, например аминокреактивных, к которым можно ковалентно присоединять любые молекулы, содержащие аминокгруппы. Главным несомненным плюсом метода ВЛІ является его быстрота и простота, что при наличии калибровочно-

Кинетические константы связывания и диссоциации, измеренные методом ВЛІ

Межмолекулярные взаимодействия	$k_a, M^{-1} c^{-1}$	k_d, c^{-1}	K_D, M
Протеин А – IgG	$1.449 \cdot 10^4$	$1.087 \cdot 10^{-2}$	$7.506 \cdot 10^{-7}$
IgG – VEGF-A	$4.285 \cdot 10^4$	$<10^{-7}$	$<10^{-12}$

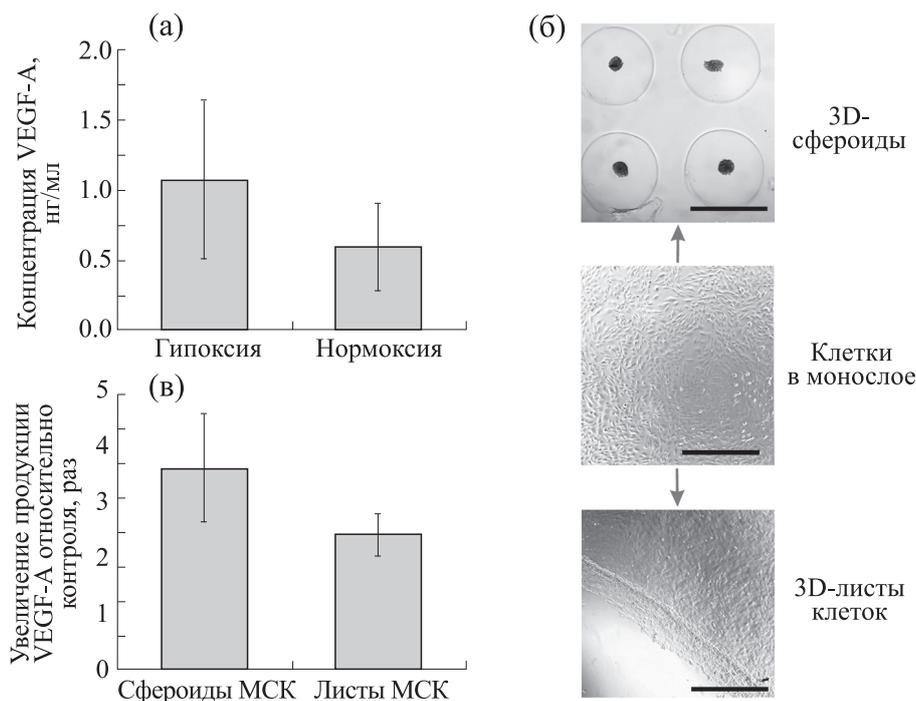


Рис. 5. Определение концентрации VEGF-A в кондиционированных средах от МСК мыши, выращенных в различных условиях. (а) – Сравнение уровня VEGF-A в средах от МСК, выращенных в монослое в условиях нормоксии (21% кислорода) и гипоксии (5% кислорода). (б) – Изображения МСК мыши в монослое, а также производных 3D-культур на основе МСК, включая сфероиды и клеточные листы. Масштабный отрезок соответствует 800 мкм. (в) – Увеличение экспрессии VEGF-A 3D-клеточными культурами на основе МСК мыши по сравнению с клетками, выращенными в монослое в условиях нормоксии (контроль). Измерения для диаграмм (а) и (в) были проведены в трех повторах; величины представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

го графика позволяет оценить концентрацию аналита в образце за несколько минут.

В работе была продемонстрирована возможность использования метода интерферометрии слоя биомолекул для количественной оценки фактора роста эндотелия сосудов в биологических жидкостях. Возможности этого подхода были показаны на примере анализа кондиционированных сред от культур МСК, выращенных в монослое, а также в виде 3D-сфероидов и клеточных листов. Чувствительность адаптированного метода ВЛИ составила для VEGF-A как минимум 100 пг/мл. Несмотря на ограничения этого способа детекции, его основным преимуществом служит быстрота и простота проведения анализа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидии по соглашению от 28.10.2018 г. №14.575.21.0179 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57518X0179), заключенному между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Московским физико-техническим институтом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Sultana and J. E. Lee, *Cur. Protocols Prot. Sci.* **79**, 19 (2015).
2. C. W. Meyerhofer and D. Yao, in *Label-Free Technologies for Drug Discovery* (Wiley, 2011).
3. W.-H. Lua, S. K.-E. Gan, D. P. Lane, and C. S. Verma, *Npj Breast Cancer* **1**, 1 (2015).
4. C. J. Weeramange, M. S. Fairlamb, D. Singh, et al., *Prot. Sci.* **29**, 1004 (2020).
5. M. Groner, T. Ng, W. Wang, and A. K. Udit, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 5843 (2015).
6. W. A. Lea, P. T. O'Neil, A. J. Machen, et al., *Biochemistry* **55**, 4885 (2016).
7. H. Müller-Esparza, M. Osorio-Valeriano, N. Steube, et al., *Front. Mol. Biosci.* **7** (2020).

8. Y. Wang, E. E. Dzakah, Y. Kang, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 5499 (2019).
9. S. Hober, K. Nord, and M. Linhult, *J. Chromatography B* **848**, 40 (2007).
10. C. H. Goey, D. Bell, and C. Kontoravdi, *MAbs.* **10**, 476 (2018).
11. J. T. Nelson, S. Kim, N. F. Reuel, et al., *Anal. Chem.* **87**, 8186 (2015).
12. Y. Han, X. Li, Y. Zhang, et al., *Cells* **8**, 886 (2019).
13. P. Bianco, X. Cao, P.S. Frenette, et al., *Nature Med.* **19**, 35 (2013).
14. Y. Shi, Y. Wang, and Q. Li, *Nature Rev. Nephrol.* **14**, 493 (2018).
15. M. J. Fontaine, H. Shih, and R. Schäfer, *Transfus. Med. Rev.* **30**, 37 (2016).
16. L. Chen, Y. Xu, J. Zhao, et al., *PLoS One* **9** (2014).
17. I. A. Potapova, G. R. Gaudette, and P. R. Brink, *Stem Cells* **25**, 1761 (2007).

Adaptation of Bio-Layer Interferometry for Quantification of Vascular Endothelial Growth Factor in Cell-Conditioned Culture Media

M.V. Volkova, V.V. Boyarintsev, A.V. Trofimenko, S.A. Biryukov, E.V. Gorina,
G.I. Filkov, and M.O. Durymanov

*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutsky per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

Quantitative analysis of cytokines, chemokines, growth factors and other soluble proteins in different biological liquids is routinely performed in contemporary diagnostics and biomedicine research. However, current methods of analysis are time-consuming and include multiple steps. In this study, we have developed a protocol that describes how bio-layer interferometry can be applied to quantify an analyte in several minutes. Conditioned growth media collected from mouse mesenchymal stem cells grown in normoxia or hypoxic conditions in a monolayer fashion, MSC-derived 3D cell sheets and 3D spheroids were used as a model system in which we determined a concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF-A). This technique displayed a high sensitivity (down to 0.1 ng of VEGF-A per mL as a minimum). The measured concentrations of VEGF-A in the conditioned media from mesenchymal stem cells turned out to be similar with values determined by the enzyme-linked immunosorbent assay. Using bio-layer interferometry, it was shown that as compared to mesenchymal stem cells grown in monolayer, spheroids and 3D sheets of mesenchymal stem cells produce significantly more VEGF-A (by 2.5–3.0-fold). Thus, due to the developed protocol it was possible to adapt bio-layer interferometry for rapid quantification of growth factors in conditioned media.

Keywords: bio-layer interferometry, biosensor, mesenchymal stem cells, conditioned media, 3D cell culture, vascular endothelial growth factor

УДК 533.92:577.35

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК К ОДНОАТОМНЫМ СПИРТАМ В ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЕ

© 2020 г. К.Д. Казаринов*, В.А. Щелконогов*, **, ***, О.А. Баранова*, **, А.В. Чеканов*, **, Э.Ю. Соловьева**, А.И. Федин**

*Фрязинский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
141190, Фрязино Московской области, пл. Введенского, 1

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

***МИРЭА – Российский технологический университет, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86
E-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.

После доработки 30.08.2020 г.

Принята к публикации 08.09.2020 г.

Представлены результаты экспериментальных исследований агрегации клеток крови в обогащенной тромбоцитами плазме с применением индуктора агрегации ристомидина в условиях крайне высокочастотного облучения низкой интенсивности. В качестве стимуляторов частичной деградации белково-липидного бислоя мембран клеток были использованы первичные спирты. Результаты показали, что крайне высокочастотное излучение снижает степень ристомидин-стимулированной агрегации тромбоцитов, а также изменяет угол наклона агрегатограммы. Обнаружен двухфазный характер влияния спиртов на агрегацию тромбоцитов – вначале наблюдали снижение агрегации и угла наклона агрегатограммы, а затем – увеличение этих параметров с ростом концентрации спиртов в пробе. Рассматривается возможный механизм обнаруженных эффектов.

Ключевые слова: микроволновое излучение, межклеточное взаимодействие, тромбоциты, метанол, этанол, индукторы агрегации, механизм биологического действия КВЧ-излучения.

DOI: 10.31857/S0006302920060095

Представленные в нашей предшествующей публикации [1] результаты по изучению эффектов излучения крайне высокочастотного диапазона (КВЧ) на элементы крови человека свидетельствуют о том, что КВЧ-излучение низкой интенсивности в условиях эксперимента способно снизить активность межклеточного взаимодействия. Эффект облучения проявлялся в снижении степени агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем при добавлении индуктора агрегации – ристомидина, а также в уменьшении скорости агрегации тромбоцитов.

Повышенная агрегация тромбоцитов лежит в основе патогенеза большого количества заболеваний. Тромбоциты, как известно, являются одними из основных участников сосудистых катастроф при ишемической болезни сердца. Однако не всегда удается снизить степень агрегации тромбоцитов и предотвратить развитие тромботических осложнений с помощью антитромбоцитарных препаратов. Попыт-

кой преодолеть некоторые нежелательные явления, связанные с активацией тромбоцитов, а также регламентировать их участие в различных патологических состояниях обусловлен поиск иных подходов к проблеме, в том числе и рассмотрение участия в апоптозе этих клеток известных индукторов агрегации: коллагена, арахидоновой кислоты, тромбина, АДФ, ионофора кальция А23187 и др. [2]. Однако несмотря на значительные усилия, приложенные в этом направлении, проблема еще далека до своего разрешения. Поэтому наряду с медикаментозными средствами в медико-биологических исследованиях иногда пытаются использовать электромагнитные воздействия с целью коррекции нарушений реологических свойств крови. К таким воздействиям относятся низкоинтенсивные световые и микроволновые излучения.

На протяжении последних десятилетий различными авторами высказывались предположения относительно результатов наблюдаемых биологических эффектов микроволнового излучения. Избыточное образование свободных радикалов в

Сокращения: КВЧ – крайне высокочастотный диапазон, ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма.

организме или окислительный стресс, вызванный излучением, в последнее время рассматривается как один из основных механизмов биологической активности микроволн [3–5]. В отличие от высокочастотного и сверхвысокочастотного излучения, биологическим эффектам КВЧ-излучения (30–300 ГГц) уделялось гораздо меньшее внимание. Это обусловлено тем, что излучение в этом диапазоне не считается повсеместным, и люди мало контактируют с ним. Однако в последнее время из-за огромного роста мобильного трафика привлекаются значительные ресурсы для развития системы связи пятого поколения (5G), которая характеризуется использованием частоты длинноволновой части миллиметрового диапазона. Но и этот стандарт уже рассматривается как промежуточный на пути к системе связи шестого поколения (6G), в котором будут задействованы частоты коротковолновой части миллиметрового диапазона. Возникшая ситуация ставит вопрос о дополнительных мерах по защите здоровья населения, особенно специалистов, занятых в производстве и внедрении этой техники [6].

Считается, что воздействие на организм человека происходит при интенсивностях облучения, которые вызывают слабое нагревание ткани, но биологические механизмы эффектов облучения еще недостаточно изучены. Результаты наших предшествующих экспериментов следует отнести к исследованию влияния микроволнового излучения на клетки человека, которые находились в стрессовом состоянии [7, 8].

Недавно был разработан метод микроволновой терапии, при котором патологические клетки погибали в условиях микроволнового облучения при температуре, не превышающей 37°C [9]. Эти явления нельзя просто объяснить повышением температуры, что подразумевает наличие «нетепловых эффектов», которые могут быть получены в результате микроволнового облучения. На основании приведенных в этой работе данных можно предположить, что патологические клетки будут убиты микроволнами при более низкой температуре (37°C), чем те, которые используются для современной терапии. С использованием специально разработанной термостатируемой системы облучения биообъекта была исследована жизнеспособность культивируемых клеток при микроволновом облучении в нормотермических условиях [10].

В наших последних работах было показано, что КВЧ-излучение снижает степень агрегации тромбоцитов и изменяет угол наклона агрегатограммы по сравнению с контролем при добавлении индуктора ристомидина [11]. Аналогичный эффект наблюдался также и при агрегации тромбоцитов коллагеном. Однако наиболее выраженный эффект имел место при использовании ристомидина, что является косвенным отражением влияния КВЧ-излучения на активность фактора фон Виллебранда, т.е. на вы-

свобождение этого гликопротеина из α -гранул тромбоцитов. Механизм, посредством которого ристоцетин индуцирует агрегацию тромбоцитов с участием фактора Виллебранда, заключается во взаимодействии мультимерного гликопротеина фактора фон Виллебранда с гликопротеином Ib рецептора тромбоцитов (GpIb). В данном взаимодействии особую роль играют фенольные группы ристоцетина, влияние которых может приводить к потере как агглютинирующей, так и тромбоциттарной активности тромбоцитов. Восстановление фенольных групп с помощью гидроксилamina способно восстановить обе активности. Добавленный положительно заряженный ристоцетин связывается через свои фенольные группы с участками на поверхности тромбоцитов и уменьшает отрицательный заряд тромбоцитов. Это может снизить электростатическое отталкивание между тромбоцитами и/или между тромбоцитами и отрицательно заряженным фактором фон Виллебранда и позволить макромолекулярному фактору фон Виллебранда вызвать агрегацию, образуя мост между тромбоцитами [12].

Как известно, фактор фон Виллебранда не только включает внешний и внутренний механизмы коагуляции, но и активирует противосвертывающую систему, предупреждая, таким образом, избыточное тромбообразование.

Микроволновое облучение, стимулируя увеличение скорости образования свободных радикалов в обогащенной тромбоцитами плазме, может регулировать агрегационную активность тромбоцитов путем воздействия на структурные и функциональные свойства ферментов [13, 14], а также за счет стимулирования увеличения скорости образования свободных радикалов [15].

Как показывает анализ литературы, накоплен некоторый опыт электромагнитных воздействий с целью коррекции нарушений реологических свойств крови. В работе [16] было установлено, что КВЧ-облучение в определенных условиях вызывает заметное ингибирование функциональной активности тромбоцитов в нативной плазме по сравнению с контролем.

Влияние микроволнового излучения на частоте 2450 МГц на тромбоциты у собак было проанализировано *in vitro* путем изучения агрегации, активированной аденозин-5-дифосфатом. При плотностях мощности, превосходящих 10 мВт/см², были продемонстрированы различные проявления агрегации тромбоцитов: гиперагрегация, уменьшенная скорость агрегации, пониженная агрегация, восстановление. Отсутствие эквивалентных реакций агрегации с изотермическим проводящим нагревом авторы работы связывают с различиями в скорости нагревания образца [17].

Известно, что основным механизмом окислительного стресса в тканях, который приводит к гибели клеток, является апоптоз (генетически запро-

граммированный процесс гибели клетки). Механизмы запуска программы апоптоза, вызванного стрессом, чрезвычайно разнообразны, однако все эти механизмы сходятся на уровне митохондрий и приводят к запуску каскада протеолитических ферментов и деградации клетки. Следует отметить, что апоптозу подвергаются не только ядродержащие клетки, но и безъядерные клетки, такие как эритроциты [18] и тромбоциты [19].

Известно, что алкоголь вызывает апоптоз в эукариотических клетках, таких как гепатоциты, нервные клетки, фибробласты роговицы, и недавно было показано, что он стимулирует апоптоз тромбоцитов [20]. Этанол индуцирует митохондриально-опосредованный внутренний апоптоз тромбоцитов, приводит к снижению числа циркулирующих тромбоцитов и ухудшает гемостаз *in vivo*.

В другой работе при потреблении крысами этанола в течение 21 суток было обнаружено снижение агрегации тромбоцитов [21]. Поскольку агрегация тромбоцитов в присутствии ристомицина происходит в результате взаимодействия комплекса I α -V-IX тромбоцитарного гликопротеина, находящегося на поверхности мембраны, и фактора фон Виллебранда, можно предположить, что этанол, добавленный в среду инкубации клеток, влияет на структурные свойства клеточной мембраны. Чтобы понять, что происходит с клеточными мембранами при добавлении первичных спиртов, следует обратиться к результатам исследования [22]. В этом исследовании оценивали изменения текучести, деформируемости и стабильности мембраны эритроцитов в присутствии первых четырех членов гомологичной серии первичных спиртов (т. е. метанола, этанола, 1-пропанола и 1-бутанола), концентрации которых не составляли $\geq 0.5\%$. С использованием методов экситометрии и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса было показано, что спирты оказывали двухфазное влияние на деформацию мембран, вызывая сначала ее увеличение, а затем снижение в зависимости от концентрации добавляемых первичных спиртов и размера их молекул.

Учитывая вышесказанное, нам представилось целесообразным провести исследование влияния первичных спиртов (этанола и метанола) на изучаемую клеточную систему в условиях микроволнового излучения и сравнить их влияние на чувствительность клеток к данному виду излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, взятых у относительно здоровых доноров в полистирольные вакуумные пробирки с цитратом натрия IMPROVACUTER (кат. № 455689). Кровь, стабилизированную цитратом натрия, центрифугировали 10 мин при 200 g со

скоростью 1000 оборотов в минуту для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Далее ОТП отбирали в чистую пробирку. Оставшуюся плазму повторно центрифугировали в течение 25 мин при 400 g со скоростью 2800 оборотов в минуту для получения бедной тромбоцитами плазмы. Далее бедную тромбоцитами плазму отбирали в отдельную чистую пластиковую пробирку. Образцы хранили при $+37^{\circ}\text{C}$ не более 3 ч.

Агрегометрия тромбоцитов. После выделения ОТП проводили подсчет клеток в пробе объемом 250 мкл. Количество клеток составляло примерно 300 тыс./мл. Затем добавляли индуктор агрегации – водный раствор ристомицина. Его конечная концентрация составляла 0.1 мг/мл.

Для исследования влияния КВЧ на агрегацию тромбоцитов использовали метод агрегометрии. Измерения были проведены на четырехканальном приборе Helena AggRam (Helena BioSciences, Великобритания). Кюветы для данного прибора были из силиконизированного стекла, их размер составлял 8×60 мм. Температура инкубации и реакции $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$; длина волны, на которой проводили измерения, – 650 нм. Для перемешивания использовали магниты с покрытием, размером 3.5×4 мм.

Регистрировали кинетику агрегации в течение 20 мин. В качестве контроля использовали пробу, которая представляла ОТП с добавлением индуктора. Калибровку прибора осуществляли с помощью бедной тромбоцитами плазмы. Оценку проводили по изменению светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы при добавлении индуктора агрегации, в нашем случае – ристомицина. После добавления индуктора образуются агрегаты тромбоцитов, параллельно с этим процессом увеличивается светопропускание до достижения плато, что указывает на необратимую агрегацию. Степень агрегации представляет собой разницу между минимальным и максимальным процентами светопропускания. Скорость агрегации оценивали по тангенсу угла наклона агрегатограммы. Полученные результаты обрабатывали с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6 (StatSoft Corp., США). Для анализа различий количественных признаков в трех и более несвязанных группах использовали статистический критерий Краскелла–Уоллиса ANOVA, в двух несвязанных группах применяли критерий Манна–Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0.05$.

Условия КВЧ-облучения. В качестве источника микроволнового излучения использовали генератор на основе диода Ганна с частотой в диапазоне от 32.9 до 39.6 ГГц (длина волны соответственно от 9.1 до 7.6 мм) и мощностью излучения от 3 до 30 мВт. Установка микроволнового облучения обеспечивала подведение излучения к исследуемому объекту с помощью волновода сечением 7.2×3.4 мм с согласующими элементами. Осуществлялся контроль ре-

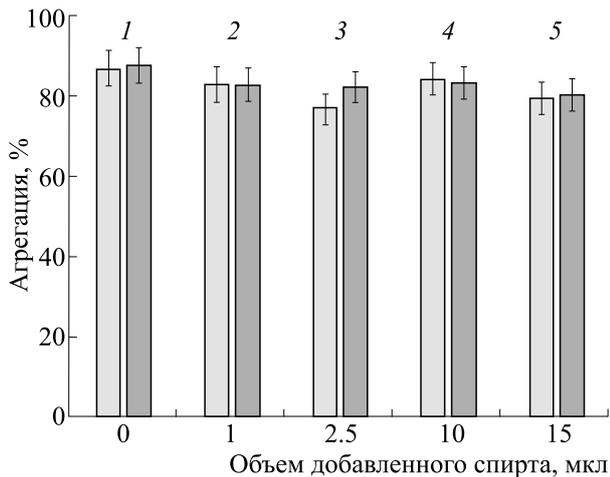


Рис. 1. Влияние метанола и этанола на степень агрегации тромбоцитов: 1 – контроль (ОТП), 2 – ОТП + метанол/этанол (1 мкл), 3 – ОТП + метанол/этанол (2.5 мкл), 4 – ОТП + метанол/этанол (10 мкл), 5 – ОТП + метанол/этанол (15 мкл).

жима бегущей волны, мощности микроволнового излучения и длины волны излучения. Образцы подвергали микроволновому воздействию над рупорной антенной, расположенной вертикально. Они находились над антенной на расстоянии 6 см от плоскости раскрытия рупора, т.е. в ближней зоне облучателя. Образцы перемешивали осторожным встряхиванием каждые 5 мин. Температуру в образцах измеряли с использованием волоконно-оптического микротермодетектора МТ-4МО (Россия) с

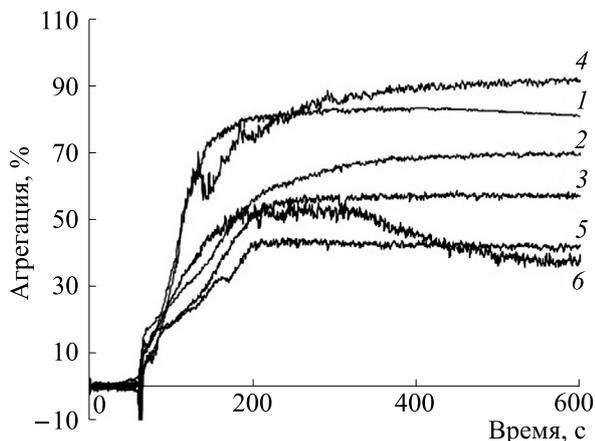


Рис. 2. Типичные кривые агрегации тромбоцитов при добавлении индуктора агрегации ристомицина. Образец содержит 225 мкл плазмы донора и 25 мкл индуктора ристомицина с конечной концентрацией в образце 0.1 мг/мл: 1 – контроль (ОТП), 2 – ОТП + облучение КВЧ, 3 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 1.0 мкл, 4 – ОТП + облучение КВЧ + метанол (2.5 мкл), 5 – ОТП + облучение КВЧ + метанол (10 мкл), 6 – ОТП + облучение КВЧ + метанол (15 мкл).

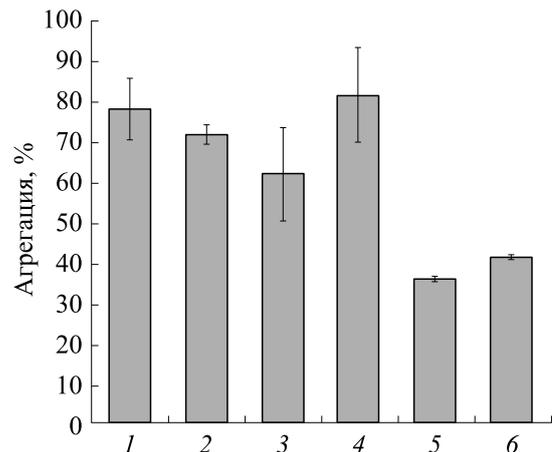


Рис. 3. Влияние концентрации метанола на степень агрегации тромбоцитов: 1 – контроль (ОТП), 2 – ОТП + облучение КВЧ, 3 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 1 мкл, 4 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 2.5 мкл, 5 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 10 мкл, 6 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 15 мкл.

точностью 0.1°C. Расчет удельной поглощенной мощности излучения для аналогичной схемы эксперимента приведен в работе [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших экспериментов показали, что добавление метанола или этанола незначительно снижает степень агрегации (в пределах ошибки эксперимента) по сравнению с контролем при добавлении индуктора ристомицина (рис. 1).

На рис. 2–4 представлены результаты, показывающие влияние КВЧ-излучения в присутствии метанола различной концентрации на степень агрегации и скорость агрегации тромбоцитов. Как следует из приведенных рисунков, КВЧ-излучение снижает степень агрегации по сравнению с контролем при добавлении индуктора ристомицина (рис. 2 и 3). Кроме того, представленные результаты показывают, что КВЧ-излучение изменяет угол наклона агрегатограммы по сравнению с контролем при добавлении того же индуктора (рис. 4).

Облучение КВЧ в течение 30 мин в присутствии индуктора ристомицина снижало степень агрегации по сравнению с контролем, а при добавлении в среду инкубации метанола (0–15 мкл) степень агрегации изменялась в зависимости от его количества. При этом добавление 2.5 мкл метанола вызывало повышение процента агрегации тромбоцитов по сравнению с добавлением 1 мкл, что указывает на двухфазную реакцию метанола, на текучесть мембранных липидов, приводящей к возникновению дефектов белково-липидного бислоя мембран тромбоцитов в зависимости от концентрации мета-

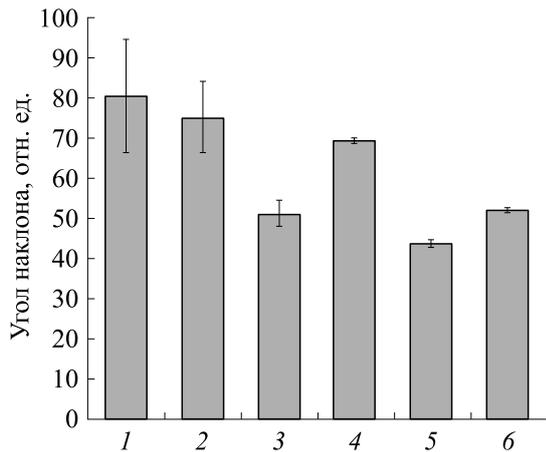


Рис. 4. Влияние концентрации метанола на скорость агрегации тромбоцитов: 1 – контроль (ОТП), 2 – ОТП + облучение КВЧ, 3 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 1 мкл, 4 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 2.5 мкл, 5 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 10 мкл, 6 – ОТП + облучение КВЧ + метанол 15 мкл.

нола, что согласуется с результатами, полученными в работе [22].

Аналогичные результаты мы получаем для угла наклона кривой агрегации (рис. 4).

На рис. 5–7 представлены результаты, показывающие влияние КВЧ-излучения в присутствии этанола различной концентрации на степень агрегации и скорость агрегации тромбоцитов.

При КВЧ-облучении (30 мин) в присутствии индуктора ристомидина степень агрегации тромбоцитов снижалась по сравнению с контролем, а при добавлении в среду инкубации этанола (0–15 мкл) – изменялась в зависимости от количества добавленного этанола в среду инкубации (рис. 6).

Добавление 1 мкл этанола способствовало повышению процента агрегации и угла наклона кривой агрегации тромбоцитов, которое при дальнейшем увеличении концентрации этанола сменялось снижением указанных параметров, что говорит о двухфазном характере влияния концентрации этанола на механические свойства мембраны тромбоцитов.

На рис. 7 представлены результаты, показывающие влияние КВЧ-облучения в присутствии этанола различной концентрации на скорость агрегации тромбоцитов.

Эффект КВЧ-облучения проявлялся в снижении степени агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем в присутствии индуктора агрегации – ристомидина, а также в уменьшении угла наклона агрегатограммы (скорости агрегации тромбоцитов). Добавление первичных спиртов (метанола и этанола) в среду тромбоцитов способствовало разнонаправленному изменению контролируемых параметров.

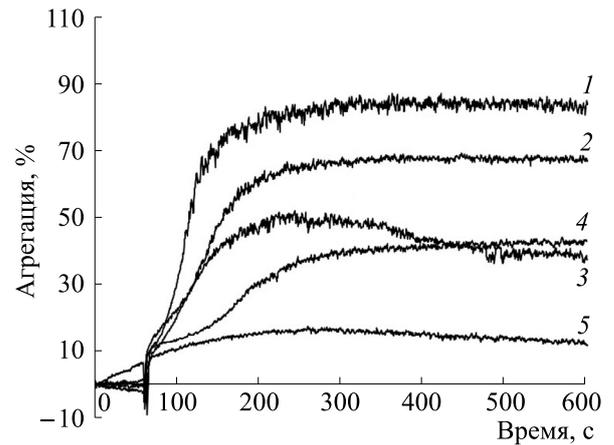


Рис. 5. Типичные кривые агрегации тромбоцитов при добавлении индуктора агрегации ристомидина: 1 – контроль (ОТП), 2 – ОТП + облучение КВЧ, 3 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (2.5 мкл), 4 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (10 мкл), 5 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (15 мкл). Образец содержал 225 мкл плазмы донора и 25 мкл индуктора ристомидина с конечной концентрацией в образце 0.1 мг/мл.

Рассматривая механизм наблюдаемого эффекта действия КВЧ-излучения на процесс агрегации тромбоцитов, индуцированный ристомидином, следует учесть наличие двух структурных переходов в мембранах тромбоцитов при изменении температуры в области 10–30°C. Переход при 23–25°C инициируется в липидной фазе, а при температурах 13–14°C – в белках. При этих же температурах происходит изменения скорости агрегации тромбоцитов под действием агрегирующих агентов.

Как известно, алкоголь вызывает апоптоз в гепатоцитах, в культурах нервных клеток и фибробластов роговицы, а также способствует активации апоптоза у тромбоцитов [20]. Показано, что этанол инициирует митохондриально-опосредованный внутренний апоптоз тромбоцитов, приводящий к снижению числа циркулирующих тромбоцитов.

Также отмечено, что при потребление крысами этанола в течение 21 суток приводило к снижению агрегации тромбоцитов [21]. Известно, что добавление ристомидина в пробу, содержащую тромбоциты, вызывала агрегацию, механизм которой обусловлен взаимодействием комплекса I α -V-IX тромбоцитарного гликопротеина, находящегося на поверхности мембраны, и фактора фон Виллебранда. Добавление этанола в среду инкубации клеток влияет на агрегацию тромбоцитов, что возможно обусловлено его воздействием на структурные свойства клеточной мембраны. Для того чтобы понять, что происходит с клеточными мембранами при добавлении первичных спиртов, следует обратиться к результатам исследований [22, 24–26]. В работе [22] при помощи методов эктацитометрии и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса

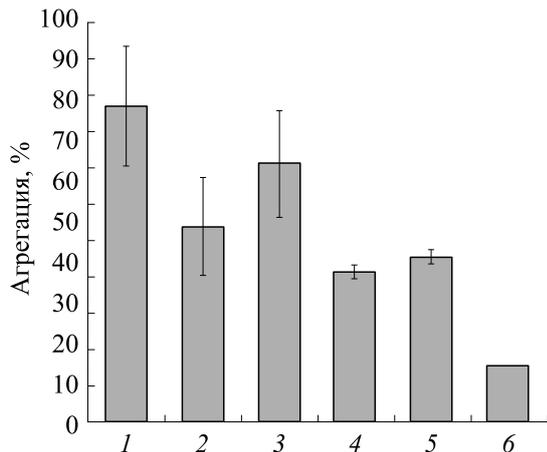


Рис. 6. Влияние концентрации этанола на степень агрегации тромбоцитов: 1 – контроль (ОТП), 2 – ОТП + облучение КВЧ, 3 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (1 мкл), 4 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (2.5 мкл), 5 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (10 мкл), 6 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (15 мкл).

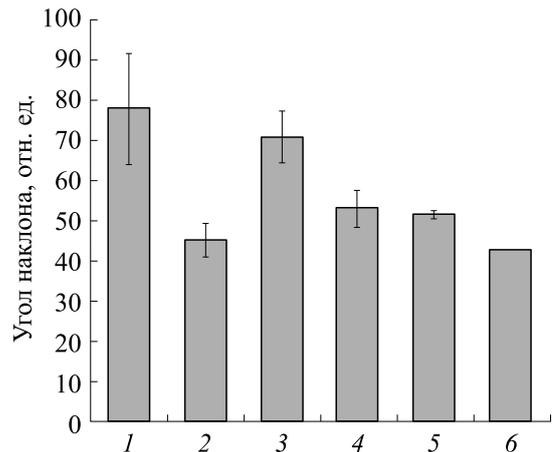


Рис. 7. Влияние концентрации этанола на скорость агрегации тромбоцитов: 1 – контроль (ОТП), 2 – ОТП + облучение КВЧ, 3 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (1 мкл), 4 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (2.5 мкл), 5 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (10 мкл), 6 – ОТП + облучение КВЧ + этанол (15 мкл).

оценивали изменения текучести, деформируемости и стабильности мембраны эритроцитов в присутствии четырех членов гомологичной серии первичных спиртов (метанола, этанола, 1-пропанола и 1-бутанола), концентрации которых не превышали 0.5%. Полученные результаты показали, что спирты оказывали двухфазное влияние на деформацию мембран, вызывая ее увеличение, а затем снижение деформации в зависимости от их размера (длины молекул спиртов) и концентрации. Было обнаружено изменение поверхностной текучести липидного ядра, показывающее постепенное расширение мембраны и уменьшение ее толщины при увеличении концентрации первичных спиртов. При этом эффективность спиртов убывала от бутанола до метанола в порядке «бутанол > пропанол > этанол > метанол» со значительной корреляцией между поверхностной текучестью и деформируемостью ($r = 0.697, p < 0.01$) [23–26].

Следует отметить результаты экспериментальных исследований, представленные в работе [27]. Они показывают, что после пробоя клеток короткими высоковольтными импульсами агрегация не наблюдалась. При этом последующее КВЧ-облучение, как и инкубация клеток при температуре, близкой к физиологической, частично восстанавливали способность клеток к агрегации. КВЧ-облученные клетки увеличивали электрическую прочность и по сравнению с контрольными обнаруживали меньшую скорость ионных утечек и соответственно выше скорость агрегации.

В нашем эксперименте проявлялся двухфазный характер влияния метанола и этанола на агрегацию тромбоцитов. Как метанол, так и этанол вызывали при определенных начальных концентрациях сни-

жение процента агрегации и угла наклона кривой, а затем увеличение этих параметров с ростом концентрации добавляемых спиртов в пробе. Следуя приведенным выше литературным данным, можно предположить, что первичные спирты вызывали увеличение, а затем снижение текучести липидного компонента мембраны тромбоцитов в зависимости от концентрации добавляемого спирта. Это влияло на стабильность белково-липидного бислоя мембран тромбоцитов и приводило к нарушению перераспределения и движения ионов через мембрану, а также гидролиза инозитольных фосфолипидов, что способствовало увеличению ионной силы и в итоге – защелачиванию среды, в результате чего могло происходить нарушение целостности взаимодействия комплекса $\text{Ib}\alpha\text{-V-IX}$ тромбоцитарного гликопротеина и фактора фон Виллебранда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким, образом, предложенный мембранный механизм обнаруженного эффекта влияния КВЧ-излучения низкой интенсивности на процесс агрегации тромбоцитов в присутствии первичных спиртов существенно расширяет наши прежние представления о действии микроволнового излучения на клетки крови. Результаты работы могут быть полезны при применении КВЧ-излучения как безопасного фактора воздействия с целью коррекции патологий реологических свойств крови человека, в частности при алкогольной интоксикации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках Государственного задания ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН по теме «РЭЛДИС» № 0030-2019-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К. Д. Казаринов, О. А. Баранова, В. А. Щелконогов и А. В. Чеканов, *Электронная техника. СВЧ-техника* **2** (545), 79 (2019).
2. L. Alberio, O. Safa, K. J. Clemetson, C. T. Esmon, and G. L. Dale, *Blood* **95**, 1694 (2000).
3. M. Barteri, R. De Carolis, F. Marinelli, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **35**, 126 (2016).
4. Q. Hou, M. Wang, S. Wu, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **34**, 85 (2015).
5. R. Meena, K. Kajal, J. Kumar, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **33**, 81 (2014).
6. V. Garaj-Vrhovac, G. Gajski, S. Pažanin, et al., *Int. J. Hyg. Environ. Health* **214** (1), 59 (2011). DOI: 10.1016/j.ijheh.2010.08.003
7. К. Д. Казаринов, Г. Г. Борисенко и И. Г. Полников, *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ-техника* **1** (536), 60 (2018).
8. I. I. Vlasova, E. V. Mikhalechik, A. A. Gusev, et al., *Bioelectromagnetics* **39** (2), 144 (2018).
9. G. Andocs, O. Szasz, and A. Szasz, *Electromagn. Biol. Med.* **28**, 148 (2009).
10. A. Szasz, *J. Cancer Res. an Therap.* **3**, 56 (2007).
11. А. В. Чеканов, О. А. Баранова, В. А. Щелконогов и К. Д. Казаринов, в кн. *VI съезд биофизиков России. Сборник научных трудов* (2019), т. 2, с. 38.
12. B. S. Coller, *Clin. Invest. J.* **60** (2), 302 (1977).
13. D. Manna and R. Ghosh, *Electromagn. Biol. Med.* **35**, 265 (2016).
14. S. Koyama, E. Narita, Y. Suzuki, et al, *J. Rad. Re.* **56**, 30 (2015).
15. Л. В. Шаталина, *Кардиология* **10**, 25 (1993).
16. V. F. Kirichuk, M. V. Volin, A. V. Majborodin, et al., *Tsitologiya* **43** (12), 1115 (2001).
17. J. T. Bushberg, *Dissertation* (Purdue University, 1982).
18. C. Birka, A. P. Lang, S. D. Kempe, et al., *Eur. J. Physiol.* **448**, 471 (2004).
19. V. Leytin, S. Mykhaylov, A. F. Starkey, et al., *Br. J. Haematol.* **133**, 78 (2006).
20. L. Liu, M. Chen, L. Zhao, et al., *Alcohol Clin. Exp. Res.* **41** (2), 291 (2017).
21. O. Baysan, K. Kaptan, K. Erinf, et al., *Tohoku J. Exp. Med.* **2**, 85 (2005).
22. M. Sonmez, H. Y. Ince, O. Yalcin, et al., *PLoS One* **8** (9), e76579 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0076579
23. H. V. Ly and M. L. Longo, *Biophys. J.* **87**, 1013 (2004).
24. K. Vaňousová, J. Beranová, R. Fišer, et al., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860** (3), 718 (2018) DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.12.015
25. K. S. Mironov, M. Shumskaya, R. A. Sidorov, et al., *Plant J.* **96** (5), 1007 (2018) DOI: 10.1111/tpj.1408
26. C. H. Tse, J. Comer, S. K. Sang Chu, et al., *J. Chem. Theor. Comput.* **15** (5), 2913 (2019) DOI: 10.1021/acs.jctc.9b00022
27. К. Д. Казаринов, *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ-техника* **2**, 62 (2018).

The Effect of Microwave Radiation on the Sensitivity of Cells to Monohydric Alcohols in Platelet-Rich Plasma

K.D. Kazarinov*, **V.A. Shchelkonogov***, **, ***, **O.A. Baranova***, **, **A.V. Chekanov***, **, **E.U. Solovieva****, and **A.I. Fedin****

**Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Fryazino branch, Russian Academy of Sciences, pl. Vvedenskogo 1, Fryazino, Moscow Region, 141190 Russia*

***Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

****MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*

We present the results of experimental studies on the aggregation of blood cells in platelet-rich plasma in the presence of an aggregation inducer rhytomicin under the effects of low-intensity radiation of extremely-high frequency. Primary alcohols were used as stimulators for partial degradation of protein-lipid bilayer in the cell membrane. The results showed that exposure to radiation of extremely-high frequency reduces the extent of rhytomicin-induced platelet aggregation and changes the angle of inclination of the aggregatogram. This study revealed a two-phase nature of the effects of alcohols on platelet aggregation – the first phase is characterized by a decrease in aggregation and in the angle of inclination of the aggregatogram, the second phase includes an increase in platelet aggregation and in the angle of inclination simultaneously with an increase in the concentration of alcohols in the sample. A possible mechanism underlying the observed effects is under debate.

Keywords: microwave radiation, intercellular interaction, platelets, methanol, ethanol, aggregation inducers, mechanism of the biological effect of extremely-high frequency radiation

ОСОБЕННОСТИ БИОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*

© 2020 г. Е.А. Сладкова, М.Ю. Скоркина

Белгородский национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 21.04.2020 г.

Принята к публикации 20.05.2020 г.

Изучены особенности биофизических свойств форменных элементов крови людей пожилого возраста в условиях механического стресса *in vitro*, который, согласно литературным данным, запускает сигнальный каскад пуриnergической рецепторной системы. Установлено, что жесткость клеточной поверхности эритроцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов при этом снизилась, а потенциал поверхности стал более положительным. Полученные экспериментальные данные могут играть роль в расширении знаний о влиянии механической деформации на лейкоциты и тромбоциты, которые являются основными регуляторами гомеостатических процессов в микроциркуляторном русле, так и на эритроциты, участвующие в регуляции сосудистого тонуса артериол и оксигенации тканей у лиц пожилого возраста.

Ключевые слова: механический стресс, пуриnergическая сигнальная система, форменные элементы крови, потенциал поверхности, модуль Юнга.

DOI: 10.31857/S0006302920060101

Старение организма в преобладающем большинстве случаев сопровождается развитием сердечно-сосудистых заболеваний, во многом обусловленных молекулярно-клеточными возрастными изменениями эндотелия [1], а также реологических показателей крови [2]. Подобные нарушения могут быть связаны с изменением в функционировании пуриnergических рецепторов форменных элементов крови и клеток эндотелия. В ряде исследований приведены данные о значительной роли пуриnergической сигнализации в развитии различных сердечно-сосудистых патологий – инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, гипертензии, инсульта, тромбоза [3]. Кроме того, у людей пожилого и старческого возраста значительно повышается вероятность развития инфекционных заболеваний. В первую очередь это связано со снижением функциональной активности иммунной системы. Важную роль в механизмах старения иммунной системы играет пуриnergическая регуляция иммунокомпетентных клеток, отвечающих за воспалительные реакции в организме [4].

Было показано, что в условиях механической деформации эритроциты высвобождают молеку-

лы АТФ [5], в результате чего запускаются пара- и аутокринные сигнальные механизмы [6]. В межклеточном пространстве молекула АТФ распадается до АДФ, АМФ и аденозина [7], которые являются агонистами пуриnergических рецепторов, широко представленных на форменных элементах крови.

В связи с вышеизложенным целью работы явилось изучение особенностей биофизических свойств форменных элементов крови людей пожилого возраста в условиях механического стресса *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на крови здоровых людей-добровольцев пожилого возраста (от 60 до 75 лет, $n = 30$), проходивших диспансеризацию на базе областной клинической больницы г. Белгорода. Забор крови осуществляли из локтевой вены с участием специализированного медперсонала.

Модель механического стресса *in vitro* осуществляли согласно методике, описанной в работе [8]. Данная модель позволяет создать условия, которые максимально приближены к физиологическим параметрам микроциркуляторного русла

Сокращение: АСМ – атомно-силовая микроскопия.

[9]. В одноразовый туберкулиновый шприц (объемом 1 мл) помещали 0.5 мл цельной крови, пузырьки воздуха были тщательно убраны. Затем суспензию клеток пропускали через 25-миллиметровую одноразовую иглу. Инъекцию выполняли путем размещения груза массой 1 кг на верхнем конце внутреннего поршня шприца, который был закреплен вертикально. Выпрыскивали кровь в микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл. Расстояние от кончика иглы до дна пробирки составляло 15 мм, напряжение сдвига стенки находилось в пределах 6600 дин/см^2 . Средняя скорость в игле достигала 5100 см/с , а время прохождения форменных элементов равнялось 0.6 мс. Следовательно, клетки подвергались воздействию относительно высокого напряжения в течение очень короткого времени. Опытные пробы крови подвергали механическому стрессу, контрольные оставляли без воздействия.

С целью оценки концентрации макроэргических соединений при проведении механического стресса *in vitro* измеряли их содержание в исследуемых пробах колориметрическим методом [10], используя фотометр КФК-3 (ЗОМЗ, Сергиев Посад, Россия). Концентрацию соединений рассчитывали по разности оптических плотностей содержимого пробирки, в которой провели гидролиз фосфатных связей, и пробой без гидролиза фосфатных связей, используя для этого калибровочный график. Калибровочный график строили, используя раствор фосфат-ионов (ГСО 7791-2000) в концентрациях от 50 до 500 мкг/мл с шагом в 50 мкг/мл. Измерение концентрации макроэргических соединений выполняли в трех повторностях для каждой пробы.

Цельную кровь разделяли на эритроцитарную, лейкоцитарную и тромбоцитарную массы путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин. Затем отбирали плазму, обогащенную тромбоцитами, и дополнительно центрифугировали при 2500 об/мин в течение 15 мин, при этом получали чистую взвесь тромбоцитов. Лейкоцитарное кольцо отбирали в отдельную пробирку, полученную суспензию лейкоцитов с помощью магнита для клеточной сепарации EasySep Magnet и набора для выделения лимфоцитов EasySep/EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (StemCell Technologies, США) разделяли на гранулоциты и лимфоциты.

Биофизические свойства поверхности форменных элементов крови изучали с использованием атомно-силового микроскопа (АСМ) ИНТЕГРА ВИТА (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71, производитель NT MDT, Зеленоград, Россия). Электрические свойства мембраны эритроцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов оценивали, выполняя на АСМ измерения поверх-

ностного потенциала в режиме зонда Кельвина. Готовили суспензию клеток для измерения поверхностного потенциала и осуществляли процедуру его измерения согласно способу, изложенному в работе [11]. Для работы использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Из каждой пробы сканировали по 20 клеток каждой популяции, обработку полученных сканов проводили в программе Nova (NT-MDT, Зеленоград, Россия).

Жесткость клеточной поверхности оценивали по числовым данным модуля Юнга. В основе метода регистрации модуля Юнга лежит измерение степени деформации поверхности образца при взаимодействии его с вершиной зонда АСМ. В работе использованы модифицированные АСМ-зонды, изготовленные коллективом авторов на основе полимерных микросфер с радиусом закругления 5 мкм [12]. Измерение модуля Юнга осуществляли на АСМ ИНТЕГРА Вита в режиме силовой спектроскопии, согласно алгоритму, описанному в работе [13]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток каждой популяции.

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента при $p < 0.05$ и нормальном распределении. В работе приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки среднего (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании сдвиговой деформации клеток крови концентрация макроэргических соединений в крови составила $0.021 \pm 0.001 \text{ мкмоль/л}$, что в 2.6 раза выше по сравнению с контролем ($0.008 \pm 0.001 \text{ мкмоль/л}$).

В условиях механического стресса показано изменение биофизических свойств форменных элементов крови. Так, потенциал поверхности эритроцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов стал более положительным – увеличился соответственно на 30, 32.2, 27.5 и 54.3% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (табл. 1).

При механическом воздействии на клетки модуль Юнга форменных элементов крови людей пожилого возраста снизился: эритроцитов на 22% ($p < 0.05$), гранулоцитов на 19% ($p < 0.05$), лимфоцитов на 23% ($p < 0.05$) и тромбоцитов на 40% ($p < 0.05$) по сравнению со значениями в контроле (табл. 2).

В нашем исследовании воспроизведены условия механического «стресса» *in vitro*, которые, согласно литературным данным, могут быть приближены к физиологическим характеристикам

Таблица 1. Потенциал поверхности форменных элементов крови

Клеточная популяция	Контроль, мВ	Опыт, мВ
Эритроциты	-15.2 ± 0.8	$-10.7 \pm 1.2^*$
Гранулоциты	-25.8 ± 1.2	$-17.5 \pm 0.6^*$
Лимфоциты	-39.6 ± 0.2	$-28.7 \pm 0.3^*$
Тромбоциты	-16.2 ± 1.3	$-7.4 \pm 1.1^*$

Примечание. * – Статистически значимые различия между показателями по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

Таблица 2. Модуль Юнга форменных элементов крови

Клеточная популяция	Контроль, мВ	Опыт, мВ
Эритроциты	4.2 ± 0.01	$3.3 \pm 0.01^*$
Гранулоциты	6.3 ± 0.01	$5.1 \pm 0.01^*$
Лимфоциты	4.7 ± 0.02	$3.6 \pm 0.01^*$
Тромбоциты	4.5 ± 0.03	$2.7 \pm 0.02^*$

Примечание. * – Статистически значимые различия между показателями по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

микроциркуляторного русла и способствуют активации пуринергической сигнальной системы форменных элементов крови [8, 9, 14, 15]. В пробах крови, подвергшихся механическому «стрессу», установлено повышение концентрации макроэргических соединений в 2.6 раза, что может быть связано с эксскрецией эритроцитами молекул АТФ в межклеточное пространство в ответ на силовое воздействие со стороны смещающихся слоев плазмы [1].

Влияние механического стресса наблюдали в изменении биофизических свойств форменных элементов периферической крови людей пожилого возраста. В частности, увеличение заряда мембраны и снижение жесткости эритроцитов может быть связано с воздействием таких макроэргических соединений, как АТФ и ее производных на P2Y₁₃-рецепторы на клеточной поверхности за счет изменения работы ионных каналов, селективных по отношению к Ca²⁺ [16]. Активация этих рецепторов на мембране эритроцита может сопровождаться не только изменениями их функций, но и морфологии клетки, ионного состава цитоплазмы и состояния белков цитоскелета [17]. Аналогичный механизм изменения биофизических свойств под действием макроэргических соединений может быть характерен и для лимфоцитов. На поверхности этих клеток локализованы рецепторы семейства P2X, которые представляют собой мембранные ионные каналы [18], контролируемые концентрацией цитозольного Ca²⁺ [19].

При повышении концентрации макроэргических молекул наблюдали также снижение жесткости и увеличение поверхностного потенциала

плазмалеммы гранулоцитов. Рядом работ показано, что рецепторы к пуриновым соединениям на поверхности гранулоцитов, доминирующими подтипами которых являются P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ и P2Y₁₁ [20], необходимы для ориентации клеток и движения в ответ на хемотаксические стимулы [19, 21]. Важным моментом в нашем исследовании является установление повышения заряда поверхности тромбоцитов, возможно посредством связывания продуктов распада макроэргических соединений с P2Y-рецепторами тромбоцитов [20]. Известно, что тромбоциты принимают активное участие в формировании внеклеточных ловушек нейтрофилов. Так, увеличение поверхностного потенциала как гранулоцитов, так и тромбоцитов может ухудшать процессы взаимодействия между собой их поверхностей, что в свою очередь приведет к снижению воспалительного ответа иммунокомпетентными клетками в крови людей пожилого возраста.

Таким образом, при моделировании механического стресса *in vitro* показано увеличение концентрации макроэргических соединений в крови людей пожилого возраста. Вместе с тем под влиянием механического стресса произошло снижение модуля Юнга и увеличение заряда плазмалеммы у всех четырех популяций форменных элементов крови. Полученные экспериментальные данные играют важную роль в расширении знаний о влиянии механической деформации на лейкоциты и тромбоциты, которые являются основными регуляторами гомеостатических процессов в микроциркуляторном русле, и на эритроциты, участвующие в регуляции реологических показателей и снабжении тканей кислородом.

Дальнейшее изучение морфологии и функциональных свойств форменных элементов крови в условиях сдвиговой деформации мембран может дать возможность подойти к решению проблем по коррекции патологических состояний (нарушение иммунных реакций, нарушение микроциркуляции в сосудистом русле, прогрессирующие сердечно-сосудистых патологий), сопровождающих старение организма.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда по мероприятию «Проведение инициативных исследований молодыми учеными», 2018-2020 гг. (соглашение № 18-75-00041).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинской декларации, было получено информированное согласие всех субъектов эксперимента в соответствии с рекомендациями (Декларация по этическим принципам медицинских исследований, в которых участвуют люди, принятая 52-й Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь 2000 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Olivieri, M. Pala, and F. Gandini, PLoS One **8** (7), 34 (2013).
2. Е. В. Узикова, М. Ю. Милорадов и В. Н. Левин, Ярославский педагогич. вестн. **3** (3), 108 (2011).
3. G. Burnstock, Keio J. Med. **62**, 63 (2013).
4. D. Erlinge and G. Burnstock, Purinergic Signalling **1**, 1 (2008).
5. R. Sprung, R. Sprague, and D. Spence, Anal. Chem. **74** (10), 2274 (2002).
6. A. Baroja-Mazo, H. Barbera-Gremades, and P. Pelegrini, Biochim. Biophys. Acta **1828** (1), 79 (2013).
7. G. G. Yegutkin, Biochim. Biophys. Acta **1783** (5), 673 (2008).
8. T. Oonishi, K. Sakashita, and N. Uyesaka, Am. J. Physiol. Soc. **273**, 1828 (1997).
9. A. Trautmann, Sci. Signal. **2** (56), ре6 (2009).
10. Т. Л. Алейникова и Г. В. Рубцова, *Руководство к практическим занятиям по биохимии* (Высшая школа, М., 1988).
11. Е. А. Сладкова и М. Ю. Скоркина, Биофизика **59** (2), 310 (2014).
12. М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, Е. А. Сладкова и Н. А. Забиняков, Патент РФ № 2466401, Бюл. № 31. Опубликовано 10.11.2012.
13. М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, А. В. Муравьев и др., Клет. технол. в биол. и мед. **3**, 172 (2012).
14. M. Ellworth, C. Ellis, and D. Goldman, Physiology **24**, 107 (2009).
15. J. Evans, W. Gratzner, N. Mohandas, and K. Parker, J. Sleep, Biophys. J. **94**(10), 4134 (2008).
16. D. H. Lee, K. S. Park, I. D. Kong, et al., BMC Immunol. **7**, 22 (2006).
17. L. Wang, G. Olivercrona, and M. Götberg, Circ. Res. **96** (2), 189 (2005).
18. R. A. North, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **371** (1700), 20150427 (2016).
19. W. G. Junger, Nat. Rev. Immunol. **11** (3), 201 (2011).
20. E. R. Lazarowski, Purinergic Signalling **8**, 359 (2012).
21. M. D. Ita and M. H. Vargas, Life Sci. **145** (5), 85 (2016).

Peculiarities of Biophysical Properties of the Formed Elements in the Blood of the Elderly under Mechanical Stress *in vitro*

E.A. Sladkova and M.Yu. Skorkina

Belgorod National Research University, ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015 Russia

This study explores the peculiarities of biophysical properties in blood cells of the elderly under mechanical stress, applied *in vitro*, which, according to the literature data, triggers the signaling pathways engaged by purinergic receptor activation. Along with it, we detected a decrease in the stiffness of the cell surface of red blood cells, granulocytes, lymphocytes and platelets and the surface potential became more positive. Our findings could increase knowledge about the effect of mechanical deformation on leukocytes and platelets, which are the main regulators of homeostatic processes in the microvasculature, and on red blood cells involved in the regulation of vascular tone of arterioles and tissue oxygenation in the elderly.

Keywords: mechanical stress, purinergic signaling system, surface potential, Young's modulus

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ КЛЕТКАМИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ И ИММУНОТОКСИНОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К β -ИЗОФОРМЕ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 90

© 2020 г. М.А. Жмурина, В.В. Врублевская, Ю.Ю. Скарга, В.С. Петренко, В.К. Жалимов, О.С. Моренков

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

E-mail: mariya100694@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2020 г.

После доработки 20.07.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Показано, что мышинные моноклональные антитела к Hsp90 β (β -изоформа белка теплового шока 90) специфически связываются с Hsp90 β , локализованным на поверхности опухолевых и нетрансформированных клеток. После связывания с мембрано-ассоциированным Hsp90 β антитела активно диссоциировали в культуральную среду, а также интернализировались клетками. Иммуноконъюгат на основе Hsp90 β -специфического антитела и цитотоксического агента мертанзина не обладал высокой цитотоксической активностью для опухолевых клеток *in vitro*. Введение Hsp90 β -специфических антител мышам не влияло на рост первичной опухоли эпидермоидной карциномы Льюиса, в то время как метастазирование опухоли в легкие снижалось и увеличивалась средняя продолжительность жизни мышей. Полученные результаты свидетельствуют об определенном терапевтическом потенциале антител к Hsp90 β для лечения опухолевых заболеваний.

Ключевые слова: экстраклеточный Hsp90 β , моноклональные антитела, иммунотоксины, интернализация антител клетками, эпидермоидная карцинома Льюиса, метастазирование.

DOI: 10.31857/S0006302920060113

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является белком-шапероном и участвует в фолдинге вновь синтезированных белков, сборке мультимолекулярных комплексов, деградации белков, предотвращает агрегацию и денатурацию белков при различных видах стресса [1]. Выявлено более 200 внутриклеточных белков-клиентов Hsp90, участвующих в клетках в трансдукции сигналов, внутриклеточной сигнализации, транскрипции, регуляции экспрессии генов и т.д. [2, 3]. Существуют две изоформы Hsp90: Hsp90 α (индукбельная форма) и Hsp90 β (конститутивная форма). Уровень гомологии двух изоформ Hsp90 составляет 86%, однако имеются существенные различия в их биохимических свойствах, экспрессии и функционировании [4].

Кроме выполнения внутриклеточных функций Hsp90 обнаруживается вне клетки (экстраклеточный Hsp90 – eHsp90) в свободной форме во

внеклеточном пространстве и в форме Hsp90, ассоциированного с плазматической клеточной мембраной [5–7]. eHsp90 играет важную роль в обеспечении миграции и инвазии нормальных и опухолевых клеток, а также в процессах метастазирования опухолевых клеток [5–15]. В сравнении с нормальными клетками в опухолевых клетках существенно повышена мембранная экспрессия и секреция Hsp90, при этом уровень Hsp90 на плазматической мембране коррелирует с метастатическим потенциалом клеток [11, 16]. Показано, что поверхностно-ассоциированный Hsp90 активно интернализуется опухолевыми клетками *in vitro* и в организме животных [17].

Важная роль eHsp90 в обеспечении инвазии и метастазирования опухолевых клеток [5–15], а также выраженная экспрессия Hsp90 на мембране опухолевых клеток [11, 16] делают его перспективной молекулярной мишенью для создания противоопухолевых препаратов. Показано, что ингибирование eHsp90 с помощью специфических антител, а также с помощью непроницающих в клетку низкомолекулярных ингибиторов Hsp90 приводило к снижению миграции опухоле-

Сокращения: Hsp90 – белок теплового шока 90, eHsp90 – экстраклеточный Hsp90, ДМЕМ – среда Игла в модификации Дальбекко, ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка, ИФА – иммуноферментный анализ, ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор.

вых клеток *in vitro* и ингибированию метастазирования опухолей у животных [6, 18–22]. Очевидно, что ингибиторы eHsp90, в том числе и Hsp90-специфические антитела, имеют значительный потенциал для создания на их основе противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. Кроме этого, так как повышенная мембранная экспрессия и интернализация eHsp90 является феноменом, характерным для опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [11, 16, 17], eHsp90 могут рассматриваться в качестве опухолеспецифических мишеней для иммунотоксических препаратов, селективно связывающихся с опухолевыми клетками и поражающих их. К настоящему времени продемонстрирована активность Hsp90 α -специфических антител в ингибировании метастазирования опухолей у мышей [20, 21]. Противоопухолевая активность антител, направленных к Hsp90 β изоформе, к настоящему времени не исследована. Также не исследован потенциал Hsp90-специфических антител для создания цитотоксических противоопухолевых препаратов. В данной работе мы показали, что иммунотоксины на основе Hsp90 β -специфических антител и мертанзина (DM1) обладают слабой цитотоксической активностью *in vitro* в отношении опухолевых клеток, что, вероятно, связано с активной диссоциацией антител с поверхности клеток и медленной интернализацией антител клетками. На модели мышшиной эпидермоидной карциномы Льюиса продемонстрирована противоопухолевая активность Hsp90 β -специфических антител в части снижения метастазирования опухоли и увеличения времени жизни мышей с привитой опухолью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и реактивы. В работе использовали среду Игла в модификации Дальбекко (DMEM) и эмбриональную сыворотку коров (ЭБС) производства GE Healthcare (США), растворы версена и трипсина производства ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург), антитела к IgG мышей («Имтек», Москва), пероксидазные конъюгаты антител против IgG мышей (Biorad, США). Общелабораторная пластиковая посуда и пластиковая посуда для культивирования клеток были производства компаний Greiner и Corning (США). Все остальные химические реактивы приобретали в компании Sigma (США).

Клеточные линии. Были использованы клеточные линии фибросаркомы человека HT1080 и глиобластомы человека A-172 из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки фибробластов сирийского хомяка ВНК-21, зеленой мартышки Vero и эпидермоидной карциномы Льюиса (LLC) получали из коллекции клеточных культур ИБК РАН

(Пушино Московской обл.). Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотики (по 40 Ед пенициллина, стрептомицина и гентамицина) (DMEM-ЭБС).

Очистка антител и конъюгирование с DM1. Полученные в лаборатории культур клеток и клеточной инженерии ИБК РАН мышшиные моноклональные антитела к Hsp90 (клон 1D5/A7, материалы готовятся к публикации) и контрольные антитела против gB вируса болезни Ауески (клон 34/2) [23] очищали из асцитной жидкости с помощью ионообменной хроматографии, как описано ранее [24]. Очищенные антитела 1D5/A7 и 34/2 конъюгировали с цитотоксическим соединением мертанзин (DM1) с использованием гетерофункционального агента Sulfo-SMCC [25]. Для проведения экспериментов на клеточных культурах препараты очищенных антител и конъюгатов антител с мертанзином диализовали против большого объема среды DMEM в течение двух суток (три смены среды DMEM) и стерилизовали фильтрацией через фильтры Durapore (Millipore, США) с диаметром пор 0.22 мкм.

Оценка связывания антител с клетками, их интернализации клетками и диссоциации в культуральную среду. Для оценки связывания антител с клетками, клетки выращивали до состояния монослоя, промывали холодным фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР), содержащим азид натрия (ФСБР-NaN₃), и инкубировали с антителами (1D5/A7 или 34/2) в концентрации 5 мкг/мл в течение 1 ч при температуре 4°C. После инкубации клетки тщательно отмывали холодным ФСБР-NaN₃, лизировали в 0.5%-м растворе тритона X-100 и определяли в лизатах содержание антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), как описано ниже. Для оценки диссоциации антител, связавшихся с клеточной поверхностью, клетки обрабатывали антителами (5 мкг/мл) в среде DMEM при 4°C в течение 1 ч. После тщательной отмывки холодной средой к клеткам добавляли культуральную среду DMEM-ЭБС и инкубировали при 4°C или 37°C в течение 2 ч с последующей оценкой содержания антител в культуральной среде (диссоциированные антитела) и в клеточных лизатах (клеточно-ассоциированные антитела) с помощью ИФА. Для оценки интернализации антител клетками, клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C в присутствии в культуральной среде антител (5 мкг/мл), отмывали и определяли количество клеточно-ассоциированных антител с помощью ИФА. Для определения количества интернализированных клетками антител мембрано-ассоциированные антитела удаляли посредством обработки раствором 0.1 М цитрата натрия (pH 3.0) в течение 2 мин при комнатной температуре с последу-

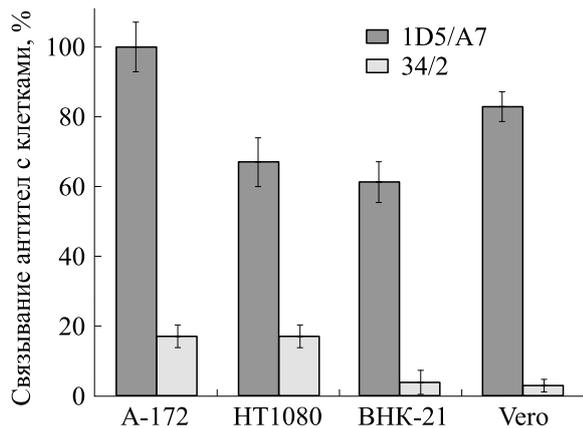


Рис. 1. Оценка связывания Hsp90 β -специфического антитела 1D5/A7 с клетками. За 100% принимали связывание антител 1D5/A7 с клетками A-172; 34/2 – негативное антитело.

ющим анализом внутриклеточных антител с помощью ИФА.

Определение содержания антител 1D5/A7 в клеточных лизатах и культуральной среде. Для определения содержания антител 1D5/A7 в лизатах клеток и культуральной среде 96-луночные планшеты сенсбилизировали аффинно-очищенными козьими антителами против IgG мыши (Имтек) и блокировали неспецифическую сорбцию в ФСБР, содержащем 0.1% твин-20 и 5% сыворотки крупного рогатого скота (ФСБР-Т-КРС). Исследуемые лизаты клеток и культуральную среду титровали в ФСБР-Т-КРС и инкубировали в лунках в течение 1 ч при 37°C. Для построения калибровочной кривой использовали очищенный препарат антител 1D5/A7 с известной концентрацией. После промывки в лунки вносили пероксидазный конъюгат против IgG мыши, адсорбированный иммуноглобулинами человека, и инкубировали планшеты в течение 1 ч при 37°C. Лунки промывали, проявляли реакцию с помощью орто-фенилендиамина, определяли оптическую плотность при 490 нм (OP_{490}) и рассчитывали концентрацию антител в образцах.

Определение цитотоксичности конъюгатов антител с DM1. Стерильные диализованные препараты иммуноконъюгатов антител 1D5/A7 и 34/2 с DM1 разводили до необходимых концентраций в среде ДМЕМ-ЭБС. Определение цитотоксичности препаратов антител и иммунотоксических конъюгатов проводили на клетках A-172, HT1080, ВНК-21 и Vero с помощью МТТ-метода, как описано ранее [26]. IC_{50} рассчитывали как минимальную концентрацию иммуноконъюгата, вызывающую гибель 50% клеток за 72 ч.

Определение противоопухолевой активности препаратов антител 1D5/A7 на животных. Суспен-

зию клеток карциномы Льюиса LLC, выращенных *in vitro*, центрифугировали, разводили в среде ДМЕМ до концентрации $1 \cdot 10^7$ кл./мл и вводили сингенным мышам линии C57BL/6 (шесть-восемь недель, самки массой 18–20 г). В работе использовали мышей линии C57BL/6, полученных из Питомника животных ИБХ РАН (Пушино Московской обл.). Введение опухолевых клеток осуществляли в объеме 100 мкл ($1 \cdot 10^6$ кл./мышь) подкожно в боковую область животного. Стерильные диализованные против ФСБР антитела вводили внутрибрюшинно на протяжении 11 суток, начиная с первых суток после введения опухолевых клеток. Дозы введения антител: первая инъекция – 2 мг/мышь, последующие инъекции – 1 мг/мышь. Контрольной группе подопытных животных вводили контрольные антитела 34/2 по той же схеме. Экспериментальная и контрольная группы состояли из 15 мышей при оценке метастазирования и из 20 мышей при оценке продолжительности жизни мышей и размеров первичной опухоли. Измерения длины (Д) и ширины (Ш) опухоли проводили с помощью штангенциркуля ежедневно, начиная с девятого суток. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = (1/2) \times Д \times Ш^2$. В этих же экспериментах определяли влияние антител на среднюю продолжительность жизни животных. В экспериментах по оценке метастазирования на 21-е сутки роста карциномы животным проводили цервикальную дислокацию, извлекали легкие и определяли количество окрашенных метастазов на поверхности легких.

Статистическая обработка. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. Каждая точка представляет собой среднее арифметическое значение повторов \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе исследовали полученные в ИБК РАН моноклональные мышинные антитела 1D5/A7, направленные к β -изоформе Hsp90 (материалы готовятся к печати). Количественную оценку связывания антитела 1D5/A7 с клеточной поверхностью проводили с помощью ИФА, определяющего содержание антител в образцах. При 4°C, в условиях блокирования процесса интернализации антител клетками, антитела 1D5/A7 эффективно и специфически связывались с клетками опухолевых линий A-172 и HT1080, а также нетрансформированных клеточных линий ВНК-21 и Vero (рис. 1).

Для оценки интернализации антител клетками в условиях постоянного присутствия антител в среде клетки инкубировали с антителами в среде

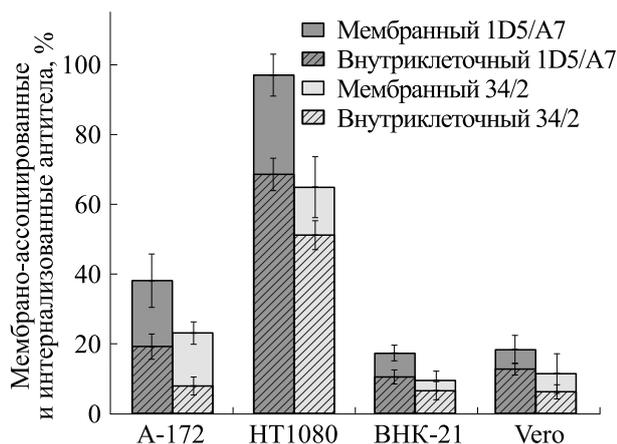


Рис. 2. Оценка интернализации антител 1D5/A7 клетками в условиях постоянного присутствия антител в культуральной среде. За 100% принимали суммарное количество антител 1D5/A7 (мембрано-ассоциированные и интернализированные антитела) в клетках HT1080.

ДМЕМ-ЭБС при 37°C в течение 4 ч, после чего оценивали количество антител, ассоциированных с клетками, включая количество интернализированных антител (обработка клеток «кислым» буферным раствором приводила к удалению с поверхности клеток антител, что позволяло дифференцировать мембрано-ассоциированные и интернализированные антитела). Результаты представлены на рис. 2. В условиях постоянного присутствия антител в среде антитела 1D5/A7 интернализировались опухолевыми клетками A-172 и HT1080, интернализация антитела неопухолевыми клетками ВНК-21 и Vero была снижена в два-четыре раза в сравнении с опухолевыми клетками. Следует отметить, что негативное антитело 34/2 также эффективно интернализировалось клетками: уровень интернализации негативного антитела был лишь в полтора раза ниже по сравнению с антителами 1D5/A7.

Для оценки диссоциации в культуральную среду мембрано-ассоциированных антител 1D5/A7 клетки инкубировали с антителами при 4°C в течение 1 ч в условиях блокирования эндоцитоза/пиноцитоза. Далее клетки промывали средой и инкубировали в среде без антител при 4°C или 37°C в течение 2 ч, оценивая количество клеточно-ассоциированных антител и антител, диссоциированных в среду с поверхности клеток. Оказалось, что за 2 ч инкубации клеток при 37°C значительная часть антител, связанных с Hsp90 β (более 80%), диссоциировала от поверхности клеток и переходила в среду (рис. 3). Диссоциация антител (комплексов антитело-Hsp90 β) в среду при инкубации при 4°C также наблюдалась, но в меньшей степени (рис. 3).

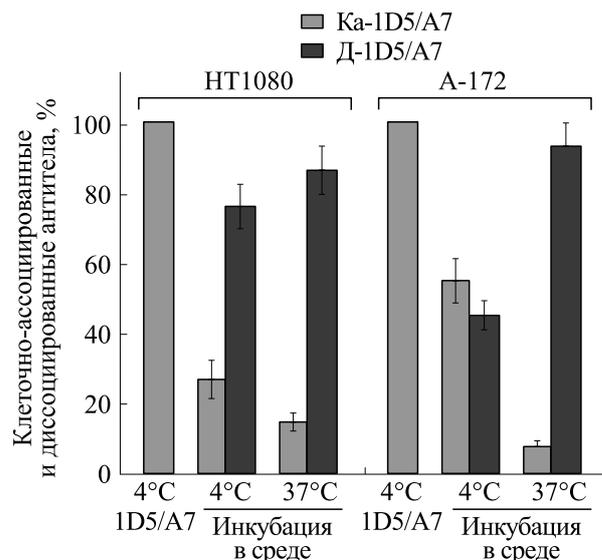


Рис. 3. Оценка диссоциации в культуральную среду антител 1D5/A7, связавшихся с поверхностью клеток. Антитела инкубировали с клетками в течение 1 ч при 4°C. После тщательной отмывки клетки инкубировали в среде в течение 2 ч при 4°C или при 37°C. Оценивали количество клеточно-ассоциированных (Ка-1D5/A7) и диссоциированных от клеточной поверхности (Д-1D5/A7) антител.

Далее мы оценили потенциал Hsp90 β -специфических антител 1D5/A7 для создания иммунотоксичных. Антитела конъюгировали с широко используемым токсическим агентом мертанзином (DM1). Спектры полученного конъюгата 1D5A7 представлены на рис. 4. Наличие дополнительных пиков на спектре конъюгатов с пиком поглощения 250 нм свидетельствовало о пришивке DM1 к антителу.

Полученный иммуноконъюгат 1D5/A7-DM1 взаимодействовал с нативным бычьим Hsp90 в ИФА, что свидетельствовало о сохранении активности антител в составе иммуноконъюгата. Конъюгат 1D5/A7-DM1 обладал токсичностью в отношении клеток, однако концентрация, вызывающая 50%-ю гибель клеток (IC_{50}), для опухолевых линий A-172 и HT1080 была довольно высокой и составляла 1–4 мкг/мл (рис. 5). IC_{50} для иммуноконъюгата контрольного антитела 34/2 была сопоставима с иммуноконъюгатом антитела 1D5/A7, что согласуется с данными по сопоставимой эффективности интернализации антитела 1D5/A7 и контрольного антитела 34/2. Цитотоксичность иммуноконъюгата 1D5/A7-DM1 для опухолевых клеток была в два-пять раз выше, чем для клеток нетрансформированных линий; гибель опухолевых клеток HT1080 и A-172 наблюдалась при более низких концентрациях иммуноконъюгатов, чем для клеток ВНК-21 и Vero (рис. 5).

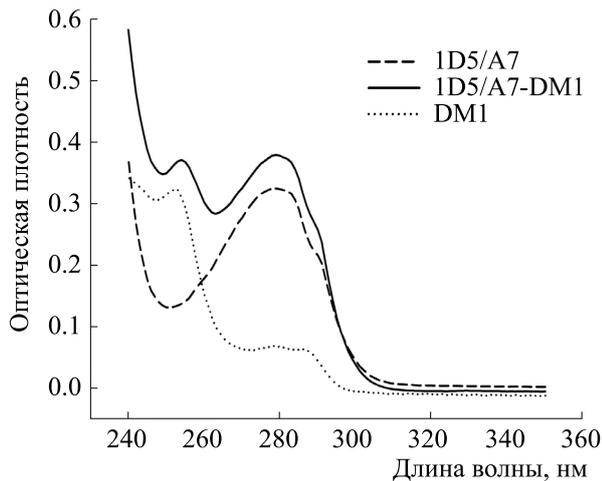


Рис. 4. Оценка пришивки мертанзина к моноклональному антителу 1D5/A7.

В целом полученные данные свидетельствовали о невысокой эффективности иммунотоксина на основе Hsp90 β -специфического антитела 1D5/A7. С учетом полученных результатов мы посчитали нецелесообразным проведение экспериментов на животных для оценки активности иммунотоксина 1D5/A7-DM1, так как необходимость поддержания высоких концентраций конъюгата неизбежно приводит к высокой общей токсичности препарата для животных.

Связывание антител с опухолевыми клетками может запускать врожденные иммунные эффекторские механизмы [27–30], приводящие к элиминации или торможению развития опухолевых клеток. С учетом этого, мы оценили влияние антитела 1D5/A7 на рост первичной опухоли, метастазирование и выживаемость мышей на модели метастазирующей эпидермоидной карциномы легких Льюиса. Введение антитела 1D5/A7 животным не влияло на процесс развития первичной опухоли, однако снижало примерно в два раза метастазирование опухоли в легкие и увеличивало на 16% среднюю продолжительность жизни животных после введения опухоли (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Hsp90 экспрессируется на мембране опухолевых клеток и играет важную роль в инвазии и метастазировании опухолевых клеток [8–13, 16]. Ингибирование eHsp90 с помощью Hsp90 α -специфических антител приводило к замедлению миграции опухолевых клеток *in vitro* и снижению метастазирования опухолей у животных [19–21], что свидетельствует о потенциале Hsp90-специфических антител в качестве противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. В данной работе мы исследовали противоопухоле-

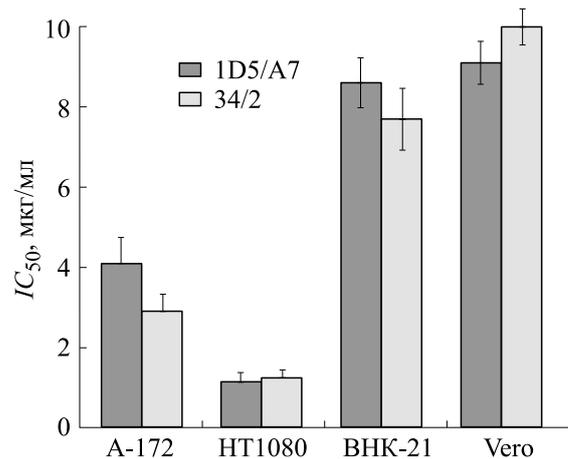


Рис. 5. Цитотоксичность иммуноконъюгата 1D5/A7-DM1 на линиях опухолевых и неопухолевых клеток.

вый потенциал Hsp90 β -специфических антител (клон 1D5/A7), полученных в ИБК РАН. При этом оценивали противоопухолевую активность 1D5/A7 как в форме очищенного антитела, так и в форме иммунотоксина.

В основе цитотоксического действия иммунотоксина лежит их специфическое связывание с поверхностью клеток и интернализация клетками, что приводит к высвобождению цитотоксина внутри клетки и их гибели. Мы обнаружили, что антитело 1D5/A7 специфически связывалось как с опухолевыми клетками A-172 и HT1080, так и с нетрансформированными клетками BHK-21 и Vero, и интернализировались клетками. При этом эффективность интернализации антител опухолевыми клетками A-172 и HT1080 была в два-четыре раза выше в сравнении с нетрансформированными клетками BHK-21 и Vero. Следует отметить, что интернализация контрольных антител 34/2, которые не связываются с клетками, была сопоставима с Hsp90 β -специфическими антителами 1D5/A7. Это свидетельствовало в пользу того, что рецептор-зависимая интернализация комплексов «антитело–Hsp90 β » клетками была медленной и незначительно превалировала над неспецифическим захватом антител клетками посредством пиноцитоза. Ранее было также продемонстрировано, что Hsp90 α -специфические антитела 4C5 после связывания с поверхностным Hsp90 практически не интернализировались клетками [21], что согласуется с нашими данными. С другой стороны, известно, что поверхностно-ассоциированный Hsp90 активно интернализуется опухолевыми клетками [17]. Возможно, что связывание антитела с поверхностно-ассоциированным Hsp90 замедляет его интернализацию. Кроме медленной интернализации Hsp90 β -специфических антител мы обнаружили, что после их

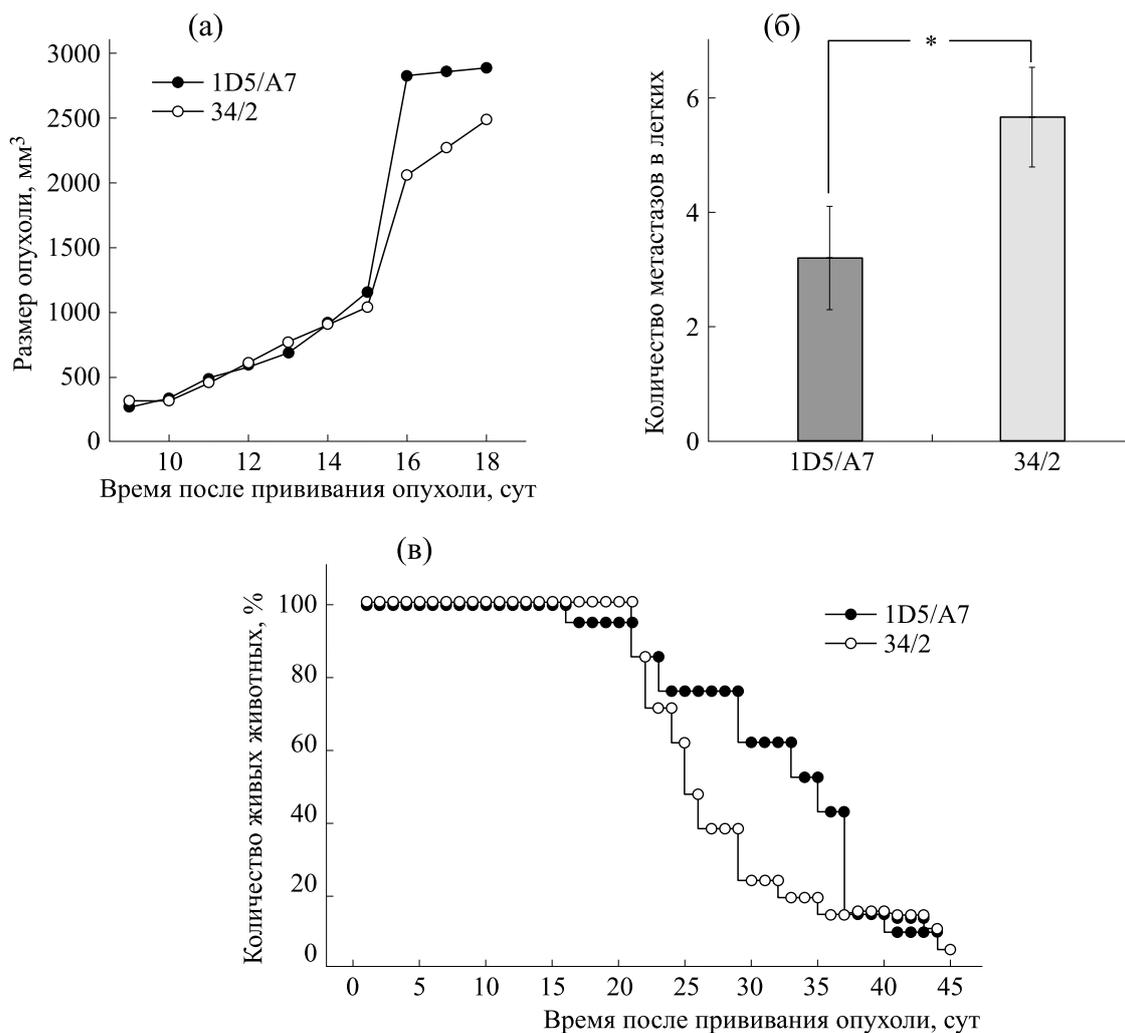


Рис. 6. Влияние введения антитела 1D5/A7 мышам с привитой карциномой Льюиса на рост первичной опухоли (а), метастазирование в легкие (б) и выживаемость животных (в); * – $p < 0.05$.

связывания с мембрано-ассоциированным Hsp90 β значительная часть антител быстро диссоциировала от поверхности клеток в культуральную среду; при этом скорость диссоциации антител значительно превышала скорость их интернализации клетками.

Для оценки возможности использовать антитело 1D5/A7 для создания иммунотоксинов антитело конъюгировали с известным токсическим агентом мертанзином (DM1). Мертанзин взаимодействует с тубулином в месте связывания ризоксина, тем самым ингибируя сборку микротрубочек, что приводит к деградации последних и нарушению митоза [31]. Мы показали, что полученный конъюгат 1D5/A7-DM1 обладал невысокой токсичностью в отношении опухолевых клеток: IC_{50} для линий А-172 и НТ1080 составляла 1–4 мкг/мл. При этом IC_{50} для иммуноконъюгата контрольного антитела 34/2 и иммуноконъюгата

антитела 1D5/A7 были сопоставимы, что согласовывалось с данными по сопоставимой эффективности интернализации антитела 1D5/A7 и контрольного антитела 34/2. В целом полученные данные свидетельствовали о невысокой эффективности иммунотоксинов на основе Hsp90 β -специфического антитела 1D5/A7: для достижения цитотоксического эффекта необходимы высокие концентрации иммуноконъюгатов, что, вероятно, связано с активной диссоциацией комплексов антител с Hsp90 β с поверхности клеток и не слишком высокой скоростью интернализации антител, связавшихся с мембрано-ассоциированным Hsp90 β . С учетом этого обстоятельства мы не исследовали иммуноконъюгат 1D5/A7-DM1 на животных, так как высокие концентрации иммуноконъюгата 1D5/A7-DM1 неизбежно приведут к высокой токсичности препарата при введении животным.

Известно, что связывание антител с белками, экспрессирующимися на поверхности опухолевых клеток, может запускать врожденные иммунные эффекторные механизмы [27–30]. Антитела класса G способны активировать антителозависимую клеточную цитотоксичность посредством связывания иммунных эффекторных клеток (NK-клетки и др.) через Fc-γ-рецепторы, расположенные на поверхности эффекторных клеток, с Fc-фрагментом опухолеспецифических антител; после связывания эффекторные клетки вызывают лизис опухолевых клеток, используя различные механизмы [32]. Ассоциированные с клетками антитела также способны активировать классический путь активации комплемента посредством связывания комплекса белков комплемента с Fc-фрагментом антитела; формирование такого комплекса приводит в конечном счете к клеточному лизису и фагоцитозу [33, 34]. С учетом вышесказанного мы провели оценку противоопухолевой активности Hsp90β-специфического антитела 1D5/A7 на модели эпидермоидной карциномы Льюиса – опухоли мышей с относительно быстрым развитием, дающей выраженные метастазы в легкие животных [35]. При многократном введении мышам антитело 1D5/A7 не влияло на процесс развития первичной опухоли, что согласуется с данными, полученными с другими экстраклеточными ингибиторами Hsp90 [6, 18–22]. С другой стороны, введение Hsp90β-специфического антитела мышам снижало метастазирование опухоли в легкие и увеличивало среднее время жизни животных. Ранее было показано, что антитела к Hsp90α-изоформе существенно ингибировали метастазирование опухолей у мышей [20, 21], что согласуется с нашими данными. Ингибирующий эффект Hsp90β-специфического антитела 1D5/A7 вероятнее всего связан с торможением миграции и инвазии опухолевых клеток, что приводит к снижению метастазирования клеток. Необходимы дальнейшие исследования антиметастатической активности Hsp90α- и Hsp90β-специфических антител на различных моделях опухолей животных и человека.

ВЫВОДЫ

Моноклональные антитела 1D5/A7, направленные к белку теплового шока Hsp90β, эффективно связывались с Hsp90β, ассоциированным с поверхностью клеток опухолевых и нетрансформированных культур. Связавшиеся с клетками антитела активно диссоциировали в культуральную среду и интернализировались клетками. Конъюгат на основе Hsp90β-специфического антитела и цитотоксического агента мертанзина не обладал высокой цитотоксической активностью. При многократном введении антитела 1D5/A7 мышам

C57BL/6 с привитой опухолью карциномы Льюиса рост первичной опухоли не замедлялся, в то время как метастазирование опухолевых клеток в легкие снижалось и увеличивалось среднее время жизни мышей. Полученные результаты свидетельствуют о терапевтическом потенциале антител, специфичных к Hsp90β, для лечения опухолевых заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Li and J. Buchner, *Biomed. J.* **36**, 106 (2013).
2. P. C. Echeverria, A. Bernthaler, P. Dupuis, et al., *PLoS One* **6**, 26044 (2011).
3. D. Picard, *Cell. Mol. Life Sci.* **59** (10), 1640 (2002).
4. A. S. Sreedhar, E. Kalmar, P. Csermely, and Y. F. Shen, *FEBS Lett.* **562**, 11 (2004).
5. W. Li, Y. Li, S. Guan, et al., *EMBO J.* **26**, 1221 (2007).
6. S. Tsutsumi, K. Beebe, and L. Neckers, *Future Oncol.* **5**, 679 (2009).
7. X. Wang, X. Song, W. Zhuo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21288 (2009).
8. J. S. Chen, Y. M. Hsu, C. C. Chen, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 25458 (2010).
9. C. F. Cheng, J. Fan, M. Fedesco, et al., *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3344 (2008).
10. U. Gopal, J. E. Bohonowych, C. Lema-Tome, et al., *PLoS One* **6**, 17649 (2011).
11. M. W. Hance, K. Dole, U. Gopal, et al., *J. Biol. Chem.* **287** (45), 37732 (2012).
12. P. Jayaprakash, H. Dong, M. Zou, et al., *J. Cell Sci.* **128**, 1475 (2015).
13. F. Tsen, A. Bhatia, K. O'Brien, et al., *Mol. Cell Biol.* **33**, 4947 (2013).
14. S. Tsutsumi, B. Scroggins, F. Koga, et al., *Oncogene* **27**, 2478 (2008).
15. D. Thuringer, A. Hammann, N. Benikhlef, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 3418 (2011).
16. D. Thuringer, A. Hammann, N. Benikhlef, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 3418 (2011).
17. B. Becker, G. Multhoff, B. Farkas, et al., *Experim. Dermatology* **13**, 27 (2004).
18. L. B. Crowe, P. F. Hughes, D. A. Alcorta, et al., *ACS Chem. Biol.* **12**, 1047 (2017).
19. B. K. Eustace, T. Sakurai, J. K. Stewart, et al., *Nat. Cell Biol.* **6**, 507 (2004).
20. K. Sidera, M. Gaitanou, D. Stellas, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 2031 (2008).
21. D. Stellas, A. El Hamidieh, and E. Patsavoudi, *BMC Cell Biol.* **11**, 51 (2010).
22. D. Stellas, A. Karameris, and E. Patsavoudi, *Clin. Cancer Res.* **13** (6), 1831 (2007).
23. J. McCready, D. S. Wong, J.A. Burlison, et al., *Cancers (Basel)* **6**, 1031 (2014).
24. M. M. Zaripov, O. S. Morenkov, B. Siklodi, et al., *Res. Virol.* **149**, 29 (1998).

24. M. Oppermann, in *Monoclonal antibodies*, Ed. by J. P. Peters and H. Baumgarten (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992), pp. 271–275.
25. A. G. Polson, S.-F. Yu, K. Elkins, et al., *Blood* **110** (2), 616 (2007).
26. A. Lisov, V. Vrublevskaya, Z. Lisova, et al., *Viruses* **7** (10), 5343 (2015).
27. T. Ben-Kasus, B. Schechter, M. Sela, and Y. Yarden, *Mol. Oncol.* **1**, 42 (2007).
28. A. M. Scott, J. D. Wolchok, and L. J. Old, *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278 (2012).
29. C. W. Shuptrine, R. Surana, and L. M. Weiner, *Semin. Cancer Biol.* **22**, 3 (2012).
30. L. M. Weiner, J. C. Murray, and C. W. Shuptrine, *Cell* **148**, 1081 (2012).
31. M. Lopus, *Cancer Lett.* **307**, (2011).
32. T. Kubota, R. Niwa, M. Satoh, et al., *Cancer Sci.* **100**, 1566 (2009).
33. J. R. Dunkelberger and W. C. Song, *Cell. Res.* **20**, 34 (2010).
34. K. A. Stoermer and T. E. Morrison, *Virology* **411**, 362 (2011).
35. J. S. Bertram and P. Janik, *Cancer Lett.* **11**, 63 (1980).

Internalization by Cells and Antitumor Activity of Antibodies and Immunotoxins Specific for Heat Shock Protein 90 Beta Isoform

M.A. Zhmurina, V.V. Vrublevskaya, Y.Y. Skarga, V.S. Petrenko, V.K. Zhalimov, and O.S. Morenkov

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

We showed that the mouse monoclonal antibodies directed against the beta isoform of heat shock protein 90 (Hsp90 β) bind specifically to Hsp90 β found on the surface of tumor and untransformed cells. After binding to membrane-associated Hsp90 β , antibodies actively dissociated into the culture medium and were internalized by cells. An immunoconjugate prepared on the basis of the Hsp90 β -specific antibody and the cytotoxic agent mertansine did not exhibit high cytotoxic activity against tumor cells in vitro. The injection of the Hsp90 β -specific antibody into mice did not influence the growth of primary tumor of epidermoid Lewis lung carcinoma but suppressed the metastasis of tumor in the lungs and increased the mean life span of mice. The results suggest a certain therapeutic potential of antibodies directed against Hsp90 β for tumor therapy.

Keywords: extracellular Hsp90 β , monoclonal antibodies, immunotoxins, internalization of antibodies by cells, epidermoid Lewis lung carcinoma, metastasis

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В СУБРЕТИНАЛЬНОЕ ПРОСТРАНСТВО

© 2020 г. М.А. Плахотный*, А.М. Кодунов*, Е.В. Горина**, В.В. Бояринцев**, А.В. Трофименко**, С.А. Бирюков**, Г.И. Фильков**

*Калужский филиал НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, 248007, Калуга, ул. Святослава Федорова, 5

E-mail: nauka@eye-kaluga.com

**Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

E-mail: biryukov.sa@mipt.ru

Поступила в редакцию 19.08.2020 г.

После доработки 19.08.2020 г.

Принята к публикации 23.08.2020 г.

Использование мезенхимальных стволовых клеток является эффективной стратегией лечения ряда дегенеративных заболеваний сетчатки. Лимитирующим фактором данного подхода является ограниченная выживаемость этих клеток после трансплантации. Ранее было показано, что выращивание мезенхимальных стволовых клеток в условиях гипоксии способно увеличить их пролиферативную активность. Мы предположили, что такой способ культивирования позволит улучшить жизнеспособность данных клеток после введения в субретинальное пространство. С этой целью мы выделили мезенхимальные стволовые клетки красного костного мозга мышей, охарактеризовали их фенотип, способность к дифференцировке в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлениях, а также их пролиферативную активность в условиях культивирования при гипоксии (5% кислорода в атмосфере) и в условиях нормоксии (21% кислорода в атмосфере). Таким же образом были получены клетки из красного костного мозга от мышей линии C57 Black, несущих ген *GFP*. Эти клетки после предварительного культивирования в условиях нормоксии (контроль) и гипоксии (опыт) были нагружены магнитными микрочастицами и введены субретинально кроликам. Клетки удерживали в месте инъекции с помощью магнитного импланта, препятствующего их миграции. Выживаемость клеток оценивали на третьи, пятые, девятые, двенадцатые и пятнадцатые сутки по данным флуоресцентной микроскопии и оптической когерентной томографии. Согласно полученным данным, выращенные в гипоксических условиях клетки сохраняли жизнеспособность в субретинальном пространстве в течение девяти суток, в то время как клетки, которые росли в условиях нормоксии, погибали спустя шесть суток. Таким образом, предварительное культивирование мезенхимальных стволовых клеток в условиях гипоксии способно увеличить их жизнеспособность после введения в субретинальное пространство, что может быть использовано при терапии дегенеративных заболеваний сетчатки.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, условия культивирования, выживаемость, субретинальная трансплантация, болезни сетчатки, гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302920060125

Возрастная дегенерация желтого пятна, диабетическая ретинопатия и глаукома, являющиеся основными причинами необратимой слепоты, в одной только Европе, согласно прогнозам, затронут около 200 миллионов человек к 2020 г. Ише-

мия сетчатки и гибель клеток, вызванные, среди прочего, апоптозом и воспалительными процессами, являются основой патогенеза многих заболеваний, приводящих к потере зрения [1]. Современная терапия направлена на предотвращение прогрессирования этих заболеваний с использованием внутриглазных инъекций (например, анти-VEGF-препаратов, препятствующих росту патологических сосудов в сетчатке), метаболических, антиоксидантных и вазоактивных препа-

Сокращения: VEGF — фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor), МСК — мезенхимальные стволовые клетки, GFP — зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein), PBS — фосфатный буфер (Phosphate Buffer Solution).

ратов в форме глазных капель или хирургического вмешательства. Тем не менее эффективность этих методов ограничена.

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для лечения офтальмологических заболеваний является одним из перспективных направлений исследования. МСК являются мультипотентными клетками с регенеративными и иммуномодулирующими свойствами [2, 3]. Субретинальные инъекции препаратов на основе стволовых клеток запускают процессы нейропротекции и/или регенерации сетчатки [4]. Одним из ограничений данной стратегии является слабая выживаемость трансплантированных МСК в субретинальном пространстве [5]. Вместе с тем выращивание МСК в условиях гипоксии способно увеличить пролиферативную активность и выживаемость данных клеток в культуре и при трансплантации в поврежденные ткани, что было показано на примере инфаркта миокарда [6]. В связи с этим целью данной работы была оценка влияния культивирования МСК в условиях гипоксии на жизнеспособность клеток после введения в субретинальное пространство. Проведенное нами исследование сроков выживаемости МСК при субретинальном введении является важным шагом на пути к эффективному лечению офтальмологических заболеваний с применением препаратов на основе МСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование первичных МСК.

Первичные линии мезенхимальных стволовых клеток животных были получены из аутбредных мышей ICR (CD 1) и SHK, а также от мышей линии C57 Black, модифицированной геном зеленого флуоресцентного белка (GFP). Выделение первичных МСК из красного костного мозга мышей в возрасте 8–11 недель проводили по стандартному протоколу [7]. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США). Смену среды проводили каждые трое суток.

Анализ фенотипа МСК и способности к дифференцировке. Для фенотипирования МСК снимали с культуральных флаконов с помощью раствора Версена и окрашивали растворами антител против CD105 (BioLegend, 120408; Biorbyt, orb187245), CD73 (BioLegend, 127220; Bioss, bs-4834R-A488), CD29 (BioLegend, 102205), CD44 (BioLegend, 203906), CD45 (BioLegend, 103107) и CD34 (BioLegend, 152204), содержащими 0.5% бычьего сывороточного альбумина. Анализ образцов МСК проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Дифференцировку клеток в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлениях про-

водили с использованием сред для дифференцировки StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit, StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit и StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (все — Gibco, Life Technologies, США) соответственно, согласно рекомендованным протоколам. Дифференцированные клетки окрашивали растворами красителей сафранин О, ализариновый красный и Судан III соответственно.

Оценка жизнеспособности и пролиферации МСК. Для оценки жизнеспособности и пролиферации МСК высевали на шестилуночные планшеты в количестве 250000 клеток на лунку в 2 мл среды. Спустя сутки клеткам меняли среду. Затем через одни или двое суток клетки снимали с применением холодного раствора 0.05% трипсина (Gibco, США), промывали раствором фосфатно-буферного раствора (PBS), pH 7.4, и фиксировали в 66%-м этаноле на льду. Далее МСК отмывали, а затем инкубировали с пропидий-йодидом (Molecular Probes, США) в концентрации 50 мкг/мл в присутствии 50 ед./мл РНКазы А в течение 30 мин для удаления из клеток РНК. Анализ образцов МСК проводили на проточном цитометре CytoFLEX. Всего были проанализированы как минимум 10000 событий для каждой пробы. Анализ каждой пробы проводили в трех повторах.

Модификация МСК магнитными частицами. После достижения 80% плотности монослоя в клеточную культуру МСК, изолированных из красного костного мозга мышей со стабильной экспрессией GFP, добавляли коммерческие магнитные частицы Dynabeads M-280 (Invitrogen, США) диаметром 2.8 мкм, обработанные 4%-м поверхностно-активным веществом Pluronic L-123 (Sigma-Aldrich, США). Через 24 ч после инкубации с магнитными частицами мезенхимальные стволовые клетки поглощали частицы. Клетки снимали с подложки, обрабатывая культуру 0.05%-м раствором трипсина, содержащего ЭДТА (Gibco, США).

Трансплантация стволовых клеток. Для фиксации трансплантированных клеток, содержащих магнитные частицы, использовали полимерные эластичные фиксирующие магнитные имплантаты, пластины толщиной 0.35 мм круглой формы, диаметром 7 мм, с индукцией магнитного поля 5 мТл, оригинальной конструкции с лазерным зондом, разработанные совместно МНТК «Микрохирургия глаза» (Калуга) с НЭП «МГ» (Москва).

Экспериментальная группа составила пять кроликов-самцов породы Шиншила массой 2000–2500 г. После семи суток карантина животным проводили хирургическое вмешательство. После достижения медикаментозного мидриаза животные находились под общим ингаляционным масочным наркозом (Фторатан — 2.7 л/мин, кислород — 2 л/мин). Под контролем операцион-

Фенотипирование полученных образцов МСК из красного костного мозга аутбредных мышей ICR (CD 1) и SHK

Маркер	CD105	CD73	CD29	CD44	CD45	CD34
Доля положительных клеток в популяции, %	94.6%	98.80%	98.25%	98.00%	0.30%	0.10%

ного микроскопа ALLEGRA 90 (Moller-Wedel, Германия) комплекс из полимерного эластичного магнитного имплантата и световода заводили в субтеноново пространство и фиксировали в верхне-наружном квадранте глазного яблока.

В правый глаз субретинально вводили суспензию клеток, культивированных при 5%-м содержании кислорода; в левый глаз вводили суспензию клеток, культивированных при 21%-м содержании кислорода. Для введения 10000 клеток, находящихся в жидкой среде (0.05 мл), канюля была присоединена к субретинальному инъектору (MicroDose injection kit 1 ml, Med One, США).

Оценка жизнеспособности МСК в субретинальном пространстве. Исследования выживаемости трансплантированных клеток проводили на третьи, шестые, девятые, двенадцатые и пятнадцатые сутки.

Оптическую когерентную томографию проводили на приборе RTVue-100 (Optovue, США). Скорость захвата изображений – 26000 А-сканов/с; частота строк от 256 до 1024 А-сканов/кадр; захват скана: глубина 2 мм, длина 12 мм, длина волны сканирующего луча от 830 до 750 нм. После фиксации животного выполняли ряд сканирований и отбирали наиболее информативные снимки, позволяющие оценить состояние места введения клеток.

После выведения животных из эксперимента методом ингаляции углекислого газа в указанные сроки наблюдения глазные яблоки энуклеировали, вскрывали переднюю камеру, глаза фиксировали с помощью погружения в раствор 4%-го параформальдегида в PBS-буфере, pH 7.3 в течение 24 ч при температуре 4°C. Затем глаза пропитывали в 30%-м растворе сахарозы в PBS-буфере 24 ч при 4°C и замораживали при температуре –24°C, после чего изготавливали срезы толщиной 40 мкм с помощью криотома CM 1510S (Leica, Германия).

Срезы монтировали на предметных стеклах, высушивали при комнатной температуре и анализировали с помощью микроскопа Olympus IX81 (Olympus, Япония) в режиме флуоресценции. Микроскоп был снабжен цифровой камерой Olympus DP72 (Olympus, Япония), соединенной с компьютером.

По гистологическим препаратам срезов глазных яблок определяли наличие в области введения стволовых клеток, содержащих магнитные

частицы, идентифицируемую GFP-флуоресценцию и миграцию МСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно принятым в научном сообществе нормам МСК должны экспрессировать на своей поверхности такие маркеры, как CD105, CD73, CD29 и CD44. В то же время МСК не должны иметь на поверхности гемопоэтических антигенов, включая, например, CD45 и CD34. Фенотипирование полученных нами МСК аутбредных мышей ICR (CD 1) и SHK показало, что более 95% МСК экспрессируют CD105, CD73, CD29 и CD44 (таблица). При этом популяция практически не содержит CD45- и CD34-позитивных клеток, что говорит высокой чистоте и однородности популяции полученных МСК. Поскольку метод выделения и культивирования МСК мышей линии C57 Black был тот же, что и линии ICR (CD 1) и SHK, мы принимаем, что эти клетки тоже относятся к МСК.

Еще одним важным признаком МСК является способность к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. В результате хондрогенной дифференцировки клетки приобретали характерную фибробласто-подобную морфологию, во внеклеточном матриксе присутствовало большое содержание глюкозаминогликанов, окрашенных сафранином O. МСК, дифференцировавшиеся по остеогенному пути, приобретали кубоидальную и полигональную форму, а окраска ализариновым красным S продемонстрировала наличие минерализованного внеклеточного матрикса. В случае индукции адипогенеза МСК приобретали округленную форму, отмечалось формирование вакуолей и внутриклеточное накопление нейтральных жиров, окрашенных Суданом III (рис. 1).

На следующем этапе мы решили оценить, как влияют условия культивирования МСК при пониженном содержании кислорода на пролиферацию и жизнеспособность клеток. Для оценки влияния гипоксии на пролиферативную активность МСК мы сравнили профили содержания ДНК в клетках, культивируемых в стандартных условиях (при 21% кислорода), и при выращивании в мультигазовом CO₂-инкубаторе в атмосфере с пониженным содержанием кислорода (5% CO₂, 5% O₂, 95% влажности). Сравнение профилей у мышинных МСК не выявило разницы в коли-

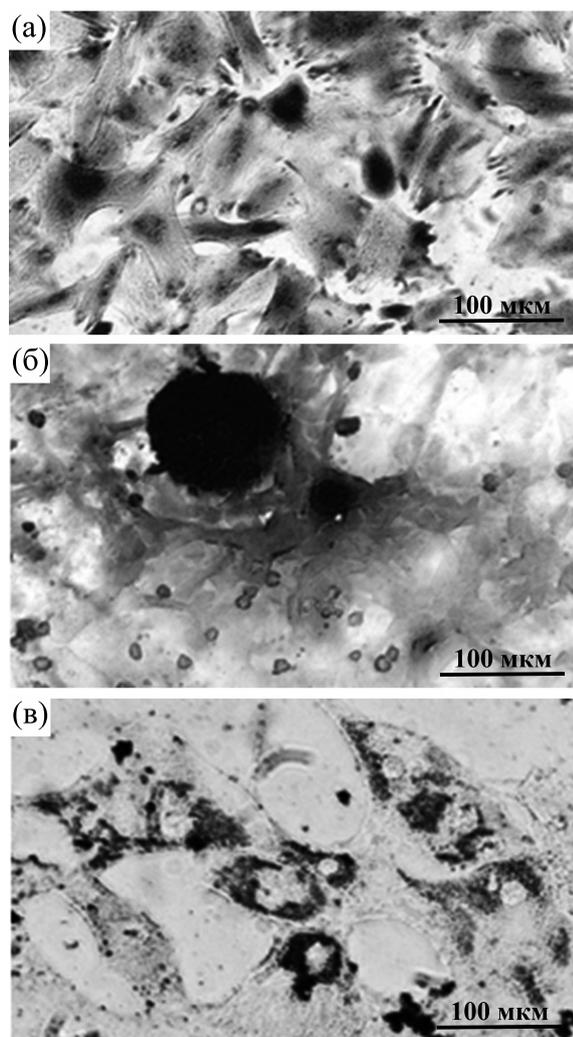


Рис. 1. Оценка способности МСК к дифференцировке: (а) – хондрогенная дифференцировка экспериментального образца МСК мыши, окраска сафранином О; (б) – остеогенная дифференцировка экспериментального образца МСК мыши, окраска ализариновым красным С; (в) – адипогенная дифференцировка экспериментального образца МСК мыши, окраска Суданом III.

честве апоптических клеток: как при содержании кислорода 5%, так и при 21% их количество было меньше 1%. В то же время мы наблюдали достоверное увеличение числа клеток, находящихся в S- и G₂/M-стадиях клеточного цикла, т.е. находящихся в процессе удвоения (рис. 2). Это говорит о том, что атмосфера с пониженным содержанием кислорода является оптимальной для роста МСК. Этот же вывод был подтвержден в результате эксперимента с колониеобразованием: при гипоксии наблюдали более ускоренный рост площади колоний МСК, чем в условиях нормоксии (рис. 3).

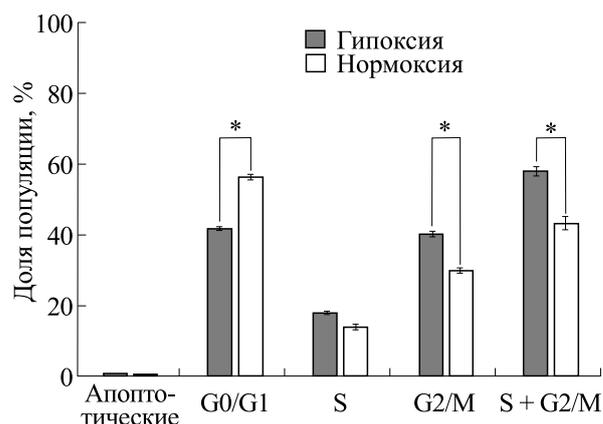


Рис. 2. Количественный анализ профилей ДНК МСК красного костного мозга. Показаны размеры субпопуляций МСК мыши при культивации в условиях нормоксии (в атмосфере с 21% кислорода) и при культивировании при пониженном содержании кислорода в атмосфере (5%). Доля пролиферирующих клеток (S + G₂/M) при переносе клеток в атмосферу с 5%-м содержанием кислорода достоверно увеличивается на несколько процентов (* – $P < 0.05$ согласно дисперсионному анализу ANOVA с последующим тестом Тьюки).

Для оценки влияния культивирования МСК в условиях гипоксии на жизнеспособность этих клеток после введения в субретинальное пространство мы использовали клетки с постоянной экспрессией GFP. Для наблюдения за трансплантированными МСК важно было удерживать клетки в месте инъекции. Чтобы достичь этого, МСК мыши были нагружены магнитными частицами, которые поглощались путем эндоцитоза и оставались локализованы в цитоплазме клеток (рис. 4).

Одной из важнейших задач для контроля выживаемости трансплантированных клеток является их визуализация *in vivo*. Оптическая когерентная томография позволяет увидеть трансплантированные субретинально клетки, нагруженные магнитными наночастицами. Этот метод визуализации является неинвазивным и применим в клинической практике. По данным когерентной томографии на третьи сутки в месте введения визуализировался локальный дефект с конгломератом клеток под сетчаткой в обоих глазах. Различия между выживаемостью трансплантированных клеток на третьи сутки в зависимости от условий культивирования не наблюдалось (рис. 5).

На пятые сутки наблюдали большее количество клеточного конгломерата под сетчаткой в глазу, в который вводили клетки, культивированные в гипоксических условиях. В другом глазу количество клеток было значительно меньшим.

На девятые сутки в глазах, где были трансплантированы МСК, культивированные в гипо-

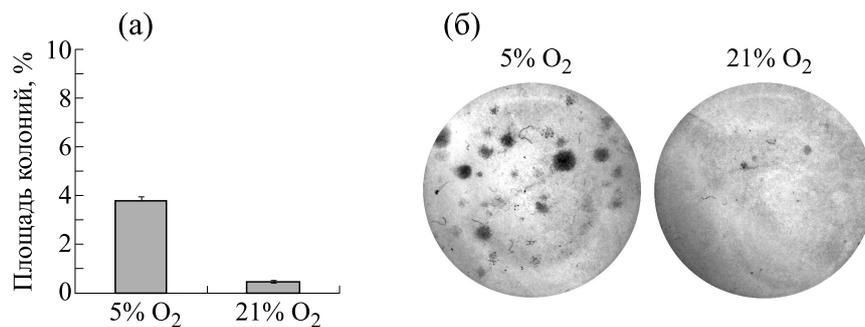


Рис. 3. Размеры колоний популяций первичных МСК мыши при культивировании в условиях нормоксии (в атмосфере с 21% кислорода) и при пониженном содержании кислорода в атмосфере (5%): (а) – площадь колоний, (б) – общий вид планшетов. Окраска метиловым фиолетовым проведена спустя две недели после высевания колоний на планшеты.

кисических условиях, некоторое количество клеток сохранялось. Там, где были трансплантированы нормоксические МСК, наблюдали локальный дефект сетчатки с зонами дистрофии пигментного эпителия вокруг них, однако МСК не визуализировались (рис. 6).

Аналогичная динамика наблюдалась по данным гистологического исследования. На третьи сутки у всех животных в левом и правом глазу МСК, содержащие GFP, располагались в месте введения. В стекловидном теле и в других структурах глаза трансплантированные клетки обнаружены не были (рис. 7). Это свидетельствует об отсутствии миграции МСК под воздействием магнитного имплантата.

На шестые сутки в левом и правом глазу клетки, содержащие GFP, располагались в месте введения под сетчаткой и сохраняли свою жизнеспособность. В стекловидном теле и других структурах глаза клетки обнаружены не были. Количество жизнеспособных (сохраняющих свою способность к зеленой флуоресценции) клеток, которые предварительно культивировались в условиях гипоксии, визуально было боль-

ше по сравнению с клетками, которые выращивали при 21% O₂.

На девятые сутки одиночные живые клетки, содержащие GFP, были обнаружены только в правом глазу (клетки культивировали при 5% O₂). В тканях левого глаза, куда вводили клетки, культивированные при 21% O₂, флуоресцентное свечение не наблюдалось (рис. 7).

На двенадцатые и пятнадцатые сутки в тканях глаза кролика ни в одной группе МСК GFP-клетки не были найдены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках проведенного исследования было установлено, что клетки, культивированные в условиях гипоксии (5% O₂), при субретинальной трансплантации живут дольше, чем клетки, культивированные в нормоксических условиях. Этот результат согласуется со множеством литературных данных.

Условия культивирования оказывают значимое влияние на время выживаемости МСК. Предшествующее трансплантации кондиционирование в условиях гипоксии, включающее культивирование в течение 15 мин при 2.5% O₂, реоксигенацию в течение 30 мин при 21% O₂ и предварительное кондиционирование в условиях гипоксии в течение 72 ч при 2.5% O₂, значительно улучшает пролиферативные и миграционные способности МСК *in vitro* [8]. При инкубации в среде с низким содержанием сыворотки МСК перейдут в состояние апоптоза, но предварительное кондиционирование при гипоксии (1% O₂) может предотвратить повреждение путем увеличения секреции ангиогенных факторов, VEGF и bFGF (основного фактора роста фибробластов) [9]. Более того, 1% O₂ также увеличивает метаболическую активность и снижает активность каспазы-3/7 и высвобождение лактатдегидрогеназы

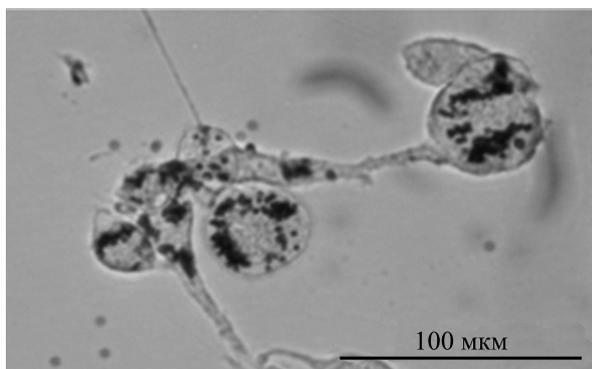


Рис. 4. Мезенхимальные стволовые клетки мыши, содержащие магнитные частицы в цитоплазме.

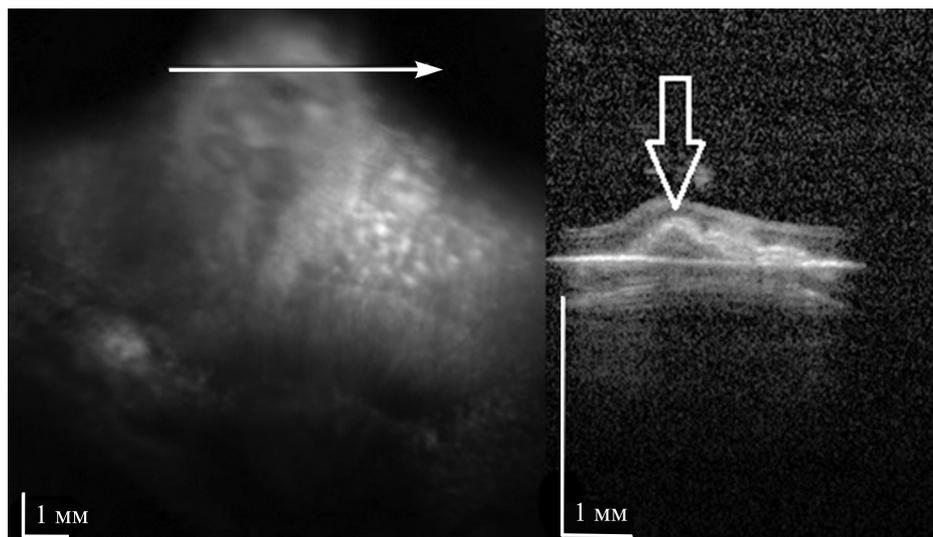


Рис. 5. Оптическая когерентная томография на третьи сутки после трансплантации клеток, культивированных при 5% O_2 . Визуализируется конгломерат из суспензии клеток под сетчаткой (отмечен стрелкой).

МСК, тем самым снижая чувствительность МСК к ишемическому микроокружению без изменения их биологического поведения, иммунофенотипа или кариотипа [10]. Было продемонстриро-

вано уменьшение онкогенного потенциала МСК, индуцированное 2% O_2 , что обусловлено увеличением экспрессии генов-супрессоров опухолей, а также индукцией субоптимальных разрывов

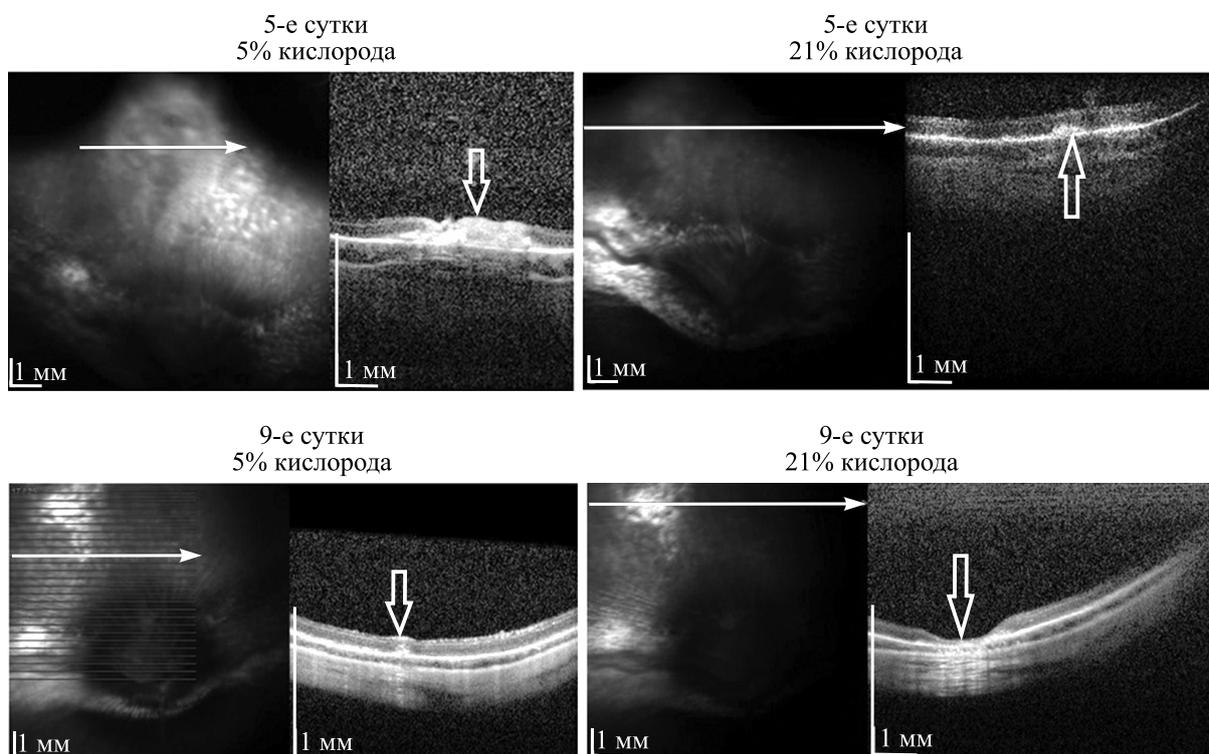


Рис. 6. Оптическая когерентная томография на пятые и девятые сутки после трансплантации клеток. Место введения клеток отмечено стрелкой. На пятые сутки в обоих глазах визуализируется трансплантированная суспензия клеток. На девятые сутки в глазу, куда были трансплантированы МСК, культивированные при 5% O_2 , клетки сохраняются, в другом глазу – клетки полностью отсутствуют.

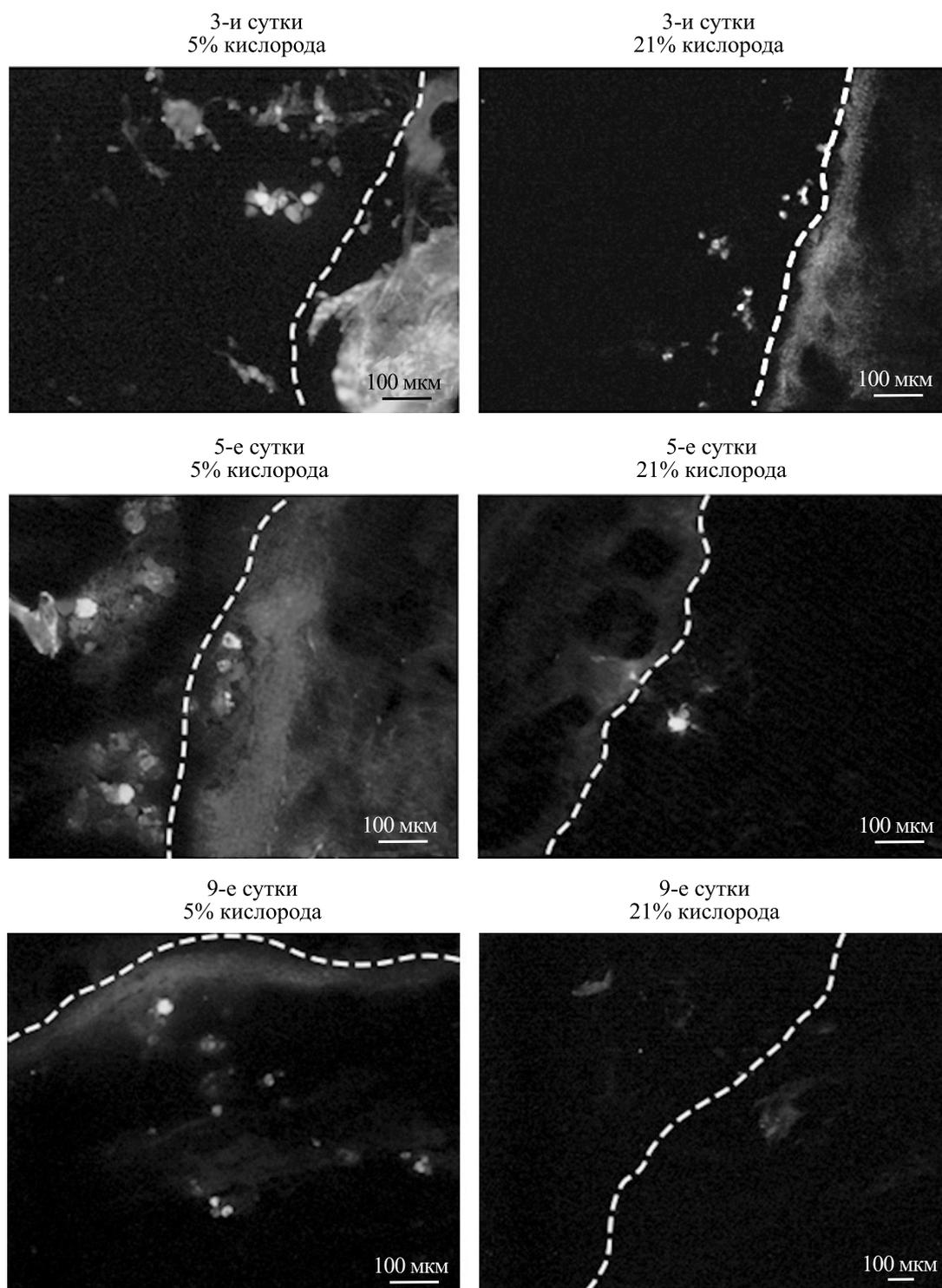


Рис. 7. Флуоресцентная микроскопия гистологических срезов сетчатки. Граница сетчатки отмечена пунктирной линией.

двухцепочечной ДНК в МСК *in vitro* [11]. Гипоксическое состояние при 3% O_2 снижает частоту анеуплоидии в МСК по сравнению с нормоксическим состоянием при 21% O_2 . Можно сделать

вывод, что предварительная инкубация в условиях гипоксии улучшает генетическую стабильность и стабильность хромосом [12]. Культивирование при 5% O_2 последовательно повышает кло-

ногенный потенциал и скорость пролиферации МСК за счет усиления секреции VEGF [13].

Хотя в большинстве исследований было доказано, что гипоксия является защитным фактором для МСК *in vitro* и *in vivo*, оптимальная концентрация кислорода для повышения выживаемости и терапевтических эффектов МСК остается не выявленной.

В ходе исследования впервые была оценена выживаемость МСК, культивированных в гипоксических и нормоксических условиях при трансплантации клеток в субретинальное пространство. Применены методы визуализации трансплантированных МСК *in vivo*, которые подтверждались данными гистологического исследования. Возможность точной визуализации и оценки состояния стволовых клеток *in vivo* позволит в дальнейшем осуществлять контроль лечения при клиническом применении клеточных препаратов. Оптическая когерентная томография может являться методом выбора для контроля распределения трансплантированных МСК *in vivo* при субретинальном введении.

Применение гибкого магнитного импланта оригинальной конструкции эффективно препятствовало миграции МСК, нагруженных магнитными наночастицами: в результате клетки на протяжении всего срока своей жизни находились в месте введения. Удержание клеток в зоне трансплантации важно для возможности репарации повреждений и лечения нейродегенеративных заболеваний сетчатки. Однако установка гибкого магнитного импланта – инвазивная процедура, поэтому необходим дальнейший поиск простых и безопасных решений, которые позволят контролировать миграцию трансплантированных МСК.

МСК сохраняют высокую способность к дифференцировке. Так, МСК, полученные из пуповинной крови, могут трансформироваться в разные нервные клетки, включая дофаминергические нейроны [14], холинергические нейроны [15], клетки Шванна [16] и олигодендроциты [17]. В доклиническом исследовании инсульта МСК, полученные из пуповинной крови и имплантированные в мозг крыс, дифференцировались в эндотелиальные клетки и нейроны [18]. Следовательно, МСК могут потенциально способствовать восстановлению нервной системы, дифференцируясь в специализированные клетки и позволяя заменить поврежденные болезнью нейроны или олигодендроциты, что может быть ключом к лечению дегенеративных заболеваний зрительного нерва.

Исследования показали, что МСК, полученные из красного костного мозга крысы, могут дифференцироваться в фоторецепторы [19] и пигментные эпителиальные клетки сетчатки [20]. Данный факт позволяет предположить, что эти

клеточные продукты применимы для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки.

МСК также могут продуцировать и секретировать белки, которые стимулируют регенерацию тканей. МСК продуцируют ангиогенные факторы (такие как хемокиновые лиганды CXCL2 и CXCL5, глиа-активирующий фактор FGF9). Также они могут секретировать нейротрофические факторы, включая нейротрофический фактор нейротрофин-3, мидкин и глиальные клетки [21]. Благодаря этим свойствам МСК могут сыграть значительную роль в лечении многих офтальмологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

МСК обладают значительным потенциалом в терапии глазных болезней. Одним из важных факторов, влияющих на успех лечения, является время выживания МСК.

Полимерный эластичный магнитный имплантат с оптоволоконным зондом позволяет осуществить интраоперационную диафаноскопию и локализовать место фиксации имплантата. В дальнейшем магнитный имплантат эффективно препятствует миграции МСК, что значительно упрощает оценку жизнеспособности трансплантированных клеток.

МСК, культивированные в гипоксических условиях при 5% O₂, продемонстрировали большую жизнеспособность (девять суток) при трансплантации в субретинальное пространство по сравнению с МСК, выращенными в условиях нормальной оксигенации (шесть суток).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидии по соглашению от 28.10.2018 г. №14.575.21.0179 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57518X0179), заключенному между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Московским физико-техническим институтом.

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. Животных содержали в соответствии с Директивой 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. J. Duh, J. K. Sun, and A. W. Stitt, *JCI insight* **2** (14), e93751 (2017).
2. B. Yu, X. Zhang, and X. Li, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (3), 4142 (2014).
3. H. J. Kim and J. S. Park, *Development & Reproduction* **21** (1), 1 (2017).
4. B. Mathew, J. N. Poston, J. C. Dreixler, et al., *Ophthalmologie* **255** (8), 1581 (2017).
5. D. Sacks, B. Baxter, C. V. Campbell, et al., *Int. J. Stroke* **13** (6), 612 (2018).
6. X. Hu, S. P. Yu, and J. L. Fraser, *J. Thoracic Cardiovasc. Surg.* **135** (4), 799 (2008).
7. X. Liu and N. Quan, *Bio Protoc.* **5** (20), e1631 (2015).
8. M. Kheirandish, S. P. Gavvani, and S. Samiee, *Transfus. Apher. Sci.* **56**, 392 (2017).
9. L. Liu, J. Gao, Y. Yuan, et al., *Cell Biol. Int.* **37**, 551 (2013).
10. A. M. Bader, K. Klose, K. Bieback, et al., *PLoS One* **10**, e0138477 (2015).
11. J. R. Choi, B. Pingguan-Murphy, W. A. Wan Abas, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**, 218 (2014).
12. J. Liu, H. Hao, H. Huang, et al., *Int. J. Low Extrem. Wounds* **14**, 63 (2015).
13. L. B. Boyette, O. A. Creasey, L. Guzik, et al., *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 241 (2014).
14. I. Datta, S. Mishra, L. Mohanty, et al., *Cytotherapy* **13** (8), 918 (2011).
15. J. Liang, S. Wu, H. Zhao, et al., *Neurosci. Lett.* **532**, 59 (2013).
16. J. Peng, Y. Wang, L. Zhang, et al., *Brain Res. Bull.* **84** (3), 235 (2011).
17. E. Mikaeili Agah, K. Parivar, M. Nabiuni, et al., *J. Mol. Neurosci.* **51** (2), 328 (2013).
18. W. Liao, J. Xie, J. Zhong, et al., *Transplantation* **87** (3), 350 (2009).
19. A. Kicic, W. Y. Shen, A. S. Wilson, et al., *J. Neurosci.* **23** (21), 7742 (2003).
20. C. Huang, J. Zhang, M. Ao, et al., *J. Cell. Biochem.* **113** (2), 590–598 (2012).
21. J. Y. Hsieh, H. W. Wang, S. J. Chang, et al., *PLoS One* **8** (8), e72604 (2013).

Influence of Cultivation Conditions on Viability of Mesenchymal Stem Cells after Injection into Subretinal Space

M.A. Plakhotniy*, **A.M. Kodunov***, **E.V. Gorina****, **V.V. Boyarintsev****, **A.V. Trofimenko****,
S.A. Biryukov**, and **G.I. Filkov****

**Kaluga Branch of the National Medical Research Center “Inter-Branch Research and Technical Complex “Eye Microsurgery” named after academician S.N. Fedorov, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Svyatoslava Fedorova 5, Kaluga, 248007 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

The use of mesenchymal stem cells is an effective treatment strategy for a number of retinal degenerative diseases. Limited survival of these cells following transplantation remains a significant barrier in achieving a therapeutic effect. It has been shown earlier that hypoxia-grown mesenchymal stem cells display enhanced proliferative activity. We hypothesized that such cultivation condition could be beneficial for successful injection of these cells into the subretinal region. For this purpose, we isolated mesenchymal stem cells from mouse red bone marrow, described phenotypic characterization and the ability of these cells to chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation, and proliferative activity in hypoxic (5% of oxygen in the atmosphere) and normoxic (21% of oxygen in the atmosphere) conditions. In the same manner, we isolated mesenchymal stem cells from red bone marrow obtained from GFP-expressing C57 black mice. After preliminary cultivation under normoxia (control cells) or hypoxia (experimental cells), the cells were loaded with magnetic particles and injected into the subretinal region of rabbit eyes. The cells were retained in the injection site tissue using magnet implant to prevent migration. The survival of transplanted mesenchymal stem cells was evaluated by fluorescence microscopy and optical coherence tomography on day 3, day 5, day 9, day 12, and day 15. We found that mesenchymal stem cells cultured under hypoxic condition demonstrated greater viability (9 days) in the subretinal space than those cultured in normoxia (6 days). Thus, the use of low oxygen conditions for cultivation of mesenchymal stem cells can improve cell viability after injection into the subretinal space that might be used for retinal degenerative disease therapy.

Keywords: mesenchymal stem cells, cultivation conditions, survival, subretinal transplantation, retinal diseases, hypoxia

ВЛИЯНИЕ ОСМОЛИТОВ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ БАКТЕРИЙ: СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2020 г. Л.А. Суковатый*, А.Е. Лисица*, В.А. Кратасюк*, **, Е.В. Немцева*, **

*Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, Свободный просп., 79

**Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: lsukovaty@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Исследовано влияние вязких сред с глицерином и сахарозой (10–40%) на кинетику биолюминесцентной реакции бактерий методом остановленного потока. Показано увеличение квантового выхода реакции при концентрации осмолитов $\geq 10\%$. Дальнейшее увеличение концентрации до 30–40% приводит к снижению количества испускаемых квантов света в средах с глицерином, в то время как для сахарозы подобный эффект не наблюдается. Моделирование молекулярной динамики бактериальной люциферазы в окружении молекул воды и различного количества молекул глицерина и сахарозы показало, что оба осмолита в исследованном диапазоне концентраций не оказывают значительного эффекта на конформацию белка. Расчет среднеквадратичной флуктуации C_{α} -атомов α -субъединицы люциферазы указывает на то, что увеличение квантового выхода в присутствии 10% сахарозы и глицерина может объясняться большей подвижностью мобильной петли фермента по сравнению с водным окружением. Установлено, что глицерин, в отличие от сахарозы, имеет доступ в активный центр бактериальной люциферазы, а при высоких концентрациях (30 и 40%) вытесняет оттуда молекулы воды на протяжении всего времени моделирования (40 нс), что может объяснять снижение квантового выхода реакции.

Ключевые слова: биолюминесценция, светящиеся бактерии, бактериальная люцифераза, осмолит, молекулярная динамика, структура и динамика белка.

DOI: 10.31857/S0006302920060137

Биохимической основой биолюминесценции бактерий является реакция окисления восстановленного флавинонуклеотида (FMN) и длинноцепочечного альдегида кислородом воздуха, катализируемая ферментом – люциферазой [1, 2]. Светящиеся бактерии обитают по всему мировому океану: от глубоководных участков, при температуре около 0°C , до тропических вод, где температура поверхности может превышать 30°C [2]. В окружающей среде бактерии регулярно сталкиваются с изменением условий – температуры, pH, осмотического давления, радиации, концентрации питательных веществ и токсинов. Одна из стратегий, обуславливающих адаптивный потенциал бактерий в изменяющихся условиях, заключается в накоплении растворенных органических веществ в ответ на повышение осмолярности вне клетки и быстрого высвобождения этих веществ при ее снижении [3, 4]. Эти низкомолекулярные соединения называют осмолитами. Механизм влияния осмолитов на активность ферментов,

обеспечивающих функцию биолюминесценции бактерий, в настоящее время не исследован, хотя их эффекты были неоднократно зарегистрированы [5, 6].

Известно, что осмолиты способны вызывать изменение стабильности и функциональной активности белков [7, 8]. Это обусловлено, в частности, балансом между преимущественной гидратацией белка и преимущественным связыванием молекул осмолита с его поверхностью [9, 10]. Эффект осмолитов на активность ферментов может быть также вызван изменением структурно-динамических свойств отдельных функционально важных участков белка и проникновением осмолитов в область активного центра [8, 11]. В данной работе с помощью методов молекулярного моделирования были исследованы механизмы влияния глицерина и сахарозы на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой. Глицерин и сахароза являются известными осмолитами в бактериальных системах [4], а также соразработчиками, используемыми для изучения

Сокращение: FMN – флавинонуклеотид.

влияния вязкости на ферментативные реакции [8, 11, 12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие растворы: FMN (Sigma, США), 30 мкМ; ЭДТА (Roth, Германия), 0.02 М; рекомбинантная люцифераза *Photobacterium leiognathi* (ООО «Биолюмдиагностика», Красноярск), 1.96 мкМ; деканаль (Acros Organics, США), $2 \cdot 10^{-3}$ М; глицерин (Panreac, Испания), 10–40 вес. %; сахароза (Gerbu, Германия), 10–40 вес. %. Все стоковые растворы были приготовлены с использованием калий-натрий фосфатного буфера (0.05 М, pH 6.9), за исключением раствора деканала, который готовили на этаноле.

Определение активности бактериальной люциферазы в присутствии глицерина и сахарозы. Регистрировали квантовый выход реакции (общее количество квантов, излученных в реакции за один оборот фермента) как площадь под кинетической кривой, измеренной методом остановленного потока с помощью анализатора кинетики SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания) при 20°C. Реакцию инициировали, смешивая раствор люциферазы (1.96 мкМ) с раствором, содержащим фотовосстановленный в присутствии ЭДТА флавиномононуклеотид (30 мкМ) и деканаль (20–100 мкМ). Каждая кинетическая кривая была получена усреднением по пяти повторностям.

Расчеты молекулярной динамики люциферазы в различных средах. Трехмерная структура бактериальной люциферазы была получена из банка данных белковых структур (PDB ID: 3FGC) [13, 14]. Для данной структуры было проведено реконструирование участка мобильной петли α -субъединицы белка (283–290 аминокислотных остатков), как описано в работе [15]. Флавиномононуклеотид, ионы и связанная вода, расшифрованные вместе с люциферазой, были исключены из структуры до старта вычислений.

Вычисление молекулярной динамики структуры бактериальной люциферазы в явном растворителе было проведено с помощью программы GROMACS версии 5.1.4 [16]. Для описания параметров взаимодействия между атомами системы было использовано силовое поле CHARMM36 [17].

Моделируемая система представляла собой кубический бокс с условиями периодической границы, в центре которого размещали молекулу люциферазы. Расстояние между боксом и ферментом составляло 12 Å от любого атома белка. Для создания водного окружения в данный бокс поместили 40821 молекулу воды (модель TIP3P). Начальная геометрия молекул глицерина и сахарозы была взята из Европейского банка данных

белковых структур (PDBeChem ID: GOL и SUC соответственно) [18]. Для моделирования концентраций осмолитов 5, 10, 20, 30 и 40 вес. % в боксе было размещено следующее количество молекул глицерина/воды: 399/38615, 799/36445, 1597/32289, 2396/28208 и 3194/24323 или сахарозы/воды: 108/39109, 215/37443, 430/34136, 645/30819, 859/27589 соответственно. Параметры силового поля для молекулы глицерина были получены с помощью онлайн-сервиса CGenFF [19], для сахарозы – посредством модификации уже известных параметров для α -D-глюкозы и β -D-фруктозы, как рекомендовано в руководстве к CHARMM36 [16]. Для анализа полученных траекторий использовали программный пакет GROMACS.

До начала моделирования была проведена нейтрализация заряда всей системы, а затем – минимизация ее энергии при изохорно-изотермических (NVT-ансамбль) и изотермо-изобарических (NPT-ансамбль) условиях. В первом случае релаксация систем происходила в течение 5 нс при температуре в 300 К, во втором – в течение 10 нс при постоянной температуре (300 К) и давлении (10^5 Па). Положение тяжелых атомов белка при данных минимизациях было зафиксировано. Далее был проделан еще один этап релаксации NPT-ансамбля в течение 10 нс без фиксации атомов белка, необходимость которого была связана с исключением FMN из активного центра кристаллической структуры люциферазы и реконструированием участка мобильной петли.

Вычисление молекулярно-динамической траектории проводили для канонического NPT-ансамбля при постоянной температуре (300 К) и давлении (10^5 Па) в течение 40 нс с шагом вычисления 2 фс. Для каждой из систем были проведены три независимых запуска, включающих в себя все шаги релаксации и молекулярную динамику.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние глицерина и сахарозы на квантовый выход реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. Была измерена нестационарная кинетика биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в средах с различным содержанием глицерина или сахарозы. Для различных концентраций деканала (10–50 мкМ) наблюдали сходные закономерности изменения кинетики в модельных средах, отраженные на рис. 1а,б. Видно, что эффекты глицерина и сахарозы на кинетику реакции различаются. В области малых концентраций осмолитов (10% для глицерина и 10–20% для сахарозы) наблюдается увеличение максимальной интенсивности свечения. Дальнейший рост содержания осмолитов в среде до 30–40% приводит к снижению мак-

симальной интенсивности, что особенно ярко проявляется для сред с глицерином. Также видно, что в средах с глицерином и сахарозой кинетика реакции замедляется, что выражается в более позднем выходе свечения на максимальный уровень по сравнению с реакцией в буфере. Замедление кинетики может быть связано с увеличением вязкости реакционной среды и, как следствие, уменьшением скорости диффузии компонентов реакции.

На основе кинетических кривых был рассчитан квантовый выход реакции, т. е. общее количество квантов света, излученных за один оборот фермента (рис. 1в). Видно, что присутствие в среде как 10% сахарозы, так и 10% глицерина приводит к увеличению квантового выхода реакции. При высоких концентрациях глицерина (30–40%) эффективность реакции снижается, в то время как в средах с таким же содержанием сахарозы квантовый выход не изменяется по сравнению с контролем (буфер). Полученные тенденции сохраняются при вариации концентрации альдегида в диапазоне 10–50 мкМ. Следует отметить, что такая немонотонная зависимость квантового выхода реакции от концентрации осмолитов говорит о наличии нескольких механизмов их влияния на фермент и/или субстраты, вовлеченные в реакцию. Также очевидно, что наблюдаемые эффекты не могут объясняться только увеличением вязкости раствора, поскольку эта характеристика изменяется монотонно с ростом концентрации осмолитов.

Полученные результаты позволяют предположить, что в присутствии глицерина и сахарозы происходит изменение структурно-динамических характеристик фермента люциферазы в целом, либо функционально важных структурных элементов данного белка. Для выявления таких эффектов были применены методы молекулярного моделирования.

Влияние глицерина и сахарозы на стабильность и компактность бактериальной люциферазы. Изменение конформации люциферазы под влиянием осмолитов было оценено с помощью двух параметров: среднеквадратичного отклонения C_{α} -атомов белка и площади поверхности белка, доступной растворителю. Вычисление среднеквадратичного отклонения было проведено относительно координат атомов в расшифрованной кристаллической структуре люциферазы (PDB ID: 3FGC). Для люциферазы расчет площади поверхности, доступной растворителю, проводили с помощью пробной сферы радиусом 1.4 Å. Значения параметров среднеквадратичного отклонения и площади поверхности, доступной растворителю при различном содержании осмолитов, усредненные для последних 20 нс молекулярного моделирования, представлены на рис. 2.

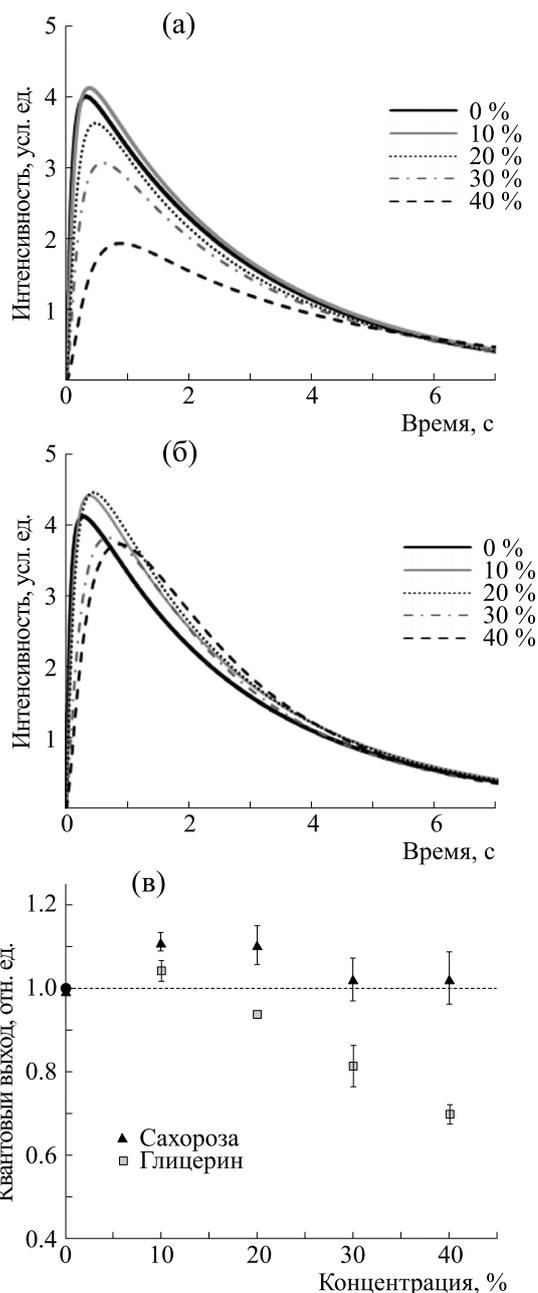


Рис. 1. Кинетика биолуминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии различных концентраций (в %) глицерина (а) или сахарозы (б) и изменение квантового выхода реакции (в). Концентрация люциферазы – 0.96 мкМ, FMNH₂ – 15 мкМ, C₁₀ – 50 мкМ. Среднее значение и погрешность определения квантового выхода вычислена на основе экспериментов с разными концентрациями альдегида (10–50 мкМ). Горизонтальная штриховая линия указывает на величину квантового выхода реакции в буфере.

Видно, что при разном количестве глицерина и сахарозы в среде данные параметры варьируют незначительно. Это говорит об отсутствии влия-

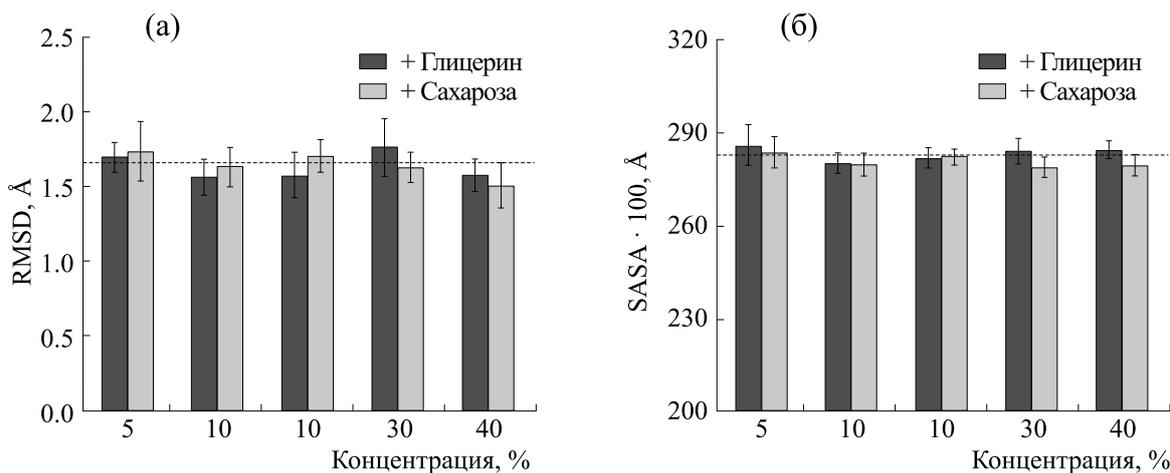


Рис. 2. Значения среднеквадратичного отклонения C_{α} -атомов (а) и площади поверхности, доступной растворителю (б), бактериальной люциферазы в средах с осмолитами, усредненные для последних 20 нс молекулярной динамики. Штриховые горизонтальные линии показывают значения для люциферазы в воде.

ния рассматриваемых осмолитов на конформацию люциферазы, аналогично тому, как это было установлено для лизоцима [10]. Таким образом, ингибирующее влияние на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой, сред с 30–40% глицерина не связано с изменением структуры фермента (взаимным положением атомов основной цепи).

Влияние сред на динамические свойства бактериальной люциферазы. Для оценки подвижности различных участков бактериальной люциферазы в присутствии осмолитов на основе полученных молекулярно-динамических траекторий был рассчитан такой параметр, как среднеквадратичная флуктуация C_{α} -атомов α -субъединицы белка (рис. 3). Видно, что большинство C_{α} -атомов испытывают небольшие колебания около своего положения с амплитудой ≤ 1 Å. Наиболее подвижным элементом α -субъединицы как в водном окружении, так и в присутствии осмолитов является мобильная петля (262–291 а.о.). Получено, что при 5–10%-м содержании глицерина и сахарозы в среде наблюдается увеличение среднеквадратичной флуктуации данного участка структуры, особенно аминокислотных остатков 282–285 (рис. 3, врезки). При дальнейшем росте концентрации осмолитов влияние среды на подвижность петли пропадает. Известно, что мобильная петля α -субъединицы играет важную роль в ходе ферментативной реакции [13, 20]. Считается, что данный участок отвечает за стабилизацию интермедиатов реакции и предотвращает попадание молекул растворителя в активный центр после связывания белка с флавином [21].

Полученный эффект сред с низкими концентрациями глицерина и сахарозы на мобильность функционально важного участка бактериальной

люциферазы может объяснять увеличение квантового выхода реакции в присутствии 10% глицерина и сахарозы, наблюдавшееся в экспериментах *in vitro* (рис. 1в). Однако он не объясняет снижение квантового выхода реакции при более высоких концентрациях глицерина.

Доступность активного центра фермента для молекул осмолитов. Проникновение молекул глицерина или сахарозы в область активного центра фермента может приводить к снижению эффективности реакции за счет таких механизмов, как конкурентное ингибирование, изменение сродства к субстрату посредством изменения полярности среды, нарушение сети водородных связей между функционально важными аминокислотными остатками и других [8, 11, 22].

Для количественной оценки доступности активного центра бактериальной люциферазы для молекул осмолитов было вычислено число молекул глицерина и сахарозы, находящихся на расстоянии ≤ 8 Å от атома серы α Cys106. В рассматриваемую область вошли все аминокислотные остатки, участвующие в связывании флавина. Расчет и усреднение количества молекул осмолитов проводили для последних 20 нс моделирования динамики белка в различных средах.

Установлено, что присутствие молекул глицерина в активном центре наблюдается при всех его концентрациях, изменяется только доля времени, в течение которого глицерин находится там (таблица). При концентрациях 30 и 40% в среднем хотя бы одна молекула глицерина находится в активном центре в течение всего времени моделирования, а количество молекул воды снижается. В то же время в активном центре фермента не было обнаружено ни одной молекулы сахарозы, а количество молекул воды оставалось неизмен-

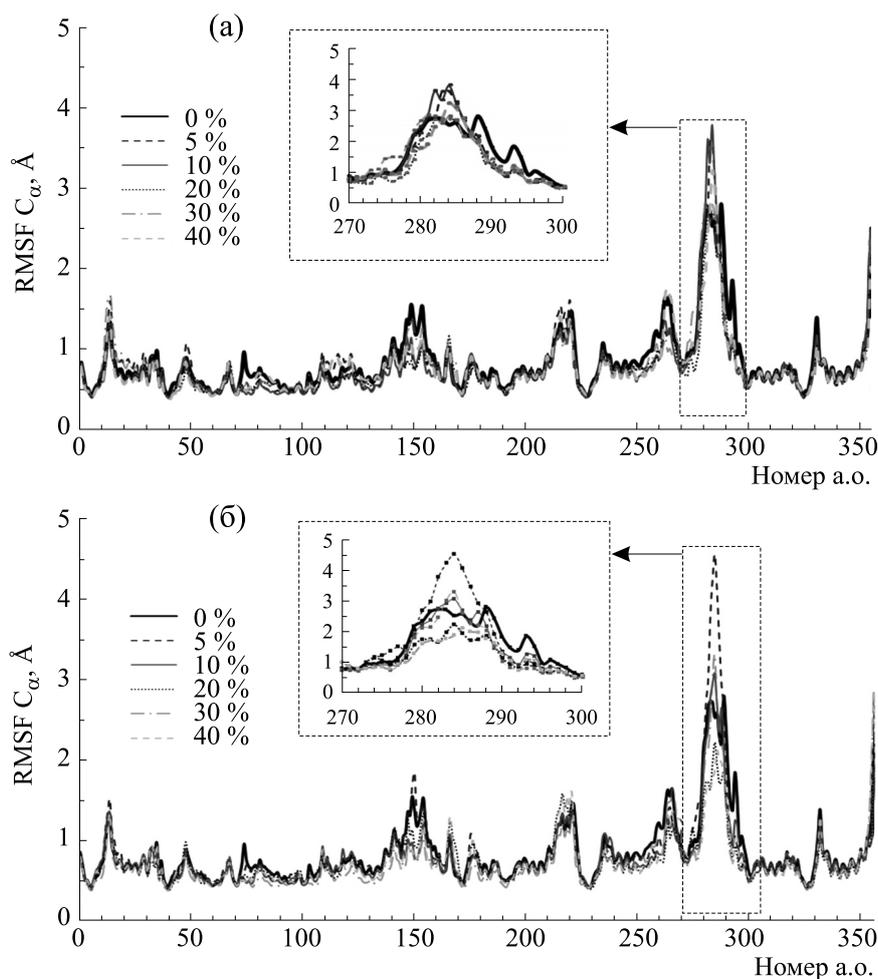


Рис. 3. Среднеквадратичная флуктуация C_{α} -атомов α -субъединицы люциферазы в присутствии различных концентраций глицерина (а) и сахарозы (б). На вставках показаны значения среднеквадратичной флуктуации для участка мобильной петли фермента (части последовательности, выделенной серой штриховой рамкой).

ным при увеличении концентрации сахарозы в среде.

Данный результат может объяснять снижение квантового выхода биолюминесцентной реакции в средах с 30 и 40% глицерина и отсутствие такого эффекта при больших концентрациях сахарозы. Разница в доступности области активного центра люциферазы для глицерина и сахарозы может быть связана с размерами этих молекул (их молекулярная масса составляет 92 и 342 Да соответственно). Вероятно, бо́льшая по размеру молекула сахарозы испытывает стерические ограничения, не позволяющие ей проникать в активный центр фермента, в отличие от молекулы глицерина. Аналогичный эффект для других белков был ранее продемонстрирован в ряде работ [7, 8, 22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов влияния природных осмолитов на структуру и функцию белков

является актуальной задачей как с точки зрения необходимости понимания принципов организации метаболизма клеток в экстремальных условиях, так и учитывая потребность в разработке методов стабилизации и активации полипептидов для нужд биотехнологии. Биолюминесцентная реакция бактерий широко используется как элемент различных биоаналитических систем [23, 24].

В данной работе было рассмотрено влияние растворов глицерина и сахарозы (10–40%) на эффективность биолюминесцентной реакции бактерий. Экспериментально было зарегистрировано увеличение квантового выхода реакции при концентрации 10% для обоих осмолитов. В то же время в присутствии 30 и 40% глицерина происходит снижение количества квантов света, испускаемых за один оборот фермента, а высокие концентрации сахарозы не изменяют эффективность реакции. Моделирование молекулярной динамики бактериальной люциферазы в окружении мо-

Число молекул воды и осмолитов в активном центре бактериальной люциферазы

Параметр		Число молекул воды в активном центре, шт.		Число молекул осмолита в активном центре, шт.	
		Глицерин	Сахароза	Глицерин	Сахароза
Концентрация осмолита, %	0	20,1 ± 5,8		0	
	5	19,7 ± 2,6	19,0 ± 2,5	0,2 ± 0,4	0
	10	16,5 ± 4,5	19,4 ± 3,6	0,5 ± 0,6	0
	20	20,6 ± 2,2	20,8 ± 3,4	0,2 ± 0,4	0
	30	15,9 ± 4,0	21,6 ± 2,3	1,1 ± 0,8	0
	40	14,4 ± 3,3	20,6 ± 2,2	1,5 ± 0,7	0

Примечание. Усреднение проведено по последним 20 нс моделирования.

лекул воды и различного количества молекул осмолитов позволило установить возможные механизмы наблюдаемых эффектов: при малых концентрациях глицерина и сахарозы наблюдается увеличение подвижности мобильной петли белка, а при высоких концентрациях глицерина его молекулы непрерывно присутствуют в области активного центра фермента. При этом конформация бактериальной люциферазы не претерпевает существенных изменений в средах с глицерином и сахарозой. Таким образом, в работе установлено, что влияние исследованных осмолитов на функционирование биолюминесцентной системы бактерий может осуществляться через изменение динамических, а не структурных, свойств люциферазы. Интересным новым результатом работы является выявленная избирательность активного центра бактериальной люциферазы относительно химической природы осмолита: молекулы сахарозы не проникают в область связывания субстратов даже при 40%-м содержании в среде, в отличие от молекул глицерина.

Следует заметить, что для понимания того, какой эффект оказывают осмолиты на бактериальную биолюминесценцию *in vivo*, требуется изучение их влияния на активность других ферментов, обеспечивающих свечение бактерий: например, NADH:FMN-оксидоредуктазы, работающей в сопряжении с люциферазой [25].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ FSRZ-2020-0006) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00420 и № 20-34-90118\20).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. В. Немцева и Н. С. Кудряшева, Успехи химии **76** (1), 101 (2007).
2. J. Lee, *Bioluminescence, the nature of the light* (University of Georgia, 2017).
3. P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, et al., *Science* **217** (4566), 1214 (1982).
4. I. Dandapath, M. Chatterjee, D. Sarkar, et al., in *Cellular osmolytes: From chaperoning protein folding to clinical perspectives*, Ed. by S. L. Rajendrakumar and T. A. Dar (Springer, Singapore, 2017) pp. 229-249.
5. O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, S. Pande, and V. A. Kratasjuk, *Mol. Catalysis* **458**, 60 (2018).
6. О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая и В. А. Кратасюк, Вестн. Оренбург. гос. ун-та **10**, 159 (2013).

7. А. В. Фонин, В. Н. Уверский, И. М. Кузнецова и К. К. Туроверов, *Биофизика* **61** (2), 222 (2016).
8. P. Masson, S. Lushchekina, L. M. Schopfer, and O. Lockridge, *Biochem. J.* **454** (3), 387 (2013).
9. V. Vagenende, M. G. S. Yap, and B. L. Trout, *Biochem.* **48**, 11084 (2009).
10. A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, et al., *J. Phys. Chem. B* **111**, 9410, (2007).
11. Y. Meng, Y. Yuan, Y. Zhu, et al., *J. Mol. Model.* **19** (9), 3749 (2013).
12. G. Gadda and P. Sobrado, *Biochem.* **57** (25), 3445 (2018).
13. Z. T. Campbell, A. Weichsel, W. R. Montfort, and T. O. Baldwin, *Biochemistry* **48**, 6085 (2009).
14. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, et al., *Nucl. Acids Res.* **28**, 235 (2000).
15. Z. T. Campbell, Thomas O. Baldwin, and O. Miyashita, *Biophys. J.* **99**, 4012 (2010).
16. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, et al., *J. Comput. Chem.*, **26** (16), 1701, (2005).
17. R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, et al., *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3257 (2012).
18. A. Gutmanas, Y. Alhroub, G. M. Battle, et al., *Nucl. Acids Res.* **42**, 285 (2014).
19. K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, et al., *J. Comput. Chem.* **31**, 671 (2010).
20. R. Tinikul and P. Chaiyen, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **154**, 47 (2016).
21. J. C. Low and S.-C. Tu, *Biochemistry* **41** (6), 1724 (2002).
22. Д. Э. Хоштария, Н. Г. Гогуадзе и Е. Ульstrup, *Биоорганическая химия* **17** (5), 618 (1991).
23. E. Esimbekova, V. Kratasyuk, and O. Shimomura, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **144**, 67 (2014).
24. E. N. Esimbekova, E. V. Nemtseva, A. E. Bezrukikh, et al., *Toxic. in Vitro* **45**, 128 (2017).
25. A. A. Deeva, E. A. Zyкова, E. V. Nemtseva, and V. A. Kratasyuk, *Proteins* **87** (9), 723 (2019).

The Effects of Osmolytes on the Bioluminescent Reaction of Bacteria: Structural and Dynamic Aspects

L.A. Sukovatyi*, A.E. Lisitsa*, V.A. Kratasyuk*, **, and E.V. Nemtseva*, **

*Siberian Federal University, Svobodnyi prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

**Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

The effects of viscous media with glycerol and sucrose (10–40%) on the kinetics of the bacterial bioluminescent reaction have been investigated by stopped-flow technique. Increment of quantum yield in media with 10% of both osmolytes was shown. Higher concentrations of glycerol, up to 30–40%, were found to reduce the efficiency of the reaction, while this effect was not observed in the media with sucrose. The molecular dynamics simulation was used to study the structure of bacterial luciferase surrounded by either water molecules solely or by mixture of water with various numbers of glycerol/sucrose molecules. It was found that both cosolvents at studied concentrations did not cause a significant change in conformation of bacterial luciferase. The calculated root mean square fluctuations for C α -atoms of bacterial luciferase α -subunit indicated that the higher flexibility of the enzyme mobile loop could be responsible for increment of quantum yield in the presence of 10% of both osmolytes. The active site of bacterial luciferase was found to be accessible for glycerol molecules while sucrose did not enter catalytic gorge. Moreover, at 30% and 40% concentration the glycerol molecules were found to locate in the active site of bacterial luciferase throughout the whole simulation time (40 ns) and to exclude water molecules, which can explain the experimentally obtained reaction quantum yield decrease.

Keywords: bioluminescence, luminous bacteria, bacterial luciferase, osmolyte, molecular dynamics, protein structure and dynamics

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ В ОСНОВНОМ ИХ БИЯДЕРНОЙ ФОРМОЙ

© 2020 г. В.Д. Микоян*, Е.Н. Бургова*, Р.Р. Бородулин*, А.Ф. Ванин*, **

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

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

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

Поступила в редакцию 26.06.2020 г.

После доработки 26.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Методом электронного парамагнитного резонанса оценено количество моонитрозильных комплексов железа с диэтилдитиокарбаматом, образующихся в печени мышей *in vivo* и *in vitro* после внутрибрюшинного введения биядерных динитрозильных комплексов железа с N-ацетил-L-цистеином или глутатионом, S-нитрозоглутатиона, нитрита натрия или вазодилатирующего препарата Изокет®. В противоположность комплексам, образующимся после введения нитрита или Изокета, уровень которых резко возрастал после обработки препаратов печени сильным восстановителем — дитионитом, количество моонитрозильных комплексов железа с диэтилдитиокарбаматом, появившихся в печени мышей после введения им биядерных динитрозильных комплексов железа с N-ацетил-L-цистеином или глутатионом или S-нитрозоглутатиона, в присутствии дитионита не изменялось. Сделан вывод, что в первом случае ЭПР-детектируемые моонитрозильные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом в отсутствие и в присутствии дитионита возникали в результате реакции NO, образующегося из нитрита, соответственно с комплексами Fe²⁺-диэтилдитиокарбамата и Fe³⁺-диэтилдитиокарбамата. Во втором случае моонитрозильные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом возникали в результате перехода железо-моонитрозильных фрагментов из готовых железо-динитрозильных групп биядерных динитрозильных комплексов, в три-четыре раза превышающих содержание в ткани моонитрозильных форм этих комплексов. Полученные результаты позволяют утверждать, что при появлении в тканях животных *in vivo* динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами, либо введенных в организм, либо продуцируемых при участии эндогенного NO, данные комплексы представлены в этих тканях преимущественно их диамагнитной, ЭПР-недетектируемой биядерной формой.

Ключевые слова: моонитрозильные комплексы железа, динитрозильные комплексы железа, биядерная форма динитрозильных комплексов.

DOI: 10.31857/S0006302920060149

В 1964–1965 гг. Р.М. Налбандяном и А.Ф. Ваниным в дрожжевых клетках по характерному сигналу ЭПР со значениями $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ (названным в соответствии с его средним значением сигналом 2.03) были обнаружены парамагнитные центры [1, 2], идентифицированные в 1967 г. как моонитрозильная форма динитрозильных комплексов железа (М-ДНКЖ) с тиол-

содержащими лигандами [3]. В том же году по сигналу 2.03 эти комплексы были зарегистрированы и в тканях животных [4]. Последующие длительные исследования позволили нашей группе (под руководством А.Ф. Ванина) установить не только их состав и происхождение, но и продемонстрировать разнообразную биологическую активность этих комплексов, обусловленную их способностью выступать в качестве доноров одного из универсальных регуляторов метаболических процессов во всех представителях живого мира — монооксида азота (NO) или, как сейчас принято говорить, оксида азота [5, 6].

В настоящее время установлено, что наряду с моонитрозильной формой ДНКЖ с тиолсодержащими

Сокращения: М-ДНКЖ — моонитрозильная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ — биядерная форма динитрозильных комплексов железа, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, МГД — N-метил-D-глюкамин-дитиокарбамат, МНКЖ — моонитрозильные комплексы железа, GSH — глутатион, NAC — N-ацетил-L-цистеин, GS-NO — S-нитрозоглутатион, ПДК — производные дитиокарбамата.

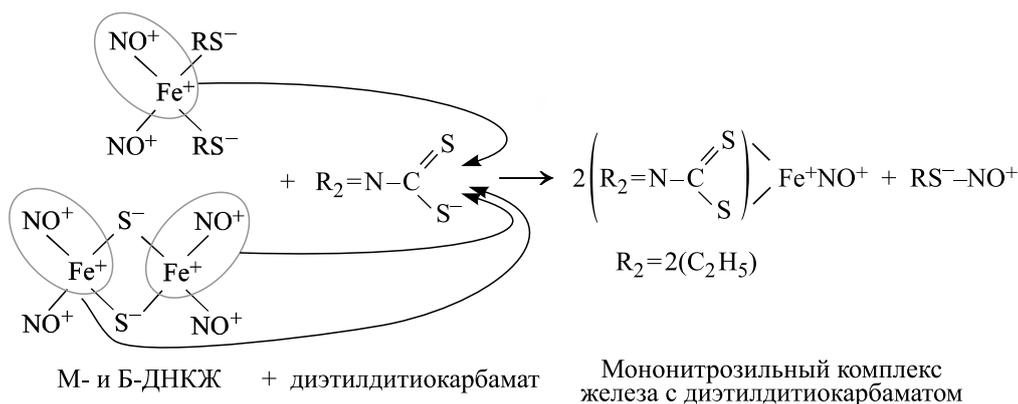


Рис. 1. Механизм превращения М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с диэтилдитиокарбаматом.

лигандами в различных биообъектах может возникать и биядерная, диамагнитная (ЭПР-недетектируемая) форма этих комплексов – Б-ДНКЖ [5–10]. Изучение электронной и пространственной структуры обеих форм ДНКЖ, их способности выступать не только в качестве доноров нейтральных молекул NO, но и в качестве производных этих молекул, не менее биологически активных – катионов нитрозония (NO^+), позволило нам предложить для М- и Б-ДНКЖ формулы, характеризующие одну из основных резонансных структур этих комплексов, соответственно как $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$ и $[(\text{RS}^-)_2(\text{Fe}^+)_2(\text{NO}^+)_4]$ [5, 6].

Более того, в настоящее время есть основание полагать, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, образующиеся в различных живых организмах, продуцирующих оксид азота, функционируют в этих организмах в качестве «рабочей формы» этого агента, т.е. оксид азота способен оказывать физиологическое действие на организм животных и человека только после его включения в ДНКЖ как в форме NO, так и в форме NO^+ . ДНКЖ обеспечивает депонирование и стабилизацию этих агентов с последующей их доставкой к мишеням их биологического действия – соответственно к гем- и тиолсодержащим белкам. Последующее связывание NO и NO^+ соответственно с гемовой или тиоловой группами этих белков, приводящее соответственно к образованию нитрозильных комплексов гемового железа или S-нитрозотиолов, вызывает резкое изменение конформации этих белков и тем самым их активацию или дезактивацию [5, 6].

В последнее время нами были получены данные, свидетельствующие о том, что в тканях животных образующиеся в них ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами представлены преимущественно биядерной формой этих комплексов [7, 8]. Эти результаты были получены в опытах с обработкой изолированных органов животных произ-

водными дитиокарбамата – диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) или N-метил-D-глюкамин-дитиокарбаматом (МГД), способными в соответствии со схемой, приведенной на рис. 1 [7, 8], перехватывать на себя железо-мононитрозильный фрагмент из железо-динитрозильной группы Б-ДНКЖ с образованием ЭПР-детектируемых мононитрозильных комплексов железа (МНКЖ) с ДЭТК или МГД, а также S-нитрозотиолы (RS^-NO^+). МНКЖ-ДЭТК, будучи водонерастворимыми комплексами, локализуются преимущественно в гидрофобных компартментах мембран, тогда как МНКЖ-МГД (водорастворимые комплексы) – в водосодержащих областях клеток и тканей.

В работе [8] мы изучили взаимодействие ДЭТК и МГД с изолированными органами мышей, в организм которых предварительно внутрибрюшинно вводили в качестве возможных экзогенных доноров NO нитрит натрия, органический нитрит (изосорбида динитрат) или S-нитрозоглутатион. Кроме того, некоторые органы *in vitro* обрабатывали газообразным NO с последующей инкубацией этих органов в растворах ДЭТК или МГД. Что касается эндогенного NO, его появление в организме мышей в высоком количестве инициировали активацией воспалительных процессов, что достигалось введением в организм животных бактериальных липополисахаридов. В результате в органах мышей начинался усиленный синтез мощного NO-генератора – индуцибельной NO-синтазы. Повышение уровня NO в печени мышей, которое мы оценивали по количеству МНКЖ-ДЭТК, возникших *in vivo* в результате связывания NO с его ловушками – комплексами железа с ДЭТК, сопоставлялось затем с количеством МНКЖ-ДЭТК, образовавшихся *in vitro* в печени мышей, обработанных липополисахаридами, после выдерживания этой ткани в растворе ДЭТК.

Что касается работы [7], то в ней обработку изолированной печени растворами ДЭТК проводили

путем ее перфузии этими растворами. Было показано, что внутрибрюшинное введение мышам Б-ДНКЖ с глутатионом приводило к образованию в печени этих животных значительного количества МНКЖ-ДЭТК, в четыре-пять раз превышавшего уровень М-ДНКЖ, появившийся в печени *in vivo* после введения мышам Б-ДНКЖ с глутатионом.

В связи с этим встает вопрос, действительно ли введение животным перечисленных выше доноров NO приводило во всех случаях к образованию в печени (а возможно, и в других органах животных) диамагнитных Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, превращавшихся под действием ДЭТК (или МГД) в парамагнитные, ЭПР-детектируемые МНКЖ-ДЭТК(МГД)? В настоящей работе мы попытались, проведя соответствующие эксперименты, ответить на этот вопрос.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH), дитионит натрия, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и цитрат натрия (все — от Sigma, США), изосорбида динитрат (ISDN, изокет) (UCB Farma, Ирландия) и ДЭТК (Acros, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой от примеси NO_2 методом низкотемпературной сублимации в вакуумированной системе [9].

Синтез Б-ДНКЖ с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином и S-нитрозоглутатиона. Б-ДНКЖ-GSH синтезировали по методу, описанному в работе [10]. В 10 мл 15 мМ HEPES-буфера, pH 7.4 последовательно растворяли 120 мг глутатиона (40 мМ), 56 мг ферросульфата (20 мМ) и 14 мг нитрита натрия. Введение в раствор глутатиона приводило к существенному снижению pH этого раствора (до 3.5), что обеспечивало растворение ферросульфата без образования водонерастворимых гидроокисных комплексов железа и последующее образование GS-NO при введении в раствор нитрита. Последнее сопровождалось розовым окрашиванием раствора. По завершении синтеза GS-NO через один-полтора часа (о чем можно было судить по интенсивности полосы поглощения GS-NO на длине волны 334 нм), pH раствора повышали до нейтральных значений, добавляя в раствор каплями 0.1 М раствор NaOH. При этом окраска раствора изменялась от розовой до темно-оранжевой, характерной для образующихся комплексов Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH). При этом ионное железо, не включившееся в эти комплексы, начинало постепенно выпадать в осадок в форме железо-гидроокисных комплексов.

Полученную таким образом суспензию оставляли на воздухе при комнатной температуре на 8–12 ч до полного осаждения железо-гидроокисных комплексов, удалявшихся из раствора Б-ДНКЖ его фильтрацией на бумаге. Концентрацию сохранившихся при этом Б-ДНКЖ-GSH определяли по интенсивности характерных для этих комплексов полос на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ) [9]. Концентрация синтезированных таким образом Б-ДНКЖ-GSH в среднем составляла 9.5 мМ.

Аналогичным образом синтезировали комплексы Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином (Б-ДНКЖ-NAC) за следующими исключениями. На синтез S-нитрозо-NAC затрачивали не более 20 мин, на синтез Б-ДНКЖ-NAC — не более 3–4 ч. В ряде экспериментов мы использовали Б-ДНКЖ-GSH(NAC), синтезированные путем обработки газообразным NO растворов Fe^{2+} с последующим контактом этих растворов с растворами GSH или NAC по методике, описанной в работе [9].

Для получения S-нитрозоглутатиона (GS-NO) к 5.5 мМ раствору глутатиона в 15 мМ HEPES-буфере, pH которого снижался после введения глутатиона с нейтральных значений до pH 3.0–3.5, на воздухе добавляли 5 мМ нитрита натрия, после чего раствор приобретал розовую окраску, характерную для GS-NO. Концентрацию последнего определяли по интенсивности его основной полосы поглощения на 334 нм с коэффициентом экстинкции, равным $0.94 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11].

Исследования на животных. Эксперименты проводили на белых беспородных мышках-самцах массой 18–20 г. Все вещества, за исключением цитратных комплексов железа, вводили животным внутрибрюшинно в 0.2 мл физиологического раствора в следующих дозах: NaNO_2 — 50 мг/кг (0.7 мМ/кг), изокет (ISDN) — 1 мМ/кг, ДЭТК — 500 мг/кг (3 мМ/кг), GS-NO — 0.2 мМ/кг, Б-ДНКЖ-GSH(NAC) — 0.12–0.15 мМ/кг (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ). Fe-цитрат вводили внутримышечно в лапу в следующих дозах: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 37.5 мг (0.135 мМ/кг), цитрат — 187.5 мг (0.675 мМ/кг).

Животных, обработанных NaNO_2 , ISDN, GS-NO или Б-ДНКЖ-GSH одновременно с введением им Fe-цитратных комплексов, через 30 мин декапитировали, извлекали у них печень, помещали в ЭПР-ампулы и замораживали в жидком азоте. После регистрации в этих образцах спектров ЭПР их размораживали и выдерживали в 200 мМ растворе ДЭТК при комнатной температуре в течение 30 мин, затем снова замораживали в ЭПР-

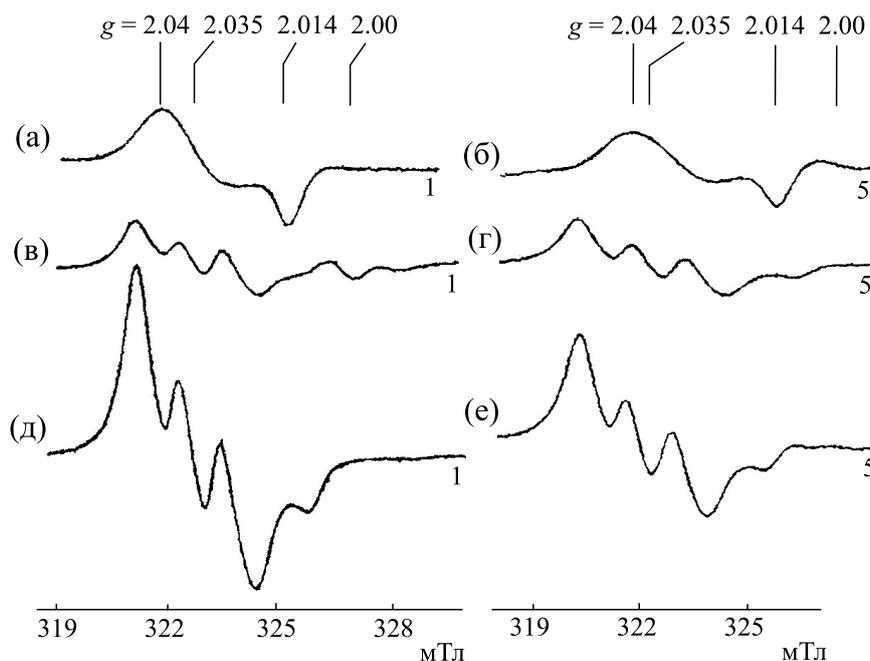


Рис. 2. Спектры ЭПР, зарегистрированные: (а, б) – в печени мышей через 30 мин после внутрибрюшинного введения им Б-ДНКЖ-НАС или ДНКЖ-GSH, (в, г) – через 30 мин инкубации препаратов печени таких же мышей в 200 мМ растворе ДЭТК, (д, е) – в печени таких же мышей с последующим внутрибрюшинным введением им на 30 мин ДЭТК. Спектры зарегистрированы при 77 К. Справа указано усиление радиоспектрметра в отн. ед.

ампулах и снова регистрировали в этих образцах спектры ЭПР.

ЭПР-измерения проводили на модифицированном ЭПР-радиоспектрметре Radio-Pan (Польша) X-диапазона при 77 К в образцах печени в цилиндрических ЭПР-ампулах диаметром 4 мм, помещаемых в палец кварцевого сосуда Дьюара. Концентрацию парамагнитных центров определяли методом двойного интегрирования сигналов ЭПР, используя в качестве стандартного образца замороженный раствор М-ДНКЖ-GSH с известной концентрацией.

Статистический анализ. Экспериментальные результаты представляли в виде средних величин \pm среднее отклонение (по трем-четырем измерениям).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени животных, обработанных Б-ДНКЖ-НАС или Б-ДНКЖ-GSH. Внутрибрюшинное введение мышам Б-ДНКЖ-НАС в дозе 0.12–0.15 мМ/кг массы животных приводило к появлению в их печени М-ДНКЖ, концентрация которых, судя по интенсивности характерного для этих комплексов сигнала 2.03 (рис. 2а), практически не изменялась в течение часа после введения Б-ДНКЖ и составляла 90 ± 20 микромолей на 1 кг влажной ткани печени. Дополнительное внутрибрюшинное введение этим животным ДЭТК в дозе

500 мг/кг (3 мМ/кг) через полчаса после инъекции им Б-ДНКЖ-НАС на полчаса вызывало полное исчезновение в печени этих животных сигнала 2.03. Вместо него регистрировался интенсивный ЭПР-сигнал МНКЖ-ДЭТК со значениями $g_{\perp} = 2.035$, $g_{\parallel} = 2.02$ и триплетной сверхтонкой структурой при g_{\perp} (рис. 2д). В соответствии с этим сигналом концентрация МНКЖ-ДЭТК существенно превышала уровень М-ДНКЖ и составляла 400 ± 30 микромолей на 1 кг влажной ткани печени.

Иная ситуация наблюдалась в опытах, в которых образцы печени, взятые у мышей через полчаса после введения им Б-ДНКЖ-НАС, инкубировали на воздухе в 15 мМ HEPES-буфере при pH 7.4, содержавшем 200 мМ ДЭТК. Такая обработка также приводила к исчезновению в препаратах печени М-ДНКЖ и появлению в них МНКЖ-ДЭТК (рис. 2в). Однако в этом случае концентрация последних не превышала уровня исходных М-ДНКЖ. Обработка этих препаратов сильным восстановителем – дитионитом натрия, вводимшемся в препараты в порошкообразной форме, не влияла на содержание МНКЖ-ДЭТК (данные не приводятся).

В аналогичных опытах на животных, в которых Б-ДНКЖ-НАС были заменены на Б-ДНКЖ-GSH, были получены идентичные результаты (рис. 2, правая панель). Различие состояло лишь в том, что при внутрибрюшинном введении мы-

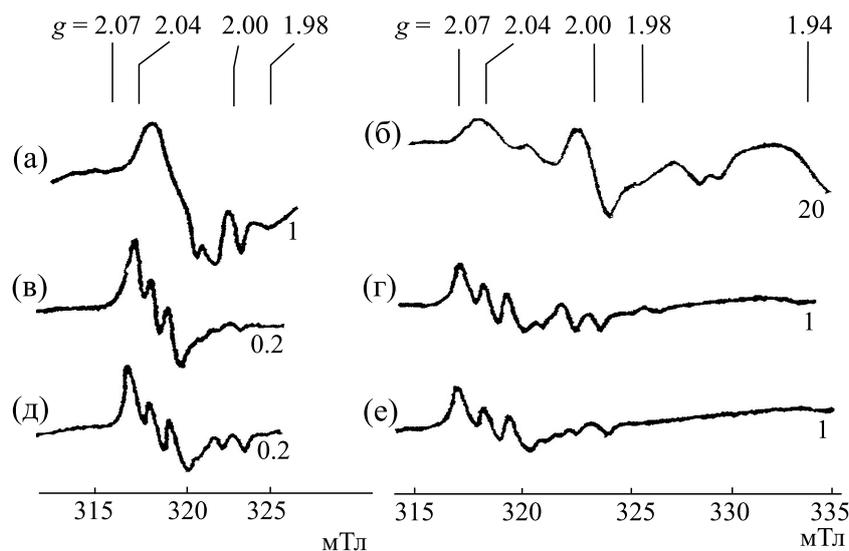


Рис. 3. Слева: спектры ЭПР препаратов печени мышей: (а) – обработанных *in vitro* газообразным NO при давлении 150 торр, (в) – с последующей 30-минутной инкубацией этих препаратов в 200 мМ растворе ДЭТК, (д) – затем обработанных дитионитом. Справа: (б) – спектры ЭПР, зарегистрированные в печени мышей через 30 мин после внутрибрюшинного введения им GS-NO, (г) – с последующей 30-минутной обработкой этих препаратов 200 мМ раствором ДЭТК, (е) – далее обработанных дитионитом. Спектры зарегистрированы при 77 К.

шам Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК в тех же дозах, что и в опытах с использованием Б-ДНКЖ-NAC, уровень образующихся М-ДНКЖ и МНКЖ-ДЭТК был существенно ниже, достигая соответственно концентраций 15 ± 5 и 80 ± 15 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 2б,е). Это снижение могло быть обусловлено более слабым проникновением Б-ДНКЖ-GSH из брюшины в кровеносные сосуды, возможно, из-за существенно более низкой проницаемости клеточных мембран для глутатиона по сравнению с уникально эффективным проникновением сквозь мембраны N-ацетил-L-цистеина. При выдерживании изолированных образцов печени в 200 мМ растворе ДЭТК уровень образующихся МНКЖ-ДЭТК составлял 20 ± 5 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 2г).

Не обнаружено никаких различий в результатах вышеописанных экспериментов при введении животным Б-ДНКЖ с GSH или NAC, синтезированных с использованием либо соответствующих S-нитрозотиолов (GS-NO или S-нитрозо-NAC), либо газообразного NO.

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени мышей, обработанной *in vitro* газообразным NO и дитионитом. Как и в нашем предыдущем исследовании [8], обработка изолированной печени мышей последовательно газообразным NO, а затем ДЭТК путем 30-минутной инкубации ткани в 200 мМ растворе ДЭТК при нейтральном значении pH приводила к появлению в ткани МНКЖ-ДЭТК в концентрации, в среднем достигавшей 250 ± 50 микромолей/кг влажной ткани

при средней концентрации М-ДНКЖ, равной 40 ± 10 микромолей/кг влажной ткани (рис. 3а,в). Характерно, что и в этом случае обработка препаратов печени, содержащих МНКЖ-ДЭТК, дитионитом натрия не влияла на уровень этих комплексов (рис. 3д). Как и в работе [8], приведенный выше высокий уровень образующихся МНКЖ-ДЭТК достигался в образцах печени мышей, которым до их забоя внутрибрюшинно вводили цитратный комплекс железа. Без такой обработки животных концентрация МНКЖ-ДЭТК в образцах печени снижалась в три-пять раз.

Следует отметить, что обработка препаратов печени *in vitro* газообразным NO приводила к образованию в них, кроме ДНКЖ, нитрозильных комплексов гемсодержащих белков (преимущественно гемоглобина), характеризующихся сигналом ЭПР с крайними значениями g-фактора, равными 2.07 и 1.98 (рис. 3а).

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени мышей, обработанной *in vivo* S-нитрозоглутатином. При одновременном введении мышам GS-NO и Fe-цитратного комплекса через 30 мин в печени этих животных, как и в опытах с введением им Б-ДНКЖ с NAC или GSH, регистрировали сигнал 2.03, интенсивность которого соответствовала концентрации М-ДНКЖ, не превышавшей 1–2 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 3б). При последующей 30-минутной инкубации этих препаратов в 200 мМ растворе ДЭТК в них возникали МНКЖ-ДЭТК в концентрации 10–5 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 3г). При последующей обработке дитионитом препаратов пече-

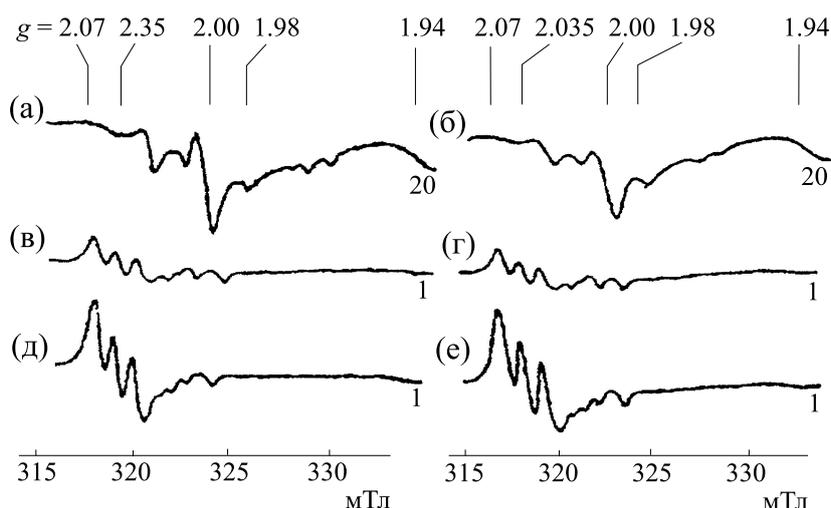


Рис. 4. (а, б) – Спектры ЭПР, зарегистрированные в печени мышей через 30 мин после внутрибрюшинного введения им нитрита натрия или изокета; (в,г) – в препаратах печени таких же животных при последующем 30-минутном внутрибрюшинном введении мышам ДЭТК; (д) – после последующей обработки этих препаратов в растворе ДЭТК, а затем (е) дитионитом.

ни, содержащих МНКЖ-ДЭТК, уровень последних практически не изменялся (рис. 3е). Следует отметить, что в отличие от результатов опытов с введением мышам «готовых» Б-ДНКЖ, с последующим действием ДЭТК на печень этих животных *in vivo* или *in vitro*, количество МНКЖ-ДЭТК, образующихся в печени *in vitro*, было существенно меньше, чем в опытах *in vivo* (рис. 2); в аналогичных опытах с введением мышам GS-NO существенных различий в количестве МНКЖ-ДЭТК в препаратах печени не обнаруживалось.

Без добавления цитратных комплексов железа мышам одновременно с GS-NO в печени этих животных, во-первых, не обнаруживалось образования М-ДНКЖ, а во-вторых, уровень МНКЖ-ДЭТК, возникавших в этом органе под действием ДЭТК, не превышал 0.15 микромолей на 1 кг

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом натрия или изокетом. При введении мышам нитрита натрия вместе цитратным комплексом железа с последующей через полчаса обработкой печени ДЭТК *in vivo* или *in vitro* – соответственно путем дополнительной инъекции животным раствора ДЭТК в дозе 500 мг/кг (3 мМ/кг) с последующим через полчаса забоем животных или получасовой инкубацией печени мышей в 200 мМ растворе ДЭТК – в обоих случаях в печени возникали, судя по характерному для них сигналу ЭПР (рис. 4в), МНКЖ-ДЭТК в примерно равной концентрации – 20 ± 5 микромолей на 1 кг влажной ткани. Без контакта с ДЭТК в препаратах печени, судя по их спектрам ЭПР (рис. 4а), нитрит инициировал появление только нитрозильных комплексов гемо-

глобина. Что касается образования М-ДНКЖ в этих препаратах, наблюдавшегося в опытах с введением животным Б-ДНКЖ или GS-NO, инъекция нитрита не сопровождалась, судя по отсутствию в спектрах ЭПР сигнала 2.03, появлением этих комплексов (рис. 4а). Этот результат, демонстрирующий неспособность нитрита инициировать при однократном введении образования в тканях животных *in vivo* М-ДНКЖ, многократно регистрировался нашей группой на всем более чем 50-летнем протяжении наших исследований ДНКЖ в живых организмах [5, 6, 12–16].

Обнаружилось и другое существенное отличие результатов опытов с введением мышам нитрита и опытов с введением им Б-ДНКЖ или GS-NO, а также опытов по обработке печени мышей газообразным NO – а именно ~ трехкратное повышение содержания МНКЖ-ДЭТК в препаратах печени мышей с нитритом при их обработке сильным восстановителем – дитионитом (рис. 4д).

Трехкратное увеличение содержания МНКЖ-ДЭТК под действием дитионита наблюдалось (рис. 4е) и в опытах на препаратах печени мышей, в организм которых вводили водорастворимую форму нитроглицерина – изокет (ISDN) – практически в той же дозе, что и нитрит (рис. 4б,г,е). Не исключено, что это сходство с препаратами печени мышей, которым вводили нитрит, могло быть обусловлено тем, что при распаде в организме изокет высвобождал не только NO, но и, как указывается в его описании как лекарства [17], преимущественно анионы нитрита.

Следует отметить, что в экспериментах с введением нитрита и изокета без добавления животным цитратного комплекса железа уровень обра-

зующихся в печени мышей МНКЖ-ДЭТК был в три-четыре раза ниже приведенных выше величин (данные не приводятся).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перед тем как перейти к обсуждению полученных результатов, обсудим возможные механизмы образования парамагнитных МНКЖ-ДЭТК, которые могли бы реализоваться в наших опытах при введении мышам Б-ДНКЖ-GSH(НАС), GS-NO, нитрита или изокета, а также при обработке изолированных препаратов печени газообразным NO. В соответствии с многочисленными результатами изучения этого процесса, МНКЖ с производными дитиокарбамата (ПДК), например, с ДЭТК или МГД [18–27], могут возникать по двум следующим механизмам. Во-первых, при наличии в органах животных ДНКЖ производные дитиокарбамата могут, как это показано на рис. 1, перехватывать на себя железо-мононитрозильные фрагменты из «уже готовых» железо-динитрозильных групп с образованием парамагнитных, ЭПР-детектируемых МНКЖ, характеризующихся формулой $(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ (или $(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{+}\text{-NO}^+$) [18, 20, 23, 25, 26]. Во-вторых, в отсутствие ДНКЖ, но при появлении в ткани NO, последний может равноэффективно связываться с ионами двух- или трехвалентного железа с последующим образованием соответственно парамагнитных $[(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}]$ или диамагнитных (ЭПР-недетектируемых) $[(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{3+}\text{-NO}]$ комплексов [19, 21–24, 26, 27]. Последние легко переходят в парамагнитную форму под действием различных восстановителей, например, дитионита, цистеина или аскорбата [19, 21, 23–27]. Поскольку в тканях животных *in vivo* значительная часть ионов железа — слабосвязанного железа, включаемого в МНКЖ с ПДК, — находится в трехвалентном состоянии [26], именно резкое, трехкратное увеличение содержания МНКЖ-ПДК под действием различных восстановителей должно отличать второй механизм образования этих комплексов от первого.

Такое различие в ответ на обработку изолированных препаратов печени дитионитом наблюдалось нами на препаратах мышей, с одной стороны, обработанных *in vivo* нитритом натрия или изокетом, а с другой — обработанных *in vivo* Б-ДНКЖ-GSH(НАС) или GS-NO, а также после обработки препаратов печени *in vitro* газообразным NO. Этот результат, собственно, и позволяет нам говорить о наличии в печени в первом случае преимущественно NO или во втором случае преимущественно Б-ДНКЖ. Действительно, если бы через полчаса после введения животным Б-ДНКЖ-GSH(НАС) или GS-NO эти соедине-

ния в печени полностью бы распадались, а образование МНКЖ-ДЭТК было бы обусловлено связыванием с ДЭТК оксида азота, высвободившегося из вводимых соединений или включением в этот процесс нитрита как продукта окисления NO, то дитионит как сильнейший восстановитель должен был повышать уровень парамагнитных, ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК. Факт полного отсутствия этого феномена в экспериментах на всех препаратах печени мышей, обработанных *in vivo* Б-ДНКЖ-GSH(НАС) или GS-NO, а также препаратов, обработанных *in vitro* газообразным NO, с большой вероятностью свидетельствует о том, что во всех этих случаях в печени мышей *in vivo* возникали ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Об образовании их моноядерной формы свидетельствовала регистрация сигнала 2.03 (рис. 2а,б и 3а,б); о появлении Б-ДНКЖ, причем в концентрации, в несколько раз превышающей уровень М-ДНКЖ, можно было судить по соответственно более высокой интегральной интенсивности сигнала ЭПР МНКЖ-ДЭТК по сравнению с аналогичной характеристикой сигнала 2.03.

Повышение в три раза уровня МНКЖ-ДЭТК под влиянием дитионита в препаратах печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом или изокетом (рис. 4д,е), свидетельствует о наличии в этих препаратах двух типов МНКЖ-ДЭТК. Первый (парамагнитный, ЭПР-детектируемый) характеризуется формулой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, второй (диамагнитный, ЭПР-недетектируемый) — формулой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{3+}\text{-NO}$. Именно взаимодействие последнего с дитионитом обеспечивало трехкратное повышение уровня ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК. Что касается МНКЖ-ДЭТК, ЭПР-детектируемых без добавления дитионита и составляющих ~30% от общего количества МНКЖ-ДЭТК, они могли возникать в результате взаимодействия ДЭТК с Б-ДНКЖ, возможно образующихся в печени при ее контакте с нитритом.

Такого рода предположение абсолютно не согласуется с результатами сравнительных исследований гипотензивной активности Б-ДНКЖ-GSH и нитрита натрия. Было показано, что в дозовом отношении нитрит как гипотензивный агент более чем в 100 раз менее активен, чем Б-ДНКЖ [28]. Это означает, что нитрит при введении в организм животных не способен эффективно инициировать образование ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, так что никоим образом 30% молекул NO, продуцируемых нитритом, не могли включиться в образование ДНКЖ. Очевидно, эти молекулы связывались с Fe^{2+} -ДЭТК-комплексами, что и обеспечивало образование исходно па-

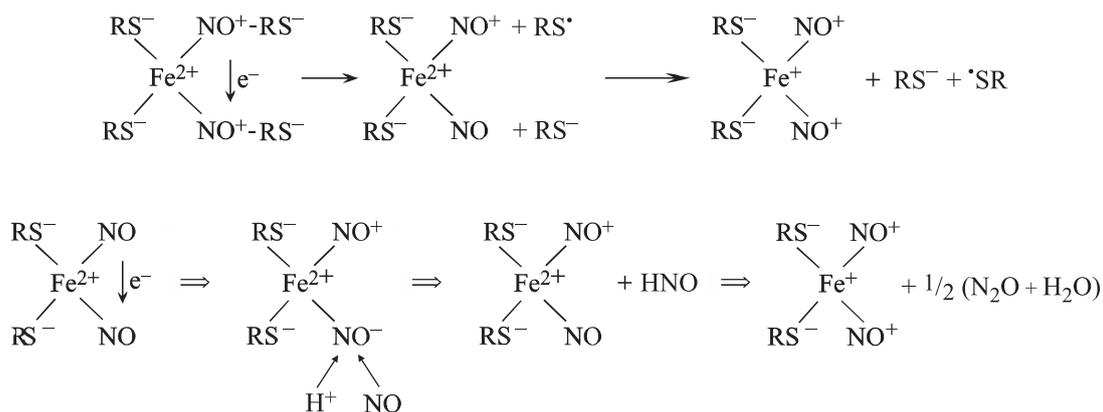


Рис. 5. Механизмы образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, инициируемого в присутствии Fe^{2+} и тиолов S-нитрозотиолами (а) или газообразным NO (б) [5, 6].

рамагнитных, ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК, не взаимодействующих с дитионитом.

Встает вопрос, почему GS-NO, введившийся мышам в дозе в три раза меньшей, чем нитрит, тем не менее мог, судя по нашим результатам, обеспечивать образование в печени *in vivo* как М-, так и Б-ДНКЖ. При этом количество ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК, возникших в препаратах печени при взаимодействии ДНКЖ с ДЭТК (10–15 микромолей на кг ткани) было примерно равно количеству тех же МНКЖ, возникших в печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом, в результате взаимодействия образовавшегося NO с Fe^{2+} -ДЭТК-комплексами (20 ± 5 микромолей на 1 кг ткани). Другими словами, почему фактически при одинаковом количестве NO его было достаточно для образования ДНКЖ при введении мышам GS-NO, но недостаточно при введении мышам нитрита?

Столь разное влияние GS-NO и нитрита на образование ДНКЖ в организме животных можно объяснить исходя из предложенных нами механизмов синтеза этих комплексов при участии в этом процессе S-нитрозотиолов (RS-NO) или свободных молекул NO, приведенных на рис. 5.

Существенное различие этих механизмов состоит в том, что для образования одной железо-динитрозильной группы в ДНКЖ при участии RS-NO и свободных молекул NO требуются соответственно две и три молекулы этих агентов. В обоих случаях этот процесс инициируется реакцией диспропорционирования (взаимного одноэлектронного окисления-восстановления) двух молекул RS-NO и NO. Его достаточно для образования железо-динитрозильной группы при участии RS-NO, тогда как для реализации этого процесса при участии NO необходима его третья молекула, включающаяся в координационную сферу железа вместо высвобождающейся из нее

молекулы нитроксила (HNO) [5, 6, 9, 29–32]. Очевидно, что в этом случае вероятность образования железо-динитрозильной группы, обусловленного трехстадийным характером этого процесса (сначала связыванием с ионом железа двух молекул NO, затем выходом из координационной сферы железа молекулы нитроксила и последующим включением на его координационное место третьей молекулы NO), должно существенно увеличивать время образования указанной группы по сравнению со временем ее синтеза при участии только двух молекул GS-NO. Более того, с учетом возможной нестабильности промежуточных продуктов оно может делать невозможным образование в ткани печени железо-динитрозильной группы при участии молекул NO, появляющихся в этой ткани в сравнительно небольшом количестве (~ 0.1 мМ), как это имело место в наших опытах. Ясно, что только при существенном повышении уровня NO в ткани, как это имело место при обработке изолированных препаратов печени мышей газообразным NO, можно было достигнуть образования М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (рис. 3а, в, д). В этом случае образцы печени мышей, помещенные при давлении газообразного NO 100–150 торр в 100-миллилитровые аппараты Тунберга, находились в контакте с этим газом в количестве 1 ммоль. Если учесть, что объем одного препарата печени равен $\sim 1 \text{ см}^3$, указанного количества NO могло хватить для образования в этом препарате до 0.3 моля железо-динитрозильных групп на 1 кг влажной ткани.

При обсуждении этой проблемы следует иметь ввиду тесную взаимосвязь между RS-NO и ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. В соответствии с работами [5, 6, 30] не исключено, что оба типа этих соединений, будучи взаимопрера-

шаемыми, могут образовывать в клетках и тканях живых организмах самоподдерживающуюся, саморегулирующуюся химическую систему, обеспечивающую в колебательном режиме появление преимущественно или ДНКЖ или RS-NO.

Следует отметить, что в работах [7, 8] мы сообщали о возможном образовании Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при участии NO, продуцируемого в печени мышей индуцибельной NO синтазой (iNOS). Синтез этого фермента мы инициировали обработкой мышей бактериальным липополисахаридом как мощным воспалительным агентом, а о появлении Б-ДНКЖ в печени мышей судили по появлению в ней МНКЖ-ДЭТК. Для этого в организм животных на полчас ввели комплексы Fe^{2+} с цитратом, после чего ткань печени обрабатывали *in vitro* ДЭТК. Предполагалось, что добавленное железо будет связывать эндогенное NO и образовывать вместе с эндогенными тиолами Б-ДНКЖ. Оказалось, что эти комплексы могли включать в себя до 70% NO, выработанного iNOS. О полном количестве NO, продуцируемым этим ферментом, мы судили по количеству образующихся в печени *in vivo* МНКЖ-ДЭТК при введении в организм этих животных избирательных ловушек NO — комплексов железа с ДЭТК.

Вместе с тем в последующей работе [26] мы обнаружили, что уровень образующихся в этих опытах МНКЖ-ДЭТК повышался в три-четыре раза под действием дитионита (как это имело место в вышеописанных опытах с введением животным нитрита или изокета). В связи с этим нельзя было исключить того, что в препаратах печени при появлении в них эндогенного NO последний мог включаться не в Б-ДНКЖ, а сразу в МНКЖ-ДЭТК, часть которых, характеризующаяся формулой $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$, регистрировалась методом ЭПР без предварительной обработки дитионитом, а другая часть, ЭПР-недетектируемая и характеризующаяся формулой $(ДЭТК)_2-Fe^{3+}-NO$, становилась ЭПР-детектируемой после ее одноэлектронного восстановления дитионитом.

Реализация такого сценария исключается, исходя из полученных к настоящему времени многочисленных данных о способности иммунокомпетентных клеток, например макрофагов, продуцировать при их активации тем же бактериальным липополисахаридом значительного количества М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [33–39], переходящих из активированных макрофагов в клетки-мишени их действия [36]. Поскольку, в соответствии с работой [39], М-ДНКЖ, возникавшие в активированных мак-

рофагах, включали в себя все слабосвязанное («свободное») железо в этих клетках (а именно оно включается в ДНКЖ), вряд ли можно говорить о наличии в них и биядерной формы этих комплексов. В этом отношении отдельные клетки, продуцирующие ДНКЖ, существенно отличаются от клеток, составляющих ткани и органы животных. Как показывают наши исследования, в последних ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами представлены *in vivo* преимущественно их биядерной формой. Поэтому есть все основания полагать, что эта же форма возникала и в иммунной системе мышей, активированной липополисахаридом, так что именно она определяла появление в препаратах печени мышей, обработанных ДЭТК, парамагнитной формы МНКЖ-ДЭТК, ЭПР-детектируемой вне зависимости от добавления к препаратам дитионита. Другая форма МНКЖ-ДЭТК, характеризующаяся формулой $[(ДЭТК)_2-Fe^{3+}-NO]$, т.е. та, которая становилась ЭПР-детектируемой в присутствии дитионита, могла возникать при участии нитрита — продукта окисления NO, продуцируемого iNOS, и представлять наибольшую часть МНКЖ-ДЭТК в препаратах печени мышей, обработанных липополисахаридом.

Недавно появилась публикация [40], в которой были изучены стабильность и превращения *in vitro* NO, нитрита, GS-NO и Б-ДНКЖ-GSH при их добавлении к препаратам гомогената плаценты человека, овец и мышей. Эта работа фактически находится в русле наших вышеизложенных исследований превращений тех же агентов (за исключением NO) как *in vitro* в ткани препаратов печени мышей, так и их метаболизма в печени тех же животных *in vivo* в течение 30 мин до их забоя. Сопоставление результатов, описанных в работе [40] и полученных нашей группой, свидетельствует как об их совпадении, так и об их различии. В обеих работах наблюдался распад М- и Б-ДНКЖ-GSH в изученных биопрепаратах *in vitro*. В работе [40] об этом распаде судили по снижению количества этих комплексов, определявшемуся по уровню газообразного NO, выделявшегося из ДНКЖ в условиях распада этих комплексов под действием феррицианида. В нашей работе о таком распаде можно было судить по значительному снижению количества МНКЖ-ДЭТК, образующихся *in vitro* в препаратах печени, содержащих ДНКЖ, при их выдерживании в растворах ДЭТК, по сравнению с количеством МНКЖ-ДЭТК, образующихся *in vivo* в печени мышей, после внутрибрюшинного введения сначала Б-ДНКЖ-НАС(GSH), а затем ДЭТК (рис. 2в,д и 2г,е соответственно). Исходя из ре-

зультатов работы [40] и наших данных, полученных в 1960–1980 гг. [5, 6], можно утверждать, что обнаруженное нами снижение уровня МНКЖ-ДЭТК не имело отношения к ДЭТК, а было обусловлено распадом непосредственно ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, возникшими *in vivo* в ткани печени в результате введения в организм мышей Б-ДНКЖ-НАС(GSH) и последующей инкубацией этой ткани вне организма при комнатной температуре. Не исключено, что этот распад инициировался ацидозом, развивавшимся в ткани в этих (анаэробных) условиях. Ацидоз, т.е. подкисление внутриклеточной среды, мог обеспечивать протонизацию тиоловых групп тиолсодержащих лигандов в ДНКЖ и тем самым распад последних.

Если это так, то почему в наших опытах мы наблюдали значительное возрастание МНКЖ-ДЭТК при выдерживании в растворе ДЭТК изолированных препаратов печени, предварительно обработанных газообразным NO (рис. 3а,в)? Пока ответить на этот вопрос однозначно мы не можем. Возможно, как это предполагается в работе [40], в тканях животных имеются активирующиеся в анаэробных условиях ферментные системы, вызывающие распад ДНКЖ. Не исключается и более простая причина этого явления, а именно подщелачивание внутриклеточной среды в ходе синтеза ДНКЖ в ткани печени под действием газообразного NO, нейтрализующее процесс ацидоза. Как следует из приведенного на рис. 5 механизма образования ДНКЖ в этих условиях, появление аниона нитроксила (NO^-) в результате предполагаемого диспропорционирования молекул NO как основополагающей стадии синтеза ДНКЖ должно приводить к подщелачиванию среды из-за акцептирования протонов анионами нитроксила с последующим необратимыми превращением молекул нитроксила (HNO) в закись азота и воду. Аналогичным образом, подщелачивание внутриклеточной среды могло происходить при синтезе ДНКЖ из соответствующих RS-NO. В соответствии с приводимым на рис. 5 механизмом образования этих комплексов протонирование высвобождающегося из RS-NO тиолового аниона и могло приводить к подщелачиванию окружающей ДНКЖ внутриклеточной среды.

Как в нашей работе, так и в работе [40] полученные результаты свидетельствуют о возможности превращения в ДНКЖ одного из представителей RS-NO – GS-NO, естественно при участии слабосвязанного железа и тиолов (экзогенного или эндогенного происхождения). Характерно, что в наших опытах ДНКЖ и соответственно МНКЖ-ДЭТК в печени мышей при введении им

GS-NO возникали только в присутствии экзогенного железа. Что касается опытов с нитритом, то, как было показано в работе [40], добавление этого агента к гомогенату плаценты человека приводило к заметному его превращению в ДНКЖ. В наших опытах такое превращение при введении животным значительного количества нитрита (в дозе 0.7 ммоль/кг веса животного) не обнаруживалось. Вероятнее всего, в этих опытах МНКЖ-ДЭТК возникали в препаратах печени не в реакции ДЭТК с ДНКЖ, а в результате связывания NO, образующегося из нитрита, с комплексами $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ –ДЭТК.

Вместе с тем, как было продемонстрировано в нашей предыдущей работе [8], при замене ДЭТК в опытах *in vitro* на глутатион, цистеин или НАС в препаратах печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом, возникало заметное количество ДНКЖ с указанными тиолсодержащими лигандами (особенно, при замене ДЭТК на НАС, тиолсодержащее соединение, эффективно проникающее сквозь клеточные мембраны). Аналогичная ситуация имела место и в наших исследованиях 1970–1980 гг., в которых было продемонстрировано образование *in vitro* значительного количества М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в ткани печени и ее гомогенате при их контакте с 0.5–1.0 мМ нитрита натрия [5, 6]. При обоих подходах образование заметного количества ДНКЖ инициировалось повышением уровня компонентов этих комплексов – соответственно либо тиолов, либо NO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что при появлении в тканях животных *in vivo* ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, либо введенных в организм, либо продуцируемых при участии эндогенного NO, эти комплексы «предпочитают» находиться в этих тканях в диамагнитной, ЭПР-недетектируемой форме. Выявить ее наличие можно, вводя животным производные дитиокарбамата (например, ДЭТК) или обрабатывая изолированные органы и ткани этим агентом в водном растворе. Такой подход обеспечивает превращение диамагнитных ДНКЖ в парамагнитные, ЭПР-детектируемые МНКЖ с использованными производными дитиокарбамата как лигандами.

ВКЛАД АВТОРОВ В РАБОТУ

Все авторы внесли существенный вклад в публикуемую работу. В.Д. Микоян и А.Ф. Ванин определили основное направление исследова-

ний, В.Д. Микоян и Е.Н. Бургова осуществили все эксперименты на животных, В.Д. Микоян и Р.Р. Бородулин проводили синтез Б-ДНКЖ-GSH(НАС), А.Ф. Ванин осуществил полное написание статьи и ее оформление для печати.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (темы № АААА-А17-117040610310-6 и № АААА-А17-170403100008-5), а также при финансовой поддержке Российского академического проекта «5-100» и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00059а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Р. М. Налбандян, А. Ф. Ванин и Л. А. Блюменфельд, *Тез докл. конф. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»* (Москва, 1964), с. 18.
2. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика* **10**, 167 (1965).
3. А. Ф. Ванин, *Биохимия* **32**, 228 (1967).
4. А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд и А. Г. Четвериков, *Биофизика* **12**, 829 (1967).
5. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физхимия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Ижевск, 2015).
6. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, 2019).
7. А. Ф. Ванин, В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина и др. *Биофизика* **60**, 735 (2015).
8. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **62**, 1 (2017).
9. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2010).
10. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
11. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
12. А. Ф. Ванин и А. Г. Четвериков, *Биофизика* **13**, 608 (1968).
13. А. Ф. Ванин, Дисс. ... канд. физ.-мат. наук (МГУ им. М.В. Ломоносова, М., 1968).
14. Ф. Ванин, Л. Н. Кубрина, И. Л. Лисовская и др., *Биофизика* **16**, 650 (1971).
15. A. F. Vanin, A. N. Osipov, L. N. Kubrina, et al., *Studia Biophys.* **49**, 13 (1975).
16. А. Ф. Ванин, Дисс. ... докт. биол. наук (Институт Хим. Физики АН СССР, М., 1980).
17. *Description of the drug form of isosorbide dinitrate (Isoket)* (UCB Manufacturing Island Limited Shannon Industrial Estate Co., Clair, Ireland).
18. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, and A. L. Kleschyov, *Studia Biophys.* **102**, 135 (1984).
19. S. Fujii, T. Yoshimura, and H. Komada, *Chem. Lett.* **9**, 785 (1996).
20. A. F. Vanin, *Methods Enzymol.* **301**, 269 (1999).
21. K. Tsuchiya, J.-J. Jang, M. Yoshizumi, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 347 (1999).
22. L. Kleschyov, H. Mollnau, V. Oelze, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **275**, 262 (2000).
23. F. Vanin, X. Liu, A. Samouilov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 365 (2000).
24. S. Fujii and T. Yoshimura, *Coord. Chem. Rev.* **198**, 89 (2000).
25. A. F. Vanin, A. Huisman, and E. van Faassen, *Methods Enzymol.* **359**, 27 (2002).
26. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **15**, 295 (2006).
27. A. F. Vanin and A. A. Timoshin, *Methods Mol. Biol.* **704**, 135 (2011).
28. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **26**, 148 (2012).
29. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**, 191, (1997).
30. A. F. Vanin, A. A. Papina, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **10**, 60 (2004).
31. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
32. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, 818836 (2011).
33. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmac. Chem.* **5** (4), id 1109 (2018).
34. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **54**, 15 (2018).
35. J. R. Lancaster and J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1223 (1990).
36. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **266**, 10162 (1991).
37. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, S. Hauschildt, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1177**, 37 (1993).
38. C. A. Bosworth, J. C. Toledo, J.W. Zmiewski, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4671 (2009).
39. J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **51**, 1558 (2011).
40. G. K. Mukosera, T. C. Clark, L. Ngo, et al., *J. Physiol.* **598** (11), 2223 (2020).

Dinitrosil Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands are Predominantly Represented by The Binuclear Form in Living Organisms

V.D. Mikoyan, E.N. Burgova, R.R. Borodulin, and A.F. Vanin*, **

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

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

The number of mononitrosyl iron complexes with diethyldithiocarbamate, formed in the liver of mice in vivo and in vitro after intraperitoneal injection of binuclear dinitrosyl iron complexes with N-acetyl-L-cysteine or glutathione, S-nitrosoglutathione, sodium nitrite or the vasodilating drug Isoket[®] was assessed by electron paramagnetic resonance (EPR). The number of the said complexes, in contrast to the complexes, formed after nitrite or Isoket administration, the level of which sharply increased after treatment of liver preparations with a strong reducing agent – dithionite, did not change in the presence of dithionite. It was concluded that, in the first case, EPR-detectable mononitrosyl iron complexes with diethyldithiocarbamate in the absence and presence of dithionite appeared as a result of the reaction of NO formed from nitrite with Fe²⁺-diethyldithiocarbamate and Fe³⁺-diethyldithiocarbamate complexes, respectively. In the second case, mononitrosyl iron complexes with diethyldithiocarbamate appeared as a result of the transition of iron-monomitrosyl fragments from ready-made iron-dinitrosyl groups of binuclear dinitrosyl complexes, which is three to four times higher than the content of the mononuclear form of these complexes in the tissue. The results obtained suggest that when dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands, either introduced into the body or produced with the participation of endogenous NO, appear in animal tissues in vivo, these complexes are presented in these tissues mainly by their diamagnetic, EPR-undetectable binuclear form.

Keywords: mononitrosyl iron complexes, dinitrosyl iron complexes, binuclear form of dinitrosyl complexes

ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© 2020 г. Е.А. Тельная*, Л.В. Плотникова*, А.Д. Гарифуллин**, ***, ****, А.Ю. Кувшинов**, ***, ****, С.В. Волошин**, ***, ****, А.М. Поляничко*, *****

*Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 199034, Санкт-Петербург, Петергоф, Ульяновская ул., 3

**Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

***Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

****Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 4

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

Эл. почта: a.polyanichko@spbu.ru

Поступила в редакцию 25.01.2020 г.

После доработки 12.07.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Проведен сравнительный анализ вторичной структуры белков сыворотки крови больных множественной миеломой, хроническим лимфолейкозом и здоровых доноров. Вторичную структуру белков в составе сыворотки определяли методом инфракрасной спектроскопии. Показано, что предложенный подход позволяет зарегистрировать уменьшение доли α -спиральных участков и рост количества β -слоев в образцах сыворотки крови больных множественной миеломой по сравнению со здоровыми донорами и больными хроническим лимфолейкозом.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия, множественная миелома, вторичная структура белка.

DOI: 10.31857/S0006302920060150

Множественная миелома (ММ) – онкологическое заболевание крови, характеризующееся наличием в крови так называемого М-белка, обусловленного гиперпродукцией моноклональных иммуноглобулинов, и/или их тяжелых и легких цепей [1–3]. В качестве первичного метода диагностики ММ широко применяется электрофоретический анализ, способный выявить присутствие М-белка в виде хорошо разрешимой фракции [4]. Постановка окончательного диагноза требует, однако, проведения дорогостоящих иммунологических исследований. Вместе с тем такой подход позволяет выявить лишь около 80% случаев заболевания, в основном на поздних стадиях [5, 6]. В настоящее время во всем мире ведется активный поиск альтернативных подходов выявления заболевания, в особенности на более ранних стадиях.

Развитие ММ сопровождается существенными изменениями протеома крови. Гиперпродук-

ция М-белка приводит к сильному увеличению содержания иммуноглобулинов и их фрагментов. Параллельно у больных ММ может наблюдаться падение содержания сывороточного альбумина в крови [4]. Будучи наиболее многочисленными белками в составе сыворотки крови иммуноглобулины и альбумины обладают различной вторичной структурой. Так, сывороточный альбумин на две трети состоит из участков в α -спиральной конформации [7, 8] тогда как во вторичной структуре IgG более 70% приходится на β -слои [9, 10]. Таким образом, мы полагаем, что при гиперпродукции М-белка будет изменяться не только содержание патологического белка в сыворотке крови, но и среднее относительное содержание полипептидных цепей с различной вторичной структурой.

Одним из методов, позволяющих оценить вторичную структуру белков в составе концентрированных неоднородных смесей, является инфракрасная (ИК) спектроскопия [11–19]. Ранее нами была продемонстрирована принципиальная возможность различать образцы сыворотки крови больных ММ и здоровых доноров по их ИК-спек-

Сокращения: ММ – множественная миелома, ИК – инфракрасная, ХЛЛ – хронический лимфолейкоз, НПВО – нарушенное полное внутренне отражение.

Таблица 1. Соответствие положения основных полос в разложении «амид I» различным типам вторичной структуры полипептидной цепи

Структура:	H ₂ O	D ₂ O
α-спирали	1650–1657 см ⁻¹	1649–1656 см ⁻¹
3 ₁₀ -спирали	1656–1663 см ⁻¹	–
β-слои (антипараллельные)	1612–1640 см ⁻¹	1630 ± 2 см ⁻¹
	Особо выражены: 1624 ± 2 см ⁻¹ , 1627 ± 2 см ⁻¹ , 1633 ± 2 см ⁻¹	
β-слои (параллельные)	1626–1640 см ⁻¹	1630 ± 2 см ⁻¹
	Особо выражены: 1627 ± 2 см ⁻¹ , 1633 ± 2 см ⁻¹	
Повороты	1662–1696 см ⁻¹	1663 ± 2 см ⁻¹
	Особо выражены: 1667 ± 2 см ⁻¹ , 1675 ± 2 см ⁻¹ , 1680 ± 2 см ⁻¹ ,	1671 ± 2 см ⁻¹
	1685 ± 2 см ⁻¹ , 1691 ± 2 см ⁻¹	1683 ± 2 см ⁻¹
		1689 ± 2 см ⁻¹
Неупорядоченная структура	1640–1651 см ⁻¹	1645 ± 4 см ⁻¹

трам [16, 20]. В данной работе на основе существенно более обширной выборки проводится сравнительный анализ вторичной структуры белков в составе сыворотки крови больных множественной миеломой, хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и здоровых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение образцов сыворотки крови. Для получения образцов сыворотки крови использовали пробирки S-Monovette (Sarstedt, Германия) с активатором свертывания. Собранные образцы крови оставляли в пробирках в течение 20–30 мин при комнатной температуре (18–24°C), после чего центрифугировали в течение 15 мин при скорости 3000 об/мин (1000 g) на центрифуге Heraeus Labofuge 200 (Thermo Scientific, США). До проведения физико-химических исследований образцы замораживали и хранили при температуре –30°C.

ИК-спектры нарушенного полного внутреннего отражения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 8700 (Thermo Scientific, США), оснащенный приставкой однократного нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на основе кристалла алмаза, а также низкошумящим МСТ(HgCdTe)-детектором. Оптические пути продували сухим воздухом. Спектры регистрировали в диапазоне 4000–600 см⁻¹ с разрешением 2 см⁻¹. Каждый спектр усредняли по 128-ми накоплениям. Коррекцию базовой линии и обработку спектров проводили по описанной ранее методике [15].

Спектры ИК-поглощения регистрировали в растворах D₂O, изотопное замещение растворителя проводили согласно описанной ранее методике [18]. Измерения проводили на приборе Ten-

or27 (Bruker, Германия) в разборных кюветах на основе кристаллов BaF₂ с длиной оптического пути 50 мкм. Спектры регистрировали с шагом 2 см⁻¹ в диапазоне 4000–800 см⁻¹. Первичную обработку и анализ спектров проводили с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором.

Анализ вторичной структуры проводили путем разложения полосы «амид I» на составляющие на основе анализа спектра второй производной по описанной ранее методике [15, 16]. Каждый полученный контур в разложении сопоставляли с определенным типом вторичной структуры (табл. 1) согласно полученным ранее отнесениям [11, 12, 21–24]. Долю каждого типа вторичной структуры в общей структуре белка определяли по доле площади соответствующего контура в полосе «амид I». Полученные результаты основаны на анализе ИК-спектров образцов сыворотки крови 60 здоровых доноров, 45 пациентов с диагнозом ММ и 15 пациентов с диагнозом ХЛЛ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поглощение белковых молекул в среднем ИК-диапазоне обусловлено в первую очередь колебаниями в пептидной связи. Эти колебания проявляются в спектрах в виде нескольких широких полос, известных как полосы «амид». Наиболее информативными при анализе вторичной структуры белков являются колебания групп С=О и N–H пептидной связи [15, 25, 26]. Наиболее воспроизводимые результаты позволяет получить анализ суперпозиции колебаний карбонильных групп, проявляющейся в спектре в виде полосы «амид I» в окрестности 1650 см⁻¹.

На практике регистрация ИК-спектров водных растворов белков осложняется сильным по-

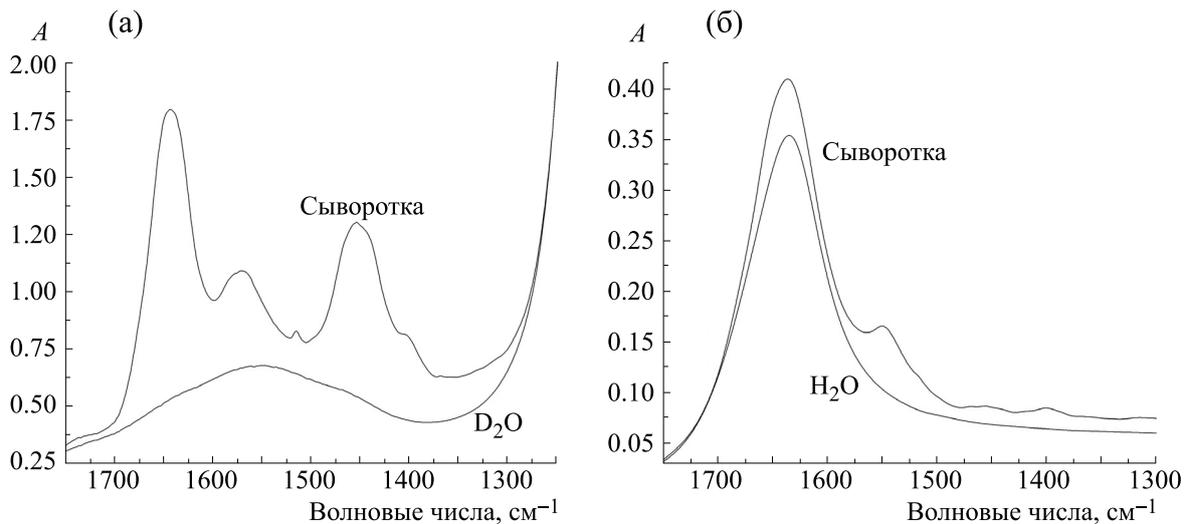


Рис. 1. Спектры ИК-поглощения сыворотки крови при измерении методом НПВО в D_2O (а) и в воде (б): 1 – спектр сыворотки, 2 – спектр растворителя.

глошением воды (H_2O) в этой области спектра. Одним из возможных путей анализа полосы «амид I» в растворах является использование изотопного замещения растворителя на тяжелую воду (D_2O), у которой в области полосы «амид I» имеется окно прозрачности (рис. 1а). Изотопное замещение позволяет добиться удовлетворительного соотношения сигнал/шум, дает надежное определение вторичной структуры белков в пробе, однако требует довольно длительной пробоподготовки. Другой возможный подход основан на применении метода НПВО. Метод основан на эффекте полного внутреннего отражения электромагнитной волны на границе раздела двух сред. При таком отражении происходит частичное проникновение излучения в приграничные области соседней среды на глубину около четверти длины волны. В результате отраженная волна содержит информацию о свойствах приграничного слоя соседней среды. Вместе с тем зависимость глубины проникновения луча от длины волны требует проведения корректировки абсолютных величин поглощения в различных областях спектра. Поправочная функция будет зависеть не только от длины волны, но и от различия показателей преломления двух сред, а также от угла падения луча. На практике для создания полного внутреннего отражения используют прозрачные в ИК-области материалы с высоким показателем преломления, на поверхность которых наносят исследуемый образец. При такой схеме проведения измерений влияние растворителя оказывается минимальным, вследствие малой глубины проникновения луча в среду. По этой же причине необходимо использовать образцы с достаточно высоким содержанием исследуемого ве-

щества. Высокие концентрации белков в сыворотке крови позволяют использовать данный подход без дополнительной пробоподготовки. Однако в этом случае в спектрах возможно появление артефактов, связанных с ошибками компенсации вклада растворителя (H_2O) (рис. 1б).

В данной работе нами проведен сравнительный анализ ИК-спектров образцов сыворотки крови здоровых доноров, больных ММ и ХЛЛ, как после изотопного замещения (рис. 2а), так и без дополнительной подготовки методом НПВО (рис. 2б). В спектрах поглощения отчетливо выделяются две полосы: полоса «амид I» ($1700\text{--}1600\text{ см}^{-1}$), соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы $C=O$ пептидной связи, а также полоса «амид II» ($1600\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ в растворах H_2O), либо соответствующая ей после изотопного замещения полоса «амид II ϕ » ($1500\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ в растворах D_2O), происходящие от суперпозиции деформационных колебаний связи $N-H$ ($N-D$), связанных с валентными колебаниями связи $C-N$. На рис. 1 отчетливо видно отличие в форме полос «амид I» в спектрах образцов ММ, отражающее изменение относительного содержания участков в α -спиральных и β -слоиных конформациях вследствие гиперпродукции иммуноглобулинов. Для определения удельного содержания различных типов вторичной структуры в пробе было проведено разложение полос «амид I» на составляющие методом второй производной [15]. Характерные разложения спектров сыворотки крови здоровых доноров, больных ММ и ХЛЛ представлены на рис. 3 (H_2O) и рис. 4 (D_2O). Отнесения полученных в результате разложения полос представлены в табл. 1. На осно-

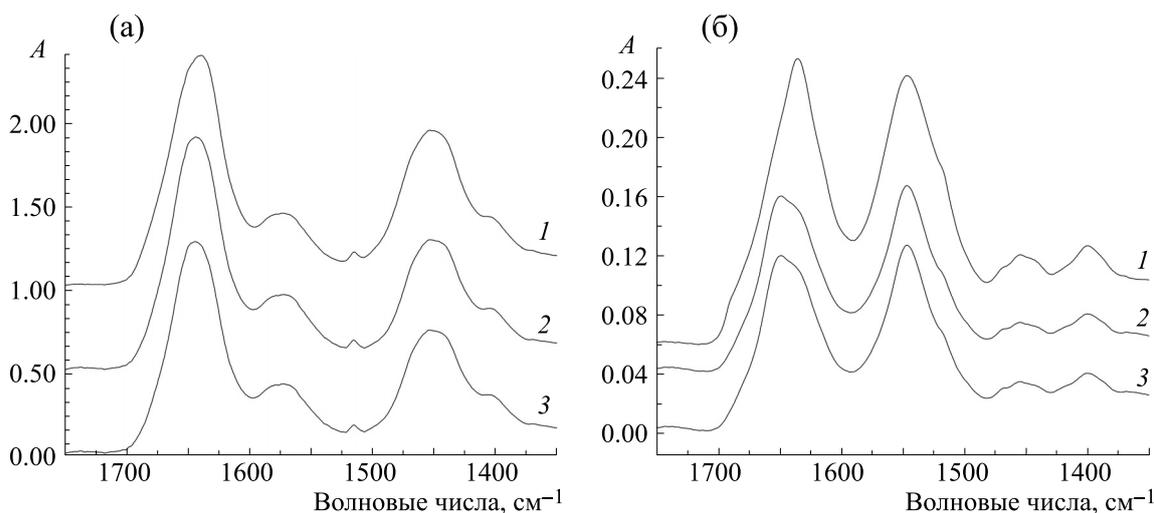


Рис. 2. Спектры ИК-поглощения сыворотки крови при измерении методом НПВО в D_2O (а) и в воде (б): 1 – пациент с ММ, 2 – пациент с ХЛЛ, 3 – здоровый донор.

вании приведенных отнесений было определено среднее содержание каждого типа вторичных структур во всех образцах.

Было установлено, что наиболее информативными при сравнении образцов являются показатели содержания α -спиральных и β -слоиных участков (табл. 2). Анализ результатов, полученных с использованием приставки НПВО, показал, что в сыворотке крови здоровых доноров и больных ХЛЛ доминируют полипептидные цепи в α -спиральных конформациях (около 50%), тогда как участки с β -структурами различного типа составляют чуть более 40%. Для образцов больных ММ картина противоположная: доминируют участки с β -структурой (более 50%), тогда как доля α -спиралей падает до уровня ниже 40%. Для описанной выше процедуры анализа вторичной структуры белков по спектрам водных растворов характерна достаточно высокая погрешность в определении содержания α -спиральных участков, обусловленная перекрыванием соответствующей полосы в разложении с полосой поглощения воды. При этом в группе образцов, полученных из сыворотки крови больных ММ, дополнительно наблюдается достаточно высокая гетерогенность, и абсолютные показатели отдельных образцов могут заметно отличаться. Это обусловлено объективными различиями, в том числе различиями в типе и количестве секретируемого М-белка у пациентов с разным типом ММ. Сравнение образцов сыворотки крови больных ММ с результатами анализа второй контрольной группы – больных ХЛЛ, у которых отсутствует гиперпродукция иммуноглобулинов и их фрагментов, выявил аналогичные различия. Таким образом, изменения, наблюдаемые в спектрах, обусловлены особенностями развития ММ, а не

различиями белкового состава сыворотки крови здоровых доноров от пациентов с произвольной патологией крови.

Анализ ИК-спектров образцов сыворотки крови, подвергавшихся изотопному замещению, дал результаты, полностью аналогичные описанным выше (табл. 2). Для вторичной структуры белков в сыворотке крови пациентов с ММ характерно повышенное по сравнению со здоровыми донорами содержание β -структур ($54 \pm 5\%$) и снижение доли α -спиральных участков ($38 \pm 2\%$). Наиболее наглядно зарегистрированные изменения проявляются при анализе соотношения между основными типами вторичных структур в исследуемых образцах (табл. 2). В частности, соотношение вкладов α -спиральных участков и β -структур дает для здоровых пациентов в среднем величину 1.1 (1.04 ± 0.06 при измерениях методом НПВО и 1.13 ± 0.07 в растворах D_2O). В то же время для больных ММ этот параметр существенно меньше и составляет в среднем 0.7 (0.7 ± 0.1 при измерениях методом НПВО и 0.70 ± 0.04 в растворах D_2O). Таким образом, оба подхода дали хорошо согласующиеся между собой результаты, что позволяет использовать для экспресс-анализа вторичной структуры белков в составе сыворотки крови метод НПВО без какой-либо дополнительной подготовки образцов. Вместе с тем измерения, проведенные в растворах D_2O , позволили заметно повысить точность определения доли α -спиралей во вторичной структуре белков благодаря отсутствию полос поглощения растворителя в данной области. Как следствие, в умеренно гетерогенных образцах здоровых доноров и пациентов с ХЛЛ при измерениях в D_2O удалось выявить незначительные

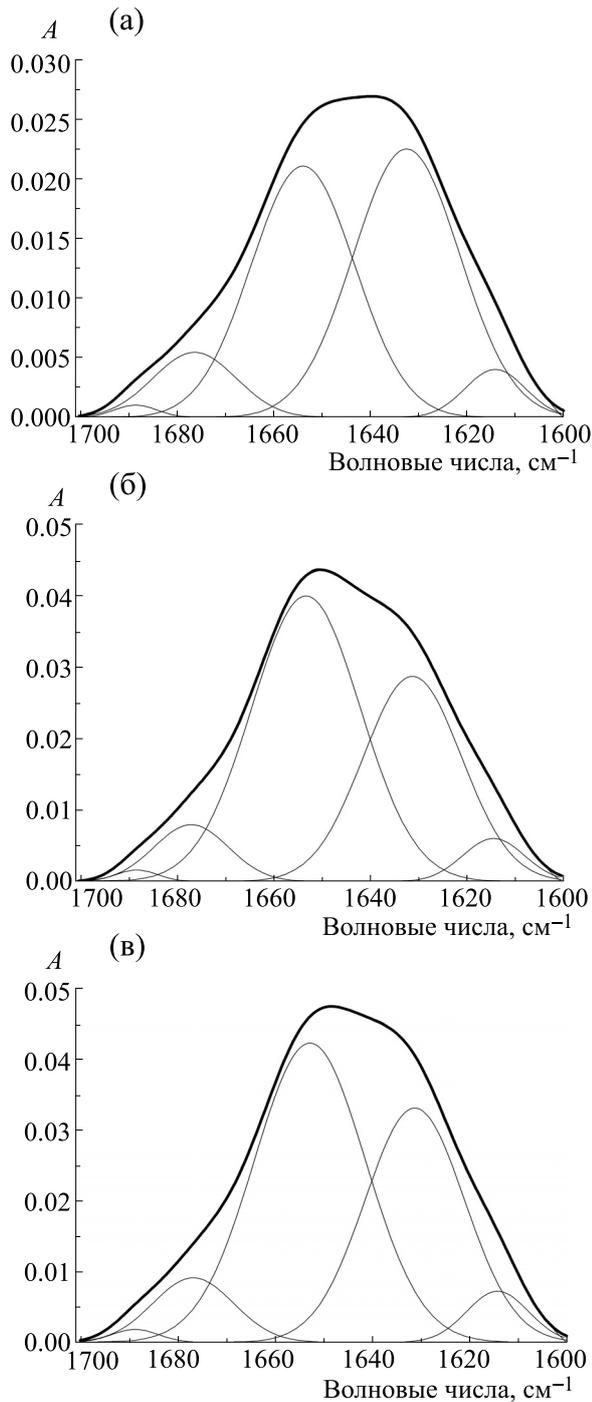


Рис. 3. Пример разложения полосы «амид I» при регистрации спектра методом НПВО: (а) – пациент с ММ, (б) – пациент с ХЛЛ, (в) – здоровый донор.

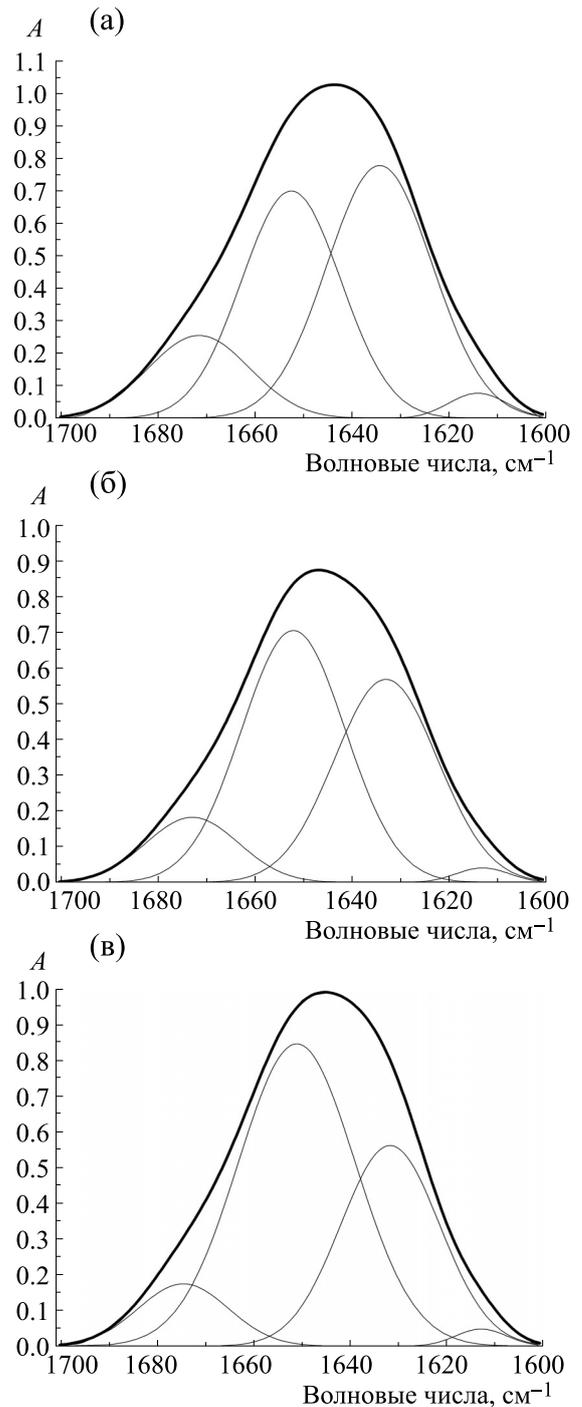


Рис. 4. Пример разложения полосы «амид I» при регистрации спектра в растворе D_2O : (а) – пациент с ММ, (б) – пациент с ХЛЛ, (в) – здоровый донор.

отличия в содержании α -спиральных участков: $54 \pm 2\%$ и $49 \pm 1\%$ соответственно. Наблюдаемое снижение доли α -спиральных участков у пациентов с ХЛЛ может быть следствием понижения уровня сывороточного альбумина в сыворотке крови при развитии заболевания. Снижение уровня сыворо-

точного альбумина в крови может наблюдаться при различных заболеваниях и не является уникальной особенностью ХЛЛ. Данное обстоятельство с нашей точки зрения указывает на перспективность использования данного подхода при изучении и диагностике более широкого круга заболеваний.

Таблица 2. Процентное содержание участков в α -спиральных и β -слоиных конформациях и их соотношение в образцах сыворотки крови

Тип вторичной структуры:		Здоровые доноры	Больные ММ	Больные ХЛЛ
α -спирали	НПВО	49 \pm 3%	38 \pm 8%	51 \pm 2%
	D ₂ O	54 \pm 2%	38 \pm 2%	49 \pm 1%
β -структуры	НПВО	47 \pm 2%	54 \pm 5%	46 \pm 2%
	D ₂ O	48 \pm 3%	54 \pm 5%	46 \pm 2%
α/β	НПВО	1.04 \pm 0.06	0.7 \pm 0.1	1.11 \pm 0.05
	D ₂ O	1.13 \pm 0.07	0.70 \pm 0.04	1.07 \pm 0.04

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Соответствие результатов, полученных в двух различных сериях экспериментов, позволяет заключить, что оба подхода оказываются пригодными для определения вторичной структуры белков в составе сыворотки крови. Полученные нами результаты указывают на то, что ИК-спектроскопия позволяет выделять образцы сыворотки крови пациентов с диагнозом ММ на фоне здоровых доноров. Можно также заключить, что при гиперпродукции моноклональных иммуноглобулинов в сыворотке крови больных ММ удается наблюдать увеличение доли полипептидных цепей в β -слоиных конформациях на 6–9% и уменьшение доли α -спиральных участков на 8–16%. Данные различия можно наблюдать путем прямого анализа ИК-спектра сыворотки крови в области полосы «амид I» без какой-либо дополнительной пробоподготовки образца. Вместе с тем результаты наших наблюдений показали, что имеются также небольшие различия в спектрах здоровых доноров и больных ХЛЛ, которые нам удалось выявить только при измерениях в растворах D₂O.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работ была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества» «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и наноэлектроники», «Нанотехнологии», «Криогенный отдел»).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. K. Kumar, V Rajkumar, R. A. Kyle, et al., *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17046 (2017).
2. C. Röllig, S. Knop, M. Bornhäuser, et al., *Lancet* **385** (9983), 2197 (2015).
3. S. V. Rajkumar, *Am. J. Hematol.* **93** (8), 1091 (2018).
4. Л. П. Менделеева, О. М. Вотякова, О. С. Покровская и др., *Гематология и трансфузиология* **61** (1–2), (2016).
5. R. A. Kyle, S. V. Rajkumar, et al., *Leukemia* **23** (1), 3 (2009).
6. С. С. Бессмельцев, *Клин. онкогематология* **6** (3), 237 (2013).
7. K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, et al., *Mol. Immunol.* **52** (3–4), 174 (2012).
8. A. A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry, et al., *J. Mol. Biol.* **303** (5), 721 (2000).
9. H. R. Costantino, J. D. Andya, J. D. Shire, et al., *Pharm. Sci.* **3** (3), 121 (1997).
10. L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, et al., *Biochemistry* **36** (7), 1581 (1997).
11. H. Yang, S. Yang, and J. Kong, *Nat. Protoc.* **10** (3), 382 (2015).
12. G. E. Trante, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, (Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 2017), pp. 740–758.

13. I. Rehman, Z. Movasaghi, and S. Rehman, in *Vibration spectroscopy for tissue analysis* (CRC Press, New-York, USA, 2013), pp 356.
14. L. Benezzeddine-Boussaidi, G. Cazorla, and A. M. Melin, *Clin. Chem. Lab. Med.* **47** (1), 83 (2009).
15. A. M. Polyanichko, N. M. Romanov, T. Y. Starkova, et al., *Cell Tissue Biol.* **8** (4), 352 (2014).
16. L. V. Plotnikova, A. M. Polyanichko, T. Nosenko, et al., *AIP Conference Proceedings* **1760**, 020052 (2016).
17. A. M. Polyanichko and H. Wieser, *Biopolymers* **78** (6), 329 (2005).
18. A. M. Polyanichko, V. V. Andrushchenko, E. V. Chikh-irzhina, et al., *Nucl. Acids Res.* **32** (3), 989 (2004).
19. T. S. Sych, Z. V. Reveguk, V. A. Pomogaev, et al., *J. Phys. Chem. C* **122** (51), 29549 (2018).
20. L. V. Plotnikova, M. O. Kobeleva, E. V. Borisov, et al., *Cell and Tissue Biology* **13** (2), 130 (2019).
21. M. K. Bellamy, *J. Chem. Educ.* **87** (12), 1399 (2010).
22. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta* **1767** (9), 1073 (2007).
23. E. Goormaghtigh, V. Cabiaux and J. M. Ruyschaert, *Subcell. Biochem.* **23**, 405 (1994).
24. J. Kong and S. Yu, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **39** (8), 549 (2007).
25. A. Barth and C. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.* **35** (4), 369 (2002).
26. K. Murayama and M. Tomida, *Biochemistry* **43** (36), 11526 (2004).

Infrared Spectroscopy of Serum from Patients with Oncohematological Diseases

E.A. Telnaya*, **L.V. Plotnikova***, **A.D. Garifullin****, *******, ********, **A.Yu. Kuvshinov****, *******, ********, **S.V. Voloshin****, *******, ********, **and A.M. Polyanichko***, *********

**Department of Physics, St. Petersburg State University, Uljanovskaya ul. 3, Peterhof, St. Petersburg, 199034 Russia*

***Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Biomedical Agency of the Russian Federation, ul. 2-ya Sovetskaya 16, St. Petersburg, 191024 Russia*

****Military Medical Academy named after S.M. Kirov, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia*

*****North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, ul. Kirochnaya, 4, St. Petersburg, 191015 Russia*

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

A comparative analysis was performed of the secondary structure of serum proteins in patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia patients and healthy donors. Determination of serum protein secondary structure was accomplished by the application of IR spectroscopy. It has been shown that the proposed approach allows to detect a decrease in the length of α -helical regions and an increase in the content of β -sheets in the serum of patients with multiple myeloma compared to healthy donors and chronic lymphocytic leukemia patients.

Keywords: IR spectroscopy, multiple myeloma, protein secondary structure

УДК 551.521.6

ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ НА ГЕОМАГНИТНУЮ ВОЗМУЩЕННОСТЬ НА РАЗЛИЧНЫХ ШИРОТАХ

© 2020 г. С.С. Паршина*, С.Н. Самсонов**, Т.Н. Афанасьева*, П.Г. Петрова***, А.А. Стрекаловская***, В.Д. Петрова*, А.И. Кодочигова*, К.В. Комзин***, Л.К. Токаева*

*Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112

**Институт космических исследований и аэронавтики им. Ю.Г. Шафера Якутского научного центра СО РАН, 677980, Якутск, просп. Ленина, 31

***Медицинский институт Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, 677000, Якутск, ул. Ойунского, 27

E-mail: 1parshinasvetlana@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2019 г.

После доработки 13.05.2020 г.

Принята к публикации 20.08.2020 г.

Описаны принципы проведения многоширотного мониторинга «Гелиомед-2» для получения новых данных о влиянии космической погоды на состояние здоровья человека. Представлены результаты синхронного мониторинга по оценке реакции сердечно-сосудистой системы и психоэмоционального состояния здоровых добровольцев на изменение геомагнитной возмущенности в высоких (пос. Тикси, г. Якутск) и средних (г. Саратов) широтах. Во всех обследуемых группах выявлено наличие эффекта синхронизации процессов реполяризации миокарда желудочков (по данным коэффициента симметрии зубца Т электрокардиограммы) и геомагнитной возмущенности, а также синхронизации реактивной тревожности и геомагнитной возмущенности. Установлено, что в одной и той же группе добровольцев групповая кардиочувствительность и психологическая чувствительность к геомагнитным возмущениям совпадают независимо от широты проживания.

Ключевые слова: космическая погода, сердечно-сосудистая система, тревожность.

DOI: 10.31857/S0006302920060162

Выяснение взаимосвязи между активностью Солнца и здоровьем человека является одной из фундаментальных проблем современной науки. Состояние здоровья человека зависит от изменения факторов внешней среды, например, метеорологических факторов и менее известных факторов космической погоды.

Термин «космическая погода» характеризует состояние околоземного космического пространства, основное влияние на которое оказывает Солнце. На явления, происходящие в биосфере Земли и связанные с солнечной активностью, одним из первых обратил внимание основоположник российской космической биологии профессор А.Л. Чижевский в 1915–1924 гг. [1]. Он

указывал, что «наше тело насквозь пронизывается электромагнитными излучениями и реагирует на них с величайшей чувствительностью». Геомагнитные возмущения, возникающие вследствие взаимодействия изменяющихся параметров солнечной активности с магнитосферой Земли, являются одним из природных факторов риска для здоровья человека. Они воздействуют на временную последовательность информационных сигналов, которые организм использует для согласования ритмики биологических процессов с ритмикой окружающей среды. У человека геомагнитные возмущения не вызывают специфических заболеваний, но из-за разбалансирования систем регуляции отягощают имеющиеся функциональные нарушения [2].

Под солнечной активностью понимается совокупность возникающих на Солнце образований: пятен, факелов, флоккул, протуберанцев, особых форм короны, вспышек, сопровождаю-

Сокращения: КСТ – коэффициент симметрии Т-зубца электрокардиограммы, ЭКГ – электрокардиограмма, K_p – K_p -индекс глобальной геомагнитной возмущенности, ГМВ – глобальная геомагнитная возмущенность, РТ – реактивная тревожность.

щихся усилениями интенсивности излучения в ультрафиолетовой, рентгеновской и радиоволновой частях спектра и появлением корпускулярной радиации — протонов, электронов и других частиц. Заряженные частицы, высыпаясь из хвоста магнитосферы в атмосферу, вызывают на Земле полярные сияния, геомагнитные бури, земные токи, неравномерную ионизацию верхних слоев атмосферы.

При этом генерируются электромагнитные колебания, которые, несмотря на их небольшую интенсивность по сравнению с теми, в которых находится человек в обычной жизни, весьма эффективны из-за близости их частот (герцы и их доли) к основным биологическим ритмам [3–5]. Хотя сами корпускулярные потоки до поверхности Земли не доходят, при их взаимодействии с магнитосферой Земли возникают электромагнитные поля, вызывающие геофизические возмущения в виде магнитных бурь и суббурь.

Раскрытие механизма влияния солнечной активности на процессы, происходящие в биосфере, является ключевой позицией не только для создания физической теории воздействия солнечной активности на биосистемы. Это также необходимо для разработки критериев адаптации и создания эффективных систем совершенствования здоровья, профилактики различных заболеваний и жизнеопасных осложнений [6]. Влияние космической погоды на здоровье человека определяется прежде всего электромагнитными излучениями Солнца и корпускулярными потоками солнечного ветра, воздействующими на магнитное поле, газовую оболочку и твердую кору Земли. Гелиогеофизические факторы — часть единого физического процесса, тесно связанного с солнечной активностью, который начинается на Солнце и заканчивается на Земле.

Основными мишенями для воздействия гелиогеофизических факторов на организм человека являются сердечно-сосудистая и нервная системы. Доказана связь возникновения острых сосудистых событий (инфарктов миокарда, инсультов) с колебаниями гелиогеомагнитного фона Земли [7–9]. Изменения напряженности магнитного поля на Земле в результате активных процессов на Солнце и в магнитосфере Земли [10] являются одним из важнейших факторов срыва адаптации и обострения хронических заболеваний. Проведенные в последние годы исследования по влиянию параметров космической погоды показали, что здоровый человек на Земле безболезненно может перенести такое воздействие. В то же время воздействие возмущенных гелиогеофизических параметров на человека с заболеваниями сердечно-сосудистой системы может при-

вести к серьезным осложнениям, вплоть до летального исхода [7, 11, 12].

При воздействии геомагнитных возмущений возникают аритмии, изменяется частота сердечных сокращений, происходят скачки артериального давления, увеличивается вязкость крови, агрегация эритроцитов, наблюдается замедление кровотока в капиллярах и происходит ряд других патологических сдвигов [6, 13–16].

Влияние фактора солнечной активности на организм человека сильно рассеяно (диспергировано) одновременным воздействием биосоциальных, производственных, психоэмоциональных и иных факторов, вот почему во многих случаях влияние солнечной активности, геомагнитных возмущений затушено, скрыто в сложных межсистемных, промежуточных соотношениях как физической, так и биологической природы. Например, разделить влияние космической погоды и метеорологических факторов достаточно сложно, что требует использования специальных методов исследования.

Одним из важнейших методологических принципов изучения влияния параметров космической погоды на сердечно-сосудистую систему человека является принцип многоширотного мониторинга состояния здоровья добровольцев, который был реализован в уникальном международном телекоммуникационном проекте «Гелиомед», осуществленном междисциплинарным коллективом физиков, биологов, специалистов по информационным технологиям и медиков [17].

Первый этап мониторинга «Гелиомед» проводился с 2006 по 2010 гг. одновременно в городах Москва (Россия), Якутск (Россия), Киев (Украина) и Симферополь (Украина), удаленных друг от друга на более чем 6000 км и находящихся в различных часовых поясах. В 2011–2013 гг. многоширотный мониторинг стал охватывать и авроральные широты (пос. Тикси), также мониторинг проводился в авроральном и субавроральном (Якутск) регионах. Состояние сердечно-сосудистой системы оценивали ежедневно по электрокардиографическим данным, получаемым с помощью экспресс-кардиографа «Фазграф», позволяющего производить обработку ЭКГ в фазовом пространстве координат [18].

В результате проведения первого этапа многоширотного мониторинга «Гелиомед» были собраны данные, включающие более 50000 измерений. Сравнение прямых измерений состояния сердечно-сосудистой системы добровольцев на широкоразнесенных пунктах наблюдения в России и на Украине показало их совпадение; было установлено, что именно космофизические факторы

являются синхронизатором общих ритмов популяции [19].

С 2014 г. проводится второй этап многоширотного синхронного биофизического эксперимента — «Гелиомед-2», особенностями которого являются изменившаяся география исследования: (за счет добавления средних широт (Саратов) к арктическому (пос. Тикси) и субарктическому (Якутск) регионам), комплексный подход к одновременному синхронному мониторинговому изучению состояния сердечно-сосудистой системы и психоэмоционального состояния добровольцев по разработанным научной группой принципам [20], исследование генетических особенностей участников мониторинга — добровольцев разных широт [21].

С 2014 г. накоплено более 30000 комплексных измерений (каждое из которых включает характеристику состояния сердечно-сосудистой системы и психоэмоционального состояния). Это впервые позволяет проводить корректную статистическую обработку при оценке влияния факторов космической погоды не на какую-либо одну систему человеческого организма, а одновременно на две основные жизнеопределяющие системы функционирования — сердечно-сосудистую и нервную — у одной и той же группы добровольцев. При этом анализируются группы добровольцев, проживающих на разных широтах. Подобных экспериментальных многоширотных исследований в доступной нам литературе не обнаружено.

Цель работы: выявление особенностей индивидуальных и групповых реакций синхронизации показателей здоровья (процессов реполяризации миокарда желудочков и психоэмоционального состояния) добровольцев с геомагнитной возмущенностью в высоких (авроральных и субавроральных) и средних широтах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синхронный мониторинг состояния сердечно-сосудистой системы и психоэмоционального состояния здоровых добровольцев осуществлялся одновременно в высоких и средних широтах. Группа добровольцев в высоких широтах (всего 44 человека) включала: в авроральных широтах (пос. Тикси) — 11 человек, в субавроральных (г. Якутск) — 33 человека. В средних широтах (г. Саратов) в мониторинге участвовал 31 человек.

Точки исследования удалены друг от друга на более чем 5000 км и на пять часовых поясов. Поселок Тикси расположен на берегу Северного Ледовитого океана (71° сев. шир.) и насчитывает всего 4537 жителей на 1 января 2018 г., в связи с чем группа добровольцев в данной точке мониторинга является самой малочисленной.

Длительность мониторинга составила 60 суток, ежедневные измерения в группах добровольцев проходили в весенний период (март—апрель) 2014 г. Весенний сезон является переходным, именно в это время происходят наиболее выраженные по количеству и амплитуде изменения геомагнитной возмущенности Земли, что позволяет проследить ответные реакции показателей сердечно-сосудистой системы и психоэмоционального состояния.

Состояние сердечно-сосудистой системы испытуемых оценивали ежедневно по данным электрокардиографии с определением коэффициента симметрии Т-зубца (КСТ, усл. ед.), отражающего процессы реполяризации миокарда желудочков, с помощью экспресс-кардиографа «Фазаграф» (ООО «Укрспецснаб», Запорожье, Украина), позволяющего проводить обработку электрокардиограмм (ЭКГ) в фазовом пространстве координат [18]. Настоящий метод исследования состояния миокарда хорошо зарекомендовал себя не только в скрининге ишемической болезни сердца, но и в оценке влияния параметров космической погоды, в частности солнечной активности, на морфологические параметры сердечной мышцы [22—25]. В норме значение КСТ составляет 0.45—0.70; при увеличении КСТ возрастают нарушения процессов реполяризации миокарда и возникает риск развития ишемических изменений.

Психоэмоциональное состояние оценивали в соответствии с методологическими принципами, изложенными в работе [20]: по показателям реактивной (ежедневный контроль) и личностной тревожности (опросник Ч. Спилбергера в модификации Ю. Ханина), особенностям построения стресс-преодолевающего поведения (опросник Э. Хайма) и определения типологии личности человека (проективный психогеометрический тест С. Делингер, адаптированный А. Алексеевым и М. Громовой).

Геомагнитную активность оценивали по показателю глобальной геомагнитной возмущенности (K_p -индексу) ежедневно в течение всего периода наблюдения. K_p -индекс (усл. ед.) отражает глобальную геомагнитную возмущенность (ГМВ) и отличается от других индексов космической погоды логарифмической шкалой измерения, поэтому лучше всего описывает слабые возмущения. А как было показано в работе [26], даже при слабой ГМВ наблюдается отклик в состоянии сердечно-сосудистой системы человека.

Оценивали индивидуальные и групповые эффекты синхронизации «КСТ— K_p », а также «реактивная тревожность— K_p » ($PT-K_p$). Синхронизация показывает, насколько состояние миокарда и реактивная тревожность человека реагируют на

изменения геомагнитного поля Земли. Данный процесс характеризует адаптационные возможности миокарда и нервной системы при внешних стресс-воздействиях.

Индивидуальный эффект синхронизации для обследуемого (КСТ– K_p и РТ– K_p) отражает совпадение между максимумами медицинского показателя (коэффициента симметрии Т-зубца ЭКГ или показателя «реактивная тревожность») и K_p -индекса геомагнитной возмущенности при анализе динамических рядов данных показателей для каждого добровольца в течение 60-суточного мониторингового наблюдения.

Поскольку мы оценивали два вида синхронизации – КСТ– K_p и РТ– K_p , возникла необходимость упорядочивания терминов, так как мы столкнулись с тем, что синхронизация КСТ– K_p и синхронизация РТ– K_p у каждого добровольца не всегда совпадали.

В связи с этим нами был введен термин «кардиочувствительность» к колебаниям ГМВ. Индивидуальная кардиочувствительность отражает синхронизацию КСТ– K_p каждого обследуемого и выражается в процентах от общего количества максимумов K_p за время наблюдения. При индивидуальной кардиочувствительности более чем 66.7% считалось, что сердечно-сосудистая система добровольца чувствительна к изменениям ГМВ, и он зачислялся в группу «кардиочувствительных» своего региона. Далее определялся групповой эффект кардиочувствительности, который показывал количество кардиочувствительных добровольцев в процентном соотношении к общей численности группы.

Также нами был использован показатель «психологическая чувствительность» к ГМВ [27]. Индивидуальная психологическая чувствительность отражает синхронизацию РТ– K_p каждого обследуемого и выражается в процентах от общего количества максимумов K_p за время наблюдения. При индивидуальной психологической чувствительности более чем 66.7% считали, что нервная система добровольца чувствительна к изменениям ГМВ, и он зачислялся в группу «психологически чувствительных» для своего региона. Далее определяли групповой эффект психологической чувствительности, который показывал количество психологически чувствительных к ГМВ добровольцев в процентном соотношении к общей численности группы.

Математическую обработку данных проводили оригинальным методом с помощью специально разработанного интерактивного программного комплекса на языке программирования Python для анализа и визуализации результатов исследования синхронизации параметров реполяриза-

ции миокарда желудочков с параметрами космической погоды, который позволяет осуществлять классификацию добровольцев [28]. Этот же метод использовали для оценки синхронизации реактивной тревожности и K_p -индекса. Для построения графиков и статистических расчетов использовали программы «Origin» и «Medstat» для сравнения показателей между группами – методы χ^2 и точный критерий Фишера.

Таким образом, алгоритм анализа полученных данных включал следующие этапы:

1. Построение индивидуальных графиков динамики КСТ и K_p для каждого добровольца за весь период мониторинга и оценка индивидуальной синхронизации КСТ– K_p с помощью указанного программного комплекса.

2. По результатам оценки индивидуальной синхронизации включение в группу кардиочувствительных либо кардионечувствительных добровольцев.

3. Определение показателя группового эффекта кардиочувствительности для каждого региона (по процентному соотношению кардиочувствительных испытуемых к общей численности группы данного региона).

4. Построение группового графика синхронизации КСТ– K_p всех кардиочувствительных добровольцев данного региона.

5. Оценка групповой синхронизации КСТ– K_p для каждого региона (в процентах к общему количеству максимумов K_p за время мониторинга) с помощью указанного программного комплекса.

6. Сравнение групп добровольцев высоких и средних широт по показателям кардиочувствительности и групповой синхронизации.

7. Анализ особенностей групповой синхронизации КСТ– K_p в различных регионах.

8. Анализ психологической чувствительности к ГМВ добровольцев различных регионов по аналогичному алгоритму.

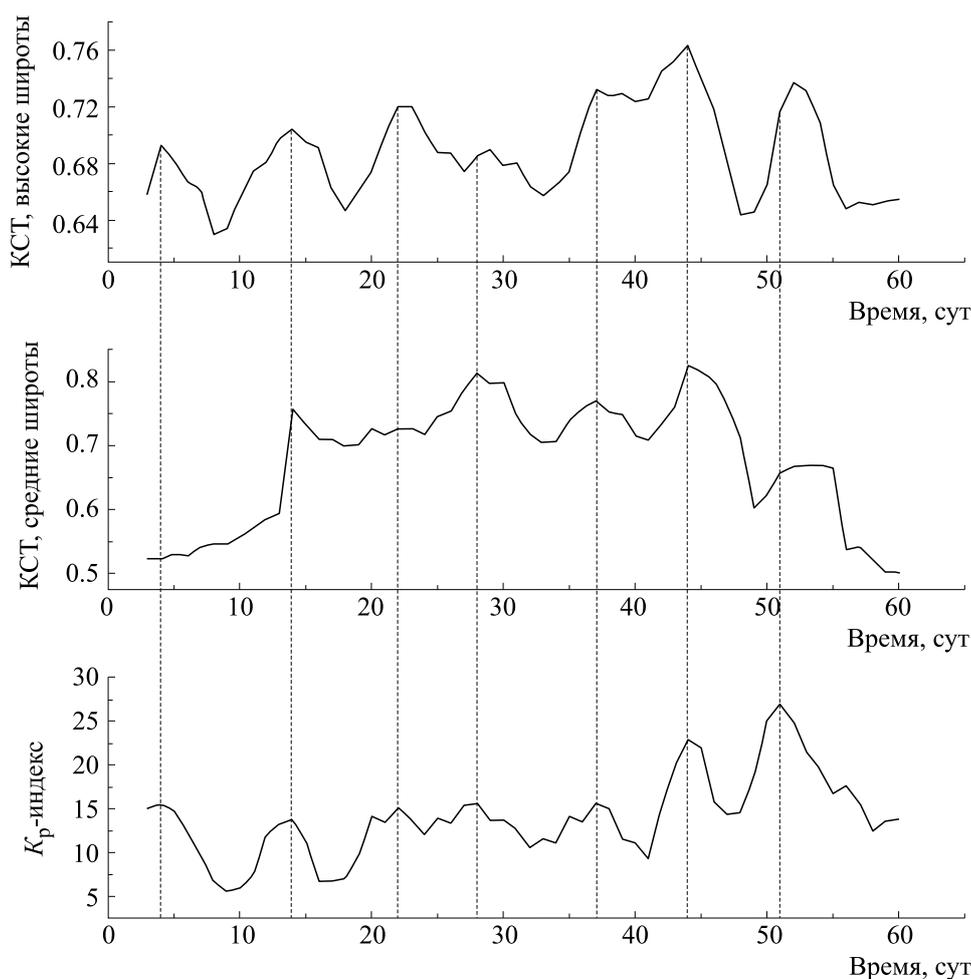
9. Оценка согласованности кардио- и психологической чувствительности к ГМВ между собой у добровольцев каждого региона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст добровольцев составил в высоких широтах 38.6 ± 5.7 года, в средних широтах – 40.6 ± 2.2 года ($p > 0.05$).

В высоких широтах групповой эффект кардиочувствительности к ГМВ составил 38.6% (из 44 добровольцев синхронизацию КСТ– K_p более чем в 66.7% показали 17 человек).

В средних широтах групповой эффект кардиочувствительности к ГМВ составил 42% (синхро-

Синхронизация КСТ– K_p у кардиочувствительных добровольцев.

низация КСТ– K_p более чем в 66.7% выявлена у 13 человек из 31 обследуемого).

Таким образом, по соотношению кардиочувствительных и кардиочувствительных добровольцев высокие и средние широты не отличаются (38.6% и 42%, $p > 0.05$).

Для кардиочувствительных добровольцев (в высоких и средних широтах) были построены графики синхронизации КСТ– K_p (рисунок). На рисунке представлены: верхний график – динамика КСТ в течение 60 суток мониторинга в группе добровольцев в высоких широтах, средний график – динамика КСТ в группе добровольцев в средних широтах, нижний график – динамика K_p -индекса за этот же период. Штриховые линии показывают максимумы K_p -индекса и соответствующие им значения КСТ в группах добровольцев в высоких и средних широтах.

Данные, представленные на рисунке, свидетельствуют, что из семи максимумов K_p -индекса

за время наблюдения добровольцы в высоких широтах отреагировали максимумом КСТ в этот же день в пяти случаях (на первый, второй, третий, пятый и шестой максимумы K_p -индекса), а на остальные два (четвертый и седьмой) – только с задержкой на одни-двое суток. В средних широтах максимумы КСТ возникали в ответ на второй, четвертый, пятый, шестой и седьмой максимумы K_p -индекса (также в пяти случаях из семи). Таким образом, у кардиочувствительных добровольцев как в высоких, так и в средних широтах групповая синхронизация КСТ– K_p не отличалась и составила 71% как в одной, так и в другой группе.

При этом структура реакций КСТ– K_p в группах высоких и средних широт отличалась. Только на 43% ГМВ добровольцы различных широт реагировали одинаково – максимумом КСТ в день ГМВ (второй, пятый и шестой максимумы ГМВ). В остальных случаях (57%) ГМВ вызвали реакцию сердечно-сосудистой системы в каком-то

одном регионе, а в другом регионе на те же ГМВ реакция не выявлена (первый, третий, четвертый и седьмой максимумы ГМВ). Так, в средних широтах добровольцы не показали синхронизации КСТ– K_p в первом и третьем максимумах ГМВ, а в высоких широтах – в четвертом и седьмом максимумах ГМВ. Таким образом, несмотря на то, что групповая синхронизация КСТ– K_p в высоких и средних широтах не отличается количественно (71%), внутри каждой группы имеются качественные отличия по реакции сердечно-сосудистой системы на одни и те же ГМВ.

Кроме того, в группе кардиочувствительных добровольцев в высоких широтах выявлен феномен «запаздывания» реакции КСТ на ГМВ на одни-двое суток (четвертый и седьмой максимумы ГМВ). При этом на те же ГМВ добровольцы средних широт реагировали увеличением КСТ без опоздания, в тот же день, демонстрируя синхронизацию данных показателей.

В обеих группах добровольцев нами была проанализирована также психологическая чувствительность к ГМВ. Установлено, что синхронизация с ГМВ наблюдается не только со стороны сердечно-сосудистой системы, но и со стороны психологического состояния добровольцев: их реактивная тревожность в динамике мониторинга также менялась в зависимости от геомагнитной активности.

После оценки индивидуальной психологической чувствительности по описанному алгоритму были сформированы группы психологически чувствительных добровольцев в каждом регионе. Для каждой группы определен групповой эффект психологической чувствительности к ГМВ.

В высоких широтах групповой эффект психологической чувствительности к ГМВ составил 34.1% (синхронизацию РТ– K_p более чем в 66.7% показали 15 человек из 44 добровольцев). Поскольку в данной группе кардиочувствительность составила 38.6%, можно говорить о совпадении групповых эффектов кардио- и психологической чувствительности к ГМВ в высоких широтах ($p > 0.05$).

В средних широтах групповой эффект психологической чувствительности к ГМВ составил 51.6% (синхронизация РТ– K_p более чем в 66.7% обнаружена у 16 из 31 человек), особенности психоэмоционального статуса добровольцев мониторинга, в том числе и психологически чувствительных к ГМВ, были подробно описаны в работе [27]. Как было показано выше, в средних широтах кардиочувствительность составила 42%, следовательно, групповые эффекты кардио- и психологической чувствительности к ГМВ в средних широтах также совпадают ($p > 0.05$).

Проведено сравнение психологической чувствительности к ГМВ по показателю РТ в группах высоких и средних широт. Статистически достоверное различие между группами выявлено не было ($p > 0.05$, метод χ^2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют, что синхронизацию состояния сердечно-сосудистой системы и психоэмоционального состояния с ГМВ демонстрируют добровольцы как в высоких, так и в средних широтах.

При этом не все добровольцы являются кардиочувствительными, некоторые демонстрируют реакцию сердечно-сосудистой системы на единичные геомагнитные возмущения за весь период мониторинга.

Показательно, что соотношение кардиочувствительных и кардионечувствительных добровольцев не зависит от места проживания, несмотря на то, что обследуемые регионы разнесены более чем на 5000 км. Таким образом, реакция миокарда на геомагнитные возмущения, характеризующаяся изменением процессов реполяризации миокарда желудочков и динамикой КСТ ЭКГ, относится к универсальным реакциям сердечно-сосудистой системы на изменение геомагнитной активности и свойственна организму человека независимо от региона проживания.

Известно, что именно изменение конечной части желудочкового комплекса, которое и отражает динамика КСТ в фазовом портрете ЭКГ, является первым признаком нарастания напряженности миокарда и появляющейся гипоксии и ишемии сердечной мышцы [18, 24]. Эти процессы всегда сопровождаются и активацией адапционно-компенсаторных механизмов, следовательно, геомагнитные возмущения у здоровых добровольцев выступают в роли «тренирующего фактора», позволяющего поддерживать приспособительные реакции в «рабочем состоянии».

Несмотря на совпадение групповой кардиочувствительности в высоких и средних широтах, нам удалось выявить отдельные региональные особенности кардиочувствительности у обследуемых добровольцев. Однотипно добровольцы в высоких и средних широтах реагируют только на 43% геомагнитных возмущений. Остальные 57% геомагнитных возмущений характеризуются «региональной чувствительностью» и могут у добровольцев различных регионов вообще не вызывать изменений со стороны миокарда, либо эти изменения могут быть «отсрочены» на одни-двое суток. Таким образом, биоэффективность отдельных ГМВ может быть различна для добровольцев в различных регионах проживания.

Данные настоящего исследования пока не позволяют определить причины таких различий. Возможно, это связано с тонкими характеристиками самих геомагнитных возмущений, потенциально влияющих на их биоэффективность. Например, одно и то же ГМВ может реализовывать свою биоэффективность с участием пульсаций P_{c1} в средних широтах либо с участием пульсаций P_{i1} в высоких широтах. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости определения региональных характеристик биоэффективности геомагнитных возмущений для дальнейшего использования в превентивной кардиологии.

Вместе с тем нельзя исключить, что выявленные особенности определяются не характеристиками геомагнитных возмущений, а особенностями самих добровольцев, которые могут быть связаны с различным вкладом полиморфизмов генов, вовлеченных в регуляцию сердечно-сосудистой системы (в частности, генов CYP11B2, GNB3, NOS3 и др.). Учитывая такую возможность, в настоящее время мы проводим сравнительный анализ полиморфизма генов, вовлеченных в регуляцию состояния сердечно-сосудистой системы, у добровольцев в высоких и средних широтах.

Необходимо также определиться с феноменом «запаздывания» реакции сердечно-сосудистой системы на ГМВ, наблюдаемом в нашем исследовании у добровольцев в высоких широтах. Возможно, это не отсутствие синхронизации КСТ–K_p (как учитывалось в настоящем исследовании), а особый («запаздывающий») тип кардиочувствительности, и в таком случае суммарный групповой эффект синхронизации КСТ–K_p (обычный, в тот же день, и «запаздывающий») у добровольцев в высоких широтах будет, вероятно, выше, чем в средних широтах.

Нами установлено, что групповые эффекты психологической чувствительности к ГМВ, также как и кардиочувствительности, не различаются у добровольцев высоких и средних широт при анализе результатов многоширотного мониторинга 2014 г. Вместе с тем при анализе данных мониторинга 2015 г. были получены аналогичные результаты [29]. Так, было установлено совпадение частоты встречаемости психологически чувствительных и нечувствительных к изменениям ГМВ добровольцев в северных и средних широтах, хотя при этом психологические характеристики обследуемых имели различия в зависимости от региона проживания.

Воспроизводимость данных результатов у добровольцев высоких и средних широт в разные годы (особенно с учетом того, что состав групп доб-

ровольцев мониторинга на отдельных этапах не является идентичным на 100%) позволяет считать совпадение групповой психологической чувствительности к ГМВ в обследуемых регионах устойчивой характеристикой.

Крайне важным нам представляется анализ кардио- и психологической чувствительности к ГМВ у добровольцев одной группы. Установлено, что групповые эффекты кардио- и психологической чувствительности к ГМВ совпадают как в высоких, так и в средних широтах. Таким образом, адаптивные реакции сердечно-сосудистой и нервной систем на изменение ГМВ согласованы между собой независимо от региона проживания.

Особый интерес представляет наличие такой согласованности для жителей высоких широт, поскольку ранее нами было установлено, что в авроральных широтах (пос. Тикси) отмечается реакция синхронизации КСТ–K_p только с мощными геомагнитными возмущениями, а в субавроральных (Якутск) – как с мощными, так и со слабыми ГМВ [23]. Объяснение данному феномену может лежать в геофизических особенностях именно авроральных широт, где на высоте 100 км протекают мощные электрические токи (авроральные электроджеты), достигающие величины миллионов ампер [5]. Вероятно, в этих условиях миокард адаптируется и перестает реагировать на слабые геомагнитные возмущения, сохраняя чувствительность только к наиболее мощным. Поскольку групповые эффекты кардио- и психоэмоциональной чувствительности у обследуемых высоких широт совпадают, следует предположить, что и нервная система добровольцев в авроральной зоне также адаптируется к повышенному геомагнитному фону и реагирует синхронизацией РТ–K_p преимущественно при значительных ГМВ. В настоящее время для уточнения данного предположения нами проводятся исследования по оценке психологической чувствительности отдельно в авроральных и субавроральных широтах.

В средних широтах, как показано в предшествующих исследованиях, групповой эффект синхронизации КСТ–K_p может колебаться от 61.3% (при оценке КСТ ЭКГ в покое) до 74.2% (по результатам четырехкратного измерения КСТ: в покое, после эмоциональной нагрузки, после физической нагрузки, после отдыха) [22, 23]. Поскольку оценку реактивной тревожности проводили у добровольцев в состоянии покоя (без дополнительных эмоциональных и физических нагрузок), методологически корректно при оценке соотношения психологической чувствитель-

ности и кардиочувствительности к ГМВ использовать данные синхронизации КСТ– K_p по результатам ЭКГ, снятой именно в покое. Данный подход и реализован в представленной работе.

Результаты исследования позволяют высказать предположение о том, что существуют единые механизмы рецепции к изменению геомагнитной возмущенности со стороны сердечно-сосудистой системы и нервной системы. Одним из таких механизмов могут быть циклические изменения в системе оксида азота [6, 16], которая регулирует основные механизмы реакции сердечно-сосудистой системы на изменение геомагнитной возмущенности: колебания артериального давления, развитие тромбозов и аритмий, нарушение реологических свойств крови [13–15, 19]. В настоящее время имеются и прямые экспериментальные доказательства связи колебаний содержания окиси азота в организме человека с состоянием геомагнитной возмущенности [30]. Известно, что цикл оксида азота принимает участие и в регуляции нервной системы за счет влияния на нейрон-нейронные и нейрон-глиальные взаимодействия [31–33]. Поскольку известно, что ритмы головного мозга синхронизируют все физиологические процессы организма [34], адаптивные изменения состояния нервной системы могут вызывать и аналогичные адаптивные реакции со стороны других систем, в частности сердечно-сосудистой. Именно этим и может объясняться совпадение кардио- и психологической чувствительности к ГМВ в группах обследуемых добровольцев, при этом регион проживания существенного значения не имеет.

Изучение кардио- и психологической чувствительности добровольцев различных регионов к ГМВ, представленное в настоящем исследовании, не только позволяет разделить глобальные и региональные особенности влияния космической погоды на ведущие системы регуляции человеческого организма, но и расширяет тем самым известные представления о влиянии факторов космической погоды на состояние здоровья человека [35–39]. Планируется, что полученные результаты будут использованы в дальнейшем при разработке персонализированных мер профилактики негативного влияния факторов космической погоды для жителей различных регионов.

ВЫВОДЫ

1. Проведение синхронного многоширотного мониторинга «Гелиомед-2» позволило выявить как в высоких, так и в средних широтах кардио-

чувствительных и кардионечувствительных к геомагнитным возмущениям добровольцев, причем их соотношение не зависит от региона проживания.

2. Групповые эффекты синхронизации состояния миокарда и геомагнитной возмущенности у кардиочувствительных добровольцев в различных регионах количественно не отличаются и составляют 71% как в высоких, так и в средних широтах, что является отражением глобальности воздействия факторов космической погоды на состояние сердечно-сосудистой системы человека.

3. Структура групповой синхронизации состояния миокарда и геомагнитной возмущенности у кардиочувствительных добровольцев имеет региональные особенности. Однотипно добровольцы в высоких и средних широтах реагируют только на 43% геомагнитных возмущений, биоэффективность остальных 57% геомагнитных возмущений различна для добровольцев в зависимости от региона проживания.

4. Феномен «запаздывания» реакции миокарда на геомагнитные возмущения на одни-двое суток выявлен у добровольцев высоких широт и отсутствует у добровольцев в средних широтах.

5. Групповые эффекты психологической чувствительности к геомагнитным возмущениям не различаются у добровольцев высоких и средних широт.

6. Адаптивные реакции сердечно-сосудистой и нервной систем при изменении геомагнитной активности согласованы между собой у здоровых добровольцев независимо от региона проживания, поскольку выявлено совпадение групповых эффектов кардио- и психологической чувствительности к геомагнитным возмущениям между собой как в группе высоких, так и в группе средних широт.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-415-140002).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим

стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Л. Чижевский, *Земное эхо солнечных бурь* (Мысль, М., 1976).
2. И. Е. Оранский и П. Г. Царфис, *Биоритмология и хронотерапия* (Высш. шк., М., 1989).
3. М. Н. Гневыхшев, *Результаты исследования солнечной активности и солнечно-земных связей* (ГАО, М., 1982).
4. Н. Г. Клейменова, О. В. Козырева, Т. К. Бреус и С. И. Рапопорт, *Биофизика* **52** (6), 1112 (2007).
5. S. N. Samsonov, N. G. Kleimenova, O. V. Kozyreva, and P. G. Petrova, *Izvestiya, Atmospheric and oceanic physics* **50**, 719 (2014).
6. С. С. Паршина, С. Н. Самсонов, В. П. Реутов и др., в кн. *Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии*, под ред. Е. Л. Глориозова (Институт новых информационных технологий, М., 2017), сс. 164–181.
7. G. Cornelissen, F. Halberg, T. Breus, et al., *J. Atmosph. Solar-Terr. Physics* **64**, 707 (2002).
8. С. Н. Самсонов, П. Г. Петрова, А. А. Стрекаловская и др., *Наука и образование*, № 2, 50 (2008).
9. С. Н. Самсонов, В. И. Манькина, Н. Г. Скрябин и др., *Вестн. новых мед. технологий*, № 1, 246 (2009).
10. В. Н. Обридко, М. В. Рагульская, О. В. Хабарова и др., *Психосоматические и интегративные исследования* **1** (1), (2015).
11. С. Н. Самсонов, П. Г. Петрова, А. А. Стрекаловская и др., *Наука и образование* **2** (50), 50 (2008).
12. Т. К. Breus, V. A. Ozheredov, E. V. Syuitkina, et al., *J. Atmosph. Solar-Terr. Physics* **70** (2–4), 436 (2008).
13. Ю. И. Гурфинкель, *Ишемическая болезнь сердца и солнечная активность* (ИИКЦ Эльф-3, М., 2004).
14. Ю. И. Гурфинкель, В. А. Ожередов, Т. К. Бреус и др., *Биофизика* **63** (2), 402 (2018).
15. Е. Г. Каменева, Дис. ... канд. биол. наук (НИИ экспериментальной медицины РАМН, СПб., 2009).
16. С. С. Паршина, С. Н. Самсонов, В. П. Реутов и др., в сб. *Матер. XII международной крымской конференции «Космос и биосфера»* (Ариал, Алушта, 2017), сс. 140–143).
17. М. В. Рагульская, В. В. Вишневецкий, П. Г. Петрова и др., *Биотропное воздействие космической погоды* (ВВМ, СПб., 2010).
18. Л. С. Файнзильберг, *Информационные технологии обработки сигналов сложной формы. Теория и практика*. (Наук. думка, Киев, 2008).
19. С. Н. Самсонов в кн. *Биотропное воздействие космической погоды (по материалам российско-украинского мониторинга «Гелиомед» 2003–2010)*, под ред. М. В. Рагульской (ВВМ, СПб., 2010), сс. 69–90.
20. А. И. Кодочигова, С. С. Паршина, С. Н. Самсонов и др., *Психосоматические и интегративные исследования* **2** (1), 105 (2016).
21. K. V. Komzin, P. G. Petrova, A. A. Strekalovskaya, et al., *Wiadomosci Lekarskie* **71** (9), 1742 (2018).
22. С. С. Паршина, С. Н. Самсонов, В. И. Манькина и др., в кн. *Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии*, под ред. Е. Л. Глориозова (Институт новых информационных технологий, М., 2015), сс. 316–322.
23. С. С. Паршина, Т. Н. Афанасьева, С. Н. Самсонов и др., *Вестн. СВФУ* **4** (5), 16 (2016).
24. Л. С. Файнзильберг, *Управляющие системы и машины*, № 4, 40 (1998).
25. В. В. Вишневецкий, Л. С. Файнзильберг и М. В. Рагульская, *Биомед. технологии и радиоэлектроника*, № 3, 3 (2003).
26. S. N. Samsonov, *Odessa Astronomical Publications* **26** (2), 297 (2013).
27. А. И. Кодочигова, С. С. Паршина, С. Н. Самсонов и др., *Психосоматические и интегративные исследования* **4** (1), 104 (2018).
28. В. А. Молчанов, И. А. Подкидышев и Е. Д. Смирнов, в кн. *Информационные технологии и математическое моделирование*, под ред. А. Н. Моисеева и С. П. Сущенко (НЛТ, Томск, 2019), сс. 278–283.
29. А. И. Кодочигова, С. С. Паршина, С. Н. Самсонов и др., *Якутский мед. журн.* **64** (4), 85 (2018).
30. В. А. Ямшанов и В. К. Кошелевский, *Биофизика* **52** (4), 718 (2007).
31. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и др., *Докл. РАН* **393** (5), 698 (2003).
32. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, Н. П. Ларионова и др., *Докл. РАН* **378** (3), 417 (2001).
33. А. В. Гурин, *Успехи физиол. наук* **28** (1), 53 (1997).
34. В. Н. Обридко, М. В. Рагульская, О. В. Хабарова и др., в кн. *Биотропное воздействие космической погоды*, под ред. М. В. Рагульской (ВВМ, СПб., 2010), сс. 205–246.
35. V. A. Ozheredov, T. K. Breus, Yu. I. Gurfinkel, et al., *Global Telemedicine and eHealth Updates: Knowledge Resources* **2**, 388 (2009).
36. Т. К. Breus, V. A. Ozheredov, E. V. Syuitkina, et al., *J. Atmosph. Solar-Terr. Physics* **7**, 436 (2008).
37. G. Cornélissen, F. Halberg, and R. B. Singh, *World Heart J.* **1** (1), 15 (2008).
38. F. Halberg, G. Cornélissen, K. Otsuka, et al., *Neuroendocrinol. Lett.* **21**, 233 (2000).
39. F. Halberg, A. Delyukov, Yu. Gorgo, et al., *Neuroendocrinol. Lett.* **21**, 233 (2000).

Features of the Response of the Cardiovascular System to Geomagnetic Disturbance at Different Latitudes

S.S. Parshina*, **S.N. Samsonov****, **T.N. Afanasyeva***, **P.G. Petrova*****, **A.A. Strekalovsky*****,
V. D. Petrova*, **A.I. Kodochigova***, **K.V. Komzin*****, and **L.K. Tokaeva***

**Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, ul. Bolshaya Kazachya 112, Saratov, 410012 Russia*

***Yu. G. Shafer Institute of Cosmophysical Research and Aeronomy, Yakut Scientific Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lenina 31, Yakutsk, 677980 Russia*

****Medical Institute of the Ammosov North-Eastern Federal University, ul. Oyunskogo 27, Yakutsk, 677000 Russia*

This paper describes the principles of multi-latitude monitoring “Heliomed-2” conducted for obtaining new data on the impact of space weather on human health. The paper presents results of synchronous monitoring oriented to the assessment of the response of the cardiovascular system and psycho-emotional state of healthy volunteers to changes in the geomagnetic disturbance at high (Tiksi settlement and the city of Yakutsk) and middle (city of Saratov) latitudes. In all the volunteers, the effects of synchronization of ventricular myocardial repolarization processes (according to the data on the symmetry coefficient of the T wave of the electrocardiogram) and geomagnetic disturbance as well as synchronization of reactive anxiety and geomagnetic disturbance were observed. It has been established that regardless of latitude, cardiac sensitivity and psychological sensitivity to geomagnetic disturbances in volunteers from the same group were similar.

Keywords: space weather, cardiovascular system, anxiety

КЛАССИФИКАЦИЯ АДАПТИВНЫХ ПРИЗНАКОВ И ВЫВОД КРИТЕРИЕВ ИХ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ОПТИМАЛЬНОСТИ

© 2020 г. Л.Л. Овсянников*, М.И. Шпитонков*, **

*Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, Трубецкая ул., 8/2

E-mail: tatiana-char@yandex.ru

**Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» РАН, 119333, Москва, ул. Вавилова, 44/2

E-mail: mixash@bk.ru

Поступила в редакцию 01.07.2019 г.

После доработки 12.08.2020 г.

Принята к публикации 14.08.2020 г.

Предложена математическая модель динамики биологического сообщества, которая представляет собой систему уравнений, описывающих динамику переменных экосистемы — плотность численности популяции; вес тела половозрелых особей; плотность энергии, получаемой особью с пищей, — и учитывает возрастную структуру популяции потребителя. С использованием результатов по конкуренции, полученных для точечных моделей другими исследователями, получены алгоритмы определения эволюционно оптимальных значений адаптивных признаков половозрелых особей популяции. Показано, что в ходе конкуренции за пищевой ресурс популяций, отличающихся между собой величинами набора признаков, выживает только одна с набором признаков, обеспечивающим максимум функции размножения, что соответствует общему критерию эволюционной оптимальности. Проведена классификация признаков по типам, показано, что каждому типу соответствует свой критерий эволюционной оптимальности. Предложены простые алгоритмы поиска эволюционно оптимальных значений различных адаптивных признаков и веса тела, определено оптимальное распределение энергозатрат на все виды жизнедеятельности организма. Численным экспериментом проиллюстрирована эволюционная оптимальность этих признаков.

Ключевые слова: эволюционная оптимальность, устойчивость равновесного состояния, конкуренция популяций, адаптивные признаки.

DOI: 10.31857/S0006302920060174

Действие естественного отбора на популяцию организмов проявляется посредством конкуренции популяций за ресурс. Для того чтобы организмы наилучшим образом приспособились к условиям обитания, природа снабдила их адаптивными признаками. Предполагается, что адаптивные признаки имеют такие величины, которые способствуют популяции-носителю этих величин признаков победе в конкуренции. Такие значения признаков будем называть эволюционно оптимальными значениями (ЭОЗ). Среди наиболее известных публикаций, посвященных определению оптимальных значений адаптивных признаков в свете дарвиновской теории естественного отбора, можно отметить работы [1–13].

В работе [14] сформулирован принцип оптимальной конструкции, согласно которому оптимальные в смысле естественного отбора значения

признаков являются оптимальными и в обычном смысле, а именно, представляют экстремум для некоторых оценочных функций. Эти оценочные функции составляют суть критериев эволюционной оптимальности адаптивных признаков. В обзорных работах [13, 15, 16] рассматривается множество моделей, в которых определяются оптимальные величины различных адаптивных признаков. Для этого авторы предлагали разные критерии, смысл которых в том, что существуют целевые функции, которым оптимальные значения адаптивных признаков доставляют экстремумы. При этом зачастую ошибочно утверждалось, что найденные оптимальные значения являются продуктом эволюции. Наиболее популярным оказался *энергетический критерий*, суть которого в том, что адаптивный признак имеет такое ЭОЗ, при котором энергозатраты на его создание и функционирование минимальны. Среди наиболее известных публикаций, посвященных энерге-

Сокращение: ЭОЗ — эволюционно оптимальные значения.

тическому критерию, можно выделить работы [2–8, 12].

Согласно дарвиновской теории эволюции, а также принципу конкурентного исключения Гаузе, величина адаптивных признаков является продуктом естественного отбора, в процессе которого выживает популяция носителей признаков данной величины. Многие авторы при этом полагали, что эволюционные значения признаков доставляют экстремум некоторым целевым функциям [1–3, 5–13, 17].

Но многообразие различных критериев оптимальности, отсутствие связи между критериями, а также отсутствие доказательств соответствия этих критериев теории естественного отбора представляют существенный дефект теории эволюционной оптимальности признаков организма и свидетельствует о незавершенности этого направления.

Настоящая работа посвящена установлению связи между критериями оптимальности и соответствия этих критериев теории эволюции (а именно, показано существование единого критерия эволюционной оптимальности; установлена связь частных критериев с единым; доказано соответствие этих критериев дарвиновской теории естественного отбора). Проведена классификация адаптивных признаков по типам. Было показано, что каждому типу признаков соответствует свой критерий эволюционной оптимальности. Доказано, что эти критерии являются следствием единого для всех, *общего критерия эволюционной оптимальности*, впервые сформулированного в работах [4, 6, 8]. Предложен алгоритм поиска ЭОЗ адаптивного признака вкпе с весом тела организма.

На адаптивных признаках конкретных популяций животных (например, толщине шерстного покрова лис Аляски и скорости плавания пелагических рыб) показана справедливость изложенной в работе теории.

1. ДИНАМИКА ЭКОСИСТЕМЫ С ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРОЙ ПОПУЛЯЦИИ (МОДЕЛЬ ЛЕСЛИ)

Рассмотрим простейший биоценоз, включающий популяцию организмов. Энергия в количестве V поступает в биоценоз в виде корма. Пусть t_0 – возраст наступления половой зрелости, T – средняя продолжительность жизни особей. Особи возраста τ , где $\tau \in [0; t_0]$, назовем ювенильными, особи возраста t , где $t \in (t_0; T]$, – взрослыми. В результате имеем t_0 ювенильных когорт и $T - t_0$ взрослых.

Динамику численности популяции опишем следующей системой:

$$\mathbf{n}^{(i+1)} = A(f^{(i)}) \cdot \mathbf{n}^{(i)}, \quad (1.1)$$

где $A(f^{(i)})$ – матрица Лесли, имеющая вид

$$A(f) = \begin{pmatrix} 0.0.f.f.f.f.f \\ \sigma_1 0.0.0.0..0.0 \\ 0.\sigma_2.0.0.0..0.0 \\ 0.0..s.0.0..0.0 \\ 0.0.0..s.0..0.0 \\ 0.0.0.0..s..0.0 \\ 0.0.0.0.0..s..0 \\ 0.0.0.0.0..s..0 \end{pmatrix}; \mathbf{n}^{(i)} = \begin{pmatrix} n_1^{(i)} \\ n_2^{(i)} \\ n_3^{(i)} \\ n_4^{(i)} \\ n_5^{(i)} \\ n_6^{(i)} \\ n_7^{(i)} \end{pmatrix},$$

где $t_0 = 2$; $T = 7$; f – плодовитость особей половозрелых когорт (одинакова для всех когорт), $n_j^{(i)}$ – численность j -й возрастной когорты ($j = t_0 + 1, \dots, T$) в i -й момент времени; σ_j – выживаемость ювенильных когорт. Общая выживаемость потомков выражается формулой $w = \prod_1^{t_0} \sigma_i$

s_j – выживаемость особей взрослых когорт (упрощенно полагаем одинаковой (равной s) во всех когортах.) Выживаемость s определяем выражением

$$s = \exp(-dh), \quad (1.2)$$

где d – смертность взрослых когорт; $[d] = \frac{1}{\text{сутки}}$; h – шаг интегрирования, ($h = 1$ сутки).

Рассмотрим подробно, от чего зависит смертность на примере приполярных животных. Приполярные территории имеют низкие температуры окружающей среды. Это приводит к гибели животных от переохлаждения. Для того чтобы противодействовать этому, приполярные животные (песцы, лисы, олени) имеют шерстный покров. Чем толще покров, тем меньше вероятность гибели. В результате зависимость смертности от толщины шерстного покрова α определим формулой

$$d_a = \frac{D_a}{\alpha^\delta}. \quad (1.3)$$

Зависимость смертности от массы тела можно представить аналогичным выражением:

$$d_p = \frac{D_p}{P^\gamma}, \quad (1.4)$$

где P – масса тела взрослой особи. Например, чем больше масса тела, тем меньше вероятность гибели от хищников. D_a , δ , D_p , γ – коэффициенты. Общую смертность определим формулой

$$d = d_a + d_p = \frac{D_a}{\alpha^\delta} + \frac{D_p}{P^\gamma}. \quad (1.5)$$

В том случае, если одна смертность много больше другой, последней можно пренебречь.

Определим по формуле (1.1) плотности численностей когорт на $(i + 1)$ -м временном шаге $n^{(i+1)}$.

Энергетический баланс организма. Энергию, поступающую в организм с пищей, определим выражением:

$$B = \frac{V}{N}, \quad (1.6)$$

где V – пищевая энергия, приходящая на единицу площади биоценоза; N – плотность численности взрослых особей, которую определяем формулой

$$N = \sum_{i+1}^T n^{(i)}. \quad (1.7)$$

Величина B пропорциональна плотности ресурса R и определяется выражением

$$B = mR, \quad (1.8)$$

где m – коэффициент пропорциональности. Заметим, что если адаптивный признак способствует добыванию пищи, то $m = \alpha q$, где α – величина адаптивного признака; q – коэффициент. В результате формула (1.8) примет вид

$$B = \alpha q R. \quad (1.8a)$$

Эта энергия расходуется на различные виды жизнедеятельности.

W_0 – затраты на основной обмен и передвижение. Определяются выражением

$$W_0 = \chi P^\beta. \quad (1.9)$$

W_f – затраты на воспроизводство. Определяются выражением

$$W_f = cf. \quad (1.10)$$

W_a – затраты на функционирования адаптивного признака α . Определяются выражением

$$W_a = K_a \alpha^\lambda. \quad (1.11)$$

W_b – энергозатраты на привес. Определяются формулой

$$W_b = c_b \frac{dP}{dt}. \quad (1.12)$$

Поскольку выражение (1.1) представляет дискретную модель, то производную $\frac{dP}{dt}$ следует представить в разностном виде. В результате име-

ем $\frac{dP}{dt} = \frac{P_{i+1} - P_i}{h}$, где h – шаг интегрирования,

$h = [d]^{-1} = 1$ сутки; c_b – удельная калорийность тела особи. Упрощенно будем полагать, что W_b равна нулю (для взрослых когорт).

В итоге уравнение энергетического баланса примет вид

$$B = W_0 + W_f + W_a + W_b, \quad (1.13)$$

или в конкретном виде

$$B = \chi P^\beta + cf^{(i)} + K_a \alpha^\lambda. \quad (1.14)$$

Плотность численности взрослых особей популяции. Условно виды можно разделить на два типа: 1-й тип – виды, у которых родители заботятся о потомстве; 2-й тип – виды, у которых родители не заботятся о потомстве. Для видов 1-го типа характерна высокая выживаемость ($w \approx 1$). При этом будем полагать, что ресурс потребляют только взрослые особи, а ювенильная часть популяции потребляет ресурс от родителей. В этом случае численность взрослых особей будет равна

$$N = \frac{V}{B}, \quad (1.15)$$

где V – плотность пищевой энергии, [ккал/(сутки · м²)].

Для видов 2-го типа характерна низкая выживаемость ($w \approx 0$). Взрослые особи потребляют только некоторую часть пищевой энергии, другую часть потребляют ювенильная доля популяции. В этом случае численность взрослых особей будет равна

$$N = \frac{V\phi}{B}, \quad (1.16)$$

где ϕ – доля пищевой энергетической плотности, поглощаемой взрослыми особями популяции.

Динамика биоценоза. Пусть σ_j – выживаемость ювенильных когорт ($j = 1, \dots, t_0$); $s_j = s$ – выживаемость взрослых когорт, одинакова для всех когорт; f – плодовитость особей, одинакова для всех взрослых когорт.

Рассмотрим популяцию видов 2-го типа (родители заботятся о потомстве).

Динамика численности возрастных когорт в $(i + 1)$ -й момент времени определяется выражением (1.1).

Находим численность взрослых особей популяции:

$$N^{(i+1)} = \sum n_j^{(i+1)}. \quad (1.17)$$

Определяем количество пищевой энергии, получаемой взрослой особью:

$$B^{(i+1)} = \frac{V}{N^{(i+1)}}. \tag{1.18}$$

Из формулы (1.14) выразим плодовитость на $(i + 1)$ -м временном шаге:

$$f^{(i+1)} = (B^{(i+1)} - a_0 P^\beta - K_a \alpha^\lambda) / c. \tag{1.19}$$

По известному значению $f^{(i+1)}$ определяем матрицу Лесли $A(f^{(i+1)})$ на $(i+1)$ -м временном шаге.

Далее по формуле (1.1) определяем численности когорт на следующем временном шаге, затем повторяем операцию. При $i \rightarrow \infty$ экосистема приходит в равновесное состояние. При этом $n^{(i+1)} = n^{(i)}$ и выражение (1.1) станет

$$n^{(i)} = A(f^{(i)}) \cdot n^{(i)}, \tag{1.20}$$

а равновесное значение плодовитости будет равно

$$\hat{f} = \frac{(1-s)}{w(1-s^{\tau_0})}, \tag{1.21}$$

где $s = \exp(-d) = \exp(-\frac{D_a}{\alpha^\delta} - \frac{D_p}{P^\gamma})$ – выживаемость

взрослых когорт, $w = \prod_1^{t_0} \sigma_i$ – общая выживаемость ювенильных когорт, $\tau_0 = T - t_0$ – продолжительность жизни взрослой особи.

В приложении 1 представлен вывод формулы (1.21) другим способом.

Рассмотрим важное упрощение формулы (1.21). В том случае, если d достаточно мало то, отбросив s^{τ_0} и разложив s в ряд ($s \approx 1 - d$), получаем

$$\hat{f} \approx d/w. \tag{1.22}$$

Равновесное значение пищевой энергии, потребляемой взрослой особью, составляет

$$\hat{B} = c\hat{f} + W_0(P) + W_a(a). \tag{1.23}$$

Равновесное значение плотности численности взрослых особей определяется выражением

$$\hat{N} = \frac{V}{\hat{B}}. \tag{1.24}$$

Итак, система уравнений (1.1), (1.17)–(1.19) описывает динамику экосистемы по модели Лесли, а система (1.21)–(1.24) – ее равновесное состояние.

2. ДИНАМИКА ЭКОСИСТЕМЫ БЕЗ УЧЕТА ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ (ТОЧЕЧНАЯ МОДЕЛЬ)

Динамику численности популяций представим уравнением

$$\frac{dN}{dt} = F(f, P, a)N. \tag{2.1}$$

Здесь N – численность популяции, F – коэффициент размножения, определяемый формулой

$$F = f - \hat{d}, \tag{2.2}$$

где смертность \hat{d} фиксирована и равна \hat{f} , выраженной формулой (1.21).

Поскольку выражение (1.1) представляет дискретную модель, то в модельных расчетах производную $\frac{dN}{dt}$ следует представить в разностном

виде, а именно,

$$\frac{dN}{dt} = \frac{N_{i+1} - N_i}{h}, \tag{2.3}$$

где h – шаг интегрирования, $h = [d]^{-1} = 1$ сутки; c_b – удельная калорийность тела особи.

Энергетический баланс особи. Количество пищевой энергии, приходящейся на одну особь, составляет

$$B = V/N. \tag{2.4}$$

Уравнения энергетического баланса были представлены выражениями (1.13) и (1.14). Представим их заново:

$$B = W + W_f + W_a + W_b, \tag{2.5}$$

$$B = \alpha P^\beta + cf + K_a \alpha^\lambda. \tag{2.6}$$

В результате динамика экосистемы, представленная точечной моделью, имеет вид:

$$N^{(i+1)} = N^{(i)} + N^{(i)}(f^{(i)} - \hat{d}). \tag{2.7}$$

где $N^{(i+1)}$ – численность популяции на $(i+1)$ -м временном шаге.

$$B^{(i+1)} = V/N^{(i+1)}. \tag{2.8}$$

Из уравнения (2.6) находим

$$f^{(i+1)} = (B^{(i+1)} - a_0 P^\beta - K_a \alpha^\lambda) / c. \tag{2.9}$$

Подставив $f^{(i+1)}$ в уравнение (2.7), получаем численность популяции на следующем временном шаге, затем повторяем операцию. В результате при $i \rightarrow \infty$ экосистема приходит к равновесному состоянию $F = \hat{f} - \hat{d} = 0$, где \hat{f} – равновесная плодовитость, соответствующая

ющая формуле (1.26), т.е.

$$\hat{f} = \hat{d} = \frac{\tau(1-s)}{w(1-s^{\tau_0})} \quad (2.10)$$

Отметим, что поскольку выживаемость s зависит от веса P и адаптивного признака a , равновесная плодовитость является функцией P и a ($\hat{f} = \hat{f}(P, a)$).

Подставив $\hat{f}(P, a)$ в уравнение (2.6), получаем равновесное значение потребляемой пищевой энергии:

$$\hat{B} = \chi P^b + \hat{f}(P, a) c + K_a a^\lambda. \quad (2.11)$$

Равновесная численность популяции определяется выражением

$$\hat{N} = V/\hat{B}. \quad (2.12)$$

Как видим, асимптотические решения обеих моделей динамики экосистемы (модели Лесли и точечной модели) идентичны. Поэтому в дальнейшем исследования по конкуренции популяций будем проводить, используя более простую точечную модель.

3. КОНКУРЕНЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ НА ОСНОВЕ ТОЧЕЧНОЙ МОДЕЛИ

Рассмотрим экосистему, в которой сосуществуют две популяции, отличающиеся величинами какого-либо адаптивного признака и массой тела. (Рассуждения без особого труда могут быть обобщены на случай k популяций и m адаптивных признаков.)

Динамику этих популяций опишем уравнениями:

$$\frac{dN_j}{dt} = F_j N_j; \quad j = 1, 2. \quad (3.1)$$

Здесь $F_j = f_j - g_j$; $g_j = \frac{1-s_j}{w(1-s_j^{\tau_0})}$; $s_j = \exp(-d_j)$;

$d_j = d_j^a + d_j^P$, где $d_j^a = D^a/a_j$ – смертность, обусловленная адаптивным признаком a , $d_j^P = D^P/P_j$ – смертность, обусловленная массой тела.

Общая численность популяций равна

$$N = \sum_{j=1}^2 N_j. \quad (3.2)$$

Пищевая энергия, потребляемая одной особью, одинакова для обеих популяций и равна

$$B = V/N. \quad (3.3)$$

Энергетический баланс особи этих популяций имеет вид:

$$B = W_0^{(j)} + W_f^{(j)} + W_a^{(j)}. \quad (3.4)$$

Здесь $W_0^{(j)}$ – энергозатраты на основной обмен плюс передвижение при добывании пищи. Они определяются следующим выражением [2]:

$$W_0^{(j)} = \chi(P_j)^{0.75}, \quad (3.5)$$

где χ – коэффициент пропорциональности, [ккал/(кг^{0.75} сутки)].

$W_f^{(j)}$ – энергозатраты на воспроизводство, определяемые формулой

$$W_f^{(j)} = c f_j, \quad (3.6)$$

где c – затраты на одного потомка.

$W_a^{(j)}$ – энергозатраты на функционирование адаптивного признака a :

$$W_a^{(j)} = K_a a_j. \quad (3.7)$$

Подставив выражения (3.5), (3.6) и (3.7) в выражение (3.4), получаем

$$B = \chi(P^{(j)})^{0.75} + c f_j + K_a a_j. \quad (3.8)$$

Уравнения (3.1)–(3.8) описывают динамику экосистемы, содержащей две конкурирующие популяции. Нетрудно показать, что эта система имеет два нетривиальных равновесных состояния: равновесие 1

$$\begin{cases} \hat{N}^{(1)} > 0; F_1 = 0 \\ \hat{N}^{(2)} = 0; F_2 \neq 0 \end{cases} \quad (3.9a)$$

и равновесие 2

$$\begin{cases} \hat{N}^{(1)} = 0; F_1 \neq 0 \\ \hat{N}^{(2)} > 0; F_2 = 0 \end{cases}. \quad (3.9a)$$

Динамическая модель конкуренции представляет собой наглядную демонстрацию эволюции адаптивных признаков, когда в ходе конкуренции выживает популяция-носитель наиболее оптимальных значений этих признаков.

В работах [6, 8] было доказано, что из совокупности равновесных состояний асимптотически устойчивым будет то, которое удовлетворяет условию:

$$F_j = \max_{P, a}(F_1, F_2) = 0. \quad (3.10)$$

Выражение (3.10) представляет собой *общий критерий эволюционной оптимальности*, суть которого в том, что в процессе конкуренции за ресурс популяций, отличающихся величинами адаптивных признаков и массы тела особей, выживает только одна популяция, особи которой обладают такими значениями перечисленных адаптивных параметров, при которых коэффициент размножения достигает своего максимума, равного нулю в состоянии равновесия экосисте-

мы. Это соответствует широко известному в экологии принципу конкурентного исключения Гаузе.

Из общего критерия эволюционной оптимальности следуют три частных. Это зависит от того, к какому из трех перечисленных типов принадлежит признак.

Классификация адаптивных признаков. Условно можно выделить следующие три типа адаптивных признаков. Первый тип – «нейтральные» адаптивные признаки. Они не влияют на смертность и на плодовитость, а также не способствуют добыванию пищи. Но, тем не менее, без них существование организма невозможно (например, угол ветвления кровеносных сосудов). Второй тип – адаптивные признаки, влияющие на смертность и/или плодовитость (например, шерстный покров у приполярных животных уменьшает их смертность от переохлаждения). Третий тип – признаки, способствующие добыче пищи (например, длинная шея жирафа позволяет ему питаться высоко растущими листьями).

Если адаптивный признак принадлежит ко второму типу (влияет на плодовитость или смертность), то условие (3.10) эквивалентно следующему условию (доказательство в приложении 2):

$$\hat{B}_j = \min_{P,a}(\hat{B}_1, \hat{B}_2). \quad (3.11)$$

Выражение (3.11) представляет собой *полный энергетический критерий* эволюционной оптимальности, суть которого в том, что в процессе конкуренции за ресурс популяций, отличающихся величинами адаптивных признаков и массы тела особей, выживает только одна популяция, та, особи которой обладают такими значениями перечисленных параметров, при которых равновесное количество пищевой энергии, потребляемое особью, минимально.

В том случае, если адаптивный признак принадлежит третьему типу (способствует добыче пищи), выражение (3.10) эквивалентно выражению

$$\hat{R}_j = \min_{P,a}(\hat{R}_1, \hat{R}_2). \quad (3.12)$$

Доказательство аналогично доказательству выражения (3.11). Отсюда из выражения (1.8а) получаем

$$\hat{R}_1 = \frac{\hat{B}_1}{q\alpha_1}; \hat{R}_2 = \frac{\hat{B}_2}{q\alpha_2}. \quad (3.13)$$

Выражение (3.12) назовем *критерием минимума плотности ресурса*. Этот критерий созвучен высказыванию Мак-Артура [17], что естественный отбор способствует выживанию такого хищника, который питается наименьшим количеством жертв.

Если же адаптивный признак является «нейтральным» (первый тип), то для нахождения его эволюционно оптимального значения применяем *энергетический критерий*. Суть его в том, что в конкуренции побеждает та популяция, особи которой потребляют наименьшее количество энергии на создание и функционирование этого нейтрального признака, т.е. справедливо выражение

$$W_a^{(j)} = \min(W_a^{(1)}, W_a^{(2)}). \quad (3.14)$$

Энергетический критерий впервые был применен в работе [14] при расчете оптимальных параметров кровеносной системы. В обзорных работах [15, 16] а также в работе [13] приведена масса примеров применения этого критерия для определения оптимальных значений различных признаков организма. При этом зачастую ошибочно утверждалось, что эти признаки также являются продуктами эволюции.

Резюмируя приведенные выводы, предложим следующую схему связей адаптивных признаков и критериев оптимальности (рис. 1).

4. АДЕКВАТНОСТЬ МОДЕЛЕЙ ЭКОСИСТЕМЫ (МОДЕЛИ ЛЕСЛИ И ТОЧЕЧНОЙ МОДЕЛИ)

Покажем адекватность моделей динамики экосистемы с учетом возрастной структуры (модель Лесли) и без ее учета (точечная модель).

Рассмотрим гипотетическую экосистему с популяцией пустынных животных, у которых адаптивным признаком являются большие уши (например лисица фенек). С помощью ушей у них происходит понижение температуры тела, что уменьшает смертность от перегрева. Как видим, этот адаптивный признак относится ко второму типу. Зависимость смертности от величины α определяется формулой

$$d_\alpha = D_\alpha/\alpha, \quad (4.1)$$

где α – площадь ушей особи в дм^2 . Кроме того, пусть существует хищник, питающийся этими ушастыми особями, причем чем выше масса, тем меньше смертность от хищников. Тогда зависимость смертности от массы тела определим выражением

$$d_P = D_P/P \quad (4.2)$$

(здесь $\delta = \gamma = 1$ из формулы (1.5)).

Зададим конкретные значения коэффициентам модели. Пусть $t_0 = 2$ временные единицы (в.е.); $T = 7$ в.е., $D_\alpha = 0.223 \text{ дм}^2/(\text{в.е.})$, $D_P = 0.8 \text{ кг}/(\text{в.е.})$, $\sigma_1 = 0.4 (\text{в.е.})^{-1}$, $\sigma_2 = 0.5 (\text{в.е.})^{-1}$, $c = 200 \text{ ккал}/\text{потомок}$, $\chi = 100 \text{ ккал}/(\text{кг}^{0.75} \cdot (\text{в.е.}))$, $K_\alpha = 300 \text{ ккал}/(\text{дм}^2 \cdot (\text{в.е.}))$, $V = 14 \text{ ккал}/(\text{м}^2 \cdot (\text{в.е.}))$.

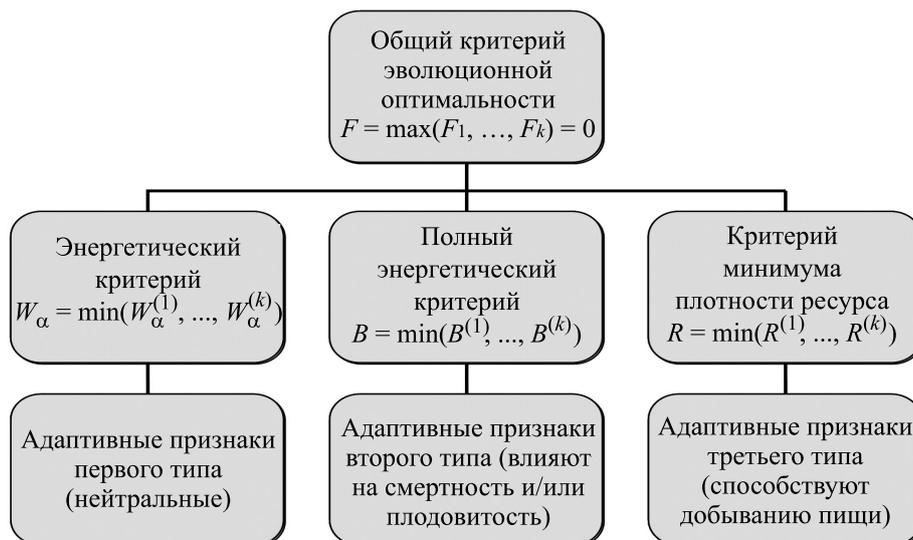


Рис. 1. Схема связей адаптивных признаков и критериев оптимальности.

Рассмотрим популяцию, взрослые особи которой имеют следующие параметры: $\alpha = 0.7 \text{ дм}^2$, $P = 4 \text{ кг}$.

Вычислим значения промежуточных параметров:

$$d_\alpha = 0.32, d_P = 0.2, d = 0.52, s = 0.595, w = 0.2$$

и равновесные значения переменных: $\hat{f} = \hat{d} = 2.19$, $W_f = 437.9$, $W_0 = 282.8$, $W_\alpha = 210$, $\hat{B} = 930.2$, $\hat{N} = 0.01505 \text{ особей/м}^2$.

Теперь рассмотрим результаты численного моделирования динамики экосистемы (с теми же параметрами) по точечной модели и по модели Лесли.

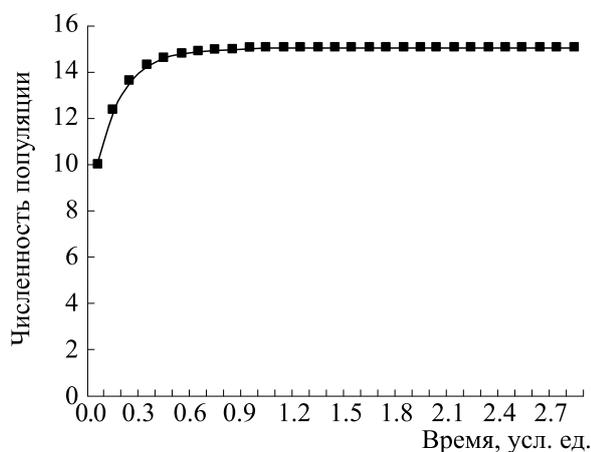


Рис. 2. Динамика численности популяции по точечной модели при $\alpha = 0.7 \text{ дм}^2$; $P = 4 \text{ кг}$.

На рис. 2 и 3 представлена динамика численности популяций по точечной модели и по модели Лесли.

Расчеты показали, что при $t \rightarrow \infty f \rightarrow 2.19$, $B \rightarrow 930.2$, $N \rightarrow 0.01505$. Таким образом, численный эксперимент показал, что в обеих моделях экосистема приходит к одному и тому же состоянию равновесия. Эти же значения получаем из решения алгебраической системы уравнений равновесного состояния экосистемы (2.10)–(2.12).

Алгоритмы поиска эволюционно оптимальных значений. В результате получаем простой алгоритм определения эволюционно оптимальных значений массы тела и адаптивного признака, суть которого состоит в определении точки (P^*, a^*) . Для этого в формуле (2.11) найдем точку

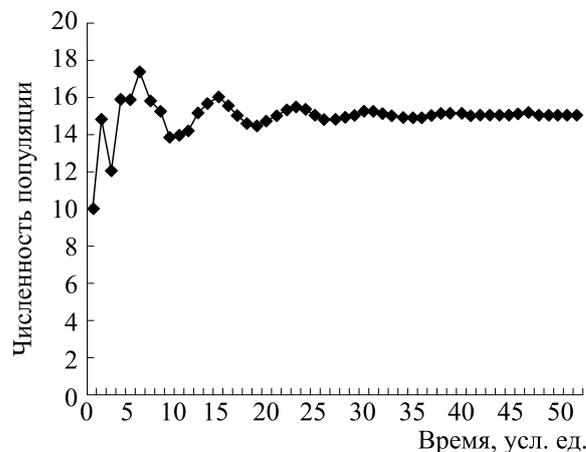


Рис. 3. Динамика численности популяции по модели Лесли при $\alpha_1 = \alpha_2 = 0.7 \text{ дм}^2$; $P_1 = P_2 = 4 \text{ кг}$.

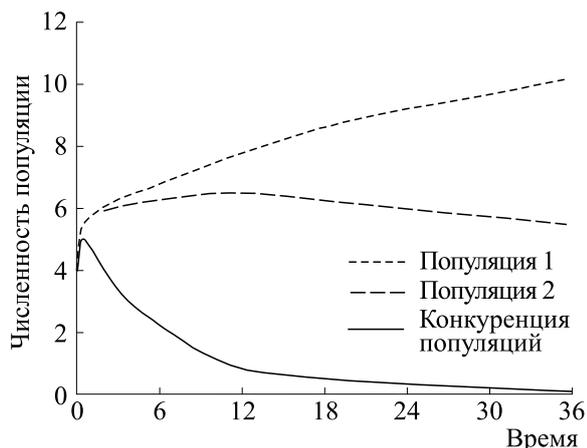


Рис. 4. Динамика численности конкурирующих популяций.

(P^*, a^*) , доставляющую минимум значению \hat{V} . Таким образом, задача свелась к поиску экстремума функции двух переменных при конкретных значениях параметров.

Можем с помощью модели конкуренции убедиться в справедливости *полного энергетического критерия* как на точечной модели, так и на модели Лесли. Продемонстрируем это на примере нашей экосистемы. С помощью программы Mathcad находим оптимальные $\alpha^* = 0,6$ и $P^* = 2,5$, доставляющие минимум V . Соответствующая оптимальная плодовитость будет: $f^* = 2,58$ (в.е.)⁻¹. Подставив найденные значения в формулы (3.5), (3.6) и (3.7), находим оптимальное распределение энергии, полученной особью с пищей по всем видам жизнедеятельности: $W_0^* = 198,8$, $W_f = 515,5$, $W_{\alpha}^* = 180$. Просуммировав эти значения, определяем полное количество энергии, получаемое особью с пищей: $B^* = 894,3$ ккал/(в.е.). Плотность численности популяции будет равна $N^* = 15,65$ особей на гектар.

Убедимся в том, что найденные значения действительно будут оптимальными. Для этого вычислим величину V в окрестности точки (α^*, P^*) . Пусть точками окрестности будут: $\alpha_2 = 0,5$, $P_2 = 2$ и $\alpha_3 = 0,7$, $P_3 = 4$. Значения переменной V для этих точек будут $B_2 = V(0,5, 2) = 897,5$, $B_3 = (0,7, 4) = 930,2$, т.е. оба значения больше B^* . Итак, $B^* = \min(B_1, B_2, B_3)$, где $B_1 = B^*$.

Покажем, что значения $\alpha_1 = \alpha^* = 0,6$ и $P_1 = P^* = 2,5$ будут также оптимальными в эволюционном смысле. Для этого проведем численный эксперимент. Рассчитаем на компьютере модель конкуренции всех трех популяций. Согласно *полному энергетическому критерию* эволюционной оптимальности, победить в конкуренции должна

первая популяция, поскольку ее особи потребляют наименьшее количество пищевой энергии.

Из рис. 4 видно, что действительно побеждает первая популяция. Расчеты показали, что ее численность $N_1 \rightarrow N^* = 15,65$, а численности $N_2 \rightarrow 0$ и $N_3 \rightarrow 0$.

Таким образом, для нахождения ЭОЗ признака мы можем не решать систему дифференциальных уравнений конкуренции, а применить один из перечисленных критериев эволюционной оптимальности (в зависимости от типа адаптивного признака).

5. ПРИМЕРЫ ЭВОЛЮЦИОННО ОПТИМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ АДАПТИВНЫХ ПРИЗНАКОВ КОНКРЕТНЫХ ЖИВОТНЫХ

В этом разделе вначале рассмотрим примеры ошибочного применения *энергетического критерия* для определения эволюционно оптимальных значений некоторых адаптивных признаков.

В работе [2] в качестве адаптивного признака рассматривался шерстный покров арктических лис. Для определения эволюционно оптимальной величины шерстного покрова авторы применили *энергетический критерий*, ошибочно полагая, что полученное значение будет также эволюционным. Так, на стр. 206 авторы пишут: «Естественно предположить, что в ходе эволюции селективные преимущества имеют особи, у которых параметры термоизоляционного слоя обеспечивают минимальный расход энергии...». Таким образом, энергетический критерий оптимальности термоизоляции имеет вид:

$$W = W_T + W_h = \min, \quad (5.1)$$

где W_T — теплоотдача особи, которая определяется выражением

$$W_T = (\varepsilon/h) S(T_s - T_e), \quad (5.2)$$

где ε — коэффициент теплопроводности, S — площадь поверхности тела особи, T_s — температура поверхности тела, T_e — средняя зимняя температура окружающей среды. Обозначим

$$K_T = \varepsilon S(T_s - T_e). \quad (5.3)$$

Подставив (5.3) в выражение (5.2), получаем:

$$W_T = K_T/h, \quad (5.4)$$

где h — толщина шерстного покрова. W_h — энергозатраты на генерацию шерсти, их определяем выражением

$$W_h = K_h h. \quad (5.5)$$

Подставив выражения (5.4) и (5.5) в (5.1), получаем:

$$W = K_T/h + K_h h = \min. \quad (5.6)$$

Продифференцировав уравнение (5.6) по h и приравняв производную к нулю, получаем оптимальное значение:

$$h_0 = \sqrt{\frac{K_T}{K_h}}. \quad (5.7)$$

Однако найденное значение не является продуктом эволюции, поскольку данный признак влияет на смертность и, следовательно, относится не к первому, а ко второму типу. Поэтому для нахождения ЭОЗ этого признака применим соответствующий *полный энергетический критерий*. Запишем его в виде

$$B = W_0 + W_f + W_T + W_h = \min, \quad (5.8)$$

где B – полные энергозатраты организма на все виды жизнедеятельности, W_0 – энергозатраты на основной обмен W_A плюс механическое передвижение W_M ; $W_A = \chi P^{0.75}$, $W_M = \theta W_A$, $\chi = 70$ ккал/(кг^{0.75} сутки), $\theta = 0.7$ ([2]). В результате имеем

$$W_0 = W_A + W_M = (1 + \theta) W_A. \quad (5.8a)$$

W_f – энергозатраты на воспроизводство, которые определяются выражением

$$W_f = c\hat{f}, \quad (5.9)$$

где \hat{f} – равновесное значение плодовитости, которое мы будем определять формулой (1.26a).

$$\hat{f} = d_h/w, \quad (5.10)$$

где w – выживаемость ювенильных особей, d_h – смертность взрослых особей от переохлаждения. Определяем ее выражением

$$d_h = D_h/h. \quad (5.11)$$

В итоге

$$\hat{f} = \frac{D_h}{hw} \quad (5.11a)$$

Подставив выражения (5.11) и (5.10) в (5.9), получаем:

$$W_f = cD_h/wh = K_f/h, \quad (5.12)$$

где

$$K_f = cD_h/w. \quad (5.12a)$$

В результате выражение (5.8) представим в виде

$$B = W_0 + K_f/h + K_T/h + K_h h = \min. \quad (5.13)$$

Для нахождения эволюционно оптимального значения h продифференцируем выражение (5.13). Приравняв производную нулю, получаем ЭОЗ

$$h^* = \sqrt{\frac{K_f + K_T}{K_h}}, \quad (5.14)$$

которое отличается от h_0 (формула (5.7)).

Убедимся в том, что полученное значение действительно эволюционно оптимальное. Для этого, используя модель конкуренции, проведем численный эксперимент, в котором покажем, что

популяция-носитель значения h^* выиграет конкуренцию у популяций с другими значениями h .

Пусть коэффициенты экосистемы, содержащей популяцию рыжей лисы Аляски, имеют следующие значения (отметим, что эти значения взяты из работы [2], стр. 207): $\varepsilon = 1.05$ ккал/(мг·сутки), $T_s = 38^\circ\text{C}$, $T_e = -20^\circ\text{C}$, $S = 0.22 \text{ м}^2$, $P = 5 \text{ кг}$, $w = 0.7$, $D_h = 0.00023 \text{ м/сутки}$, $c = 20000 \text{ ккал/детеныш}$, $K_h = 5290 \text{ ккал/(мг·сутки)}$, $\chi = 70 \text{ ккал/(кг}^{0.75} \text{ сутки)}$, $t_0 = 2 \text{ года}$, $T = 7 \text{ лет}$.

По формулам (5.3) и (5.12a) вычисляем: $K_T = 13.4 \text{ ккал/сутки}$, $K_f = 6.57 \text{ ккал/сутки}$. Затем по формулам (5.7) и (5.14) вычисляем: $h_0 = 0.05 \text{ м}$, $h^* = 0.061 \text{ м}$. По формуле (5.11a) находим $f^* = 0.0053 \text{ сут}^{-1}$. Полные энергозатраты организма, согласно формуле (5.13), будут составлять $B^* = 1048 \text{ ккал/сутки}$.

Численный эксперимент по конкуренции. Рассмотрим три популяции, отличающиеся толщиной шерстного покрова. Эти популяции обитают в одной экологической нише.

Пусть $h_1 = h_0 = 0.05$, $h_2 = h^* = 0.061$, $h_3 = 0.07$. Соответствующие им равновесные значения B будут равны $B_1 = 1062$, $B_2 = 1048$, $B_3 = 1054$.

Как видим, значению h^* соответствует минимальное значение B . На рис. 5 представлены результаты конкуренции этих трех популяций

Из рис. 5 видно, что в конкуренции побеждает, как и ожидалось, популяция с ЭОЗ величины h . Численности популяций с другими значениями признака стремятся к нулю.

Эволюция адаптивного признака при изменении внешних условий. Рассмотрим процесс эволюции признака при изменении внешней среды. Пусть экосистема находится в равновесном состоянии ($f_1^* = 0.0053 \text{ сут}^{-1}$, $B_1^* = 1048 \text{ ккал/(особь сутки)}$)

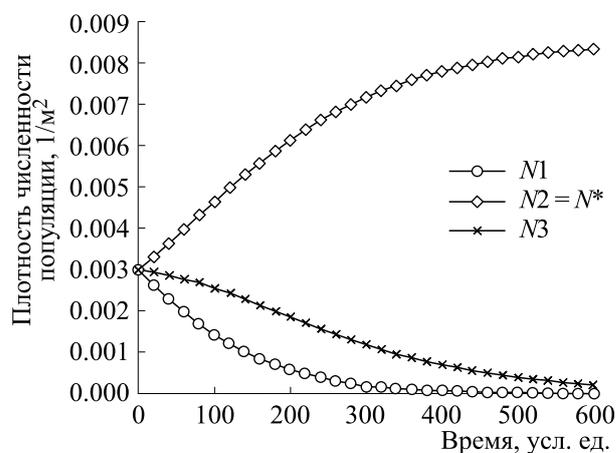


Рис. 5. Динамика численности популяций (модель конкуренции) с разными значениями признака h .

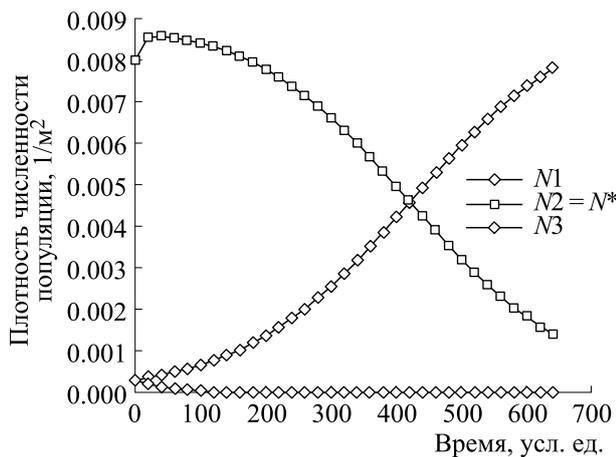


Рис. 6. Динамика численности популяций (модель конкуренции) с разными значениями адаптивного признака (h_1 — до мутации; h_M — после).

(при $V = 0.0002$ ккал/($m^2 \cdot$ сутки), $N_1^* = 0.019$ особей/ km^2), соответствующем значению $h_1^* = 0.061$ м при $T_e = -20^\circ C$.

В какой-то момент произошло потепление, в результате которого средняя температура окружающей среды повысилась до $-10^\circ C$. При этом коэффициент смертности D_α понизился с 0.00023 до 0.00018. В результате экосистема выйдет из состояния равновесия. Новое ЭОЗ станет равным $h_2^* = 0.055$ м. Ему соответствуют равновесные значения $f_2^* = 0.0066$, $B_2^* = 1003.2$, $N_2^* = 0.02$.

Через некоторое время произошла мутация, в результате которой в популяции появилось несколько особей с толщиной покрова $h_M = 0.058$ м. Этой толщине соответствуют следующие равновесные значения: $f_M = 0.00575$; $B_M = 985$; $N_M = 0.0208$. Таким образом, в экосистеме появилась популяция-конкурент с меньшим равновесным значением полной потребляемой энергии. В соответствии с *полным энергетическим критерием* эта популяция должна вытеснить прежнюю из экосистемы. В итоге величина адаптивного признака особей станет $h_M = 0.058$ м. На рис. 6 приведен результат этой мутации.

Видно, что численность популяции-мутанта стремится к $N_M = 0.0208$, в то время как численность первой популяции стремится к нулю. При дальнейших мутациях в экосистеме сохранится только популяция с величиной признака $h_2^* = 0.055$ м, доставляющей глобальный минимум равновесному $B = B_2^* = 984$.

6. АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭВОЛЮЦИОННО ОПТИМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ПРИЗНАКА ТРЕТЬЕГО ТИПА

В работе [18] в качестве адаптивного признака была рассмотрена скорость плавания пелагических рыб. Для определения оптимальной скорости плавания авторы ошибочно применили *энергетический критерий*. Однако этот признак относится к третьему типу (способствует добыче ресурса), поэтому для определения его ЭОЗ необходимо использовать *критерий минимума плотности ресурса*.

Рассмотрим водоем, в котором находится фитопланктон плотностью R . Количество пищевого ресурса (фитопланктона), потребляемого рыбой за сутки, определяется формулой

$$M = \eta v R, \quad (6.1)$$

где η — площадь забора ресурса, v — средняя скорость плавания рыбы (м/сутки).

Динамика численности популяции рыб определяется выражением

$$\frac{dN}{dt} = (fw - \hat{d})N, \quad (6.2)$$

где N — плотность численности взрослых особей; f — плодовитость (количество икринок, произведенных самкой за нерест деленное на промежуток времени между соседними нерестами); w — выживаемость (доля икринок, доживших до начала взрослого возраста особей); \hat{d} — смертность взрослых особей.

Энергетический баланс взрослой особи представим выражением

$$W = W_0 + W_f + W_A, \quad (6.3)$$

где W — полное количество энергии, получаемое с пищей, которое затем расходуется на различные виды жизнедеятельности. Определяется выражением

$$W = c_b M = \lambda v R, \quad (6.4)$$

где $\lambda = c_b \eta$, c_b — удельная калорийность ресурса, W_0 — основной обмен, W_f — затраты энергии на воспроизводство, которые определяются выражением

$$W_f = cf, \quad (6.5)$$

в котором c — калорийность одной икринки.

W_A — мощность, расходуемая при плавании. Определяется выражением

$$W_A = F_c v, \quad (6.6)$$

где $F_c = K_v v$ — сила сопротивления при плавании. В результате имеем

$$W_A = K_v v^2. \quad (6.7)$$

Для определения ЭОЗ скорости плавания применим критерий минимума плотности ресурса. Подставив формулу (6.7) в выражение (6.3), получаем для равновесного состояния:

$$\lambda v \hat{R} = W_0 + c \hat{f} + K_v v^2, \quad (6.8)$$

где \hat{R} – равновесная плотность ресурса, $\hat{f} = \hat{d}/w$ – равновесная плодовитость. Из выражения (6.8) выразим \hat{R} :

$$\hat{R} = \frac{1}{\lambda} \left(\frac{W_0 + c \hat{f}}{v} + K_v v \right). \quad (6.9)$$

Определим оптимальное значение v , доставляющее минимум \hat{R} . Для этого продифференцируем выражение (6.9) по v . Приравняв производную нулю, получаем

$$v^* = \left(\frac{W_0 + c \hat{f}}{K_v} \right)^{1/2}. \quad (6.10)$$

По данным наблюдений в работе [19] за популяцией северо-байкальского омуля компоненты этой формулы имеют следующие значения: $W_0 = 1.9$ ккал/сутки, $W_f = c \hat{f} = 0.076$ ккал/сутки, $K_v = 12.24$ (ккал/сутки)·(с²/м²). Подставив эти значения в формулу (6.10), получаем ЭОЗ скорости плавания северо-байкальского омуля $v^* = 0.4$ м/с, что совпадает с данными наблюдений за природными популяциями.

Соответствующее минимальное значение \hat{R} будет равно

$$R^* = \min \hat{R}(v) = \frac{2}{\lambda} \left(\sqrt{K_v(W_0 + c \hat{f})} \right). \quad (6.11)$$

Подставив выражение (6.10) в (6.7), получаем формулу активного обмена:

$$W_A^* = W_0 + c \hat{f}. \quad (6.12)$$

Для рыб энергозатраты на воспроизводство обычно не превышают 4%. Поэтому справедливо следующее выражение:

$$W_A^* \approx W_0. \quad (6.13)$$

Иначе говоря, активный обмен примерно равен основному обмену. Этот факт был обнаружен эмпирически в работе [20].

Итак, мы видим, что для определения ЭОЗ адаптивных признаков нам не надо решать трудоемкую имитационную модель конкуренции, а достаточно определить, к какому типу относится данный признак, и применить соответствующий критерий эволюционной оптимальности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для более детального описания динамики экосистемы была применена широко известная в экологии модель Лесли. Оказалось, что в равновесном состоянии экосистемы значения переменных этой модели и значения переменных точечной (без учета возрастной структуры) модели совпадают.

Для точечных моделей рядом авторов ([6, 8]) была разработана теория (Общий критерий эволюционной оптимальности), позволяющая определять эволюционно оптимальные значения адаптивных признаков. В работе показано, что эту теорию можно применить, используя модель, учитывающую возрастную структуру популяции (модель Лесли), что позволяет получить более адекватные результаты.

Оказалось, что адаптивные признаки можно классифицировать по типам и для каждого типа признаков существует свой критерий эволюционной оптимальности, который является следствием общего критерия.

Показано, что, применяя к определенному признаку соответствующий критерий оптимальности, можно определить эволюционно оптимальное значение этого признака.

Предложенная классификация позволяет избежать не вполне корректного определения ЭОЗ признака на основе только одного критерия, критерия минимума энергозатрат на функционирование признака. Так ЭОЗ толщины шерстного покрова лис Аляски [2] и скорости плавания рыб [18] должны определяться с помощью критерия минимума потребляемой энергии и критерия минимума плотности ресурса.

Этот результат был обобщен на случай совокупности признаков, в том числе, когда в качестве признака рассматривался вес тела особи.

Следует отметить, что полученные авторами теоретические результаты подтверждаются численными экспериментами по определению ЭОЗ признаков особей популяции непосредственным моделированием конкуренции популяций с разными значениями адаптивных признаков.

Отметим так же любопытный факт. Оказалось что при эволюционно оптимальной скорости плавания энергозатраты на плавание равны основному обмену. Этот факт был обнаружен эмпирически в работе [20].

Был проведен численный эксперимент по моделированию эволюции адаптивного признака (толщины шерстного покрова лис Аляски) при изменении значений параметров среды обитания. Были получены удовлетворительные результаты.

ВЫВОДЫ

Предлагается математическая модель динамики биологического сообщества. Модель представляет собой систему уравнений, описывающих динамику переменных экосистемы: плотность численности популяции; вес тела половозрелых особей; плотность энергии, получаемой особью с пищей, и учитывает возрастную структуру популяции потребителя.

Используя результаты по конкуренции, полученные для точечных моделей другими исследователями, получены алгоритмы определения ЭОЗ адаптивных признаков половозрелых особей популяции.

Было показано, что в ходе конкуренции за пищевой ресурс популяций, отличающихся между собой величинами набора признаков, выживает только одна, та, чей набор обеспечивает максимум функции размножения, что соответствует общему критерию эволюционной оптимальности (Ханина – Семеновского) ([6, 8]).

Проведена классификация признаков по типам. Показано, что каждому типу соответствует свой критерий эволюционной оптимальности, который является следствием общего критерия.

В результате были предложены простые алгоритмы поиска ЭОЗ различных адаптивных признаков и веса тела. А также определено оптимальное распределение энергозатрат на все виды жизнедеятельности организма.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Равновесное значение плотности численности взрослых когорт составляет

$$\hat{n}_j = \hat{n}_1 w s^j; j = t_0 + 1, \dots, T. \quad (п1.1)$$

Прирост численности популяции за один временной шаг равен

$$N^+ = \left(\hat{n}_1 w \sum_1^{T-t_0} \hat{n}_j \right) \hat{f} = \hat{n}_1 w \frac{1-s^{T-t_0}}{1-s} \hat{f}. \quad (п1.2)$$

Убыль численности популяции за один временной шаг составляет

$$N^- = \hat{n}_1. \quad (п1.3)$$

В равновесном состоянии прирост равен убыли. Приравняв правые части уравнений (п1.2) и (п1.3), получаем:

$$\hat{n}_1 w \frac{1-s^{T-t_0}}{1-s} \hat{f} = \hat{n}_1. \quad (п1.4)$$

Отсюда

$$\hat{f} = \frac{(1-s)}{w(1-s^{T-t_0})}. \quad (п1.5)$$

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Пусть функция

$$z = \varphi(x, y) \quad (п2.1)$$

задана уравнением:

$$F(x, y, z) = 0, \quad (п2.2)$$

причем $F(x, y, z)$ – дифференцируемая функция переменных x, y, z .

Утверждение. Если

$$F(x^*, y^*, z) = \max_{x, y} F(x, y, z) \quad (п2.3)$$

и

$$\Delta > 0, A > 0$$

$$\left(A = \frac{\partial^2 \varphi(x^*, y^*)}{\partial x^2}, B = \frac{\partial^2 \varphi(x^*, y^*)}{\partial x \partial y}, \right. \quad (п2.4)$$

$$\left. C = \frac{\partial^2 \varphi(x^*, y^*)}{\partial y^2}, \Delta = AC - B^2 \right),$$

то

$$z^* = \varphi(x^*, y^*) = \min_{x, y} \varphi(x, y), \quad (п2.5)$$

Доказательство. Из условия (п2.3) следует, что

$$\frac{\partial F(x^*, y^*)}{\partial x} = \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial \varphi(x^*, y^*)}{\partial x} = 0,$$

$$\frac{\partial F(x^*, y^*)}{\partial y} = \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial \varphi(x^*, y^*)}{\partial y} = 0.$$

Если $\frac{\partial F}{\partial z} \neq 0$, то $\frac{\partial \varphi(x^*, y^*)}{\partial x} = 0$ и $\frac{\partial \varphi(x^*, y^*)}{\partial y} = 0$.

Отсюда следует, что точка (x^*, y^*) является подозрительной на экстремум для функции $z = \varphi(x, y)$.

Но поскольку выполнено достаточное условие экстремума функции (п2.4), то выражение (п2.5) справедливо. Таким образом, утверждение доказано.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. В. Волосова, *Математические структуры и моделирование* 2 (38), 27 (2016).

2. И. Ф. Образцов и М. А. Ханин. *Оптимальные биомеханические системы* (Медицина, М., 1989).
3. Л. Л. Овсянников, Журн. общ. биологии 53 (1), 92 (1992).
4. Л. Л. Овсянников и В. П. Пасеков. Журн. общ. биологии 51 (5), 709 (1990).
5. Р. Розен, *Принцип оптимальности в биологии* (Мир, М., 1969).
6. Ф. Н. Семейский и С. М. Семенов, *Математическое моделирование экологических процессов* (Гидрометеоиздат, Л., 1982).
7. А. Т. Терехин и Е. В. Будилова, Журн. общ. биологии 62 (1), 286 (2001).
8. М. А. Ханин, Н. Л. Дорфман, И. Б. Бухаров и В. Г. Левадный, *Экстремальные принципы в биологии и физиологии* (Наука, М., 1978).
9. J. Kozlovski and J. Weiner, Amer. Nat. 149 (1), 423 (1997).
10. E. L. Charnov, *Life History Invariants. Some Exploration of Symmetry in Evolutionary Ecology* (Univ. Press, Oxford, 1993).
11. R. E. Ulanowicz, Ecol. Modelling 220 (16), 1886 (2009).
12. Л. Л. Овсянников, *Экстремальные принципы в биологии* (Моск. гуманитарный ун-т, М., 2017).
13. А.П. Левич, *Искусство и метод в моделировании систем* (Москва–Ижевск, 2012).
14. Н. Рашевски, в сб. *Теоретическая и математическая биология* (Мир, М., 1968), сс. 48–68.
15. П. В. Фурсова, Л. П. Левич и И. Л. Алексеев, Успехи соврем. биологии 123 (2), 115 (2003).
16. И. В. Волвенко, Биофизика 57 (3), 476 (2012).
17. Р. Мак-Артур, в сб. *Теоретическая и математическая биология* (Мир, Москва, 1968), сс. 420–430.
18. А. А. Яржомбек, А. Б. Клянтонин и С. Г. Подржанская, Экология 23 (1), 65 (1977).
19. И. Б. Волерман и В. В. Контонин, *Биологические сообщества рыб и нерпы в Байкале* (Иркутск, 1983).
20. Г. Г. Винберг, Журн. общ. биологии 37 (1), 56 (1967).

Classification of Adaptive Traits and Criteria for Optimality in Adaptive Evolution

L.L. Ovsyannikov* and M.I. Shpitionkov*, **

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

**Dorodnicyn Computing Centre, Federal Research Center «Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 44/2, Moscow, 119333 Russia

This study proposes a mathematical model of biological community dynamics which is represented by a system of equations that describe the dynamics of ecosystem variables – population density; body weight of mature individuals; the density of energy received by an individual with food – and takes into account the age structure of the consumer's population. Using the results on competition obtained for point models by other researchers, algorithms for determining the evolutionarily optimal values of adaptive traits of mature individuals of the population were obtained. It has been shown that during food resource competition between populations each harboring a different set of traits, selection favored only the population which will survive and have larger reproductive function, that corresponds to the general criterion for optimality in adaptive evolution. The classification of traits by types is carried out, it is shown that each type corresponds to its own criterion for optimality in adaptive evolution. Simple algorithms for a search for evolutionarily optimal values of various adaptive traits and body weight are proposed, the optimal distribution of energy consumption for all types of vital functions of the organism is determined. Optimality in adaptive evolution of these traits is illustrated by a numerical experiment.

Keywords: optimality in adaptive evolution, stability of equilibrium state, competition between populations, adaptive traits

УДК 574.4 + 519.6, 519.6

О КАЛИБРОВКЕ АВТОНОМНОЙ МОДЕЛИ ТУНДРОВОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЛЕММИНГОВ

© 2020 г. Г.К. Каменев*, Д.А. Саранча*, В.О. Поляновский**

*Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» РАН, 119333, Москва, ул. Вавилова, 44/2

E-mail: gkk@ccas.ru

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

E-mail: polyanovskyvo@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.02.2020 г.

После доработки 13.07.2020 г.

Принята к публикации 14.07.2020 г.

Рассмотрена автономная модель биологической популяции леммингов феноменологического типа, полученная в рамках комплексных исследований тундровых сообществ. В модели динамика популяции описывается через разностное уравнение, связывающее численность популяции в двух соседних годах и зависящее от трех параметров биолого-экологического генезиса. Совокупность сочетаний значений параметров, входящих в рассматриваемое уравнение, определяет класс одномерных унимодальных отображений динамической системы, в котором были аналитически и численно исследованы бифуркационные свойства, асимптотика и устойчивость траекторий. В настоящей статье основное внимание уделяется проблеме идентификации модели. Калибровку модели предлагается осуществлять методом множеств идентификации, основанном на аппроксимации и визуализации маломерных проекций многомерного графика функции ошибок, заданного на пространстве трех экологических и двух популяционных параметров. Приведен пример идентификации на данных по тундровой популяции леммингов полуострова Таймыр. Показано, что в этом случае два биолого-экологические параметра допускают устойчивую локализацию.

Ключевые слова: биологическая популяция, дискретное отображение, динамика численности, цикличность, устойчивость, метод множеств идентификации.

DOI: 10.31857/S0006302920060196

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ТУНДРОВЫХ СООБЩЕСТВ

Математическое моделирование популяций и сообществ — один из ведущих разделов биофизики сложных систем. Начиная с работ А. Лотки и В. Вольтерра [1, 2], для математической экологии классической считается задача описания динамики численности животных [3–8].

В классической физике для построения моделей вещества используются два подхода — термодинамический и подход с позиций статистической физики. Первый подход — феноменологический, он основан на обобщении опытных фактов, в основе которого лежит макроскопическая характеристика температуры, не применимая к отдельным элементам структуры вещества. Второй подход основан на вероятностном агрегировании детального описания элементов вещества с большим числом степеней свободы. Мы рассмотрим феноменологическую модель популяции термо-

динамического типа, в основе которой лежит макроскопическая характеристика размера популяции в единичном биотопе и в которой детализированное описание поведения особей, их питания и размножения, а также поведения их врагов заменены немногочисленными макроскопическими параметрами окружающей среды. Опишем кратко, из какого микроскопического описания была получена эта модель и каковы ее основные свойства.

Успех или неудача моделирования во многом определяются наличием у выбранного объекта «тестирующего эффекта». При моделировании тундровых популяций и сообществ таким тестирующим эффектом обладает динамика численности леммингов (лемминги — своего рода «экологическая дрозофила»): отмечены регулярные пики численности животных, в среднем раз в три-четыре года [9–13], на полуострове Таймыр — раз в три года [9, 13].

Наличие тестирующего эффекта позволяет использовать при моделировании принцип минимальности — использование минимально возможной математической структуры, — который уравновешивается принципами соответствия (экологичности) — привлечением предположений, не противоречащим доступным экологическим данным, и системности — учетом многообразия связей внутри и вне изучаемого объекта. Исходя из тестирующего эффекта, осуществляется выбор методов его математического описания, под которые подбирается информация об объекте, дополненная экспертными оценками.

В настоящей работе рассматривается автономная модель биологической популяции, полученная в рамках комплексных исследований тундровых сообществ, которые включали в себя всю последовательность операций: сбор, отбор, анализ и переработку исходной (биологической) информации с формированием набора взаимосвязанных моделей разной степени детализации на их основе, гипотез о ведущих механизмах исследуемого явления, согласованных с экспертами [14].

В основе *первого этапа* разработки рассматриваемой модели тундровой биологической популяции лежала апробированная математическая модель трофических взаимодействий (обобщение взаимодействия типа «хищник—жертва»).

При этом определяющими факторами являлись: первое — долговременное существование объекта, математически выражаемое в сохранении траекторий в положительном квадранте; второе — наличие релаксационных колебаний по типу «краха», что и позволяет впоследствии использовать одномерные разностные уравнения; третье — наличие определенного порядка чередования пиков.

Биофизический анализ структуры пастбищной (наземной) части тундрового биоценоза позволил на *втором этапе* разработки феноменологической модели автономно рассматривать сообщество «растительность — лемминги — песцы» (более детально биофизический анализ описан в работах [14, 15]).

На *третьем этапе* разработки стремление приблизиться к большему пониманию механизмов формирования динамики численности тундровых животных привело к формированию модели популяции леммингов [9, 15] с учетом возрастной структуры. Она использована для изучения поведения популяций двух видов леммингов Западного Таймыра: сибирского и копытного.

Если при моделировании тундрового сообщества рассматривали некую обобщенную ситуацию, то в случае моделирования популяции леммингов осуществлялась «привязка модели» к конкретному участку тундры, в районе поселка Тарей Западного Таймыра. Модель настраивалась под конкретные данные В.А. Орлова [9], в тесном

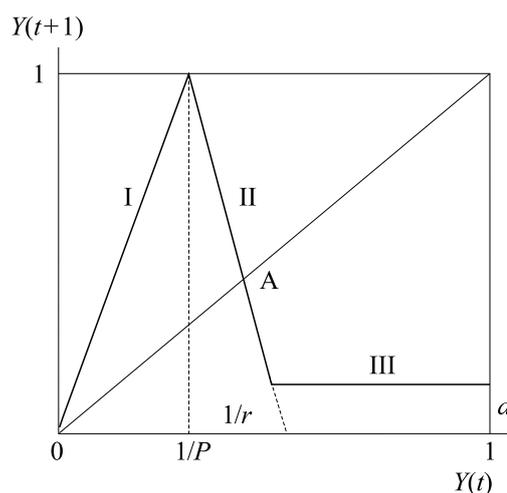


Рис. 1. Функция последования, связывающая относительную численность леммингов за два соседних года.

с ним взаимодействии. В случае недостаточности данных использовали экспертные оценки с привлечением данных по близкородственным видам [9, 15].

Если в случае моделирования тундрового сообщества важнейшим аспектом моделирования являлся поиск необходимой для модели биологической информации, то при моделировании популяции леммингов полностью использовали данные В.А. Орлова [9] по процессам размножения, дополненные информацией по смертности, оцененной по близко родственным видам. Данные, дополненные соответствующими экспертными оценками, были полностью использованы при моделировании. Но это относилось только к сезону размножения. Для описания периода перезимовки данных о популяционных параметрах и характеристиках не было. Единственное, чем мы располагали — это величины численности (плотности) популяций в конце и в начале периода вегетации (бесснежного периода). В связи с этим фундаментальное значение для понимания процессов и способов их формализованного описания имели значения «сезонной функции последования». Эта функция описывает зависимость популяции в следующем году от ее численности в текущем. Пример функции последования, лежащей в основе рассматриваемой в статье модели, приведен на рис. 1. Видовые различия заключены в кривой, описывающей «сезон перезимовки», посредством которой реализуются релаксационные колебания по «типу краха». Описания перезимовки являются определяющими при описании релаксационных колебаний. Для сезона размножения важна только их «интегральная характеристика» — скорость прироста численности за этот период в благоприятный год (когда от-

сутствует плотностное лимитирование). В связи с этим «летние» популяционные параметры (которые только доступны для большинства биологических исследований) играют менее важную роль по сравнению с выживаемостью в период перезимовки. Эти рассуждения позволяют разделить экологические показатели по степени их влияния на суммарную динамику.

На заключительном этапе разработки феноменологической модели анализ результатов вычислительных экспериментов с обеими взаимодополняющими моделями привел к обоснованию упрощенной модели в виде одномерного разностного уравнения (функции последования), связывающего численности леммингов в двух соседних годах.

Отметим, что особая роль функций последования в исследовании колебаний численности популяций тундровых животных привела к поиску более тесной связи функций последования и исходной модели тундрового сообщества «растительность – лемминги – песцы» [14, 15].

Применение комплексного подхода при моделировании тундровых популяций и сообществ [14, 15] позволило сформулировать количественные гипотезы о ведущих (главных, определяющих) механизмах формирования колебаний численности тундровых животных. Как указано выше, ведущим фактором, определяющим эти колебания, является динамика численности популяции леммингов. Эта динамика в свою очередь определяется тремя биолого-экологическими показателями: 1) скоростью прироста биомассы в благоприятный год; 2) максимальной численностью; 3) выживаемостью в наиболее неблагоприятных условиях. Первый показатель характеризует баланс между процессами рождаемости и смертности в отсутствие «давления среды»; второй – характеризует экосистему в целом и отражает коэволюцию леммингов и кормовой базы; третий характеризует адаптационные свойства леммингов в экстремальных условиях и во многом определяется локальными характеристиками, в частности рельефом местности в местах перезимовки. Полученные выводы хорошо согласуются с одной из распространенных гипотез о том, что формирует колебания численности популяций не какой-то отдельно взятый фактор, а некоторая их комбинация [9–13].

Полученные количественные соотношения, связывающие обобщенные показатели с характеристиками динамики численности, могут быть использованы в процедурах оценки параметров реальных популяций, таких как плодовитость, смертность и т.д. Разностные уравнения могут служить простым инструментарием для прогноза возможной численности леммингов и песцов. В то же время для адаптации такого подхода для

изучения различных регионов тундры, для анализа кардинальных изменений ее свойств, в частности вследствие антропогенных воздействий (изменений климата и т.д.), необходимо разработать методы идентификации параметров модели под конкретный биотоп и временной период, а для более детального анализа использовать полную имитационную модель [17]. Настоящая статья посвящена методу калибровки модели.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ. АВТОНОМНАЯ ТРЕХПАРАМЕТРИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ТУНДРОВОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Предложенная в работах [14, 15] модель динамики тундровой популяции основана на следующих упрощенных предположениях, хорошо выполняющихся для популяции леммингов в условиях полуострова Таймыр.

1. Влияние численности хищников (песцов) на популяцию (леммингов) пренебрежимо мало.

2. В условиях достаточной обеспеченности кормом, т.е. растительностью, популяция (леммингов) растет монотонно и линейно. Рост ограничивается запасом растительности. Когда запасы корма снижаются до такого уровня, что не могут обеспечить существующий уровень численности, происходит рост смертности и снижение численности.

3. Существует некий «оптимальный биотоп» для данной популяции, т.е. такое сочетание внешних условий (наличие корма, климатические условия и т.д.), при котором некоторый уровень численности остается постоянным. Это означает, что смертность и рождаемость (точнее, доля выжившего потомства) равны. Понятие «оптимальный биотоп» было введено в работах [14, 15] и подразумевает область пространства обитания с оптимальными условиями проживания.

Таким образом, при недостатке корма снижение численности происходит до достижения размера популяции оптимального биотопа.

Получаем три состояния популяции, каждому из которых соответствует своя область в отображении функции последования (рис. 1).

Первой области соответствует восходящая прямая с угловым коэффициентом P , равным скорости роста, третья область представляет собой горизонтальную прямую, находящуюся на расстоянии d от оси абсцисс. Вторую область определяет нисходящая прямая с угловым коэффициентом r , исходя из следующего соображения: «В предположении слабого влияния вариаций в описании этой зоны на динамику численности популяции опишем переходную зону отрезком прямой, соединяющим первый и третий фрагменты» ([14], с. 106).

Представим разностное уравнение, связывающее нормированную на максимально возможную, т.е. относительную численность популяции

$$F(Y, \lambda) = \begin{cases} PY, & Y \leq 1/P \\ 1 - r(Y - 1/P), & 1/P < Y \leq 1/P + (1-d)/r \\ d, & 1/P + (1-d)/r < Y \leq 1 \end{cases}$$

$Y(t)$ в двух соседних годах, как $Y(t+1) = F(Y(t), \lambda)$, $\lambda = (P, r, d)$, где

Здесь P – прирост биомассы леммингов в благоприятный год; коэффициент r характеризует изменение биомассы леммингов в условиях нехватки кормов в весенний период; величина d – нормированная биомасса леммингов в оптимальном биотопе, λ – вектор трех биолого-экологических параметров, характеризующих основные факторы влияния окружающей среды.

Функция F постоянна при $Y \in [1/P + (1-d)/r, 1]$ и равна d , поэтому величину d будем в дальнейшем называть *ступенькой*. Мы будем рассматривать область параметров λ , где $P, r > 1$ и $0 < d < 1$. Нас, как правило, будет интересовать случай $1/P + (1-d)/r \leq 1$, при невыполнении этого условия будут рассматриваться только решения с $F(Y(t), \lambda) \leq 1$. Отображение (1) имеет единственную нетривиальную стационарную точку A со свойством $A = F(A, \lambda)$. Нетрудно видеть, что при $d \leq 1/P + (1-d)/r$ справедливо $A = (P+r)/(1+rP)$, а при $d > 1/P + (1-d)/r$ выполняется $A = d$.

СВОЙСТВА АВТОНОМНОЙ МОДЕЛИ

При аналитическом и численном исследовании приведенной автономной модели тундрового сообщества основной интерес представляли прежде всего периодические режимы численности популяции (циклы) и их устойчивость при изменении параметров.

Аналитически свойства рассматриваемой модели тундровой популяции были исследованы для различных частных случаев отображения (1): при $P = 2, r = 2, d = 0$ (*треугольное отображение без ступеньки*); $P = 2, r = 2$ (*треугольное отображение со ступенькой*) – однопараметрическое отображение.

Для треугольного отображения без ступеньки в работах [19, 17, 20] получены явные формулы для циклов заданного периода, рассчитано их число, получены соотношения для размеров (ширины) соседних областей, в которых реализуются циклы с удвоенным периодом. Показано, что если при процедуре последовательного увеличения периода циклов возник цикл некоторого периода n , то непосредственно за ним возникают циклы с периодом $n \cdot 2^m$ ($m = 1, 2, 3, \dots$) и внутри последовательности таких циклов нет циклов других периодов. Также показано, что в этом случае между интервалами области параметров, при которых

впервые появляются циклы периодов 4 и 6, находятся все четные циклы.

Треугольное отображение со ступенькой аналитически изучалось в работах [17, 18]. С помощью специально разработанной технологии «линий возврата» проводилось «бифуркационное исследование» – определение циклов, которые возникают по мере опускания ступеньки. Одной из целей этих исследований была проверка условий выполнения теоремы Шарковского [20], точнее, его утверждения о порядке наличия циклов различных периодов. Для треугольного отображения со ступенькой было получено некоторое подтверждение порядков Шарковского и сформулирован ряд утверждений (гипотез) о порядке следования циклов при изменении бифуркационного параметра d . Эти утверждения проверялись с помощью вычислительных экспериментов и, частично, с помощью аналитических выкладок [17, 18].

Свойства трехпараметрической динамической модели с отображением (1) впервые численно исследовались в работе [18]. Были выделены три типа областей в пространстве параметров: зоны стабильности, переходные и аномальные зоны. Было показано, что:

1) при монотонном изменении каждого из параметров последовательно появляются зоны стабильности (периодических траекторий или циклов), которые отделены переходными зонами со сложными режимами;

2) внутри зон стабильности период траекторий постоянный, при переходе от одной зоны стабильности к другой период изменяется в порядке натурального ряда, кратно (в частности, бифуркация удвоения периода), а также и в более сложном порядке изменения периода;

3) в каждой из переходных зон при небольшом изменении параметров период траекторий значительно изменяется (упорядоченный хаос, аналог стохастического поведения);

4) существуют периодические траектории с периодом, большим любого наперед заданного натурального числа, соответствующие так называемым аномальным зонам, в которых траектория, будучи ограниченной, никогда не опускается на ступеньку – аналог «катастрофы голубого неба» («Blue sky catastrophe» [21]).

В работах [17, 22, 23] были исследованы асимптотические свойства траекторий системы, для зон стабильности были построены аттракторы траекторий, исследована их деформация при малом изменении параметров, построены бифуркационные диаграммы для произвольных контуров в пространстве параметров. В частности, в работах [22, 23] был приведен пример построения бифуркационной диаграммы вдоль контура в пространстве параметров, заходящего в аномальную зону, что позволяет рассмотреть случай динамики популяции с учетом временного параметрического дрейфа параметров моделируемого отображения в рамках данного класса в критических климатических условиях. В частности, было показано, что наличие медленных биосферных ритмов, включающих временные периоды с экстремальными для моделируемого сообщества условиями проживания (хаотическая динамика и области «катастрофы голубого неба»), при сохранении «оптимального биотопа» не приводит к вырождению популяции, а экстремальные режимы существования сменяются вполне упорядоченным поведением со структурами в виде популяционных циклов малого периода.

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ АВТОНОМНОЙ МОДЕЛИ ТУНДРОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ НА ДАННЫХ ТЕРРИТОРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Задача идентификации рассматриваемой модели тундровой популяции на данных территориального происхождения заключается в определении вектора биолого-экологических параметров $\lambda = (P, r, d)$ по данным наблюдений за динамикой численностью популяции леммингов на рассматриваемой территории. Предполагается, что рассматриваемая территория содержит в себе единственный оптимальный биотоп популяции. В этом случае, однако, биолого-экологические параметры отображения (1) должны быть дополнены параметрами, характеризующими данную конкретную популяцию — максимально-возможной численностью популяции и ее значением на момент начала наблюдений.

Обозначим через $L^E(t)$, $t = 0, 1, \dots, T$ временной ряд наблюдаемых значений численности популяции. Отображение (1) определяет динамику относительной численности $Y(t)$. Пусть задано начальное состояние относительной численности популяции в момент $t = 0$: $Y(0) = Y_0$. Для заданного значения вектора параметров λ рассмотрим траекторию системы (1), полученную при $Y(0) = Y_0$: $Y(1), \dots, Y(T)$. Обозначим через $L(t)$ абсолютную численность популяции: $L(t) = L_{\max} Y(t)$, где L_{\max} — максимально возможная численность популяции в данном биотопе.

Таким образом, для решения задачи идентификации экологические параметры должны быть дополнены популяционными параметрами L_{\max} и Y_0 .

Если задано значение расширенного вектора параметров $\mu = (P, d, r, L_{\max}, Y_0)$, то, рассчитав по модели ряд $L(t, \mu)$, можно сравнить его с рядом данных $L^E(t)$. Чтобы численно измерить близость расчетного ряда с рядом данных, определим ошибку идентификации на участке времени от T_1 до T_2 , используя показатель среднеквадратичного нормированного отклонения:

$$E(\mu) = \frac{1}{L_{\max}} \left(\frac{\sum_{t=T_1, \dots, T_2} (L(t, \mu) - L^E(t))^2}{(T_2 - T_1 + 1)} \right)^{1/2}.$$

Функция $E(\mu)$, определенная на пространстве расширенных параметров (в данном случае пятимерном), представляет собой свертку погодных ошибок идентификации — отклонений предсказаний модели от наблюдений — и называется *функцией ошибки идентификации*. Могут быть использованы и другие виды свертки погодных ошибок, например, максимальная ошибка за рассматриваемый период.

Задача идентификации модели традиционно формулируется как поиск значения расширенного вектора параметров μ , доставляющего минимум функции ошибок E на некотором множестве допустимых значений вектора параметров M :

$$E(\mu) \rightarrow \min \{ \mu \in M \}.$$

При решении этой задачи в рассматриваемом случае возникают следующие проблемы:

- 1) рассматриваемая модель нелинейна, оптимизируемая функция ошибки не является непрерывной;
- 2) данные рядов являются результатами годового агрегирования территориально распределенных полевых наблюдений в сложных условиях (см. первый раздел работы) и, как правило, имеют низкое качество, особенно при малых численностях популяции, нередко лакуны (пропуски данных) за отдельные годы;
- 3) исследуемый биотоп может занимать значительную территорию с существенно варьирующимися климатическими параметрами окружающей среды.

Указанные особенности задачи идентификации приводят к тому, что сочетания параметров, обеспечивающие глобальный минимум функции ошибки, должны быть дополнительно исследованы на единственность и глобальную устойчивость, и только в случае устойчивости оптимума для некоторого параметра оптимальное значение этого параметра может быть принято в качестве решения задачи идентификации. Для решения

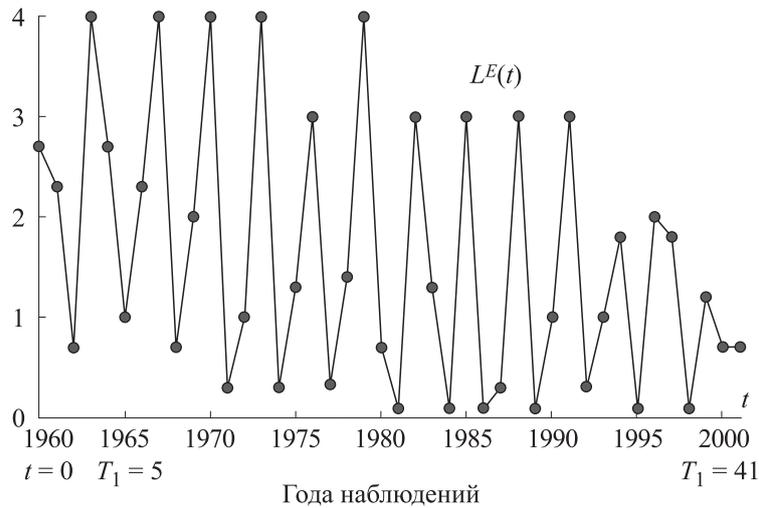


Рис. 2. Оцифрованные данные наблюдений для популяции леммингов полуострова Таймыр.

задач идентификации в условиях неопределенности [24, 25] и плохих данных [26, 27] разработан метод множеств идентификации [28–30], состоящий в аппроксимации методами [31, 32] проекций и срезов многомерного графика функции ошибок с помощью метрических сетей К. Шеннона [33] и визуализации их с помощью диалоговых карт решений [34]. В настоящей работе мы не будем подробно рассматривать эту методологию, ограничившись результатами ее применения для рассматриваемой задачи.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОДЕЛИ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИИ ЛЕММИНГОВ ТАЙМЫРА

Рассмотрим данные работ [13, 23] по популяции леммингов полуострова Таймыр (*Lemmus Dicrostonyx*) за 1960–2001 гг. Это пример данных достаточно высокого качества. Оцифрованный вариант данных представлен на рис. 2 (оригинал см. в работах [13, 35]).

Из рисунка видно, что колебания численности популяции в рассматриваемом биотопе приблизительно соответствуют циклу периода три (максимумы численности достигаются раз в три года), однако в силу различной амплитуды этих максимумов нельзя исключить и вариант более сложного цикла с периодом, кратным трем. Следует также отметить, что характер колебаний численности после 1992 г. существенно отличается. По известным историческим причинам эти данные могут быть существенно худшего качества. По причинам, указанным в первом разделе, наблюдения в окрестности минимума популяции также ненадежны.

Рассмотрим задачу идентификации модели на данных популяции леммингов Таймыра. Выберем $t = 0$ для 1960 г., $T_1 = 5$ (1965 г.), $T_2 = 41$

(2001 г.). Таким образом, первые пять лет наблюдений оставим для «настройки» системы на регулярный режим, ошибки идентификации по ним не включаются в функцию ошибок.

Рассмотрим на некотором множестве параметров M проекцию графика функции ошибок $E(\mu) = E(P, d, r, L_{\max}, Y_0)$ в пространство (P, E) , т.е. множество

$$Z^{PE}(M) = \{(P, E): (P, d, r, L_{\max}, Y_0) \in M, \\ E = E(P, d, r, L_{\max}, Y_0)\}.$$

Аналогично определим множества $Z^{dE}(M)$, $Z^{rE}(M)$, $Z^{L_{\max}E}(M)$ и $Z^{Y_0E}(M)$. Такие множества в подходе [28–30] называются *множествами идентификации*, они аппроксимируются покрытиями К. Шеннона (коллекциями шаров или кубов малого размера) и анализируются визуально.

Выберем наиболее широкий стартовый диапазон возможных значений вектора параметров μ :

$$M_{\infty} = \{(P, d, r, L_{\max}, Y_0): 1 < P < 10, 0 < d < 1, \\ 1 < r < 10, 0 < L_{\max} < 44, 0 < Y_0 < 1\}.$$

Таким образом, согласно определению, в множестве $Z^{PE}(M_{\infty})$ каждому значению параметра P , $1 < P < 10$, соответствует множество точек с различными значениями функции ошибок $E(P, d, r, L_{\max}, Y_0)$ при варьировании всех прочих параметров d, r, L_{\max}, Y_0 : $0 < d < 1, 1 < r < 10, 0 < L_{\max} < 44, 0 < Y_0 < 1$. Множество $Z^{PE}(M_{\infty})$ изображено на рис. 3 справа. Из рисунка видно, что при $1 < P < 10$ существуют такие комбинации значений остальных параметров $((P, d, r, L_{\max}, Y_0) \in M_{\infty})$, что ошибка идентификации E превышает 7 (700%). В то же время имеются решения со значениями ошибки менее 0.3 (30%). Часть множества

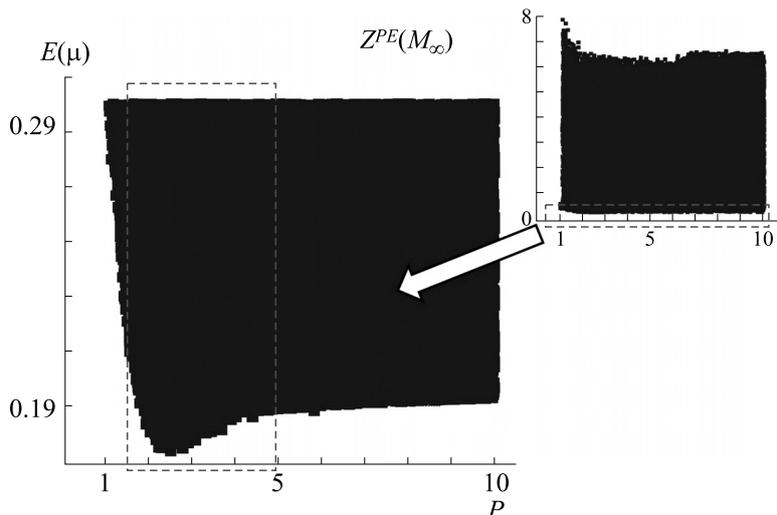


Рис. 3. Множество идентификации, т.е. проекция графика функции ошибок $E(\mu) = E(P, d, r, L_{\max}, Y_0)$, заданного на множестве параметров M_{∞} , в пространство (P, E) (справа) и ее часть с малой ошибкой идентификации (слева).

$Z^{PE}(M_{\infty})$, удовлетворяющая условию $E \leq 0.3$, изображена на рис. 3 слева. Из рисунка видно, что глобальный минимум функции ошибки идентификации находится в диапазоне $1.5 < P < 5$. Для ускорения расчетов на основе визуализации множеств $Z^{dE}(M_{\infty})$, $Z^{rE}(M_{\infty})$, $Z^{L_{\max}E}(M_{\infty})$ и $Z^{Y_0E}(M_{\infty})$ локализуем множество параметров, при которых ошибка идентификации не превышает 0.3:

$$M_{0.3} = \{(P, d, r, L_{\max}, Y_0): 1.5 < P < 5, \\ 0.01 < d < 0.4, 1 < r < 10, 2 < L_{\max} < 12, \\ 0 < Y_0 < 1\}.$$

Множество $Z^{PE}(M_{0.3})$ изображено на рис. 4 справа. Из рисунка видно, что возможна дальнейшая локализация параметра P : $2.3 < P < 3$.

В итоге можно получить следующую локализацию параметров, при которых ошибка идентификации не превышает 0.173:

$$M_{0.173} = \{(P, d, r, L_{\max}, Y_0): 2.4 < P < 3, \\ 0.04 < d < 0.11, 3 < r < 10, 4 < L_{\max} < 6, \\ 0 < Y_0 < 0.63\}.$$

Множество $Z^{PE}(M_{0.173})$ изображено на рис. 4 слева. Глобальный минимум функции ошибок,

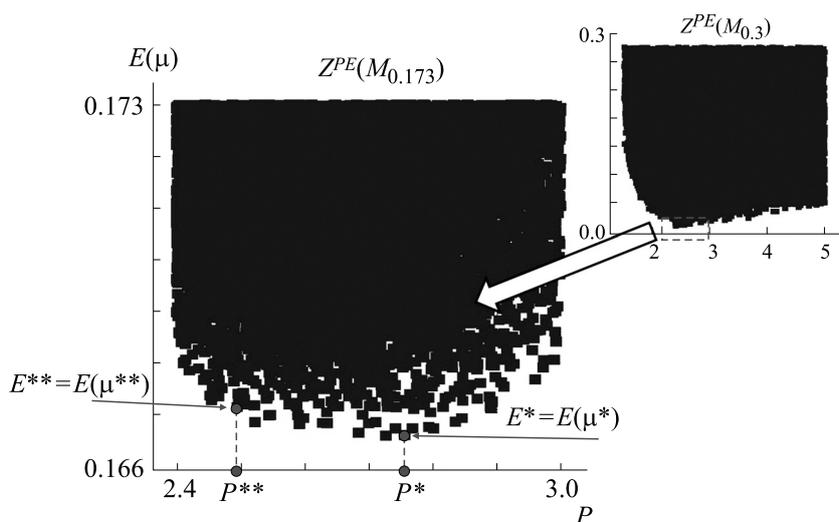


Рис. 4. Множество идентификации, т.е. проекция графика функции ошибок $E(\mu) = E(P, d, r, L_{\max}, Y_0)$, заданного на множествах параметров $M_{0.3}$ (справа) и $M_{0.173}$ (слева), в пространство (P, E) .

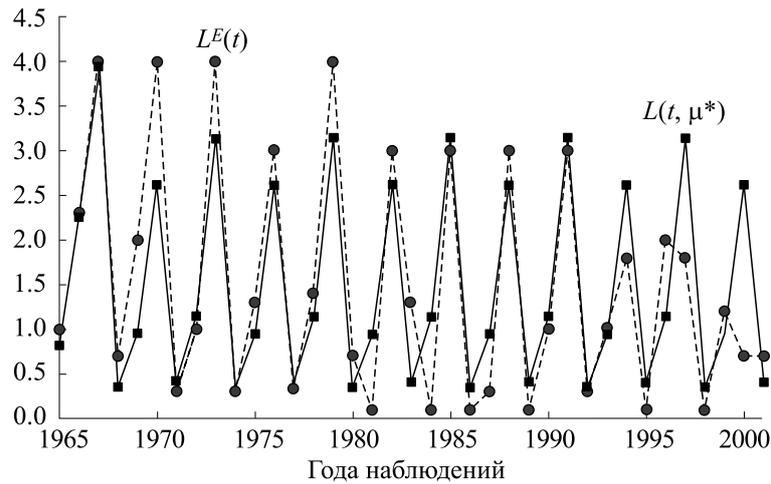


Рис. 5. Данные наблюдений $L^E(t)$ (круглые маркеры) и ряд модели $L(t, \mu^*)$ (квадратные маркеры), откалиброванной сочетанием параметров μ^* с минимальной ошибкой.

находящийся в множестве $M_{0.173}$, равен $E^* = 0.16632$ (16.6%) и соответствует сочетанию параметров μ^* : $P^* = 2.77$, $d^* = 0.0595$, $r^* = 9.93$, $L_{\max}^* = 5.75$, $Y_0^* = 0.0009$ (здесь и далее приводятся округленные значения параметров μ). Соответствующая ему траектория на оптимизируемом периоде от T_1 до T_2 изображена на рис. 5 (пунктиром представлены данные наблюдений). Заметим, что полученное решение представляет собой шестилетний цикл с промежуточным максимумом через три года.

От глобального минимума по величине функции ошибок незначительно (на 1.37%) отличается субоптимальное решение задачи идентификации с $E^{**} = 0.1686$ (16.9%), которое соответствует сочетанию параметров μ^{**} : $P^{**} = 2.49$, $d^{**} = 0.103$,

$r^{**} = 3.82$, $L_{\max}^{**} = 4.40$, $Y_0^{**} = 0.203$. Соответствующая ему траектория изображена на рис. 6 (пунктиром представлены данные наблюдений). Заметим, что, несмотря на очень близкое к глобальному минимуму $E^* = 0.16632$ значение функции ошибок $E^{**} = 0.1686$, полученное решение существенно отличается от него по всем параметрам, кроме P ($P^* = 2.77$, $P^{**} = 2.49$), и представляет собой трехлетний, а не шестилетний цикл.

Дальнейшая локализация глобального минимума невозможна по причине недостаточной точности наблюдений. Кроме того, при малом уровне ошибки (менее 0.17) имеет место замещение параметров P и d , как это видно из рис. 7.

На нем изображено множество $M^{Pd}(0.169)$ пар параметров (P, d) , для которых в множестве $M_{\text{су}}$

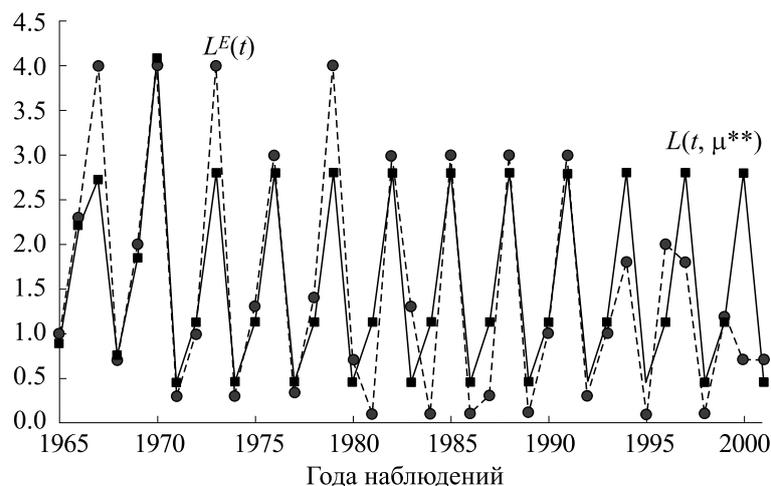


Рис. 6. Данные наблюдений $L^E(t)$ (круглые маркеры) и ряд модели $L(t, \mu^{**})$ (квадратные маркеры), откалиброванной сочетанием параметров μ^{**} с субминимальной ошибкой.

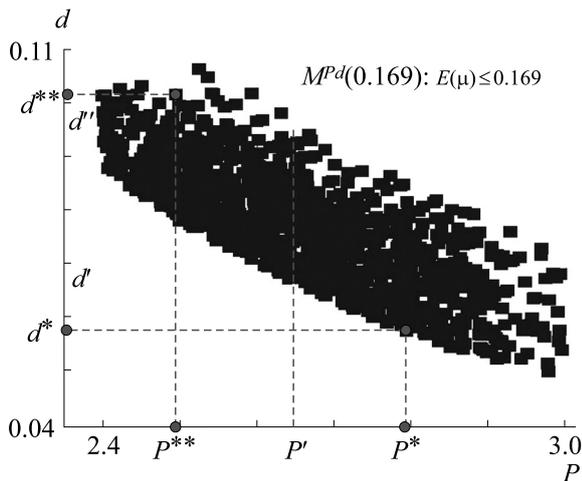


Рис. 7. Множество субоптимальных параметров $M^{Pd}(0.169)$, т.е. проекция графика функции ошибок $E(\mu) = E(P, d, r, L_{\max}, Y_0)$ в пространство (P, d) с ошибкой $E(\mu) \leq 0.169$.

существуют значения вектора параметров μ с ошибкой идентификации $E(\mu)$ не более 0.169 (в то время как минимум ошибки составляет 0.16632), где

$$M^{Pd}(E) = \{(P, d): (P, d, r, L_{\max}, Y_0) \in M, E(P, d, r, L_{\max}, Y_0) \leq E\}.$$

Такие множества в подходе [28–30] называются *множествами субоптимальных параметров*. Ясно, что при построении множества $M^{Pd}(0.169)$ можно вместо зондирования всей области возможных значений параметров M_∞ ограничиться множеством $M_{0.173}$, построенном на предыдущих этапах.

В приведенном на рис. 7 множестве $M^{Pd}(0.169)$ отличие по уровню ошибки от глобального минимума не превышает 0.002 (0.2%), при этом параметр P варьируется от 2.4 до 3.0, а параметр d — от 0.05 до 0.11. Между калибровочными параметрами P и d в этом случае имеется некоторая обратная связь — каждому значению P соответствует небольшой, смещающийся диапазон значений d (например, на рис. 7 для P' — между d' и d''). Этот диапазон смещается вниз с увеличением значения P . В таком случае для дальнейшей локализации этих параметров требуется внешняя *экспертная оценка* одного из этих параметров. В рассматриваемом случае это может быть следующее соображение. Как правило, данные наблюдений на минимуме численности популяции (вблизи ступеньки d) существенно занижены (зверьков отловить достаточно сложно). Поэтому среди различных решений задачи идентификации предпочтительно выбирать решения с большим значением d (вариант μ^{**} предпочесть варианту μ^*).

Итак, проведенный анализ позволяет в качестве решения задачи идентификации модели популяции леммингов полуострова Таймыр принять значения параметров $P^{**} = 2.49$, $d^{**} = 0.103$, $r^{**} = 3.82$, с интервальной оценкой $P = 2.5 \pm 0.5$, $d = 0.08 \pm 0.03$, при этом локализация параметра r является неустойчивой.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОДЕЛИ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИИ ЛЕММИНГОВ ТАЙМЫРА ПРИ ИЗМЕНЯЮЩЕМСЯ ВО ВРЕМЕНИ БИОТОПЕ

Мы подробно рассмотрели процесс калибровки модели на данных по конкретному территориальному биотопу для одного периода времени, на котором параметры окружающей среды были вы-

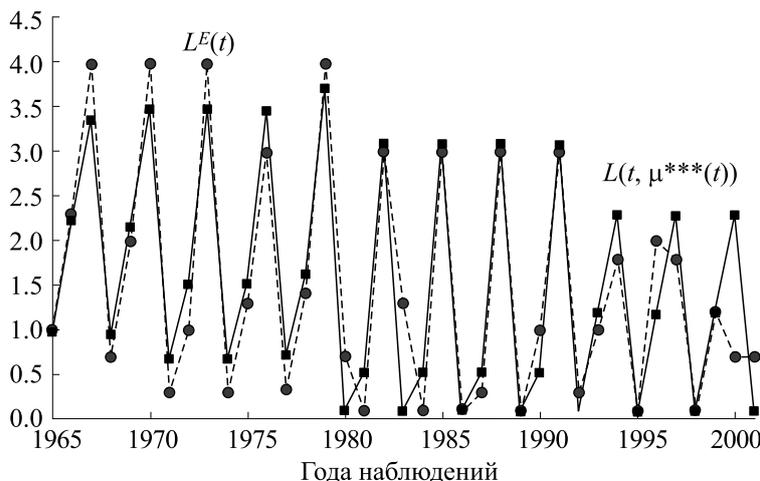


Рис. 8. Данные наблюдений $L^E(t)$ (круглые маркеры) и ряд модели $L(t, \mu^{***}(t))$ (квадратные маркеры), откалиброванной сочетанием параметров $\mu^{***}(t)$ с минимальной ошибкой.

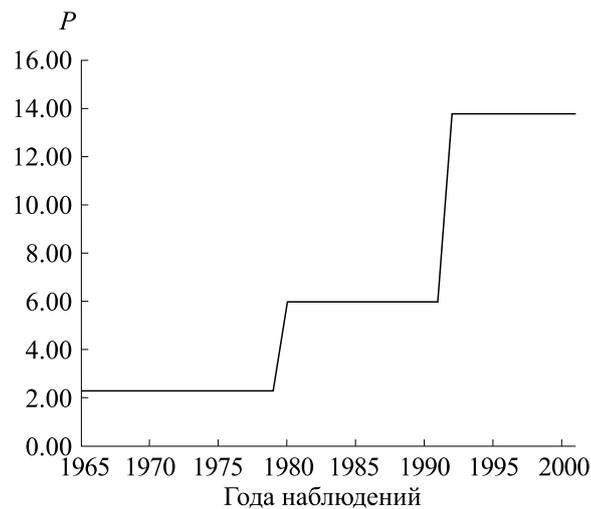


Рис. 9. Зависимость оптимального значения параметра P от времени.

браны постоянными. Вместе с тем результаты последних исследований популяций леммингов по всему миру [39] свидетельствуют об изменении характера колебаний численности, возможно в силу изменения климатических условий. Как уже было указано выше, рассматриваемый в настоящей статье период может быть достаточно надежно разделен на три этапа с весьма различным характером колебания численности. Приведенная выше технология может быть использована для калибровки автономной модели при допущении изменения одного или нескольких параметров окружающей среды. На рис. 8 приведен результат варьирования параметра P , определяющего скорость прироста популяции, обусловленного, в частности, климатическими показателями. Переключения этого параметра происходят в 1980 и 1992 годах (см. рис. 9).

Если говорить более подробно, в данном случае ошибка идентификации $E^{***} = 0.123$ (12.3%) при параметрах $P^{***}(t) = 2.28$ для $t < 1980$, $P^{***}(t) = 5.98$ для $t < 1992$, $P^{***}(t) = 13.8$ для $t > 1991$, $d^{***} = 0.0207$, $r^{***} = 2.12$, $L_{\max}^{***} = 4.17$, $Y_0^{***} = 0.756$. Таким образом, варьирование параметра P (прирост биомассы леммингов в благоприятный год) позволяет на 4% снизить ошибку идентификации и значительно качественно улучшить соответствие модели данным наблюдений. Интересно отметить, что полученное решение характеризуется монотонным увеличением этого параметра. Заметим, что согласно работе [37] повышение этого параметра коррелирует с повышением абсолютного максимума температуры в регионе. Более подробное рассмотрение этого вопроса выходит за рамки данной статьи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы подробно рассмотрели технологию идентификации автономной трехпараметрической модели популяции на данных достаточно высокого качества. Нелинейность и отсутствие непрерывности в рассматриваемом критерии минимума функции ошибок приводит к необходимости применения особых технологий метода множеств идентификации с изучением устойчивости и привлечением экспертных оценок в случае наличия замещения параметров на минимуме критерия ошибки. При этом оказалось возможным устойчиво локализовать только часть параметров модели. В случае данных с лагунами (отсутствием данных по ряду годов) или низкого качества (с большими ошибками наблюдений) решение может быть значительно более неустойчивым и плохо локализованным. В работах [26, 27] рассмотрены примеры идентификации популяций леммингов на данных по ряду территорий России, полученных в 1970-х годах непосредственно от охотоведов [36]. Рассмотрение этого вопроса выходит за рамки настоящей статьи, однако заметим, что и в этом случае удается достаточно хорошо локализовать параметр модели P , характеризующий прирост биомассы леммингов в благоприятный год. Этот результат, а также пример идентификации популяции на полуострове Таймыр, проведенный в настоящем исследовании, позволяет рассматривать вопрос о привязке параметров автономной динамической трехпараметрической модели популяции биотопа к территориальным климатическим характеристикам окружающей среды (см. работу [37]), что в свою очередь позволяет оценить влияние на популяцию климатических изменений, в том числе антропогенного характера, а также больших биосферных ритмов (см. работы [22, 23, 38]).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Вольтерра, *Математическая теория борьбы за существование* (Наука, М., 1976).
2. A. J. Lotka, *Elements of Physical Biology* (Williams and Wilkins, Baltimor, 1925).
3. P. Turchin, *Complex Population Dynamics: a Theoretical/empirical Synthesis* (Princeton University Press, Princeton, Oxford, 2003).
4. А. Н. Колмогоров, в сб. *Проблемы кибернетики* (Наука, М., 1972), вып. 25, сс. 100–106.
5. Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, *Математические модели биологических продукционных процессов* (Изд-во МГУ, М., 1993).
6. Ю. М. Свиричев и Д. О. Логофет, *Устойчивость биологических сообществ* (Наука, М., 1978).
7. А. Д. Базыкин, *Математическая биофизика взаимодействующих популяций* (Наука, М., 1985).
8. С. В. Фомин и М. Б. Беркенблит, *Математические проблемы в биологии* (Наука, М., 1973).
9. В. А. Орлов, Д. А. Саранча и О. А. Шелепова, *Экология* **2**, 43 (1986).
10. F. A. Pitelka and G. O. Batzli, *Acta Theriol.* **52** (3), 323 (2007).
11. Ф. Б. Чернявский, *Природа*, № 10, 34 (2002).
12. О. Ф. Садыков и И. Е. Бененсон, *Динамика численности мелких млекопитающих: концепции, гипотезы, модели* (Наука, М., 1992).
13. T. Oksanen, L. Oksanen, J. Dahlgren, et al., *Evol. Ecol. Res.* **10**, 415 (2008).
14. В. Н. Глушков и Д. А. Саранча, *Автоматика и телемеханика* **2**, 94 (2013).
15. Д. А. Саранча, *Количественные методы в экологии. Биофизические аспекты и математическое моделирование* (МФТИ, М., 1996).
16. В. А. Костицын, *Эволюция атмосферы, биосферы и климата* (Наука, М., 1984).
17. Г. К. Каменев, Н. А. Лысенко, О. П. Люлякин и др., *Использование методов математического моделирования для анализа экологических объектов* (ВЦ РАН, М., 2015).
18. Э. В. Недоступов, Д. А. Саранча, Е. Н. Чигерев и др., *Докл. РАН* **430** (1), 23 (2010).
19. Н. В. Белотелов, И. В. Дмитриева и Д. А. Саранча, в сб. *Биомоделирование*, под ред. Ю. П. Иванилова (ВЦ РАН, М., 1993), сс. 111–154.
20. G. K. Kamenev, O. P. Lyulyakin, D. A. Sarancha, et al., *Russ. J. Numer. Anal. Math. Modelling* **31** (5), 253 (2016).
21. Yu. Pyashenko and W. Li, *Nonlocal bifurcations* (Amer. Math. Society, Providence, R.I., 1999).
22. Г. К. Каменев, *Труды Института системного анализа РАН* **68** (2), 26 (2018).
23. Г. К. Каменев, Д. А. Саранча и В. О. Поляновский, *Биофизика* **63** (4), 758 (2018).
24. Г. К. Каменев, *Математическое моделирование* **22** (9), 116 (2010).
25. Г. К. Каменев, *Метод исследования неопределенности, возникающей при идентификации параметров моделей* (ВЦ РАН, М., 2010).
26. Г. К. Каменев, в сб. *Труды отдела математического моделирования экономических систем ВЦ ФИЦ ИУ РАН*, под ред. И. Г. Поспелова (ФИЦ ИУ РАН, М., 2017), сс. 94–142. DOI: 10.13140/RG.2.2.33808.46086
27. Г. К. Каменев, в сб. *Труды IX Московской межд. конф. по исследованию операций (ORM2018)*, под ред. Ф. И. Ерешко (МАКС Пресс, М., 2018), т. 2, сс. 175–179.
28. Г. К. Каменев, *Докл. РАН* **359** (3), 319 (1998).
29. Г. К. Каменев, *Журн. вычисл. математики и мат. физики* **56** (11) 1872 (2016). DOI: 10.7868/S0044466916110089
30. Г. К. Каменев, *Мат. моделирование* **29** (8), 29 (2017).
31. Г. К. Каменев и Д. Л. Кондратьев, *Мат. моделирование* **4** (3), 105 (1992).
32. Г. К. Каменев, *Журн. вычисл. математики и мат. физики* **41** (11), 1751 (2001).
33. К. Шеннон, *Математическая теория связи (1948), приложение 7. В кн. К. Шеннон, Работы по теории информации и кибернетике* (ИЛ, М., 1963).
34. A. V. Lotov, V. A. Bushenkov, and G. K. Kamenev, *Interactive Decision Maps. Approximation and Visualization of Pareto Frontier* (Kluwer Acad. Publ., Boston, 2004).
35. Y. I. Kokorev and V. A. Kuksov, *Ornis Suecica* **12** (3), 139 (2002).
36. Л. М. Шиляева, *Частное сообщение* (ВНИИ Охотоведения и звероводства, Киров, 1978).
37. Г. К. Каменев, Д. А. Саранча и В. О. Поляновский, в сб. *Моделирование коэволюции природы и общества: проблемы и опыт. К 100-летию со дня рождения академика Н.Н. Моисеева*, под ред. И. Г. Поспелова (ФИЦ ИУ РАН, М., 2017), сс. 327–335.
38. Г. К. Каменев, в сб. *Моделирование коэволюции природы и общества: проблемы и опыт. К 100-летию со дня рождения академика Н.Н. Моисеева*, под ред. И. Г. Поспелова (ФИЦ ИУ РАН, М., 2017), сс. 315–326.
39. D. Ehrlich, N. M. Schmidt, G. Gauthier, et al., *J. Human Environ.* **49**, 786 (2020). DOI: 10.1007/s13280-019-01198-7

On Calibration of an Autonomous Model of Tundra Biological Population of Lemmings

G.K. Kamenev*, **D.A. Sarancha***, and V.O. Polyanovsky**

**Dorodnicyn Computing Centre, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 44/2, Moscow, 119333 Russia*

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

The paper presents an autonomous model of the biological population of lemmings of a phenomenological type, designed in complex studies of tundra communities. In the model, the dynamics of a population is described through a difference equation relating the population in two neighboring years that depends on three parameters of the biological and ecological genesis. The combination of parameter values included in the equation under consideration determines a class of one-dimensional unimodal mappings of a dynamical system in which the bifurcation properties, asymptotics, and stability of trajectories were analytically and numerically studied. In this paper the main focus is made on model identification criterion. The method of identification sets is proposed to be used for calibration of the model. The identification sets method is based on the approximation and visualization of small-dimensional projections of a multidimensional graph of the error function given in the space of three environmental and two population parameters. This paper describes a case study of model identification using data on the tundra lemming population on the Taimyr Peninsula. It is shown that in this case two biological and ecological parameters allow for stable location distribution.

Keywords: biological population, discrete mapping, population dynamics, cyclicity, stability, identification sets method

УДК .043:57.02:612.01

ВЛИЯНИЕ ОБЕДНЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ ПИТЬЕВОГО РАЦИОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИИ ГИПОКСИИ

© 2020 г. С.В. Козин*, **, А.А. Кравцов**, Э.И. Злищева*, Л.В. Шурыгина*, В.В. Мальшко**, ***, А.В. Моисеев****, А.А. Елкина*, **, М.Г. Барышев**

*Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149
E-mail: kozinsv85@mail.ru

**Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, просп. Чехова, 41
E-mail: aakravtsov@mail.ru

***Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, 350063, Краснодар, ул. Седина, 4
E-mail: intro-2@rambler.ru

****Кубанский государственный аграрный университет, 350004, Краснодар, ул. Калинина, 13
E-mail: moiseew_a@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.01.2020 г.

После доработки 30.01.2020 г.

Принята к публикации 07.08.2020 г.

Исследовано влияние длительного (в течение 42 суток) введения в рацион крыс обедненной по дейтерию воды на функциональное состояние центральной нервной системы в условиях нормы и нормобарической гипоксии с гиперкапнией. Установлено также, что применение обедненной по дейтерию воды как в условиях нормы, так и до стрессового воздействия способствует значительному снижению эмоциональной тревожности животных. Длительное применение обедненной по дейтерию воды до гипоксического воздействия (воздействие амнезирующего фактора) способствует сохранению обучаемости и памяти на уровне контроля, т.е. оказывает выраженный протективный антиамнестический эффект. В норме обедненной по дейтерию воды влияния на обучаемость животных не оказывает.

Ключевые слова: обедненная по дейтерию вода, крысы, гипоксия, анксиолитический эффект, антиамнестический эффект.

DOI: 10.31857/S0006302920060198

Как известно, одним из ведущих факторов гибели нервных клеток при тяжелом гипоксическом воздействии является развитие окислительного стресса, который характеризуется повышенным образованием свободных радикалов и снижением активности антиоксидантной системы [1–3]. Индукция активных форм кислорода и дальнейшая активация свободнорадикального окисления становится причиной повреждения биомолекул — нуклеиновых кислот, белковых молекул и полисахаридов, а также нарушения межклеточных и внутриклеточных сигнальных процессов [4–9]. Даже непродолжительные периоды ишемии или тяжелой гипоксии могут приводить к повреждению областей мозга с сопутствующим неврологическим дефицитом и поведенче-

ской дисфункцией. В настоящее время установлено, что окислительный стресс играет важнейшую роль в нейродегенеративных процессах, наблюдающихся при инсультах и инфарктах мозга, черепно-мозговых травмах, а также ряде нейродегенеративных заболеваний [10–16]. Иначе говоря, вызывая каскад необратимых метаболических изменений в мозговых структурах, гипоксия нарушает целый ряд процессов, что проявляется в том числе, в нарушении функционального состояния центральной нервной системы (ЦНС) [17, 18].

Повреждение и гибель нейронов при ишемии — многофакторный процесс, включающий множество взаимозависимых звеньев, таких как дефицит кислорода (гипоксия), энергетический дефицит, деполяризация мембраны, нарушение ионного гомеостаза, гиперактивация рецепторов возбуждающих аминокислот, поступление кальция в нейрон,

Сокращения: ЦНС — центральная нервная система, ОДВ — обедненная по дейтерию вода, ПКЛ — тест «приподнятый крестообразный лабиринт».

избыточное образование активных форм кислорода, тканевой ацидоз [19, 20]. В качестве механизмов формирования антигипоксического эффекта фармакологическими средствами рассматривается возможность их влияния на метаболические процессы и функциональное состояние ЦНС.

В этой связи разработка и исследование возможностей применения новых фармакологических средств, препятствующих чрезмерному накоплению радикалов и поддерживающих собственную антиоксидантную систему организма, является весьма актуальным. Несомненный интерес для изучения представляют средства с антиоксидантным действием, поскольку они позволяют обеспечить защиту нейронов от действия универсальных повреждающих факторов, лежащих в основе большинства нейродегенеративных заболеваний [21, 22].

В связи с этим в качестве одного из возможных механизмов коррекции метаболических и функциональных нарушений ЦНС рассматривается применение воды с модифицированным изотопным составом — обедненной дейтерием.

К настоящему времени установлено, что введение в рацион животных обедненной по дейтерию воды (ОДВ) приводит к снижению концентрации дейтерия в плазме крови и тканях различных органов, в том числе головного мозга [23–27]. При этом изменение баланса дейтерия из-за замещения дейтерия на протий может оказывать влияние на многие биологические процессы [28]. Как показали исследования, уменьшение концентрации дейтерия в организме повышает активность антиоксидантных и антигипоксических систем [29, 30] и оказывает влияние на функциональное состояние ЦНС. Так, потребление ОДВ положительно влияет на стрессоустойчивость и уровень тревожности лабораторных животных при действии продолжительного стресс-фактора, уменьшает тревожность в незнакомой окружающей среде [31], способствует улучшению долговременной памяти, стимулирует исследовательское поведение [32, 33].

В этой связи представлялось целесообразным изучить в эксперименте влияние ОДВ на окислительные процессы в головном мозге и функциональное состояние ЦНС в условиях гипоксии.

Целью данной работы являлось исследование влияния применения ОДВ на уровень тревожности и обучение крыс в условиях нормоксии и острой гиперкапнической гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ОДВ (50 ppm), произведенную на установке, разработанной в Кубанском государственном университете [34, 35]. Физиологически полноценную воду с концентраци-

ей дейтерия 50 ppm получали путем добавления в нее минеральных солей (в мг/л: общая минерализация — 314–382, гидрокарбонаты — 144–180, сульфаты <1, хлориды — 60–76, кальций — 6, магний — 3, натрий — 50–58, калий — 50–58). В качестве стандартизованной питьевой воды с природной концентрацией дейтерия (150 ppm) использовали дистиллированную воду с аналогичной минерализацией. Животных содержали в виварии при естественном освещении, свободном доступе к пище и воде.

Эксперимент выполнен на 28 крысах-самцах линии Wistar в возрасте два с половиной месяца (массой от 240 до 270 г). Влияние ОДВ на функциональное состояние ЦНС определяли в условиях нормоксии (без воздействия гипоксии) и через одни сутки после гипоксического воздействия.

Острую гипоксию с гиперкапнией моделировали у крыс, помещая их в герметичные сосуды емкостью 1 л. Животные находились в таких условиях до появления первого агонального вдоха. После этого крыс извлекали и помещали в стандартные клетки [36].

Эксперименты проводили в первой половине светового дня. Животные были разделены на четыре группы по семь животных в каждой:

— группа 1 (контроль) — интактные крысы, получавшие в рационе воду с концентрацией дейтерия, равной естественной (150 ppm), в течение шести недель, без гипоксического воздействия;

— группа 2 — крысы, получавшие в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, без гипоксического воздействия;

— группа 3 — крысы, получавшие в рационе воду с концентрацией дейтерия, равной естественной (150 ppm), в течение шести недель, на 43 сутки эксперимента подвергнутые острой гипоксии;

— группа 4 — крысы, получавшие в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, на 43 сутки эксперимента подвергнутые острой гипоксии.

Функциональное состояние ЦНС животных исследовали в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Т-образный лабиринт» [37, 38]. В тесте ПКЛ оценивали состояние тревожности экспериментальных животных. Приподнятый крестообразный лабиринт с рукавами длиной 90 см имел два открытых и два закрытых рукава, высота стенок 15 см. Учитывали число заходов в закрытые и открытые рукава лабиринта, стойки, свешивания с открытых рукавов, груминг, а также время пребывания в закрытых и открытых рукавах и в центре лабиринта. Все показатели регистрировали в течение пяти минут наблюдения. Оценку тревожного статуса крыс проводили в тесте ПКЛ. Выработку условного рефлекса с положительным подкреплением оценивали в тесте с Т-образным лабиринтом и с положительным пищевым подкреплением. Как из-

вестно, потребление пищи и воды — наиболее тщательно изученные формы поведения, в связи с этим они служат основной моделью мотивированного поведения [37].

Результаты воздействия длительного приема ОДВ на выработку условного рефлекса с положительным пищевым подкреплением у крыс после воздействия гипоксии оценивали в сравнении с крысами, не подвергавшимися гипоксическому воздействию. Контролем служила группа интактных крыс, принимавших стандартизованную питьевую воду. После приучения животных к лабиринту вырабатывали навык чередования право- и левосторонних побегок на положительном подкреплении. Пищевое подкрепление (хлебные шарики) оставляли поочередно в кормушках правого и левого рукава. Для повышения мотивации обучение проводили на фоне пищевой депривации. Крыс, подвергавшихся 48-часовой пищевой депривации, помещали в стартовый отсек Т-образного лабиринта, в одном из рукавов которого располагалась кормушка с пищей. Через 30 с после посадки крыс открывали дверцу стартового отсека. Щелчок открывания дверцы служил условным раздражителем. Учитывали следующие показатели: процент правильных побегок, время выполнения условно-рефлекторной реакции (время между выходом из стартовой камеры и взятием пищи либо время выполнения неправильной побегки). В течение четырех суток обучения для выработки навыка двустороннего чередования право- и левосторонних побегок каждое животное совершало по 20 побегок. Затем через двое суток проверяли сохранение памятного следа. Данные побегок усредняли за каждый день.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10: для проверки гипотезы равенства медиан при множественном сравнении нескольких независимых выборок использовали *H*-критерий Краскела—Уоллиса; для оценки достоверности различий количественных параметров между двумя независимыми малыми выборками применяли непараметрический *U*-критерий Манна—Уитни; для проверки различий между двумя малыми выборками с парными измерениями применяли *W*-критерий Уилкоксона. Достоверными считали различия между выборками при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты изучения влияния воды с модифицированным (D/H) изотопным составом (50 ppm) на тревожность крыс в нормальных условиях и после воздействия гипоксии с гиперкапнией в тесте ПКЛ показали, что через сутки после гипоксии (рис. 1) у крыс, принимавших воду с природным содержанием дейтерия (группа 3), на-

блюдался более высокий в сравнении с животными в группе 1 (контроль) уровень тревоги, что проявлялось в снижении числа заходов в закрытые рукава на 37.5%, снижении числа стоек на 46.7%, отсутствии свешиваний с открытых рукавов лабиринта. Животные группы 3 меньше времени (на 66.7%) находились в центре и более длительный период времени в закрытых рукавах. В открытые рукава они не заходили, а контрольные животные (группа 1) провели в них менее 2% времени (4 с).

У крыс группы 4 (50 ppm, гипоксия) отмечалась значительно менее выраженная тревожность в сравнении с группой 3 (150 ppm, гипоксия). Так, крысы, получавшие ОДВ и подвергшиеся гипоксии, больше времени находились в центре и меньше — в закрытых рукавах ($p < 0,05$). У этих животных отмечалась более высокая исследовательская активность (число стоек было выше на 41.2%), более низкая частота груминга (на 73.3%), наблюдались свешивания. В открытые рукава они не заходили, как и крысы группы 3.

У животных группы 2 (50 ppm) практически по всем показателям уровень тревоги был достоверно ниже, чем у контрольных животных.

Таким образом, анализ поведенческих реакций через сутки после воздействия гипоксии с гиперкапнией в тесте ПКЛ показывает, что у крыс, принимавших воду с природным содержанием дейтерия и подвергшихся гипоксическому воздействию, отмечается высокий уровень тревожности. Длительное (в течение 42 суток) применение ОДВ как в условиях нормы, так до гипоксии способствует значительному снижению эмоциональной тревожности животных.

Исследование влияния воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) на выработку условного рефлекса с положительным подкреплением у крыс в условиях нормы и гипоксии с гиперкапнией в Т-образном лабиринте (рис. 2) показало, что ОДВ в норме не оказывает влияния на обучаемость животных. Число правильных побегок в группе 2 (50 ppm) во все дни обучения практически не отличалось от таковых в контроле. Достоверно ниже (на 23%), чем в контроле, в первый день обучения было число правильных побегок у животных группы 3 (150 ppm, гипоксия). На второй день обучения процент правильных побегок в этой группе хотя и повысился до 57%, однако был ниже, чем в контроле (68%). Тенденция к повышению обучаемости крыс в группе 3 (150 ppm, гипоксия) отмечалась и в последующие дни. На четвертый день обучения процент правильных побегок практически не отличался от контроля, в то время как в группе 4 (50 ppm, гипоксия) число правильных побегок во все дни исследования находилось на уровне контроля (группа 1), при этом

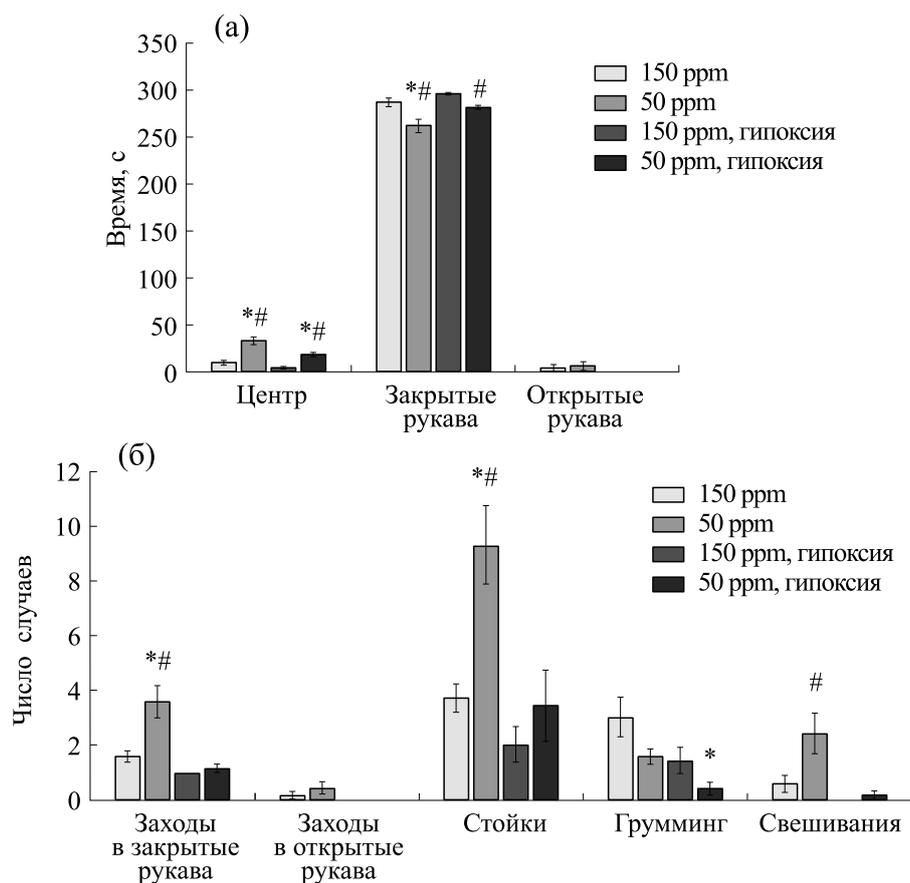


Рис. 1. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на тревожность крыс в нормальных условиях и через сутки после гипоксии в тесте ПКЛ. (а) – Время нахождения в центре, закрытых и открытых рукавах. (б) – Число заходов в закрытые и открытые рукава, стойки, свешиваний, случаев груминга. Данные представлены $M \pm m$; * – $p < 0.05$, по сравнению с группой 1 (контроль), # – $p < 0.05$ в сравнении с группой 3 (150 ppm, гипоксия).

в первый день оно достоверно превышало таковое в группе 3.

Кроме того, в группе 3 (150 ppm, гипоксия) (рис. 3) наблюдались выраженные отличия и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции. Так, несмотря на то, что в первый день обучения у всех животных время выполнения условно-рефлекторной реакции было самым длительным, в группе 3 (150 ppm, гипоксия), оно достоверно превышало (на 66.7%) таковое в контрольной группе и на 52.7% в группе крыс, получавших воду с содержанием дейтерия 50 ppm и подвергнутых гипоксии (группа 4). Хотя время выполнения условно-рефлекторной реакции с каждым днем постепенно сокращалось во всех группах, тем не менее в группе 3 с первого по третий день обучения оно было более длительным, чем в контроле, и достоверно более продолжительным, чем в группе 4. И только на четвертый день обучения время выполнения условно-рефлекторной реакции во всех группах практически не стало отличаться от контроля (группа 1).

Через двое суток после окончания обучения у всех животных сохранились навыки условно-рефлекторной реакции двустороннего чередования право- и левосторонних побегов, при этом существенных отличий между группами не было. Не было отличий и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции.

Таким образом, установлено, что длительное применение ОДВ в норме не оказывает влияния на обучаемость животных, в то время как применение ее до гипоксического воздействия (воздействие амнезирующего фактора) способствует сохранению обучаемости и памяти на уровне контроля, т.е. оказывает выраженный протективный антиамнестический эффект.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как указывалось выше, индукция активных форм кислорода и дальнейшая активация свободнорадикального окисления при ишемии/гипоксии становится причиной повреждения биомолекул – нуклеиновых кислот, белковых молекул и

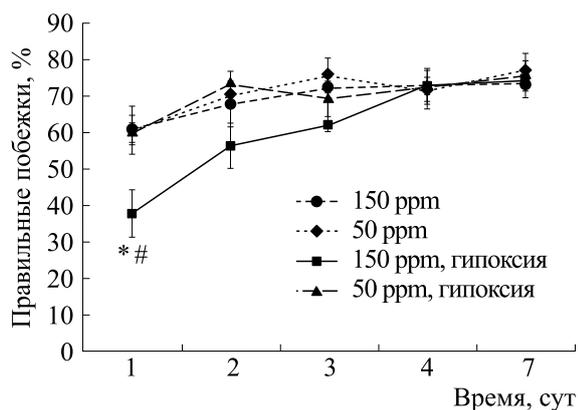


Рис. 2. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) в норме и при воздействии гипоксии на % правильных побегов в тесте с Т-образным лабиринтом. Данные представлены в виде $M \pm m$; * – $p < 0.05$ при сравнении с группой «150 ppm», # – $p < 0.05$ – при сравнении с группой «150 ppm, гипоксия».

полисахаридов, а также изменения интегративных межклеточных и внутриклеточных сигнальных процессов [4, 7]. При этом даже непродолжительные периоды ишемии или тяжелой гипоксии могут приводить к повреждениям областей мозга с сопутствующим неврологическим дефицитом и поведенческой дисфункцией, т.е., вызывая каскад необратимых метаболических изменений в мозговых структурах, гипоксия нарушает целый ряд процессов, в том числе и поведенческих [18]. Перспективными в фармакотерапии ишемии мозга считаются препараты с антиоксидантными свойствами [4]. Как показали результаты исследования, в головном мозге крыс при стрессовом воздействии отмечается усиление окислительных процессов. Введение в рацион крыс воды с модифицированным (D/H) изотопным составом до гипоксического воздействия препятствует развитию окислительных процессов в головном мозге. Все изучаемые показатели – уровень СРО, содержание МДА и активность каталазы – остаются на уровне контроля.

Известно также, что гипоксия вызывает значительные нарушения поведенческих реакций животных: оказывает амнестический эффект, повышает эмоциональную тревожность, снижает ориентировочно-исследовательскую активность [36, 39]. Результаты исследования поведенческих реакций в тестах ПКЛ и «Т-образный лабиринт» показали, что длительное применение ОДВ до гипоксического воздействия вызывает снижение эмоциональной тревожности у крыс, положительно влияет на ориентировочно-исследовательскую деятельность, способствует сохранению обучаемости и памяти на уровне контроля, т. е.

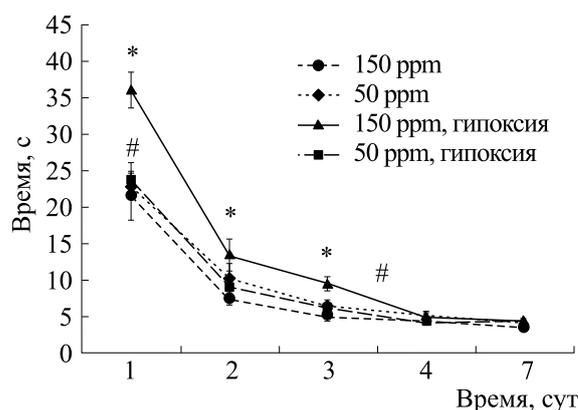


Рис. 3. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) на время выполнения условно-рефлекторной реакции в тесте с Т-образным лабиринтом. Данные представлены в виде $M \pm m$; * – $p < 0.05$ при сравнении с группой «контроль», # – $p < 0.05$ для группы «50 ppm, гипоксия» в сравнении с группой «150 ppm, гипоксия».

оказывает выраженный анксиолитический и протективный антиамнестический эффект.

Ранее установлено, что длительное потребление ОДВ вызывает снижение соотношения D/H в тканях головного мозга крыс и стимулирует его антиоксидантный потенциал [40]. Известно также, что окислительный стресс нарушает когнитивные функции ЦНС [41]. Полагаем, что обнаруженные нами анксиолитический и антиамнестический эффекты потребления ОДВ во многом определяются замещением дейтерия на протий в тканях головного мозга крыс и влиянием этого замещения на антиокислительные системы головного мозга, что приводит к повышению резистентности к развитию окислительного стресса.

Полагаем, что влияние потребления ОДВ на метаболические процессы может быть обусловлено изотопным замещением (D/H) в активных и аллостерических центрах ферментов, а также замещением молекул HDO на H₂O в гидратной оболочке белков и нуклеиновых кислот [42]. Избирательные изменения в активных и аллостерических центрах ферментов, связанные с обменом изотопов водорода в составе легкодиссоциирующих групп (гидроксильных (–OH), тиоловых (–SH), первичных и вторичных аминогрупп (–NH₂, =NH)), увеличивающие содержание протия, могут изменять скорость каталитических процессов за счет снижения энергии активации переходных состояний молекулы в ходе осуществления реакций биокатализа [42].

Кроме того, изменение изотопного D/H-состава тканей и биологических жидкостей может способствовать изменению функционального состояния организма, связанного с развитием общих неспецифических адаптационных реакций,

которые развиваются в ответ на действие любого эндогенного или экзогенного фактора [43]. Этот эффект также может быть одним из механизмов, обеспечивающих анксиолитическое и антиамнестическое действие ОДВ при длительном ее потреблении.

Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности применения ОДВ в качестве антиамнестического и анксиолитического фармакологического средства и необходимости проведения дальнейших исследований механизмов ее действия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-44-233005) и Государственного задания ЮНЦ РАН (№ АААА-А19-119040390083-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности и в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава РФ № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» от 23.08.2010 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. C. Bondy and C. P. LeBel, *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 633 (1993).
2. Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой и Д. А. Сутковой, *Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга* (Знание, М., 2000).
3. A. Peresyphkina, A. Dolzhikov, V. Gubareva, et al., *Research Results in Pharmacology* **3** (1), 18 (2017).
4. M. Zhao, P. Zhu, M. Fujino, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **17** (12), E2078 (2016).
5. L. V. Fedulova, A. A. Basov, E. R. Vasilevskaya, et al., *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* **20** (3), 245 (2019).
6. L. V. Fedulova, E. R. Vasilevskaya, E. A. Kotenkova, et al., *J. Pharm. Nutrition Sci.* **7** (2), 35 (2017).
7. G. G. Ortiz, F. P. Pacheco Moisés, M. Mireles-Ramírez, et al., *Adv. Prot. Chem. Struct. Biol.* **108**, 1 (2017).
8. I. Fidianingsih, T. Nurmasitoh, A. D. Ashari, et al., *J. Pharm. Nutrition Sci.* **8** (1), 6 (2018).
9. N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, D. A. Tsomartova, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **165** (4), 508 (2018).
10. F. M. Longo and S. M. Massa, *NeuroRx.* **1** (1), 117 (2004).
11. B. Thomas, and M. F. Beal, *Human Mol. Genetics* **16** (2), 183 (2007).
12. М. С. Попова и М. Ю. Степаничев, *Нейрохимия* **25** (3), 170 (2008).
13. H. L. Martin and Teismann P. *FASEB J.* **23** (10), 3263 (2009).
14. Y. Zhao and B. Zhao, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 316523 (2013).
15. K. Ohl, K. Tenbrock, and M. Kipp, *Exp. Neurol.* **277**, 58 (2016).
16. H. Yoo, F. Bamdad, N. Gujral, et al., *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* **18** (2), 158 (2017).
17. И. Н. Тюренков, М. Н. Багметов и В. В. Епишина, *Экспериментальная и клиническая фармакология* **70** (2), 24 (2007).
18. C. A. Netto, E. Sanches, F. K. Odorczyk, et al., *J. Neurosci. Res.* **95** (1–2), 409 (2017).
19. Н. К. Исаев, Н. А. Андреева, Е. В. Стельмашук и др., *Биохимия* **70** (6), 741 (2005).
20. Н. К. Исаев, Е. В. Стельмашук, Е. Ю. Плотников и др., *Биохимия* **73** (11), 1461 (2008).
21. И. А. Трегубова, В. А. Косолапов и А. А. Спасов, *Успехи физиол. наук* **43** (1), 75 (2012).
22. И. Н. Тюренков, Е. В. Волотова, Д. В. Куркин и др. *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **159** (3), 344 (2015).
23. M. I. Bykov, S. S. Dzhimak, A. A. Basov, et al., *Voprosy Pitaniia* **84** (4), 89 (2015).
24. V. I. Lobyshev, *Int. J. High Dilution Res.* **17** (2), 12 (2018).
25. A. V. Kosenkov, M. V. Gulyaev, V. I. Lobyshev, et al., *Biophysics* **63** (5), 820 (2018).
26. A. I. Shikhliarova, G. V. Zhukova, O. I. Kit, et al., *Medical News of the North Caucasus* **13** (1), 85 (2018).
27. A. Basov, L. Fedulova, E. Vasilevskaya, et al., *Molecules* **24** (22), 4101 (2019).
28. A. V. Syroeshkin, N. V. Antipova, A. V. Zlatska, et al., *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **50**, 629 (2018).
29. I. M. Chernukha, L. V. Fedulova, E. A. Kotenkova, et al., *Voprosy Pitaniia* **85** (5), 36 (2016).
30. A. A. Basov, A. A. Elkina, A. A. Samkov, et al., *Iranian Biomed. J.* **23** (2), 129 (2019).
31. С. В. Козин, А. А. Кравцов, А. А. Елкина, и др., *Биофизика* **64** (2), 362 (2019).
32. C. Mladin, A. Ciobica, R. Lefter, et al., *Arch. Biol. Sci.* **66** (2), 947 (2014).
33. C. Mladin, A. Ciobica, R. Lefter, et al., *Neuroscience Letters* **583**, 154 (2014).
34. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин, В. Ю. Фролов и др., *Экологич. вестн. научных центров Черноморского экономич. сотрудничества* **1**, 13 (2013).
35. I. S. Petriev, V. Y. Frolov, S. N. Bolotin, et al., *Rus. Phys. J.* **6** (9), 1611 (2018).

36. В. Е. Новиков, В. В. Дикманов и В. В. Марышева, Эксперим. клинич. фармакология **75** (9), 7 (2012).
37. Я. Буреш, О. Бурешова и Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения* (Высш. школа, М., 1991).
38. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых физиологических веществ* (Медицина, М., 2005).
39. Т. А. Sapozhnikova, S. S. Borisevich, D. R. Kireeva, et al., *Behav. Brain Res.* **373**, 112109 (2019).
40. A. Kravtsov, S. V. Kozin, E. R. Vasilevskaya, et al., *J. Pharm. Nutrition Sci.* **8** (2), 42 (2018).
41. W. Li, S. Yang, F.-Y. Yu, et al., *Brain Res. Bull.* **143**, 225 (2018).
42. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, et al., *Nutrients* **11** (8), 1903 (2019).
43. G. V. Zhukova, A. I. Shikhliarova, A. V. Soldatov, et al., *Biophysics* **61** (2), 303 (2016).

Influence of Deuterium Depleted Drinking Diet on the Functional State of the Central Nervous System of Animals in Hypoxia

S.V. Kozin^{*, **}, A.A. Kravtsov^{**}, E.I. Zlischeva^{*}, L.V. Shurygina^{*}, V.V. Malyshko^{**}, ^{***},
A.V. Moiseev^{****}, A.A. Elkina^{*, **}, and M.G. Baryshev^{**}

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

^{**}*Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

^{***}*Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Sedina 4, Krasnodar, 350063 Russia*

^{****}*Kuban State Agrarian University, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350004 Russia*

The effects of prolonged (42 days) addition of deuterium-depleted water into rat's diet on the functional state of the central nervous system in normal conditions and under conditions of normobaric hypoxia with hypercapnia were studied. It was also established that the use of deuterium-depleted water both in normal conditions and after exposure to oxidative stress contributes to a significant reduction in the emotional anxiety of animals. Prolonged use of deuterium-depleted water before hypoxic exposure (amnesic effect) helps to maintain learning and memory at the control level, i.e. it has a pronounced protective anti-amnesic effect. In normal conditions, deuterium-depleted water does not affect the learning ability of animals.

Keywords: deuterium-depleted water, rats, hypoxia, anxiolytic effect, anti-amnesic effect

УДК 577.29

КОМПЬЮТЕРНАЯ ОЦЕНКА ВЕРОЯТНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ КСЕНОБИОТИКОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Д.А. Филимонов*, А.В. Рудик*, А.В. Дмитриев*, А.А. Лагунин*, **, В.В. Поройков*

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10/8

**Медико-биологический факультет Российского национального исследовательского медицинского университета
имени Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

E-mail: rudik_anastassia@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 04.12.2019 г.

В организме человека ксенобиотики подвергаются биотрансформации, в процессе которой могут образовываться метаболиты, существенно отличающиеся по физико-химическим и биологическим свойствам от исходных веществ; возможно образование токсичных и реактивных метаболитов. Экспериментальное исследование биотрансформации ксенобиотиков сопряжено с рядом трудностей, поэтому разработка вычислительных методов прогноза является актуальной задачей. Основная проблема компьютерных методов заключается в генерации большого количества предполагаемых метаболитов, что приводит к «комбинаторному взрыву». В работе осуществлен выбор критериев для оптимизации прогноза метаболитов в рамках разработанного авторами веб-ресурса MetaTox (<http://www.way2drug.com/MG>). Установлено, что аддитивный метод оценки вероятности образования метаболитов в сравнении с мультипликативным дает лучшие результаты на тестовой выборке.

Ключевые слова: биотрансформация, метаболизм, сайт метаболизма, прогноз, PASS, MetaTox.

DOI: 10.31857/S0006302920060204

Многие ксенобиотики, включая лекарства, при поступлении в организм человека подвергаются метаболизму (биотрансформации) под воздействием ферментных систем [1]. Метаболизм ксенобиотиков оказывает существенное влияние на биологические, терапевтические и токсикологические характеристики лекарств, поскольку он может влиять на деактивацию, активацию, детоксикацию и токсификацию биологически активных веществ [2].

В результате биотрансформации ксенобиотика как правило образуется не один, а несколько метаболитов, которые могут претерпевать дальнейшие превращения. Совокупность всех реакций биотрансформации ксенобиотика, называемых метаболическими путями, можно представить в виде метаболической сети. Идентификация метаболического пути лекарства может быть выполнена на разных стадиях разработки с использованием методов *in vitro* и *in vivo*. При этом возникают трудности в интерпретации результатов экспериментов *in vitro*, которые проводятся без учета влияния различных факторов, имеющих место в организме человека. Кроме того, затруднителен перенос на организм человека результатов экспериментов *in vivo*, полученных на лабораторных животных, у которых могут

наблюдаться существенные количественные и/или качественные различия в метаболизме по сравнению с человеком [3, 4]. Вычислительные методы, прогнозирующие метаболические пути фармакологических веществ, могут быть использованы для целенаправленного экспериментального поиска образующихся метаболитов и оценки их биологических свойств [5, 6].

В настоящее время существует множество вычислительных методов оценки метаболизма ксенобиотиков [6, 7]. Одним из наиболее важных результатов компьютерного прогноза метаболизма ксенобиотиков является определение структуры образующихся метаболитов. Для решения этой задачи используют экспертные системы, которые основаны на правилах преобразования исходных соединений в метаболиты. Общим недостатком экспертных систем, предназначенных для построения метаболических сетей, является комбинаторный взрыв в результате генерации чрезмерно большого числа продуктов на каждой итерации [6]. Для решения этой проблемы используют различные методы, включая ограничение числа химических соединений, к которым применим тот или иной класс реакции биотрансформации. Наиболее известными системами для прогнозирования метаболитов ксено-

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

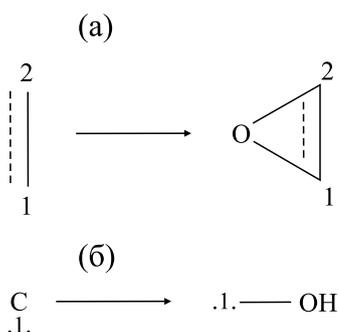


Рис. 1. Фрагменты используемых реакций биотрансформации: (а) – реакция эпексидирования, (б) – реакция С-гидроксилирования.

биотиков являются MetabolExpert [8], META [9], Meteor [10], UM-PPS [11], SyGMa [12], TIMES [13], GLORY [14] и др.

Нами разработан свободно доступный веб-ресурс MetaTox (www.way2drug.com/mg), позволяющий прогнозировать сеть метаболизма для ксенобиотиков, а также оценивать побочные эффекты исходного соединения и его метаболитов. В работах [15, 16] были подробно описаны методы генерации сети метаболизма. Алгоритм MetaTox использует правила трансформации и оценивает их вероятность на основе метода SOMP (Sites of Metabolism Prediction) [17], который является модификацией программного алгоритма PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [18] (прогноз спектров биологической активности для веществ). Целью настоящей работы является сопоставление аддитивного и мультипликативного подходов к оценке вероятностей образования метаболитов и выбора параметров для прогноза сети метаболизма.

Обучающая выборка. Для прогноза метаболитов ксенобиотиков были созданы обучающие выборки субстратов и реакций биотрансформации. Выборка субстратов содержит структуры молекул в виде дескрипторов многоуровневых атомных окрестностей MNA (Multilevel Neighborhoods of Atoms) [18] и применяется для прогноза классов реакций биотрансформации.

Выборки реакций используются для прогноза сайтов метаболизма – атомов молекулы, которые изменяются во время реакций биотрансформации. На веб-ресурсе MetaTox представлены классификационные модели на основе 18-ти выборок данного типа (по одной на каждый класс реакции биотрансформации), созданных на основе БД Metabolite (Biovia), из которой была извлечена информация о структурных изменениях, происходящих с химическими соединениями в процессе реакций, и помечены атомы, которые являются сайтами метаболизма. Помеченным может быть как один атом (в случае реакций гидроксилирования, глюкуронирования и др.), так и два атома (в случае реакций деалкилирования, эпексидирования, дегидрогенирования и др.). Для описания структур с помеченными атомами используются дескрипторы многоуровневых окрестностей помеченных атомов LMNA (Labeled Multilevel Neighborhoods of Atoms) [19].

Каждому классу биотрансформации соответствует фрагмент реакции, состоящий из фрагмента субстрата и фрагмента продукта, отражающий изменения, происходящие в ходе реакции. Число помеченных атомов в структуре молекулы химического соединения соответствует количеству атомов в фрагменте субстрата. Например, в случае реакции гидроксилирования фрагмент субстрата состоит из одного атома, в случае реакции эпексидирования – из двух атомов (см. рис. 1).

Таблица 1. Реакции биотрансформации, используемые на ресурсе MetaTox

$N_{SOM} = 1$	$N_{SOM} = 2$
С-гидроксилирование	Деалкилирование по атомам азота
Гидроксилирование по атому азота	Деалкилирование по атомам кислорода
Метилирование	Эпексидирование
Окисление по атомам азота	Гидрогенирование
Окисление по атомам серы	Дегидрогенирование
Окисление по атомам углерода	
Конъюгация с глутатионом	
Глюкуронирование по атомам азота	
Глюкуронирование по атомам кислорода	
Ацетилирование по атому азота	
Сульфатирование по атому кислорода	
Фосфолирование по атому кислорода	

Примечание. N_{SOM} – количество атомов, помеченных как сайт метаболизма в структуре молекулы химического соединения. Для реакций гидролиза $N_{SOM} = 4$.

В табл. 1 представлена информация о реакциях биотрансформации, используемых на ресурсе MetaTox, с указанием количества атомов, помеченных как сайт метаболизма. Источниками информации послужили данные из БД Metabolite (Biovia), включающие как реакции *in vivo* в организме человека, так и эксперименты *in vitro*, проводимые с использованием белков человека.

Расчет вероятности образования метаболитов.

Расчет вероятности образования метаболитов на ресурсе MetaTox основан на комбинации двух прогнозов – прогноза вероятности прохождения реакции биотрансформации и прогноза сайта метаболизма для данной реакции [12]. Входными данными для генерации метаболитов является структурная формула химического соединения, выходными данными – следующие характеристики:

P_a – вероятностная оценка принадлежности ХС к классу субстратов, которые подвергаются определенной биотрансформации (класс «активных» химических соединений при прогнозе реакций биотрансформации);

P_i – вероятностная оценка принадлежности химического соединения к классу субстратов, которые не подвергаются определенной биотрансформации (класс «неактивных» химических соединений при прогнозе реакций биотрансформации);

P_t – вероятностная оценка принадлежности конкретного атома в структуре молекулы химического соединения к классу атомов, являющихся сайтами метаболизма определенной биотрансформации (класс «активных» химических соединений при прогнозе сайтов метаболизма);

P_f – вероятностная оценка принадлежности конкретного атома в структуре молекулы химического соединения к классу атомов, не являющихся сайтами метаболизма определенной биотрансформации (класс «неактивных» химических соединений при прогнозе сайтов метаболизма).

Для каждой реакции биотрансформации и для каждого атома в структуре молекулы химического соединения происходит расчет указанных выше четырех величин и вычисляется комбинированная оценка вероятности образования метаболита определенной биотрансформации по конкретному атому. В данной работе были сопоставлены мультипликативный (1) и аддитивный (2) методы оценки вероятности образования метаболитов

$$P_c = \frac{P_a * P_t}{P_a * P_t + P_i * P_f}, \quad (1)$$

$$P_c = \frac{(P_a - P_i) + (P_t - P_f)}{1 + (P_a - P_i) * (P_t - P_f)}. \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа эффективности формул (1) и (2) расчета вероятности образования метаболитов нами была использована база данных DrugBank v. 5.1.4 [20]. Была произведена автоматическая выгрузка данных из файлов в форматах xml и sdf, в которых содержится информация о структурных формулах лекарств и их метаболитов, и подготовлена выборка, состоящая из 2452 пар «субстрат – наблюдаемый в эксперименте метаболит» (далее «субстрат–метаболит»), которые были использованы в качестве «положительных примеров» для генерации метаболитов. Субстраты из созданной выборки были использованы для генерации «отрицательных примеров» – были сгенерированы все продукты для всех одностадийных реакций биотрансформации, представленных на ресурсе MetaTox. Всего было сгенерировано 93256 пар «субстрат – сгенерированный продукт» (далее «субстрат–продукт»), среди которых было найдено 1510 пар «субстрат–метаболит», содержащихся в базе данных DrugBank, что составляет примерно 62% всех пар из БД Drug Bank. Были проанализированы причины отсутствия генерации для 942 пар «субстрат–метаболит». Оказалось, что около 65% этих пар соответствуют схемам описания многостадийного процесса преобразования субстрата в продукт. Около 20% не сгенерированных пар «субстрат–метаболит» относятся к преобразованиям, в ходе которых изменяется заряд продукта реакции; примерно по 7% связано с преобразованиями с разрывом циклических структур и перераспределением ненасыщенных связей в ароматических структурах; 5% непредсказанных пар «субстрат–метаболит» – это преобразования, связанные с изменением стереохимии.

Для всех сгенерированных продуктов реакции мы оценили вероятности их образования P_c по формулам (1) и (2), построили графики плотности распределения (рис. 2 и 3) этих величин и зависимости от порога по P_c оценок точности и полноты предсказаний (рис. 4, см. ниже «Precision» и «Recall») и провели анализ выбора оптимального порога. Оценки P_a и P_i , P_t и P_f рассчитываются независимо по подвыборкам активных и неактивных соединений, поэтому их сумма не равна единице. Чем выше для конкретной биотрансформации величина P_a и чем меньше величина P_i , тем больше вероятность, что субстрат будет подвергаться данному виду биотрансформации в эксперименте. Аналогичным образом трактуются величины P_t и P_f при прогнозе сайта метаболизма. При выборе порога разделения положительных и отрицательных предсказаний нужно учитывать как уменьшение числа ложноположительных результатов (сгенерированных продуктов реакций, отнесенных к метаболитам, но не являющихся таковыми), так и пропуск ис-

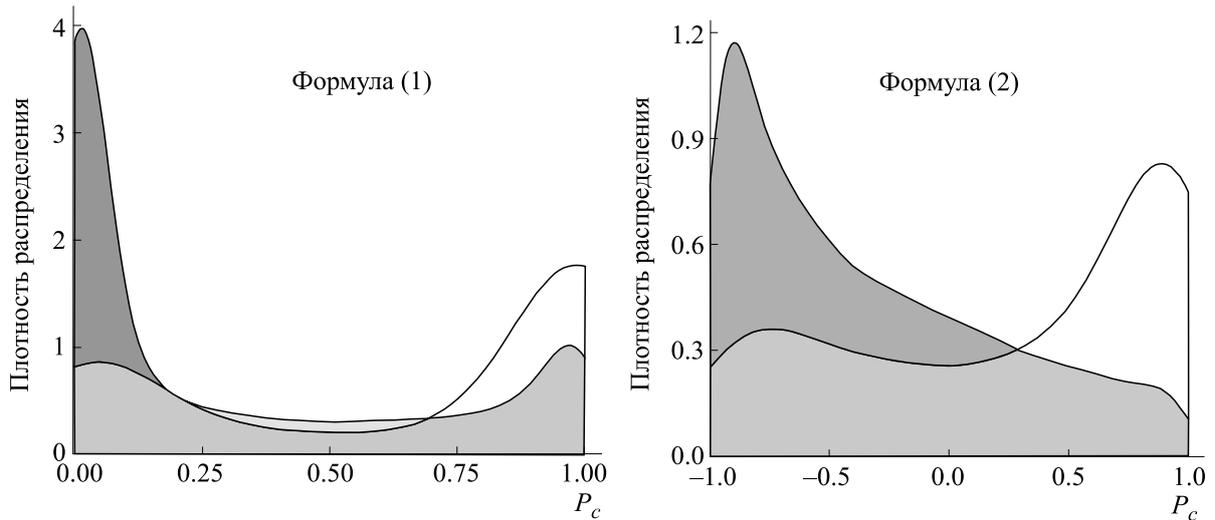


Рис. 2. Плотности распределения оценок вероятностей P_c образования метаболитов для положительных (светло-серая заливка) и отрицательных примеров (темно-серая заливка) без использования порогов отсеечения по P_a и P_i .

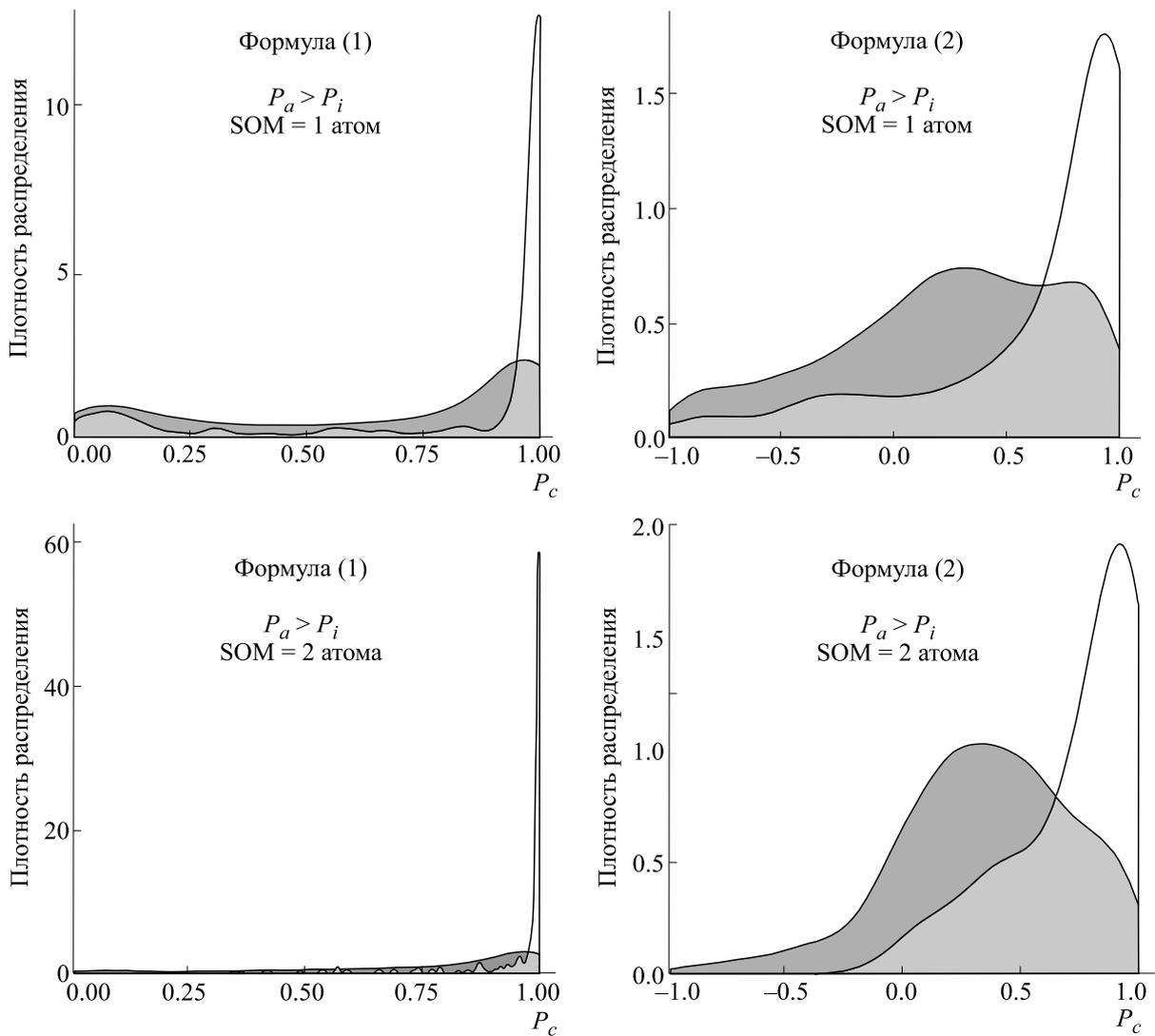


Рис. 3. Плотности распределения оценок вероятностей P_c образования метаболитов для положительных (светло-серая заливка) и отрицательных примеров (темно-серая заливка) с использованием порога $P_a > P_i$ для реакций с разным количеством сайтов метаболизма.

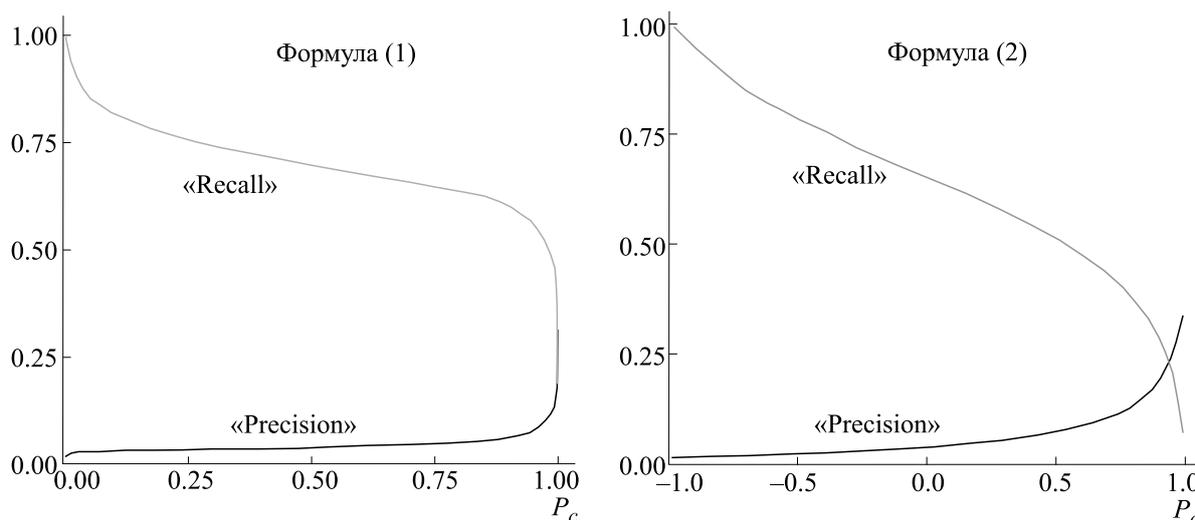


Рис. 4. Зависимости точности и полноты от порога по P_c .

тинно положительных результатов (экспериментально обнаружимых метаболитов). При использовании порога $P_a > P_i$ вероятности ошибок первого и второго рода равны, поэтому этот порог рекомендуется при использовании программы PASS. Нами проанализирована целесообразность использования порогов $P_a > P_i$.

Общее количество сгенерированных положительных и отрицательных примеров для каждой реакции биотрансформации при выборе порогов $P_a > P_i$ или $P_a > P_i$ и $P_i > P_f$ приведено в табл. 2. Соотношение числа положительных и отрицательных примеров зависит как от особенностей рассматриваемого сайта метаболизма (фрагмента для описания реакции), так и от частоты встречаемости данной реакции биотрансформации при метаболизме лекарств (варьирует от 4 до 6000). Например, гидроксирование — одна из самых частых реакций, что объясняет ее первое место по количеству сгенерированных положительных примеров, при этом сайт метаболизма представляет собой один атом углерода, поэтому количество отрицательных примеров превышает число положительных примерно в 24 раза, так как отрицательными примерами являются структуры с помеченными атомами углерода. Помимо гидроксирования наиболее часто встречаемыми реакциями в БД DrugBank является деалкилирование, глюкуронирование по атомам кислорода и гидролиз.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, при использовании порогов $P_a > P_i$ и $P_i > P_f$ отношение положительных примеров к отрицательным существенно возрастает, но, тем не менее, количество отрицательных примеров существенно больше, что говорит о необходимости исполь-

зовать определенный порог для оценки вероятности образования метаболитов ($P_c > \text{cutoff}$).

Плотности распределения оценок P_c вероятностей образования метаболитов, рассчитанных аддитивным и мультипликативным методами, при отсутствии порогов по P_a и P_i и при наличии порога $P_a > P_i$ приведены на рис. 2, медианы распределений приведены в табл. 3.

Медианы и графики плотности распределений P_c для положительных и отрицательных примеров отличаются друг от друга независимо от типа используемой формулы расчета.

На рис. 2 приведены плотности распределения P_c для 18-ти классов реакций биотрансформации. Между тем для описания разных реакций используется разное количество атомов, соответствующих сайтам метаболизма (см. табл. 1). При расчете вероятности образования метаболитов происходит усреднение вероятностей для атомов, составляющих сайт метаболизма, и это значение учитывается в формулах (1) и (2). Мы сравнили плотности распределения P_c для двух типов реакций: описываемых одним и двумя атомами (см. рис. 3 и табл. 4) при выборе порога $P_a > P_i$.

Как видно из приведенных в табл. 4 данных, в реакциях, описываемых сайтами метаболизма с двумя атомами, разница между медианными значениями положительных и отрицательных примеров меньше, чем в реакциях, описываемых сайтом метаболизма с одним атомом.

Для выбора оптимального порога по вероятности образования метаболитов P_c мы проанализировали зависимости от него точности (Precision) и полноты (Recall) (рис. 4). Точность оценивает до-

Таблица 2. Реакции биотрансформации, сгенерированные для выборки DrugBank

Название биотрансформации	N_{pos}	N_{neg}	N_{pos}^*	N_{neg}^*	N_{pos}^{**}	N_{neg}^{**}
С-гидроксилирование	477	11554	299	4775	186	1790
Гидроксилирование по атому азота	12	857	12	399	12	399
Метилирование	16	14270	12	2586	10	282
Окисление по атомам азота	12	857	9	301	9	244
Окисление по атомам серы	26	110	23	53	23	53
Окисление по атомам углерода	41	5488	29	2064	29	1484
Деалкилирование по атомам азота	227	4508	166	1846	162	1099
Деалкилирование по атомам кислорода	198	3393	92	952	77	286
Эпоксидирование	21	9287	19	3225	18	1882
Гидрогенирование	36	6451	32	1276	3	183
Дегидрогенирование	48	6966	29	2666	27	1675
Конъюгация с глутатионом	2	12029	2	2518	2	1434
Глюкуронирование по атомам азота	6	863	5	338	5	321
Глюкуронирование по атомам кислорода	119	1070	98	550	93	505
Ацетилирование по атому азота	12	857	11	254	11	232
Сульфатирование по атому кислорода	34	1155	28	271	28	229
Фосфолирование по атому кислорода	0	12031	0	440	0	37
Гидролиз	114	851	98	529	96	428

Примечание. N_{pos} – общее количество сгенерированных пар «субстрат–продукт», которые были найдены в БД DrugBank; N_{neg} – общее количество сгенерированных пар «субстрат–продукт», которые не были найдены в БД DrugBank; N_{pos}^* – количество сгенерированных пар «субстрат–продукт», которые были найдены в БД DrugBank при выборе порога $P_a > P_i$; N_{neg}^* – количество сгенерированных пар «субстрат–продукт», которые не были найдены в БД DrugBank при выборе порога $P_a > P_i$; N_{pos}^{**} – количество сгенерированных пар «субстрат–продукт», которые были найдены в БД DrugBank при выборе порога $P_a > P_i$ и $P_i > P_f$; N_{neg}^{**} – количество сгенерированных пар «субстрат–продукт», которые не были найдены в БД DrugBank при выборе порога $P_a > P_i$ и $P_i > P_f$.

лю метаболитов среди сгенерированных продуктов по следующей формуле:

$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP + FN},$$

где TP – количество известных метаболитов среди сгенерированных продуктов, FN – количество неправильно сгенерированных продуктов, кото-

рые были классифицированы как метаболиты, но таковыми не являются. Полнота характеризует отношение количества метаболитов среди сгенерированных продуктов к общему количеству метаболитов в тестовой выборке:

$$\text{Recall} = \frac{TP}{TP + FP},$$

Таблица 3. Медианы распределений оценок P_c

Порог	Формула (1)			Формула (2)		
	M_{neg}	M_{pos}	M_{all}	M_{neg}	M_{pos}	M_{all}
Отсутствует	0.08	0.94	0.08	-0.48	0.62	-0.47
$P_a > P_i$	0.85	0.99	0.86	0.33	0.87	0.34

Примечание. M_{neg} – медиана распределения P_c для отрицательных примеров, M_{pos} – медиана распределения P_c для положительных примеров, M_{all} – медиана распределения P_c для всех примеров.

Таблица 4. Медианы распределений оценок P_c для двух типов реакций

N_{SOM}	Формула (1)		Формула (2)	
	M_{neg}	M_{pos}	M_{neg}	M_{pos}
1	0.826	0.998	0.287	0.884
2	0.882	0.999	0.365	0.857

Примечание. M_{neg} – медиана распределения P_c для отрицательных примеров, M_{pos} – медиана распределения P_c для положительных примеров, N_{SOM} – количество атомов, содержащихся в сайте метаболизма.

где FN – количество известных метаболитов, которые не попали в число сгенерированных продуктов при выбранном пороге.

Для исследуемых формул были установлены пороги P_c (табл. 5), при которых достигается максимальное гармоническое среднее точности и полноты (F -мера):

$$F = 2 \frac{\text{Precision} \cdot \text{Recall}}{\text{Precision} + \text{Recall}}$$

Из приведенных выше данных можно сделать вывод, что полностью решить проблему комбинаторного взрыва в MetaTox, являющуюся результатом значительной доли ложноположительных предсказаний, не удалось. Однако следует учитывать неизбежную неполноту схем метаболизма, представленных в базах данных, что соответственно увеличивает долю предсказаний, кажущихся ложноположительными. Аддитивный и мультипликативный методы оценки вероятности (формулы (1) и (2)) незначительно отличаются по максимальному гармоническому среднему точности и полноты. Использование аддитивного метода предпочтительнее в силу большей разницы между медианами значений P_c положительных и отрицательных примеров (табл. 3 и 4), порог $P_c > 0.92$ для формулы (2) более удобен, чем $P_c > 0.999$ для формулы (1). При использовании таких высоких порогов все сгенерированные продукты удовлетворяют ограничениям $P_a > P_i$ или

Таблица 5. Максимальное значение F -меры

Формула	(1)	(2)
P_c	0.999	0.92
F_{max}	0.246	0.234

$P_a > P_i$ и $P_t > P_f$, и их использование является нецелесообразным. Альтернативным решением проблемы комбинаторного взрыва при генерации сети метаболизма ксенобиотика может быть выбор небольшого числа наиболее вероятных метаболитов по аддитивной оценке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Информация о метаболизме лекарственных веществ в организме человека чрезвычайно важна, поскольку их токсичность, биологическая активность и другие свойства могут значительно отличаться от таковых у исходных веществ. Созданный нами ранее веб-ресурс MetaTox (<http://www.way2drug.com/MG>) позволяет прогнозировать вероятные метаболиты ксенобиотиков по их структурной формуле. В настоящей работе исследованы аддитивный и мультипликативный методы оценки вероятности образования метаболитов. Было установлено, что аддитивный метод оценки вероятности образования метаболитов в

сравнении с мультипликативным дает лучшие результаты на тестовой выборке. Найденные значения порога выбора наиболее вероятных метаболитов позволяют оптимизировать соотношение количества ложноположительных и ложноотрицательных результатов среди сгенерированных гипотетических метаболитов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00396).

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. M. E. Wolff, *Principles of Medicinal Chemistry*, 4th Edition (Williams and Wilkins, Philadelphia, 1995).
2. C. Wermuth, *The Practice of Medicinal Chemistry* (Acad. Press – Elsevier, 2008).
3. *Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry*
4. Г. Н. Красовский, Ю. А. Рахманин и Н. А. Егорова, *Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека* (ОАО «Издательство «Медицина», М., 2009).
5. В. Д. Лахно, *Биофизика* **56** (6), 1071 (2011).
6. V. M. Bezhentsev, et al., *Russ. Chem. Rev.* **85** (8), 854 (2016).
7. J. Kirchmair, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **14** (6), 387 (2015).
8. F. Darvas, *QSAR Environ. Toxicol.* **2**, 71 (1987).
9. G. Klopman, M. Dimayuga, and J. Talafous, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **34** (6), 1320 (1994).
10. C. A. Marchant, K. A. Briggs, and A. Long, *Toxicol. Mech. Methods* **18** (2–3), 177 (2008).
11. J. Gao, L. B. M. Ellis, and L. P. Wackett, *Nucl. Acids Res.* **39** (2), 406 (2011).
12. L. Ridder and M. Wagener, *ChemMedChem* **3** (5), 821 (2008).
13. O. Mekenyan, et al., *Curr. Pharm. Des.* **10** (11), 1273 (2004).
14. C. de Bruyn Kops, et al., *Front. Chem.* **7**, 402 (2019).
15. A. V. Rudik, et al., *J. Chem. Inf. Model.* **57** (4), 638 (2017).
16. A. Rudik, et al., *J. Bioinform. Comput. Biol.* **17** (1), 1940001 (2019).
17. A. Rudik, A. Dmitriev, A. Lagunin, et al., *Bioinformatics* **31**(12), 2046 (2015).
18. D. A. Filimonov, et al., *Biomed. Chem. Res. Methods* **1** (1), e00004 (2018).
19. A. V. Rudik, et al., *J. Chem. Inf. Model.* **54** (2), 498 (2014).
20. D. S. Wishart, et al., *Nucl. Acids Res.* **46**, 1074 (2018).

Computational Assessment of a Probability of Xenobiotic Metabolite Formation in the Human Body

D.A. Filimonov*, A.V. Rudik*, A.V. Dmitriev*, A.A. Lagunin*, **, and V.V. Poroikov*

*V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya ul. 10/8, Moscow, 119121 Russia

** Medical & Biological Department, Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

In the human body, xenobiotics undergo biotransformation, that may result in the formation of metabolites physical, chemical and biological properties of which differ significantly from the initial substances; the formation of toxic and reactive metabolites is possible. An experimental study of xenobiotic biotransformation appears challenging and the development of computational methods of prediction is therefore an important task. The main disadvantage of computational methods includes that a large number of possible metabolites are generated leading to a "combinatorial explosion". The purpose of this work is to select criteria for optimizing the prediction of metabolites within the framework of our web resource MetaTox (<http://www.way2drug.com/MG>), which is freely available via Internet. We compared the performance of additive and multiplicative methods for assessing the probability of the formation of metabolites and shown the additive approach's superiority.

Keywords: biotransformation, metabolism, site of metabolism, prediction, PASS, MetaTox

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРЕПАРАТОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ВО ВЗРОСЛОЙ ОФТАЛЬМОАНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ, С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

© 2020 г. Л.М. Балашова*, **, В.А. Намиот***, И.И. Колесниченко****, Н.А. Бакунина*. **, Л.С. Коробова*. **, А.Н. Доронин****, И.А. Балашов*, Д.Р. Черкашин*, С.Н. Удальцов*****

*НП Международный научно-практический Центр пролиферации тканей, 119034, Москва, ул. Пречистенка, 29/14

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

***Институт ядерной физики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

****Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 31/4

*****ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2

Поступила в редакцию 25.01.2020 г.

После доработки 12.07.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Для эффективной дозировки офтальмологических препаратов требуется оценка динамики изменения их концентрации в слезной жидкости во времени. В работе приведены примеры определения с помощью мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии местноанельгизирующих препаратов наропина, хирокаина и лидокаина, применяемых при офтальмологических операциях. Изучено поведение данных анестетиков в слезной жидкости пациентов при проведении операции по фактоэмulsionификации хрусталика, в том числе при наличии у них сопутствующей глаукомы.

Ключевые слова: мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия, планарные электроды, наропин, хирокаин, лидокаин, местная анестезия, офтальмология.

DOI: 10.31857/S0006302920060216

Для эффективной дозировки вновь разрабатываемых анельгизирующих офтальмологических препаратов требуется оценка динамики изменения их концентрации в слезной жидкости во времени. В данной работе исследована принципиальная возможность применения метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии в целях определения фармакинетики местноанельгизирующих препаратов. В основе работы мультисенсорных приборов всех типов лежит использование набора (матрицы) сенсоров с отличающимися друг от друга характеристиками. Проблемой описанных методов является воспроизводимость характеристик матрицы сенсоров, что в конечном счете отрицательно сказывается на разрешающей способности и достоверности дискриминации N -мерных образов. Также общим недостатком этих типов мультисенсорных устройств является сложность в обеспечении ка-

либровки и воспроизводимости сигналов [1]. Электрохимические методы в решении многих аналитических задач достаточно просты, обладают приемлемым быстродействием и имеют хорошие метрологические показатели. В ИФХЭ РАН (Москва) был разработан электрохимический метод анализа органических веществ – мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия [2, 3]. Этим методом определяется изменение электрохимической активности катионов металлов в растворе в результате их взаимодействия с органическими веществами. На получаемой вольтамперограмме при этом фиксируются изменения пиков токов растворения металлов, которые можно зафиксировать для каждого металла тест-системы по отдельности или оценить изменение всей вольтамперограммы интегрально. Измерения проводят на одном индикаторном электроде, что имеет большое преимущество по сравнению с

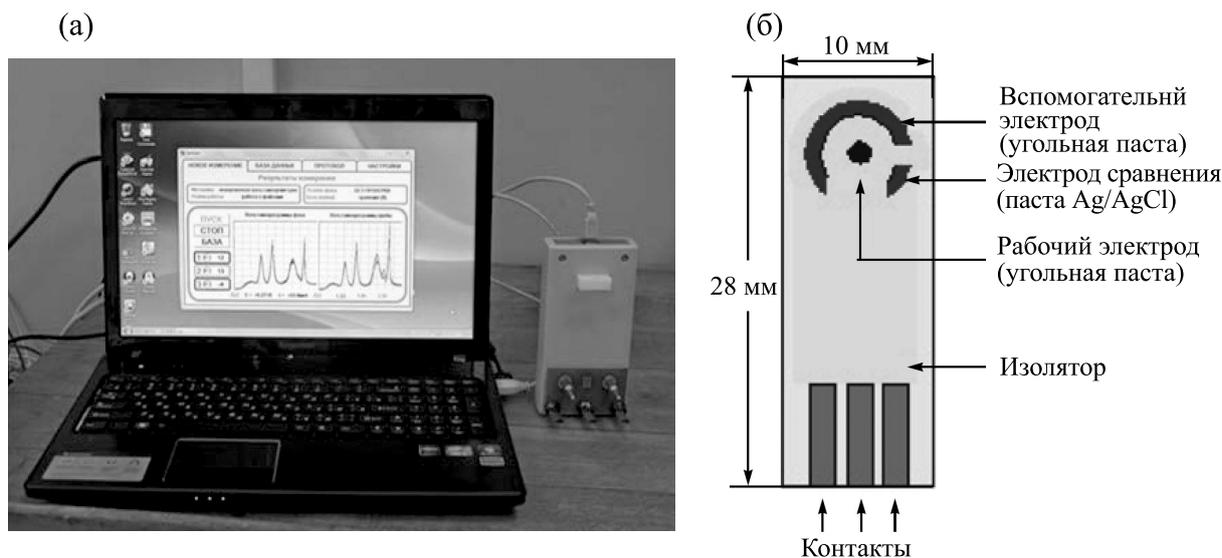


Рис. 1. Общий вид электрохимического мультисенсорного анализатора (а) и схема планарной электродной системы (б).

мультисенсорными методами, в которых используют набор электродов. При решении задачи идентификации конкретного органического вещества данным методом требуется сравнение с предварительно составленной базой данных.

Ранее нами был предложен метод экспресс-диагностики биологических объектов с использованием мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии для ранней диагностики глаукомы по сыворотке крови [4]. В дальнейшем работоспособность и эффективность метода была показана нами, в частности, при определении ряда офтальмологических препаратов – визомитина [5, 6], ланостерола [7], бетоптика и его дженериков [8].

Целью данной работы являлось исследование методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии фармакокинетики поведения в слезной жидкости ряда анестетиков – наропина, хирокаина и лидокаина – у больных при проведении операции по факэмульсификации хрусталика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 30 больных, страдающих незрелой катарактой и смешанной компенсированной глаукомой I–III стадий в возрасте от 60 до 86 лет, из них 15 мужчин и 15 женщин. Больным была проведена операция по факэмульсификации хрусталика с имплантацией интраокулярной линзы, причем десяти больным с сопутствующей глаукомой – сочетанная операция. Послеоперационный период протекал без осложнений. У пациентов с помощью кружка стерильной фильтровальной бумаги диаметром

8 мм проводили забор слезы до операции, через 5 и 10 мин после проведения анестезии до проведения разреза (с инстилляцией раствора антибиотика – 0.25%-го левомецетина – после последнего забора слезы) с целью возможного выявления растворов анестезиологических препаратов в слезе. Использовали препараты 0.75%-го раствора наропина, 5%-го раствора хирокаина и 2%-го раствора лидокаина, которые вводили за 1 ч до операции. Каждый из препаратов применяли ретробульбарно (по стандартной методике) и инфраорбитально (по стандартной методике), объемом вводимого препарата составлял 4 мл. У 18 больных исследования дублировали с целью проверки точности метода. Всего было взято 108 проб.

Следует отметить, что с клинической точки зрения наиболее глубокое обезболивание вызывает наропин. Больные после его применения спокойнее ведут себя на операционном столе. Введение же лидокаина нередко сопровождается аллергической реакцией (вплоть до анафилактического шока).

Исследования осуществляли с помощью электрохимического мультисенсорного анализатора, разработанного в ИФХЭ РАН. Измерения проводили на планарных электродных системах представляющих собой полипропиленовую пластину с нанесенными рабочим и вспомогательным электродами (углеродный материал) и хлорсеребряным электродом сравнения. Общий вид анализатора и схема планарной электродной системы представлена на рис. 1.

В качестве электрохимической «тест-системы» использовали 0.05 М раствор KCl, содержащий катионы ряда металлов, обладающих спо-

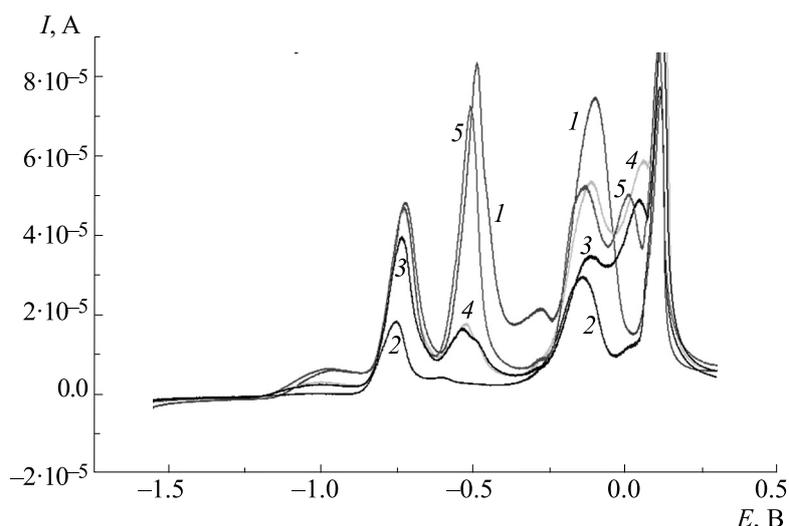


Рис. 2. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы при воздействии на нее наропина в различных концентрациях (%): 1 – 0 (фон), 2 – $0.125 \cdot 10^{-3}$; 3 – $0.250 \cdot 10^{-3}$; 4 – $0.375 \cdot 10^{-3}$; 5 – $0.500 \cdot 10^{-3}$ (на электроде).

способностью образовывать комплексные соединения с органическими веществами: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Hg^{2+} [2, 3]. Сформированная таким образом на индикаторном электроде матрица сенсоров в нашем случае обеспечивала работу прибора в формате «Электронный язык» [9].

Вольтамперограммы, получаемые методом инверсионной вольтамперометрии, имеют определенный вид (рис. 2) и хорошо воспроизводимы. Они представляют собой зависимости тока от потенциала рабочего электрода, меняющегося по линейному закону во времени. Регистрируемые пики соответствуют окислению разных металлов, входящих в тест-систему. Введение в тест-систему анализируемых органических веществ приводит к изменению спектра вольтамперограмм. Эти изменения характерны для каждого из органических веществ (или смеси веществ), что позволяет проводить их идентификацию.

Полученная вольтамперограмма разбивается на N участков, количество которых зависит от сложности исследуемой системы. Таким образом формируется N -мерный образ объекта.

При проведении испытаний на планарные электроды наносили 50 мкл тест-системы и снимали фоновую инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов -1.55 В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой потенциала до 0.3 В. Затем на электрод помещали 50 мкл свежего раствора тест-систем и диск из пористого материала (фильтровальной бумаги) с нанесенным на него тем или иным препаратом в различной концентрации и снова снимали инверсионные вольтамперограммы.

Для получения образцов слезной жидкости в конъюнктивный мешок глаза пациента помещали диск диаметром 8 мм из предварительно обработанного пористого материала (фильтровальной бумаги, которую тщательно промывали в спирте и дистиллированной воде и сушили при $80^{\circ}C$ в течение трех часов). Через определенное время (до введения препарата, через 5 или 10 мин после его введения) бумажный диск извлекали из конъюнктивного мешка, помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой и снимали инверсионные вольтамперограммы.

Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние наропина, хирокаина и лидокаина на тест-систему. Было исследовано воздействие на тест-систему трех анестетических препаратов — наропина, хирокаина и лидокаина. Состав указанных препаратов близок по основному действующему веществу: это местные анестетики, представляющие собой фармакологическую группу амидов. На рис. 1 приведены фоновая вольтамперограмма и вольтамперограммы, полученные для наропина в различных концентрациях. В случае хирокаина и лидокаина вольтамперограммы имеют примерно такой же вид и поэтому не приводятся. Все данные по воздействию на тест-систему наропина, хирокаина и лидокаина обобщены в табл. 1.

Можно видеть, что в присутствии всех изученных анестетиков токи ионов металлов, входящих в тест-систему, изменяются в разной степени в зависимости от концентрации анестетика: с ро-

Таблица 1. Влияние изучаемых анестетиков на тест-систему

Анестетик	Концентрация анестетика, %	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	—	8	64	70,0	50,2	40,0	52,8
Наропин	$0.125 \cdot 10^{-3}$	7	38	44	25	48	27
	$0.250 \cdot 10^{-3}$	8	42	42	28	28	29
	$0.375 \cdot 10^{-3}$	9	29	15	15	16	50
	$0.500 \cdot 10^{-3}$	16	20	16	20	20	90
Хирокаин	$0.125 \cdot 10^{-3}$	6	35	43	24	45	25
	$0.250 \cdot 10^{-3}$	7	40	40	26	26	27
	$0.375 \cdot 10^{-3}$	8	25	14	14	15	50
	$0.500 \cdot 10^{-3}$	15	18	15	19	19	90
Лидокаин	$0.125 \cdot 10^{-3}$	12	54	56	36	36	34
	$0.250 \cdot 10^{-3}$	8	52	43	21	21	16
	$0.375 \cdot 10^{-3}$	9	40	36	16	16	12
	$0.500 \cdot 10^{-3}$	6	20	31	12.5	12	80

стом концентрации ток иона ртути возрастает, а у остальных металлов — уменьшается.

Наиболее заметно изменение тока ионов кадмия — от 50 до 20 мкА в исследованном диапазоне концентраций анестетиков, причем в равной степени для всех изученных анестетиков. Следовательно, в дальнейшем достаточно ограничиться изучением влияния слезной жидкости пациентов только на эти ионы.

Анализ слезной жидкости пациентов после инфраорбитального введения анестетиков. Группа пациентов, поступивших на операцию по поводу катаракты, которым вводили анестетики инфраорбитально, состояла из одиннадцати человек: троим из них вводили наропин, еще троим — хирокаин, пятерым — лидокаин. Далее был произведен отбор образцов слезной жидкости, как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты анализа методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии образцов слезной жидкости пациентов этой группы представлены в табл. 2.

Анализ слезной жидкости пациентов после ретробульбарного введения анестетиков. Данная группа пациентов, поступивших на операцию по поводу катаракты, состояла из двенадцати человек: четверым из них вводили наропин, троим — хирокаин, пятерым — лидокаин. Результаты анализа образцов слезной жидкости пациентов данной группы представлены в табл. 3.

Следует отметить, что при введении препаратов ретробульбарно их действие на слезную жидкость и, следовательно, на пики токов сильнее, чем при введении препаратов инфраорбитально ($p < 0.05$).

Анализ слезной жидкости пациентов с сочетанными катарактой и глаукомой. Больные еще одной группы (в количестве десяти человек) кроме катаракты имели сопутствующую глаукому. Им перед операцией вводили противоглаукомный препарат «Азарга» (Azarga®, Novartis Pharma AG, Швейцария) и затем через 30 мин проводили инстилляцию одного из анестетиков. Поэтому на следующем этапе методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии было изучено действие препарата «Азарга» на используемую нами тест-систему и ее возможное влияние при инфраорбитальном или ретробульбарном введении анестетиков.

На рис. 2 приведены фоновая вольтамперограмма и вольтамперограммы, демонстрирующие действие препарата «Азарга» в различной концентрации на используемую нами тест-систему, а в табл. 4 — соответствующие численные данные.

Результаты анализа образцов слезной жидкости пациентов с сочетанными катарактой и глаукомой после инстилляцией им препарата «Азарга» и последующего инфраорбитального введения анестетиков (всего 4 пациента) представлены в табл. 5, а после последующего ретробульбарного

Таблица 2. Влияние на слезную жидкость анестетиков после их инфраорбитального введения

Анестетик	Время отбора пробы	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон		8	64	70,0	50,2	40,0	52,8
Лидокаин (5 пациентов)	До введения препарата	2	30	33,0	32,2	32,0	19,8
	Через 5 мин после введения	1,6	19	21,2	20,0	18	13
	Через 10 мин после введения	2	20	20,5	22	22	20
Наропин (3 пациента)	До введения препарата	4	26	31,0	23	21,0	22
	Через 5 мин после введения	3	23	23	26,0	26	20
	Через 10 мин после введения	2	23	33	25	26	23
Хирокаин (3 пациента)	До введения препарата	3	25,4	31,0	22	21,0	22
	Через 5 мин после введения	1,6	22	22	25,0	26	20
	Через 10 мин после введения	2	23	32	25	25	23

Таблица 3. Влияние на слезную жидкость анестетиков после их ретробульбарного введения

Анестетик	Время отбора пробы	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон		8	64	70,0	50,2	40,0	52,8
Лидокаин (5 пациентов)	До введения препарата	3	21,4	31,0	22	21,0	14
	Через 5 мин после введения	1,6	20	20	20	20	10
	Через 10 мин после введения	2	21	21	20	20	11
Наропин (4 пациента)	До введения препарата	3	38	44	34	31,0	32
	Через 5 мин после введения	1,6	20	20	19,0	19	12
	Через 10 мин после введения	2	20	23	20	21	13
Хирокаин (3 пациента)	До введения препарата	3	21,4	25,0	17	17,0	12
	Через 5 мин после введения	1,6	20	21	19	19	10
	Через 10 мин после введения	2	20	23	19	19	12

Таблица 4. Влияние на тест-систему препарата «Азарга» в различной концентрации

Концентрация препарата «Азарга»	Пики токов растворения металлов, мкА					
	Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	8	64	70,0	50,2	40,0	52,8
0.5%	6	34	33	28	21,0	14
0.10%	4	27	28	26,0	16	12
0.15%	3	23	25	21	15	13
0.20%	1,5	20	22	18	11	10

Таблица 5. Влияние анестетиков на слезную жидкость при инфраорбитальном введении через 30 мин после инстилляций препарата «Азарга»

Анестетик	Время отбора пробы	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон		8	64	70,0	50,2	40,0	52,8
Наропин (2 пациента)	До введения препарата	3	17	16,0	16	17	11
	Через 5 мин после введения	6	19	20	20	21	12
	Через 10 мин после введения	2	20	19	19	21	13
Хирокаин (2 пациента)	До введения препарата	3	18	18,0	17	19,0	12
	Через 5 мин после введения	6	19	20	19,0	21	13
	Через 10 мин после введения	3	20	19	19	21	13

Таблица 6. Влияние анестетиков на слезную жидкость при ретробульбарном введении через 30 мин после инстилляций препарата «Азарга»

Анестетик	Время отбора пробы	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон		8	64	70,0	50,2	40,0	52,8
Наропин (3 пациента)	До введения препарата	3	17	16,0	16	17	11
	Через 5 мин после введения	6	19	19	20	19	12
	Через 10 мин после введения	5	20	19	19	21,6	13
Хирокаин (3 пациента)	До введения препарата	3	18	18,0	17	19,0	12
	Через 5 мин после введения	3	19	19	18,0	19	11
	Через 10 мин после введения	3	20	19	19	21	13

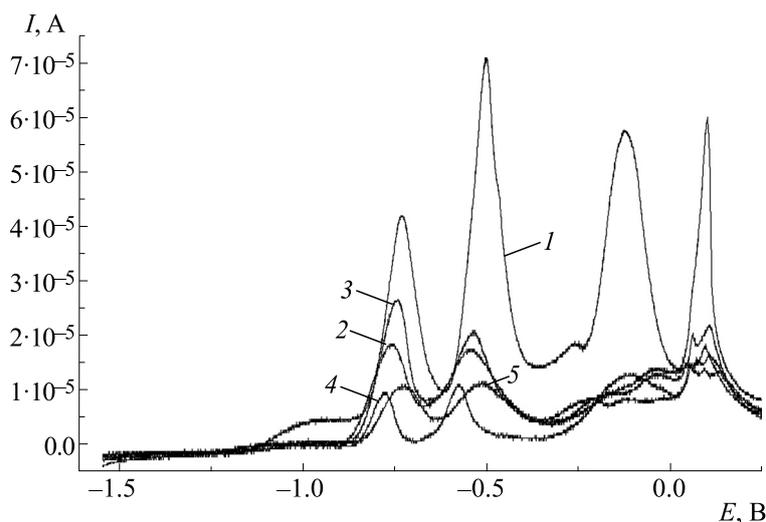


Рис. 3. Влияние на тест-систему препарата «Азарга» в различной концентрации: 1 – тест-система, 2 – 0.05%, 3 – 0.10%, 4 – 0.15%, 5 – 0.20% (на электроде).

введения анестетиков (всего 6 пациентов) – в табл. 6.

Полученные данные показывают, что инстилляцией препарата «Азарга» снижает действие слезной жидкости на тест-систему, а последующее введение препаратов-анестетиков практически не оказывает дополнительного влияния.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии возможно определение анестезиологических препаратов в слезной жидкости.

2. Показано, что при введении препаратов ретробульбарно их действие на слезную жидкость сильнее, чем при введении препаратов инфраорбитально.

3. Инстилляцией препарата «Азарга» снижает действие слезной жидкости на тест-систему, но практически не влияет на вводимые препараты-анестетики.

4. Отмечается, что различные анестезиологические препараты (наропин, хирокаин и лидокаин) мало отличаются по своему действию на пики токов ионов кадмия ($p > 0,05$)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с участием пациентов соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. П. Нестеров, *Глаукома* (Медицинское информационное агенство, М., 2014).
2. В. Н. Андреев, В. М. Ганшин, А. Н. Доронин и В. П. Луковцев, Патент РФ № 2375705, опублик. 10.12.2009.
3. В. П. Луковцев, А. Н. Доронин, В. А. Семенова и В. М. Ганшин, *Электрохимия* **45** (7), 869 (2009).
4. И. И. Колесниченко, А. Л. Ключев, В. М. Ганшин и др., *Физикохимия поверхности и защита материалов* **50** (4), 440 (2014).
5. И. И. Колесниченко, Е. П. Кантаржи и А. Н. Доронин, в сб. *Труды 6-й Всероссийской науч.-практич. конф. «Измерения в современном мире – 2017»* (СПб-ПУ, СПб., 2017), сс. 33–37.
6. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология* **23** (9–10), 6 (2017).
7. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика* **63** (4), 825 (2018).
8. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., *Биофизика* **64** (6), 1088 (2019).
9. I. I. Kolesnichenko, L. M. Balachova, and E. P. Kantarzhi, *Am. J. Anal. Chem.* **7** (7), 588 (2016).

Determination of Anesthetics Used for Adult Ophthalmology in Tear Fluids by Multisensory Stripping Voltammetry Method

L.M. Balashova^{*, **}, V.A. Namiot^{**}, I.I. Kolesnichenko^{***}, N.A. Bakunina^{*, **},
L.S. Korobova^{*, **}, A.N. Doronin^{***}, I.A. Balashov^{*}, D.R. Cherkashin^{*}, and S.N. Udaltsov^{*****}**

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

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

***** Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskiy prosp. 31/14, Moscow, 119071 Russia*

******Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

An assessment of the dynamics of the change of anesthetic concentration in relation to time in the tear fluid is needed to understand the efficient doses for ophthalmologic surgery during anesthesia. The paper describes the examples of determination of local anesthetics – naropine, chirocaine and lidocaine used for ophthalmologic surgery by means of multisensor stripping voltammetry. The behavior of these anesthetics in the tear fluids of patients with concomitant glaucoma during phacoemulsification surgery was studied.

Keywords: multisensory stripping voltammetry, planar electrodes, naropin, chirocaine, lidocaine, local anesthesia, ophthalmology

УДК 519.876.5

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ РАСТЕНИЙ В СИСТЕМЕ «УДОБРЕНИЕ–ПОЧВА–РАСТЕНИЕ»

© 2020 г. В.А. Четырбоцкий*, А.Н. Четырбоцкий**, Б.В. Левин***

*Центр инновации АО «Апатит», 119333, Москва, Ленинский просп., 55/1, стр. 1

**Дальневосточный геологический институт ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

***ПАО «ФосАгро», 119333, Москва, Ленинский просп., 55/1, стр. 1

E-mail: vchetyrbotskii@gmail.com

Поступила в редакцию 02.09.2019 г.

После доработки 29.06.2020 г.

Принята к публикации 19.08.2020 г.

Разработана численная модель пространственно-временной динамики многопараметрической системы, составляющими которой выступают биомасса растений, подвижные и неподвижные формы элементов минерального питания среды, ризосферные микроорганизмы и параметры состояния внешней среды (температура, влагосодержание, кислотность). Проведена параметрическая идентификация и проверка адекватности разработанной модели на имеющейся выборке экспериментальных данных по росту яровой пшеницы «Красноуфимская-100» на торфяной низинной почве. Результаты представлены временными распределениями биомассы исследуемой сельскохозяйственной культуры и данными по содержанию основных элементов питания внутри самого растения (азота, фосфора, калия). Дана агрономическая оценка и интерпретация полученных результатов.

Ключевые слова: элементы минерального питания, минеральная емкость растений, кривая логистического роста, параметрическая идентификация модели.

DOI: 10.31857/S0006302920060228

Применение большинства известных динамических моделей агросистем ограничено изучением лишь небольшого числа составляющих элементов системы ввиду, во-первых, большого числа прямых и косвенных связей между самими элементами и, во-вторых, отсутствием достоверного экспериментального материала для верификации выполненных работ. Так, в работе [1] приводится модель динамики роста нескольких видов сельскохозяйственных культур, где основным предикатом продуктивности агросистемы выступает температура. При неблагоприятном температурном режиме принимается отрицательный рост биомассы, что не отражает целесообразность применения такой модели в реальных системах. Рост численности популяции замкнутого сообщества микроорганизмов в однородной стационарной среде изучался в работе [2]. Модель отражает превращение элементов питания среды (жертвы) и микроорганизмов (хищника) друг в друга, тем самым имитируя круговорот превращения питательных веществ, однако не учитывает внутривидовые взаимодействия популяции и влияния параметров внешней среды на динамические переменные выражений. В работе [3] при-

водятся характерные для замкнутых морских экосистем уравнения, составляющими которых выступают морская среда, биомасса фитопланктона, минеральные вещества и отмершая органика. Минеральное питание организмов подразделяется на группы сходных веществ (на основе азота, фосфора, кремния и т.д.), где морская среда играет роль ризосферы, фитопланктон – роль растений, минеральные вещества – элементов питания. В работе [3], аналогично работам [1] и [2], не учитываются факторы изменений состояния внешней среды, пространственного перераспределения элементов среды и учет внутрисистемных взаимодействий. Модель динамики травостоя в зависимости от климатических факторов без учета внутренних особенностей отдельных элементов приведена в работе [4]. Распределение почвенного органического вещества без отсылки к продуктивности самой среды изучалось в работах [5, 6].

Вне рамок перечисленных исследований оказываются важные практические случаи пространственной неоднородности ризосферы, приуроченность сообществ микроорганизмов к местам распределений питательных субстратов, внесе-

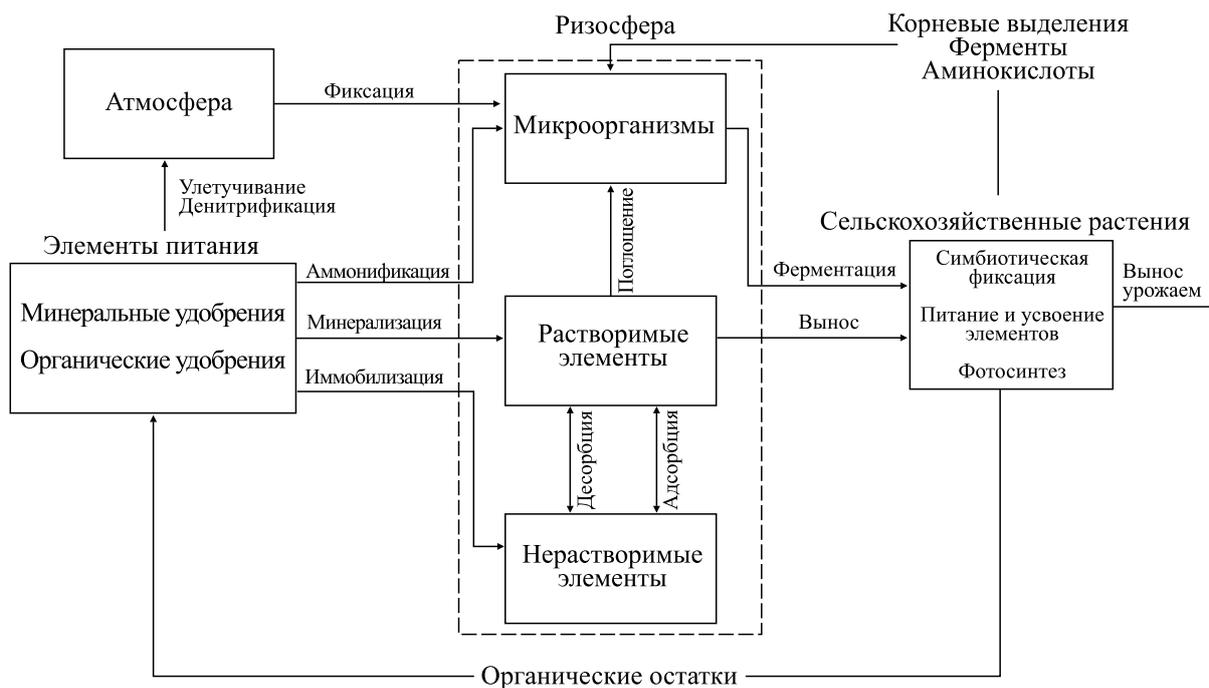


Рис. 1. Блок-схема модели химико-микробиологических процессов ризосферы.

ние удобрений в наиболее благоприятные фазы роста растений. Вопрос о распределении растворимых и нерастворимых форм питательных веществ, а также их связь между собой и растением был рассмотрен лишь в ограниченном числе случаев и не имеет дополнительных связывающих факторов между системой «питательный элемент–почва–растение». Также стоит отметить отсутствие методов и алгоритмов решения задач параметрической идентификации моделей (способов оценивания численных значений параметров модели) и проверки степени адекватности изучаемым реальным системам.

Перечисленные особенности подчеркивают актуальность разработки модели динамики комплексной системы, динамическими переменными которой выступают растения, ризосфера и сообщества населяющих ее микроорганизмов, элементы подвижной и неподвижной форм как минерального (минеральные удобрения), так и органического (навоз, компост, торф, солома и др.) питания. Всюду в дальнейшем под термином «минеральное питание растений» будет пониматься совокупность процессов поглощения, передвижения и усвоения клетками корней растений химических элементов, получаемых из почвы в форме ионов минеральных солей [7].

Блок-схема модели продукционных процессов ризосферы представлена на рис. 1.

Объектами исследования выступают: основное питательное вещество почвы, определяющее

ее плодородие, которое поступает извне посредством внесения удобрений; ризосферные микроорганизмы, которые выступают катализатором метаболических реакции в почве и которые служат универсальным механизмом следования питательных элементов до клеток растений; сами растения.

Процесс взаимодействия приведенных объектов состоит в следующем.

Удобрения попадают в почву в виде минеральных солей. Определенная их часть связывается с мезо- и микроэлементами почвы, образуя соли труднорастворимых соединений. Эти элементы неподвижных форм, как правило, статичны и практически не меняют своей координаты с течением времени, сорбируются в почвенные твердые породы и не растворяются в подвижный питательный почвенный раствор [8]. Остальная часть либо улетучивается в атмосферу, либо сорбируется в жидкую фазу почвы (почвенный раствор), которая непосредственно прилегает к корневой зоне растений и доставляет питательные элементы к корневым клеткам. При этом соли одних элементов находятся в определенных отношениях с солями других элементов, катализируя либо ингибируя их реакции с почвенным раствором.

Перешедшая в почвенный раствор определенная часть минеральных солей потребляется почвенными микроорганизмами. Дополнительным источником их питания служат корневые выделения растений. Конечным продуктом их реакции

являются биологически активные вещества и белковые соединения, поглощаемые вместе с питательными элементами среды растением. Такое поглощение служит основой для формирования урожая и органических остатков ризосферы.

Цель работы состоит в построении математической модели динамики системы «удобрение—почва—растение», составляющими компонентами которой выступают совокупность элементов питания почвы, сообщества микроорганизмов ризосферы и биомасса растений. В качестве основных типовых уравнений, используемых для построения выражений модели, были использованы уравнения самолимитированного роста Ферхюльста и ограничения потребления субстрата Моно [3, 7]. Для каждой из переменных выполнено построение модели, учитывающей определенные связи и самосогласованный характер составляющих элементов системы. Далее выполнено исследование роста яровой пшеницы на торфяной низинной почве с помощью программной реализации, адаптированной под уникальный репрезентативный экспериментальный материал.

МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ ЭЛЕМЕНТОВ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Динамика содержания в растениях элементов минерального питания определяется начальными

распределениями элементов подвижной формы в ризосфере, содержанием в ней органики и состоянием среды (распределениями температуры, влажности, плотности ризосферы, кислотности и т.п.), периодичностью внесения удобрений, взаимосвязями между элементами системы, пространственными распределениями растений и рядом других причин. Принимаются внутри- и межвидовые отношения между содержанием элементов (конкуренция, симбиоз, отношения «паразит—хозяин» и т.д.), где каждый элемент «борется» за вакантное место в системе «почва—растение» и тем самым вытесняет другие элементы из почвенного раствора. Примером такого поведения может служить отношение между цинком и кадмием, а также между кадмием и кальцием: цинк и кальций вытесняют кадмий из раствора его солей [9]. Принимаются также определенные взаимоотношения между содержаниями элементов в самом растении. Допускаются пространственно-временные перераспределения элементов неподвижной формы (их миграция).

Согласно принятым допущениям запись уравнений модели динамики элементов питания подвижных и неподвижных форм принимает следующий вид

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial C_i}{\partial t} = f_C(T, W) [q_{i,0} R_i + \sum_{j=1}^{n_C} q_{i,j} C_j] B \\ R_i = (1 - a_i^{(aw)}) (C_{i,0} - C_i) + a_i^{(a)} \sum_{k=1}^{n_K} p_{ik} \delta(t - t_{i,k}) + a_i^{(s)} S + a_i^{(wa)} C_i^{(w)} \\ \frac{\partial C_i^{(w)}}{\partial t} = a_i^{(aw)} (C_{i,0} - C_i) + a_i^{(w)} \sum_{k=1}^{n_K} p_{ik} \delta(t - t_{i,k}) - a_i^{(wa)} C_i^{(w)} + D_i^{(w)} \nabla^2 C_i^{(w)} \\ C_i(0, X) = 0 \text{ и } C_i^{(w)}(0, X) = 0, \text{ где } X \equiv (x, y, z) \end{array} \right., \quad (1)$$

где $\{C_i, i = 1 \div n_C\}$ — выраженное в единицах массы содержание в растении элементов его минерального питания в подвижной форме, n_C — число видов элементов питания; $C_i^{(w)}$ — выраженное в единицах массы содержание этих же элементов неподвижной формы в ризосфере. Функция $f_C(T, W)$ характеризует влияние температурного (T) и влажностного (W) режимов. Понятно, что ее набор аргументов не ограничивается только этими переменными: сюда следует также добавить показатель рН, плотность среды ρ и т. д. Для компактности записей ограничимся только температурой и влажностью. Далее, коэффициенты пропорциональности $\{q_{i,0}, i = 1 \div n_C\}$ характеризуют интенсивности поступления элементов подвижной формы из ризосферы в растение, а коэффици-

циенты $\{q_{ij}, i, j = 1 \div n_C\}$ — интенсивность влияния элементов питания на их прирост в самом растении. Наличие такой связи обусловлено химическими свойствами элементов питания: в одних случаях они могут выступать ингибиторами динамики, а в других — активаторами.

Набор $\{C_{i,0}, i = 1 \div n_C\}$ определяет начальное распределение элементов питания подвижной формы в ризосфере (R_i вводится для удобства записей). Коэффициенты $a_i^{(a)}$ и $a_i^{(w)}$ характеризуют доли внесенных удобрений, которые приходятся на элементы подвижной и неподвижной форм. Их сумма не превышает единицу (и может оказаться меньше ее), поскольку удобрения могут частично улетучиваться либо не попадать в раствор. Набор $\{p_{ik}, i = 1 \div n_C, k = 1 \div n_K\}$ характери-

зует внесенные в ризосферу в момент времени t_{ik} удобрения, где $\delta(t - t_{ik})$ — дельта-функция Дирака; $a_i^{(aw)}$ и $a_i^{(wa)}$ характеризуют взаимные переходы элементов между подвижной и неподвижной формами; $a_i^{(s)}$ — доля опада, которая приходится на i -й элемент подвижной формы; n_K — порядковое число вносимых в почву видов удобрений. Коэффициенты (1) подлежат оцениванию на основании вычислительных экспериментов.

Согласно уравнению (1), динамика элементов минерального питания подвижной формы в растении следует положениям, принятым в модели «ресурс—потребитель» [10]. При расчете элементов подвижной формы в ризосфере следует учитывать, что их количество C_i перешло в само растение, а количество $a_i^{(aw)}(C_{i,0} - C_i)$ перешло в неподвижную форму. Добавлены же сюда элементы удобрений, опада и перешедшие в подвижную форму элементы неподвижной формы.

Динамика элементов неподвижной формы $C_i^{(w)}$ определяется суммой перешедших из подвижной формы элементов (первый член в правой части) и той части массы удобрений, которая приходится на элементы неподвижной формы. Допускается их пространственно-временное перераспределение (миграция), которую тут выполняет диффузионный механизм ($D_i^{(w)}$ — коэффициент диффузии и ∇^2 — оператор Лапласа).

МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы выступают агентами переноса питательных для растений элементов и существенно стимулируют их рост. Динамика микробиоты определяется состоянием ризосферы,

естественным приростом и убылью, элементами подвижной формы (азот, фосфор и т.д.), внутри- и межвидовой конкуренцией за пищевой субстрат (он продуцируется самим растением, стебли, листья и корни которого выделяют углеводы и органические кислоты) и пространственный ресурс (они расселяются на поверхности и внутри растений). Эти выделения (корневые экссудаты) состоят преимущественно из различных органических соединений. Они активно выделяются корнями растений в окружающую среду и обеспечивают питательным субстратом микроорганизмы ризосферы, создавая тем самым благоприятные условия для их существования в прикорневых зонах [11].

В выделениях корней содержатся органические соединения большой физиологической активности — витамины, ростовые вещества, иногда алкалоиды и т. д. Многие из них выделяются и надземными органами растений. Поэтому на корнях и надземных органах растений размножается обильная сапрофитная микрофлора [9]. Питанию микроорганизмов в ризосфере обеспечивает коровые ризодепозиты, включая высокомолекулярные слизи полисахаридной и белковой природы, утраченные части растений (корневой чехлик, корневые волоски, отмершие части корня) [12, 13]. Ряд видов микроорганизмов находятся в антагонистических отношениях с другими видами, что ведет к регрессу системы. Например, среди эпифитных бактерий встречаются такие, которые образуют действующие отрицательно на фитопатогенные бактерии вещества и тем самым предохраняют растения от заболеваний [11].

Согласно принятым допущениям, запись уравнений модель динамики сообществ микроорганизмов принимает вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y_k}{\partial t} = f_Y(T, W) \left[\frac{\mu(S, B)}{b_k + b_k^{(u)} \mu(S, B)} - \sum_{j=1}^{n_Y} b_{k,j} Y_j \right] Y_k + \nabla(A_k \nabla \mu(S, B)) \\ \mu(S, B) = b_k^{(s)} S + b_k^{(b)} B \\ Y_k(0, x, y, z) = Y_{k,0}(x, y, z) \\ \frac{\partial Y_k}{\partial n} \Big|_{r=0} \end{array} \right. , \quad (2)$$

где $f_Y(T, W)$ характеризует влияние температурного T и водного W режимов ризосферы на динамику микроорганизмов (надо также учитывать кислотность среды pH, ее плотность ρ и т. д.); Y_k — численность/биомасса микроорганизмов k -го вида, $k = 1 \div n_Y$; S и B — масса органики и масса растений, которые представляют для микроорга-

низмов их питательный субстрат; $b_{k,j}$ — коэффициенты, посредством которых учитывается внутри- и межвидовая конкуренции микроорганизмов. Учет разномасштабного вклада опада и растений в питательный субстрат микроорганизмов фиксируется с помощью коэффициентов $b_k^{(s)}$ и $b_k^{(b)}$. A_k — функция эффективности поиска

питательного субстрата [14]; слагаемое вне квадратных скобок определяет механизм пространственного перераспределения микроорганизмов, согласно которому они следуют дивергенции градиента массы их питательного субстрата (хемотаксис [10,14]). Последнее соотношение в выражениях (2) указывает отсутствие потоков на границах области рассмотрения модели; $\nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right)$ – оператор градиента, а ∇ – дивергенция выражения.

Коэффициенты (2) подлежат оцениванию на основании вычислительных экспериментов. Согласно первому уравнению (2), локальная динамика микроорганизмов (выражение в квадратных скобках) следует принятым для микроорганизмов положениям естественного прироста в форме Моно [14]. Питательным субстратом для них выступает органика и растения. Микроорганизмы следуют распределению своего питательного субстрата, что определяется здесь дивергенцией от градиента массы субстрата. Такой механизм пространственного распределения микроорганизмов подобен механизму режима с обострением [15, 16], когда происходит взрывной характер роста биомассы микроорганизмов за конечное время. И чем выше масса субстрата (в том числе и биомасса растений), тем выше масса микроорганизмов.

МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ БИОМАССЫ РАСТЕНИЙ И ОРГАНИКИ

Динамика биомассы растений определяется элементами его питания, конкуренцией за ресурс, результатами жизнедеятельности микроорганизмов и интенсивностью отмирания растения, что существенным образом влияет на фор-

мирование органики. При построении моделей динамики биомассы и органики были приняты следующие допущения:

1. Динамика биомассы растений определяется ее естественной скоростью роста, содержанием в ризосфере элементов минерального питания, внутри- и межвидовых отношений между растениями (конкуренция, симбиоз и т. д.).

2. Характер потребления растением элементов минерального питания определяется положением модели «ресурс–потребитель», где ресурсом выступают элементы минерального питания, а потребителем – растение.

3. Отдельные виды микроорганизмов вызывают стимулирующий рост растений; в частности, продуцируемые ризобактериями антибиотики и токсины воздействуют на фитопатогены, приводя к ингибированию их роста и гибели [17].

4. Учитываются отношения между элементами питания (конкуренция, симбиоз и т.д.), которые уже употребились растением.

5. Попавшие в ризосферу отмершие части растений трансформируются в элементы органики, где интенсивность их накопления определяется функцией возраста растения (чем оно старше, тем выше интенсивность отмирания его частей) и текущего временного сезона года (весна, лето или осень).

6. Динамика органики определяется отмершими частями растений и ее потреблением микроорганизмами, для которых она выступает их субстратом.

Следуя этим допущениям, запись уравнений модели динамики биомассы растений и органики принимает следующий вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial B}{\partial t} = f_B(T, W) [d_0 - \varphi(t) + \sum_{i=1}^{n_C} d_i^{(c)} C_i + \sum_{k=1}^{n_Y} d_k^{(y)} Y_k - d_1 B] B \\ B(0, x, y, z) = B_{\min}(x, y, z) \\ \frac{\partial S}{\partial t} = \varphi(t) B - (d_0^{(s)} + \sum_{k=1}^{n_Y} d_k^{(s)} Y_k) S + D_S \nabla^2 S \\ S(0, x, y, z) = S_0(x, y, z) \end{array} \right. , \quad (3)$$

где $f_B(T, W)$ характеризует влияние температурного T и влажностного W режимов ризосферы на динамику биомассы (как и в предыдущих случаях, необходимо учитывать кислотность среды pH, ее плотность ρ и т. д.); d_0 – коэффициент естественного прироста биомассы; $\varphi(t)$ характеризует интенсивность формирования опада растения (стволы, сухие вершины, ветви, сухие стебли),

которая существенным образом зависит от возраста растения и сезона года (например, с наступлением осени деревья теряют свою листву); $d_i^{(c)}$ характеризует отнесенную к единице биомассы интенсивность потребления элементов подвижной формы, $i = 1 \div n_C$; посредством $d_k^{(y)}$ учитывается влияние микроорганизмов на динамику ро-

ста растения; последний член в квадратных скобках характеризует самолимитирование растения (влияние самого растения на свой рост).

Последние два уравнения определяют динамику органики, где $d_0^{(s)}$ – коэффициент естественного разрушения органики или ее естественных потерь (например, выветривание органики), а $d_k^{(s)}$ – коэффициенты потребления органики микроорганизмами.

ТЕМПЕРАТУРНЫЕ И ВЛАЖНЫЕ РЕЖИМЫ

При построении модели полагаем, что воздействие среды ризосферы на динамические переменные системы задается функциями $f_C(T, W, pH, \rho)$, $f_Y(T, W, pH, \rho)$, $f_B(T, W, pH, \rho)$ (как правило, кусочно-непрерывными функциями [1, 18, 19]). Представляется естественным, что их запись принимает вид:

$$\begin{cases} f_C(T, W, pH, \rho) = C_C \psi(T_1^{(C)}, T_2^{(C)}, T) \psi(W_1^{(C)}, W_2^{(C)}, W) \psi(pH_1^{(C)}, pH_2^{(C)}, pH) \psi(\rho_1^{(C)}, \rho_2^{(C)}, \rho) \\ f_Y(T, W, pH, \rho) = C_Y \psi(T_1^{(Y)}, T_2^{(Y)}, T) \psi(W_1^{(Y)}, W_2^{(Y)}, W) \psi(pH_1^{(Y)}, pH_2^{(Y)}, pH) \psi(\rho_1^{(Y)}, \rho_2^{(Y)}, \rho) \\ f_B(T, W, pH, \rho) = C_B \psi(T_1^{(B)}, T_2^{(B)}, T) \psi(W_1^{(B)}, W_2^{(B)}, W) \psi(pH_1^{(B)}, pH_2^{(B)}, pH) \psi(\rho_1^{(B)}, \rho_2^{(B)}, \rho) \end{cases} \quad (4)$$

где C_C , C_Y , C_B – эмпирические константы, а

$$\psi(X_{\min}, X_{\max}, X) = \begin{cases} (X - X_{\min})(X_{\max} - X) & \text{при } X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0 & \text{иначе} \end{cases}$$

При записи (4) полагается, что первые два аргумента функций в правых частях характеризуют оптимальный для жизненного цикла объектов диапазон соответствующих величин. Выбор именно такого представления обусловлен тем, что за пределом оптимального для диапазона температуры, влажности и т. д. имеет место его адекватная реакция. Кроме того, такое представление удобно для программной реализации. При неблагоприятном для объектов состоянии ризосферы правая часть первого уравнения (3) становится отрицательной, что приводит к падению биомассы. Когда потери биомассы ниже допустимого предела, растение погибает.

Для нахождения динамики температуры в ризосфере допустимым представляется использование уравнения теплопроводности в виде

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla D_T \nabla T, \quad (5)$$

где c_p – удельная теплоемкость вещества ризосферы, D_T – коэффициент его теплопроводности.

Поскольку моделью ризосферы выступает капиллярно-пористое тело, то здесь выполняется закон Дарси [20]: поток воды направлен в сторону уменьшения давления почвенной влаги и пропорционален ее градиенту. В ризосфере динамика распределения влаги по вертикальному профилю, как правило, задается уравнением Ричардса [21]:

$$\frac{\partial W}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K(W) \left(\frac{\partial \eta}{\partial z} + 1 \right) \right], \quad (6)$$

где $K(W)$ – коэффициент фильтрации в ненасыщенной зоне, η – высота всасывающего давления, высота над плоскостью сравнения..

ЧИСЛЕННАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ

Для изучения динамики роста яровой пшеницы «Красноуфимская-100» на торфяной низинной почве была выполнена адаптация модели, где учитывается особенность доступного для исследований экспериментального материала. Здесь он представлен временными распределениями биомассы растения и выраженных в единицах массы содержания в растении его основных элементов питания (калий, фосфор и азот).

Схема опытов и условия закладки экспериментов состоят в следующем [22]. Перед посевом специально отобранную торфяную низинную почву обработали азотными, фосфорными и калийными удобрениями (сульфат аммония, простой суперфосфат и сульфат калия соответственно). Эксперименты проводили на десяти типах объектов (варианты торфяной низинной почвы), отличающихся различием содержания К2О. Сам объект представлял собой сосуд с почвой, масса которой составляла 3.5 кг. Численные значения измеряли в масштабных единицах «г/сосуд». Набор {24, 28, 34, 39, 46, 55} определяет даты отбора растительных проб с момента появления первых всходов, которые соответствуют наиболее критическим фазам роста растений (единица времени – сутки). Поэтому начальный момент приходится на 24-е сутки проведения экспериментов. Характер жизненного цикла таких растений предопределяет его переход от фазы всхода к стадии кущения и прорастанию пер-

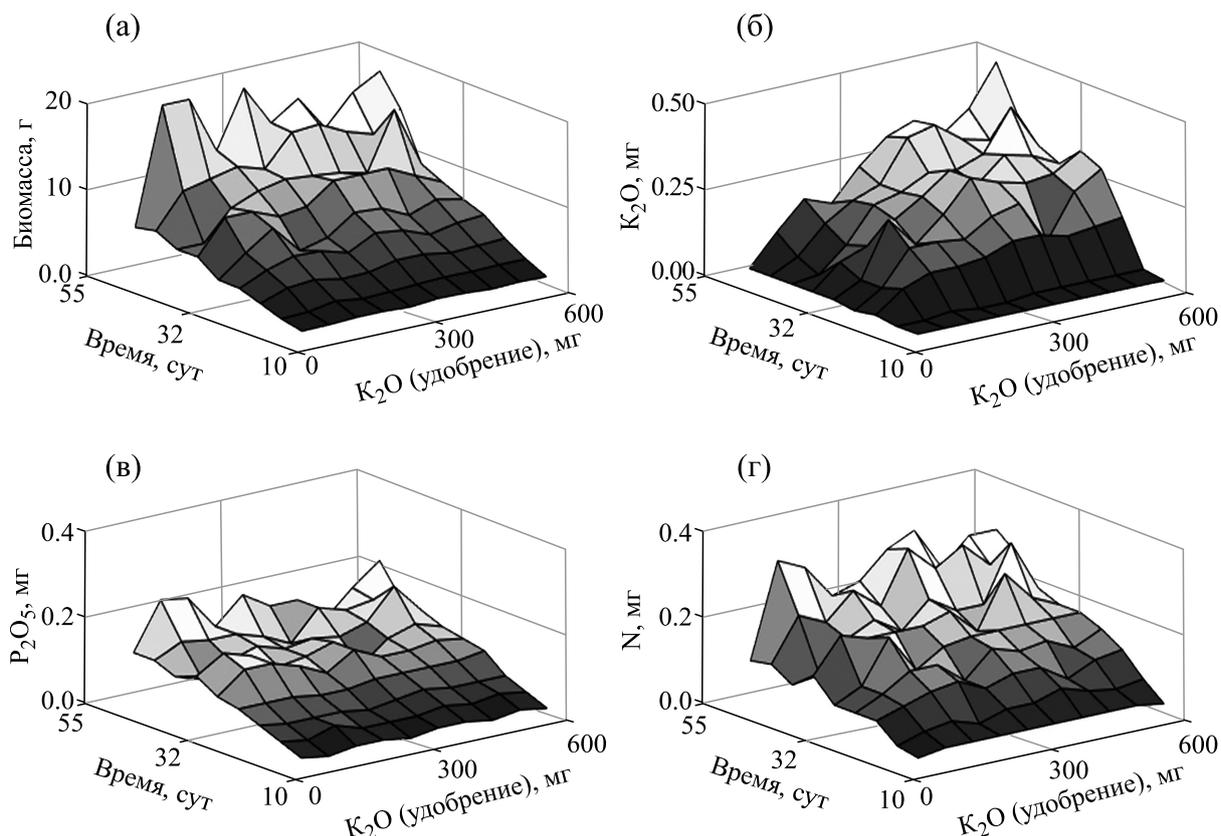


Рис. 2. Экспериментальные распределения динамических переменных модели.

вичных (зародышевых) корней на глубину 50–55 см. Vegetационный период яровой пшеницы в зависимости от сорта, районов возделывания и погодных условий колеблется от 85 до 110 суток [23, 24]. В экспериментах обеспечивали постоянный температурный и водный режимы ризосферы, где в граммах на сосуд учитывали только биомассу надпочвенной части растения и количественное содержание в ней элементов минерального питания. Экспериментальные распределения динамических переменных модели представлены на рис. 2.

На рис. 2а представлено распределение биомассы растений в момент отбора проб (граммы), а в остальных случаях – пересчитанные на окислы (кроме азота) содержания элементов в растениях (в мг). Ось «K₂O (удобрение), г» показывает содержание этого элемента в ризосфере при выполнении экспериментов по влиянию удобрений на рост биомассы. Независимо от внесения калийных удобрений почва также характеризуется наличием азота и фосфора. Всего, как уже сказано выше, для выполнения экспериментов было подготовлено десять вариантов торфяной низинной почвы с различным содержанием K₂O.

Характер распределений экспериментальных поверхностей на рис. 2 указывает на их относительно плавные и согласованные между собой изменения, причем отмеченная тенденция является общей для всех представленных случаев. Достаточно отметить, что если мерой согласованности распределений выступает коэффициент корреляции между ними, то он превышает значения 0.918 (корреляция между наблюдениями на 39-е и 55-е сутки). Для оценки корреляций была сформирована матрица, столбцами которой выступают значения биомассы и концентрации минеральных элементов за определенные сутки отбора проб.

Форма поверхностей несущественно отличается от поверхностей, которые обычно определяются принятыми в физиологии растений модели Ферхюльста или так называемыми логистическими уравнениями [10, 14]. Можно заметить, что здесь имеет место более длительный индукционный период (от момента начала роста до момента его быстрого роста или точки перегиба) по сравнению с логистической кривой.

Отсутствие требуемых для оценки модели системы (1)–(3) соответствующих пространственно-временных выборочных распределений обу-

словили рассмотрение здесь динамики биомассы и содержание основных элементов ее питания (K_2O , P_2O_5 и N) только в надземной части рас-

тения. Запись редуцированных уравнений систем (1)–(3) для такого случая принимает следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{\partial C_i}{\partial t} = \left(q_{i,0}C_{i,0} - q_{i,i}C_i + \sum_{j \neq i}^3 q_{i,j}C_j \right) B \\ \frac{\partial B}{\partial t} = (d_0 + d_K C_1 + d_P C_2 + d_N C_3 - d_B B) B, \quad i = 1 \div 3, \\ C_i(0, K) = C_{i,00}(K) \text{ и } B(0, K) = B_0(K) \end{cases} \quad (7)$$

где B_0 и $C_{i,00}$ – измеренные в экспериментах заданные начальные распределения переменных; аргумент K соответствует распределению участвующих в экспериментах типов почв с различным содержанием K_2O . Для компактности записей в уравнениях (7) по сравнению с уравнениями (1) принято $q_{i,0} = 1 - a_i^{(aw)}$. Коэффициенты модели оцениваются на основании серии вычислительных экспериментов. Маркировка нижних индексов у коэффициентов для динамики биомассы соотнесена с наименованием соответствующего химического элемента (калия, фосфора и азота). Здесь отсутствует разделение на элементы подвижной и неподвижной форм, поскольку измерения последних не были выполнены. В уравнениях (7) также не учитывается влияние температурного и влажностного режимов, т.к. при

выполнении экспериментов они были постоянными.

Для оценки применимости модели и проверки ее адекватности выборочным распределениям следует выполнить процедуру параметрической идентификации, т.е. найти значения параметров модели и установить степень соответствия модели экспериментальному материалу. Здесь значения параметров являются решением задачи поиска экстремума функционала, при построении которого надо учитывать различие масштабов переменных (7) (величины $[B]$ выражены в г, а $[C]$ – в мг). Поэтому переменные этого функционала должны быть безразмерными.

Здесь задача поиска экстремума формализуется следующим образом:

$$\Phi(p) = \sum_{i=2}^{45} \sum_{k=1}^{10} \left[\left(1 - B_{t,k} / B_{t,k}^{(d)} \right)^2 + \sum_{i=1}^3 \left(1 - (C_i)_{t,k} / (C_i)_{t,k}^{(d)} \right)^2 \right] \rightarrow \min, \quad (8)$$

где массивы $B^{(d)} = \{B_{t,k}^{(d)}\}$ и $C_i = \{(C_i)_{t,k}^{(d)}\}$ – выборочные распределения, а $B = \{B_{t,k}\}$ и $C_i = \{(C_i)_{t,k}\}$ следуют решению системы (7). При записи (8) учитывается тот факт, что всего было 45 временных точек и десять типов почв с различным содержанием K_2O .

Решение задачи (8) следует методологии нелинейного оценивания параметров [25] и выполня-

лось процедурой `lsqnonlin` программной среды MATLAB [26]. Начальные значения параметров оценивали согласно такой схеме.

Поскольку уравнения (7) линейны по своим параметрам, то их начальные значения можно оценить стандартным методом наименьших квадратов. Для каждого i набор $\{q_{ij}, j = 1 \div 3\}$ определяется вектором зависимых переменных:

$$\left\{ \frac{C_i^{(d)}(t_j + (\Delta t)_j, k) - C_i^{(d)}(t_j, k)}{B^{(d)}(t_j, k)(\Delta t)_j}, j = 1 \div n_t, k = 1 \div 10 \right\},$$

где верхний индекс d указывает на выборочные данные, t_j – моменты времени проведения съемок, $D(t)_j$ – промежуток между съемками в сутках, n_t – число съемок, k – число типов почв в экспериментах. Для каждого i независимыми пе-

ременными выступают наборы $\{C_{i,0}(t_j, k), j = 1 \div n_t, k = 1 \div 10\}$ и $\{C_i(t_j, k), j = 1 \div n_t, k = 1 \div 10\}$ при коэффициентах правой части (7). При оценке коэффициентов модели биомассы вектор зависимых переменных определяется выражением

$$\left\{ \frac{B^{(d)}(t_j + (\Delta t)_j, k) - B^{(d)}(t_j, k)}{B^{(d)}(t_j, k)(\Delta t)_j}, j = 1 \div n_t, k = 1 \div 10 \right\}.$$

Численные оценки параметров модели и их доверительные интервалы приведены в таблице, где нижние индексы заглавий строчек и столбцов соотнесены с наименованием соответствующих химических элементов (К, Р и N).

Анализ элементов таблицы показывает полнотное превышение показателя интенсивности поступления N из ризосферы в растение q_0 по сравнению с такими показателями для K_2O и P_2O_5 . Необходимо также отметить существенное превышение (более чем на два порядка) dN значений d_K и d_P , каждое из которых характеризует интенсивность/темп влияния N на динамику биомассы. Такая ситуация полностью согласуется с натурными исследованиями его важности в минеральном питании растений [7]. Действительно, продолжительность его поступления в растения совпадает с началом вегетации и продолжается до фазы молочной спелости [27]. Оптимальное азотное питание обуславливает усиление синтеза пластических веществ и ускоряет рост растений. При этом, в отличие от других элементов, N характеризуется высокой мобильностью и большим разнообразием форм, что и обуславливает важность его высокого положения среди остальных элементов минерального питания. Коэффициент корреляции между экспери-

ментальным и модельным распределениями для биомассы равен 0.887.

Следуя модели (7) и используемому здесь экспериментальному материалу, необходимо отметить менее значимое прямое влияние калия и фосфора на динамику биомассы растения.

Адекватность моделей минерального питания их натурным экспериментальным распределениям следует высоким значениям коэффициентов корреляции между ними.

Период вегетации яровой пшеницы «Красноуфимская-100» составляет в среднем 95 суток [27]. На рис. 3 приведены модельные распределения биомассы (а) и элементов минерального питания (б–г).

Анализ распределений показывает, что во всех случаях они следуют близким к логистическому росту кривым. При этом рост значений динамических переменных коррелирует с ростом содержания в ризосфере калийных удобрений.

Для динамики биомассы растения степень важности его элементов питания можно оценить исходя из таких положений. Согласно уравнениям (7), конечные содержания элементов в надземной части растений (стационарное состояние) и соответствующие значения биомассы определяются соотношениями

$$\left\{ \begin{array}{l} \sum_{j=1}^3 \frac{q_{i,j}}{q_i} C_j^* = C_{i,0} \\ B^* = \frac{d_0}{d_B} + \frac{d_K}{d_B} C_K^* + \frac{d_P}{d_B} C_P^* + \frac{d_N}{d_B} C_N^* \end{array} \right. \quad i = 1 \div 3,$$

Оценка коэффициентов параметров модели

	q_0	q_K	q_P	q_N	R
C_K	0.004 ± 0.001	0.029 ± 0.002	0.001 ± 0.003	0.001 ± 0.003	0.889
C_P	0.004 ± 0.001	0.041 ± 0.005	0.001 ± 0.003	0.007 ± 0.004	0.901
C_N	0.006 ± 0.001	0.025 ± 0.004	0.011 ± 0.001	0.001 ± 0.005	0.907
	d_0	d_K	d_P	d_N	d_B
B	0.128 ± 0.017	0.037 ± 0.137	0.0001 ± 0.662	5.457 ± 1.320	0.129 ± 0.032

Примечание. Число после знака \pm указывает размах для доверительного интервала; в графе R для каждого вида минерального питания указаны коэффициенты корреляции между экспериментальными и модельными распределениями.

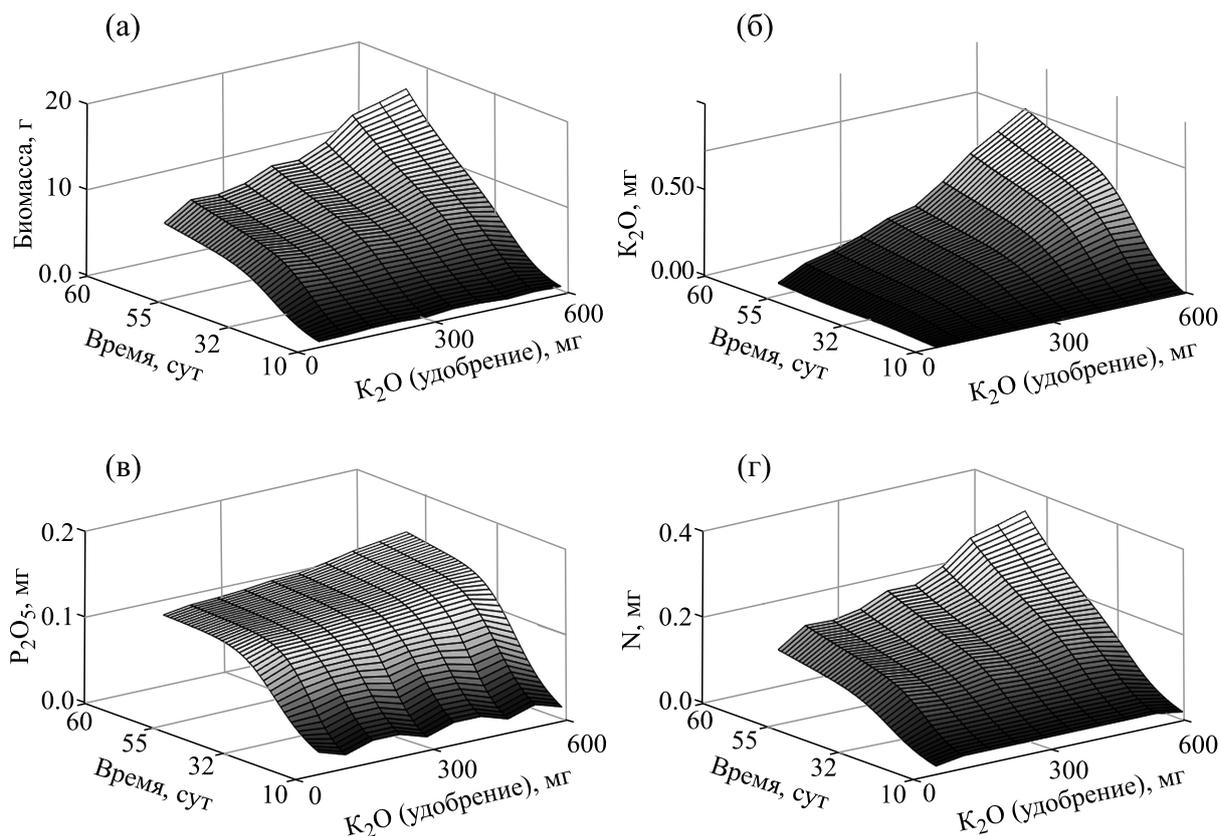


Рис. 3. Распределения динамических переменных модели (г/сосуд) на весь период вегетации растения (ось « K_2O » характеризует его содержание в ризосфере до посева).

где для удобства записи и последующей интерпретации приводится смешанное использование нижних индексов. Из второго соотношения следует, что естественный прирост биомассы $\frac{d_0}{d_B}$ составляет порядка единицы, а диапазон воздействия азота для почв с различным содержанием удобрений – от 8.5 до 12.7.

ВЫВОДЫ

Разработана математическая модель динамики системы «удобрение–почва–растение», где динамическими переменными выступают: содержание в растении элементов ее минерального питания в подвижной форме, ризосферные микроорганизмы и биомасса растений. В ризосфере учитываются также взаимные переходы между элементами подвижной и неподвижной форм. На основании положений модели «ресурс–потребитель» разработана модель динамики микроорганизмов, где ресурсом выступает биомасса и отмершие части растений.

Результат применения адаптированной под динамику роста яровой пшеницы модели показал, что на почвах с повышенным содержанием K_2O имеет место повышенное значение биомассы. При этом азот оказывает самое большое влияние на темп роста биомассы, следующим оказывается калий, а фосфор практически не оказывает влияния. Превалирующее здесь влияние азота обусловлено его ролью при росте и урожайности растительных культур, поскольку он является строительным материалом для их новых клеток [22–24]. Результаты моделирования как раз и отражают этот факт, что подтверждает адекватность разработанной модели.

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. Е. П. Колпак и М. В. Столбовая, Журн. научных публикаций аспирантов и докторантов (2013). URL: <http://jurnal.org/articles/2013/mat7.html>
2. Н. С. Стригуль, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (Санкт-Петербург, 2000).
3. А. И. Абакумов, в кн. *Математическое моделирование в экологии* (ИФХиБПП РАН, Пушкино, 2011), сс. 18–19.
4. И. М. Михайленко, С.-х. биология, № 1, 103 (2007).
5. А. С. Комаров, Ю. С. Хораськина, С. С. Быховец и др., *Мат. биология и биоинформатика* 7 (1), 162 (2012).
6. М.-С. Braakhekke, T. Wutzler, C. Beer et al., *Biogeosciences*, No 10, 399 (2013).
7. В. Г. Минеев, *Агрехимия* (Изд-во МГУ, «КолосС», М., 2004).
8. Д. С. Орлов, *Химия почв* (Изд-во МГУ, М., 1992).
9. А. Кабата-Пендиас и Х. Пендиас, *Микроэлементы в почвах и растениях* (Мир, М., 1989).
10. Ю. М. Свирижев, *Нелинейные волны, диссипативные структуры и катастрофы в экологии* (Наука, М., 1987).
11. Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. М. Хадиева и М. Р. Шарипова, *Уч. записки Казанского ун-та. Сер. Естественные науки* 158, 207 (2016).
12. О. Е. Беззубенкова, М. Н. Юхимова и Н. И. Нестерова, *Естественные и технические науки* 4, 99 (2012).
13. В. П. Иванов, *Корневые выделения и их значение в жизни фитоценоза* (Наука, М., 1973).
14. Г. Ю. Ризниченко и А. В. Рубин, *Математические модели биологических продукционных процессов* (Изд-во МГУ, М., 1993).
15. А. А. Самарский, В. А. Галактионов, С. П. Курдюмов и А. П. Михайлов, *Режимы с обострением в задачах для квазилинейных параболических уравнений* (Наука, М., 1987).
16. J. Murray, *Mathematical Biology: I. An Introduction* (Springer., New-York, 2002).
17. A. Beneduzi, A. Ambrosini, and L. M. Passaglia, *Genet. Mol. Biol.* 35 (Suppl. 4), 1044 (2012).
18. T. Roose, S. D. Keyes, K. R. Daly, et al., *Plant Soil*, No. 407, 9 (2016).
19. Л. А. Хворова, А. Г. Топаж, А. В. Абрамова, К. Г. Неупакоева, *Изв. Алтайского государственного ун-та*, № 1-1 (85), 192 (2015).
20. Н. С. Бахвалов и Г. П. Панасенко, *Осреднение процессов в периодических средах* (Наука М., 1984).
21. M. A. Celia, E. T. Bouloutas, and R. L. Zabra, *Water Resource Res.* 26 (7), 1483 (1990).
22. Н. А. Сладкова, Дис. ... канд. биол. наук (Санкт-Петербург, 2016).
23. *Растениеводство*, под ред. Л. А. Посыпанова («КолосС», М. 1997).
24. *Растениеводство с основами селекции и семеноводства*, под ред. Г. В. Коренева (Агропромиздат, М., 1990).
25. Й. Бард, *Нелинейное оценивание параметров* (Статистика, М., 1979).
26. В. П. Дьяконов, *MATLAB. Полный самоучитель* (ДМК Пресс, М., 2012).
27. Б. А. Доспехов, *Методика полевого опыта* (Агропромиздат, М., 1985).

Mathematical Modeling of the Dynamics of Plant Mineral Nutrition in the Fertilizer-Soil-Plant System

V.A. Chetyrbotskiy*, A.N. Chetyrbotskiy**, and B.V. Levin***

*Joint-Stock Company «Apatit», Leninskii prosp. 55/1, build. 1, Moscow, 119333 Russia

**Far East Geological Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

***Public Joint-Stock Company «PhosAgro», Leninskii prosp. 55/1, build. 1, Moscow, 119333 Russia

A numerical simulation of the spatial-temporal dynamics of a multi-parameter system is developed. The components of this system are plant biomass, mobile and stationary forms of mineral nutrition elements, rhizosphere microorganisms and environmental parameters (temperature, humidity, acidity). Parametric identification and verification of the adequacy of the model were carried out based on the experimental data on the growth of spring wheat «Krasnoufimskaya-100» on peat lowland soil. The results are represented by temporal distributions of biomass from agricultural crop under study and the findings on the content of main nutrition elements within the plant (nitrogen, phosphorus, potassium). An agronomic assessment and interpretation of the obtained results are given.

Keywords: mineral nutrition elements, plant mineral capacity, logistic growth curve, model parametric identification of the model

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ К 65 ТОМУ ЗА 2020 ГОД

Авторский указатель к 65 тому за 2020 год 1230
Содержание тома 65, 2020 г. 1240

- Абдрасулова Ж.Т.** см. Шаповалов Ю.А.
Абзаева К.А. см. Корман Д.Б.
Абзаева К.А. см. Островская Л.А.
Абушик П.А. см. Карелина Т.В.
Аверин А.С. см. Фесенко (мл.) Е.Е.
Агафонов А.В. см. Тхагапсова М.М.
Акатов В.С. см. Кобякова М.И.
Александров А.В. см. Кулешова Т.Э.
Алова А.В. см. Бульчев А.А.
Анашкина А.А. см. Некрасов А.Н.
Анашкина А.А. см. Нечипуренко Ю.Д.
Андреев А.А. см. Пономарева Е.Н.
Андреева А.Ю. см. Солдатов А.А.
Андреева-Ковалевская Ж.И. см. Сиунов А.В.
Андреев Т.И. см. Солдатов А.А.
Аникина Л.М. см. Кулешова Т.Э.
Антал Т.К. см. Ризниченко Г.Ю.
Антипова А.С. см. Сажина Н.Н.
Антонов В.Г. см. Мельнишкая А.В.
Антонов С.М. см. Карелина Т.В.
Антонян А.П. см. Аракелян В.Б.
Апашева Л.М. см. Белов С.В.
Аракелян В.Б., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Вардеванян П.О. Изменение выходного сигнала ДНК-биосенсора, индуцированного адсорбцией лигандов на дуплексы ДНК в флуктуирующей среде 670
Армеев Г.А. см. Эрендженова А.А.
Артюшина З.С. см. Сереженков В.А.
Асауленко З.П., Полушкина Л.Б., Лепский А.И., Криволапов Ю.А. Морфологическая дифференциальная диагностика первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с использованием компьютерного кластерного анализа мегакариоцитарного ростка миелоидной ткани 792
Афанасьева Т.Н. см. Паршина С.С.
Ахадов Т. см. Яковлев А.Н.
Аюпова А.Ф. см. Канапин А.А.
Багрова О.Е. см. Мальшко Е.В.
Бажина Е.В. Изменения архитектуры кроны деревьев пихты сибирской при нарушении гомеостаза 753
Бакунина Н.А. см. Балашова Л.М.
Балакин А.А., Лукин О.Н., Кузнецов Д.А., Проценко Ю.Л. Кинетика внутриклеточного кальция и потенциал действия в миокарде желудочков спонтанно-гипертензивных крыс линии ISIAN 574
Балашов В.А. см. Погорелов А.Г.
Балашов И.А. см. Балашова Л.М.
Балашова Л.М., Намиот В.А., Колесниченко И.И., Бакунина Н.А., Коробова Л.С., Доронин А.Н., Балашов И.А., Черкашин Д.Р., Удальцов С.Н. Определение в слезной жидкости препаратов, используемых во взрослой офтальмоанестезиологической практике, с помощью метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии 1211
Баль Н.В. см. Урошлев Л.А.
Баранова О.А. см. Казаринов К.Д.
Баранцев К.А. см. Божокин С.В.
Барышев М.Г. см. Козин С.В.
Барышев М.Г. см. Текуцкая Е.Е.
Барышева Е.В. см. Елкина А.А.
Басов А.А. см. Елкина А.А.
Белов С.В., Апашева Л.М., Данилейко Ю.К., Егоров А.Б., Лобанов А.В., Луканин В.И., Овчаренко Е.Н., Савранский В.В., Шилин Л.Г. Стимуляция роста растений водным раствором, активированным плазмой тлеющего разряда 326
Белопольская Т.В. см. Грунина Н.А.
Белоусов А.В. см. Морозов В.Н.
Белоусов А.В., Морозов В.Н., Крусанов Г.А., Моисеев А.Н., Давыдов А.С., Штиль А.А., Климанов В.А., Кольванова М.А., Самойлов А.С. Изменение линейной передачи энергии клинического пучка протонов при добавлении в облучаемую мишень наночастиц золота 638
Беляева Н.Е. см. Ризниченко Г.Ю.
Беляева С.Н. см. Петрова И.В.
Беспалова С.В., Романчук С.М., Чуфицкий С.В., Пребейнос В.В., Готин Б.А. Флуориметрический анализ влияния шламовых загрязнителей на фитопланктон 994
Билецкая Е.С. см. Зинчук В.В.
Бирулина Ю.Г. см. Петрова И.В.
Бирюков С.А. см. Волкова М.В.
Бирюков С.А. см. Плахотный М.А.
Бисвас С., Пал Д., Махапатра Г.С., Саманта Г.П. Динамика системы «хищник–жертва» со стадным поведением в обоих случаях и сильным эффектом Олли у жертвы 967
Блохтерова Н.В. см. Ванин А.Ф.
Блохтерова Н.В. см. Корман Д.Б.
Блохтерова Н.В. см. Островская Л.А.
Бобык С.З. см. Плескова С.Н.
Бобылёв А.Г. см. Якупова Э.И.
Бобылёва Л.Г. см. Якупова Э.И.
Богданова Ю.В. см. Полетаева И.И.
Божко О. см. Яковлев А.Н.

Божокин С.В., Лесова Е.М., Самойлов В.О., Баранцев К.А. Нестационарная вариабельность сердечного ритма во время антиортостатической пробы 175

Бокерия Л.А. см. Тхагапсова М.М.

Болдырев С.В. см. Канапин А.А.

Бондарь Г.Г. см. Орлов В.И.

Борзова И.А. см. Хусаинов Д.Р.

Борисова М.П. см. Сиунов А.В.

Бородулин Р.Р. см. Микоян В.Д.

Бороновский С.Е. см. Копылова В.С.

Боряков А.В. см. Плескова С.Н.

Бояринцев В.В. см. Гончаров Р.Г.

Бояринцев В.В. см. Волкова М.В.

Бояринцев В.В. см. Плахотный М.А.

Братковская Л.Б. см. Маторин Д.Н.

Брилкина А.А. см. Плескова С.Н.

Буко В.У. см. Ильич Т.В.

Бульчев А.А., Алова А.В., Крупенина Н.А., Рубин А.Б. Течение цитоплазмы как внутриклеточный конвейер: влияние на фотосинтез и потоки H^+ в клетках Chara 290

Бургова Е.Н. см. Микоян В.Д.

Быстров В.С. см. Филиппов С.В.

Ванин А.Ф. см. Марнаутов Н.А.

Ванин А.Ф. см. Сереженков В.А.

Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут как доноры катионов нитрозония подавлять вирусные инфекции (гипотеза) 818

Ванин А.Ф. Свободно-радикальная природа молекул монооксида азота как фактор, определяющий их превращение в живых организмах в ионы нитрозония 421

Ванин А.Ф. см. Микоян В.Д.

Ванин А.Ф., Островская Л.А., Корман Д.Б., Блюхтерова Н.В., Рыкова В.А., Фомина М.М. Противоопухолевые свойства динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами и S-нитрозоглутатиона в эксперименте 48

Ванин А.Ф., Островская Л.А., Корман Д.Б., Некрасова Е.И., Рябая О.О., Блюхтерова Н.В., Рыкова В.А., Фомина М.М. Влияние природы лиганда на противоопухолевую активность и цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа 1009

Вардеванян П.О. см. Аракелян В.Б.

Василисков В.А. см. Шершов В.Е.

Василов Р.Г. см. Куликов Е.А.

Вейко А.Г. см. Ильич Т.В.

Векшин Н.Л. см. Крылова А.Е.

Векшин Н.Л. Электрон-колебательные возбужденные комплексы в ферментативных реакциях 412

Вихлянцева И.М. см. Якупова Э.И.

Владимиров Г.К. см. Ромодин Л.А.

Владимиров Ю.А. см. Ромодин Л.А.

Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Кулигин В.С., Кожухова Е.И., Иванов Е.В., Дебабов В.Г. Микробный синтез наночастиц: механизмы, характеристики, применение 878

Волков В.А., Ямскова О.В., Воронков М.В., Курилов Д.В., Романова В.С., Мисин В.М., Гагарина И.Н., Павловская Н.Е., Горькова И.В., Лушников А.В. Новые стимуляторы роста растений на основе водорастворимых наночастиц *n*-замещенных моноаминокислотных производных фуллерена C_{60} и изучение механизма их действия 745

Волкова М.В., Бояринцев В.В., Трофименко А.В., Бирюков С.А., Горина Е.В., Фильков Г.И., Дурьманов М.О. Адаптация метода интерферометрии слоя биомолекул для количественной оценки содержания фактора роста эндотелия сосудов в кондиционированной клеточной среде 1099

Волошин С.В. см. Тельная Е.А.

Волощук О.Н., Копыльчук Г.П., Тазырова К.А. Особенности энергообеспечения гепатоцитов в условиях различного содержания в рационе нутриентов 310

Воронков М.В. см. Волков В.А.

Врублевская В.В. см. Жмурина М.А.

Вчерашняя А.В. см. Мартинович Г.Г.

Гагарина И.Н. см. Волков В.А.

Гагаринский Е.Л. см. Фесенко (мл.) Е.Е.

Галль Н.Р. см. Кулешова Т.Э.

Гапеев А.Б. см. Щербатюк Т.Г.

Гараева А.Я., Сидорова А.Э., Левашова Н.Т., Твердислов В.А. Перколяционная решетка естественного отбора как коммутатор детерминированных и случайных процессов в потоке мутаций 614

Гараева А.Я., Сидорова А.Э., Твердислов В.А., Левашова Н.Т. Модель предпосылок видообразования в представлениях теорий перколяций и самоорганизованной критичности 932

Гарифуллин А.Д. см. Тельная Е.А.

Герасимова Т.В. см. Таратухин О.Д.

Гладьшев П.П. см. Шаповалов Ю.А.

Головко В.А. см. Лебедева Е.А.

Голощапов А.Н. см. Марнаутов Н.А.

Гольтяев М.В. см. Фесенко (мл.) Е.Е.

Гончаров Р.Г., Фильков Г.И., Трофименко А.В., Бояринцев В.В., Новоселов В.И., Шаратов М.Г. Защитный эффект химерного фермента-антиоксиданта PSH при ишемически-реперфузионном поражении почек 349

Гордеева А.Е., Шаратов М.Г., Евдокимов В.А., Новоселов В.И., Фесенко Е.Е. Влияние экзогенного перокси-редоксина 6 на функциональные параметры изолированной почки крысы 340

Горина Е.В. см. Волкова М.В.

Горина Е.В. см. Плахотный М.А.

Городков А.Ю. см. Тхагапсова М.М.

Горькова И.В. см. Волков В.А.

Горячев С.Н. см. Маторин Д.Н.

Горячев С.Н. см. Ризниченко Г.Ю.

Готин Б.А. см. Беспалова С.В.

Грецова М.В., Самсонова М.Г. Генетическая идентификация сортов сои с использованием однонуклеотидных полиморфизмов 206

Гриневич А.А. см. Танканаг А.В.

- Гришин С.Н. см. Хайруллин А.Е.
 Грудинин Н.В. см. Фесенко (мл.) Е.Е.
 Грунина Н.А., Белопольская Т.В., Церетели Г.И., Смирнова О.И. Проявление гистерезиса в тепловых свойствах наносистем на примере переохлажденных кластеров воды во влажных G-сефадексах 36
 Гудымо А.С. см. Онхонова Г.С.
 Гулин А.А. см. Погорелов А.Г.
 Гуринов А.Е. см. Фесенко (мл.) Е.Е.
 Гурия Г.Т. см. Сапега Т.С.
 Гурский В.В. см. Подольный Б.С.
 Гусакова С.В. см. Петрова И.В.
 Гусарук Л.Р. см. Текуцкая Е.Е.
- Давыдов А.С. см. Белоусов А.В.
 Данилейко Ю.К. см. Белов С.В.
 Данилова М.А. см. Олешкевич А.А.
 Дашкевич Л.В. см. Тютюнов Ю.В.
 Дебабов В.Г. см. Воейкова Т.А.
 Дегтярев С.Х. см. Ильинский В.В.
 Деев Л.И. см. Слатинская О.В.
 Демихов Е.И. см. Ромодин Л.А.
 Джелдубаева Э.Р. см. Чуян Е.Н.
 Джимаков С.С. см. Елкина А.А.
 Диатроптов М.Е., Панчелого В.А., Станкевич А.А. Динамика смены первостепенного махового оперения у воробьиных птиц, возможные факторы синхронизации 152
 Дмитриев А.В. см. Филимонов Д.А.
 Донцов В.И., Крутько В.Н. Моделирование полной кривой смертности человека: регуляторная модель старения 198
 Донцов В.И., Крутько В.Н. Смертность как показатель старения: возможности и ограничения 190
 Доронин А.Н. см. Балашова Л.М.
 Дорофеев А.В. см. Тхагапсова М.М.
 Дульцева Г.Г. см. Немова Е.Ф.
 Дурыманов М.О. см. Волкова М.В.
 Дьяконова А.Н. см. Ризниченко Г.Ю.
- Евдокимов В.А. см. Гордеева А.Е.
 Евстратова Я.В. см. Кобякова М.И.
 Егоров А.Б. см. Белов С.В.
 Елкина А.А. см. Козин С.В.
 Елкина А.А., Тумаев Е.Н., Басов А.А., Моисеев А.В., Малышко В.В., Барышева Е.В., Чуркина А.В., Джимаков С.С. Механизмы взаимодействия стабильных изотопов с биологическими объектами с учетом нескомпенсированного нейтрона в химических связях 1034
 Есипова Н.Г. см. Некрасов А.Н.
 Еськов Е.К. Восприятие и специфичность реагирования медоносных пчел, бумажных ос и рыжих лесных муравьев на низкочастотное электрическое поле 565
 Жалимов В.К. см. Жмурина М.А.
 Жданова О.Л. см. Фрисман Е.Я.
 Жмурина М.А., Врублевская В.В., Скарга Ю.Ю., Петренко В.С., Жалимов В.К., Моренков О.С. Интернализация клетками и противоопухолевая активность антител и иммунотоксинов, специфичных к β -изоформе белка теплового шока 90 1118
 Жоржоллиани Ш.Т. см. Тхагапсова М.М.
 Жузе А.Л. см. Чурюкина К.А.
 Жукова (Плеханова) Е.С. см. Щербатюк Т.Г.
 Журавлева О.А. см. Воейкова Т.А.
- Заводник И.Б. см. Ильич Т.В.
 Загайнова А.В. см. Заломова Л.В.
 Заломова Л.В., Решетников Д.А., Уграйская С.В., Межевикина Л.М., Загайнова А.В., Макаров В.В., Юдин С.М., Фесенко (мл.) Е.Е. Эффективность консервации в жидком азоте микробиоты кишечника человека в зависимости от состава криозащитной среды 924
 Замулаева И.А. см. Чурюкина К.А.
 Зверев В.И. см. Морозов В.Н.
 Зеленский К.А. см. Шошина И.И.
 Зенков Н.К. см. Мартинович Г.Г.
 Зиганшин А.У. см. Хайруллин А.Е.
 Зиганшин Р.Х. см. Некрасов А.Н.
 Зинчук В.В., Билецкая Е.С. Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах воздействия в опытах *in vitro* 915
 Злищева Э.И. см. Козин С.В.
- Иванов А.А. см. Чурюкина К.А.
 Иванов Е.В. см. Воейкова Т.А.
 Ивлев С.А. см. Орлов В.И.
 Иконникова А.Ю. см. Шершов В.Е.
 Ильинский В.В., Козлова Е.М., Дегтярев С.Х., Янковский Н.К., Макеев В.Ю. Эффективность определения 5-метилцитозина в ДНК клеток *Escherichia coli*, несущих гены бактериальных ДНК-метилтрансфераз, с помощью установки Oxford Nanopore 1045
 Ильич Т.В., Лапшина Е.А., Маскевич А.А., Вейко А.Г., Лавыш А.В., Палеч Б., Степняк А., Буко В.У., Заводник И.Б. Комплексы включения кверцетина с β -циклодекстринами: ультрафиолетовая и инфракрасная спектроскопия, квантово-химическое моделирование 453
 Ильичева И.А., Ходыков М.В., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Нечипуренко Ю.Д. Ультразвуковое расщепление ДНК: анализ структурно-динамических характеристик регуляторных участков генома и ошибок секвенирования 504
 Ильченко Г.П. см. Текуцкая Е.Е.
 Ишемгулов А.Т. см. Летуга С.Н.
- Казаринов К.Д., Щелконогов В.А., Баранова О.А., Чеканов А.В., Соловьева Э.Ю., Федин А.И. Влияние микроволнового излучения на чувствительность клеток к одноатомным спиртам в обогащенной тромбоцитами плазме 1107
 Каменев Г.К., Д.А. Саранча, Поляновский В.О. О калибровке автономной модели тундровой биологической популяции леммингов 1184
 Канапин А.А., Соколкова А.Б., Самсонова А.А., Щегольков А.В., Болдырев С.В., Аюпова А.Ф., Хайтович Ф.Е., Нурдин С.В., Самсонова М.Г. Генетические варианты,

ассоциированные с продуктивностью и содержанием белка и масла у сои 280

Карандашев В.К. см. **Кольтовер В.К.**

Карелина Т.В., Степаненко Ю.Д., Сибаров Д.А., Абушик П.А., Антонов С.М. Ингибирование гамкергической передачи как модель гиперактивации клеток Пуркинью мозжечка крыс 104

Карпинская В.Ю. см. **Шошина И.И.**

Карраскила-Гарсия Н. см. **Соколкова А.Б.**

Касумов Х.М. см. **Таги-заде Т.П.**

Кикнадзе Г.И. см. **Тхагапсова М.М.**

Климанов В.А. см. **Белоусов А.В.**

Кобякова М.И., Евстратова Я.В., Сенотов А.С., Ломовский А.И., Новикова В.В., Краснов К.С., Фадеева И.С., Акатов В.С., Фадеев Р.С. Исследование макрофагальной дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах 320

Ковалев И.В. см. **Петрова И.В.**

Коваленко И.Б. см. **Ризниченко Г.Ю.**

Ковач М. см. **Сереженков В.А.**

Ковтун А.Л. см. **Фесенко (мл.) Е.Е.**

Кодочигова А.И. см. **Паршина С.С.**

Кодунов А.М. см. **Плахотный М.А.**

Кожухова Е.И. см. **Воейкова Т.А.**

Козин С.В., Кравцов А.А., Злищева Э.И., Шурыгина Л.В., Малышко В.В., Моисеев А.В., Елкина А.А., Барышев М.Г. Влияние обедненного дейтерием питьевого рациона на функциональное состояние центральной нервной системы животных в условии гипоксии 1196

Козин С.В., Кравцов А.А., Туроверов К.К., Фонин А.В., Чихиржина Е.В., Малышко В.В., Моисеев А.В., Чуркина А.В. Изменение функциональной активности пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в средах с различным изотопным $^2\text{H}/^1\text{H}$ составом 229

Козлов К.Н. см. **Таратухин О.Д.**

Козлова Е.М. см. **Ильинский В.В.**

Козмин Ю.П. см. **Некрасов А.Н.**

Козырев С.В. см. **Некрасов А.Н.**

Колесников А.С. см. **Сиунов А.В.**

Колесниченко И.И. см. **Балашова Л.М.**

Кольванова М.А. см. **Белоусов А.В.**

Кольванова М.А. см. **Морозов В.Н.**

Кольтовер В.К., Лабынцева Р.Д., Карандашев В.К. Магнитно-изотопные эффекты магния и цинка в ферментативных реакциях гидролиза АТФ, катализируемых молекулярными моторами 493

Комзин К.В. см. **Паршина С.С.**

Комиссарова Л.Х. см. **Марнаутов Н.А.**

Копылова В.С., Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р. Применение фрактального анализа для оценки артериальной системы мозга крысы 583

Копыльчук Г.П. см. **Волощук О.Н.**

Коренюк И.И. см. **Хусаинов Д.Р.**

Корман Д.Б. см. **Ванин А.Ф.**

Корман Д.Б. см. **Островская Л.А.**

Корман Д.Б., Некрасова Е.И., Островская Л.А., Рябая О.О., Блюхтерова Н.В., Абзаева К.А. Цитоток-

сическое действие полиакрилата золота (аурумакрил) на фибробласты кожи человека 1093

Коробова Л.С. см. **Балашова Л.М.**

Кошлань И.В. см. **Полетаева И.И.**

Кошлань Н.А. см. **Полетаева И.И.**

Кравцов А.А. см. **Козин С.В.**

Краснобаева Л.А., Якушевич Л.В. Динамические и статистические свойства кинков ДНК 29

Краснов К.С. см. **Кобякова М.И.**

Кратасюк В.А. см. **Суковатый Л.А.**

Криволапов Ю.А. см. **Асауленко З.П.**

Кривошапкин П.В. см. **Морозов В.Н.**

Крупенина Н.А. см. **Бульчев А.А.**

Крусанов Г.А. см. **Белоусов А.В.**

Крутецкая З.И. см. **Мельнишкая А.В.**

Крутецкая Н.И. см. **Мельнишкая А.В.**

Крутько В.Н. см. **Донцов В.И.**

Кручинин Н.Ю., Кучеренко М.Г. Молекулярно-динамическое моделирование связанных с атомарными кластерами полиамфолитных полипептидов на поверхностях металлоподобных нанообъектов 219

Крылова А.Е., Чаплыгина А.В., Векшин Н.Л. Образование липофусцина у дрозофил при нагревании и ультрафиолетовом облучении 69

Крюков Р.Н. см. **Плескова С.Н.**

Кувшинов А.Ю. см. **Тельная Е.А.**

Кузнецов Д.А. см. **Балакин А.А.**

Кузнецова В.Е. см. **Шершов В.Е.**

Кузнецова М.И. см. **Сереженков В.А.**

Кук Д.Р. см. **Соколкова А.Б.**

Кукушкин В.И. см. **Субекин А.Ю.**

Кулешова Т.Э., Черноусов И.Н., Удалова О.Р., Аникина Л.М., Хомяков Ю.В., Александров А.В., Середин И.С., Феофанов С.В., Щеглов С.А., Галль Н.Р., Панова Г.Г. Влияние спектральных особенностей световой среды на поглощение света листьями салата и его нетто-продуктивность 112

Кулигин В.С. см. **Воейкова Т.А.**

Кулик Л.В. см. **Субекин А.Ю.**

Куликов Е.А., Куликова И.С., Василев Р.Г., Селищева А.А. Влияние природы растворителя и освещения на изомеризацию и окислительную деструкцию астаксантина 512

Куликова И.С. см. **Куликов Е.А.**

Курилов Д.В. см. **Волков В.А.**

Кухарева Т.А. см. **Солдатов А.А.**

Кучеренко М.Г. см. **Кручинин Н.Ю.**

Лабынцева Р.Д. см. **Кольтовер В.К.**

Лавыш А.В. см. **Ильич Т.В.**

Лагунин А.А. см. **Филимонов Д.А.**

Лапа С.А. см. **Шершов В.Е.**

Лапшина Е.А. см. **Ильич Т.В.**

Лебедева Е.А., Головкин В.А. Эффекты ингибиторов ионных каналов на генерацию электрических импульсов у клеток водителя ритма правого предсердия десятисуточного куриного эмбриона 728

Левашова Н.Т. см. **Гараева А.Я.**

- Левашова Н.Т.** см. **Гараева А.Я.**
- Левин Б.В.** см. **Четырбоцкий В.А.**
- Леонидов А.В.** Пороговая характеристика ретино-гипоталамического тракта управления циркадианной активностью человека солнечным излучением 402
- Леонидов А.В.** Спектрально-селективные преобразования солнечного излучения фотоприемниками сетчатки при управлении циркадианном ритмом организма человека в 11-летнем цикле солнечной активности 605
- Лепский А.И.** см. **Асауленко З.П.**
- Лесова Е.М.** см. **Божокин С.В.**
- Летута С.Н., Пашкевич С.Н., Ишемгулов А.Т., Никитин А.Н.** Фототермическая инактивация микроорганизмов при релаксации высоковозбужденных состояний сенсibilизаторов 705
- Лисица А.Е.** см. **Суковатый Л.А.**
- Лиу Р., Педлар Ш., Од А., МакДоналд С., Стоун Дж.** Фенотипическое приспособление у морских ежей, выращенных в условиях геометрических ограничений 557
- Лобанов А.В.** см. **Белов С.В.**
- Лобышев В.И.** см. **Лобышева Н.В.**
- Лобышева Н.В., Нестеров С.В., Скоробогатова Ю.А., Лобышев В.И.** Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия 315
- Ломовский А.И.** см. **Кобякова М.И.**
- Луканин В.И.** см. **Белов С.В.**
- Лукин О.Н.** см. **Балакин А.А.**
- Лунева О.Г.** см. **Слатинская О.В.**
- Лушников А.В.** см. **Волков В.А.**
- Лысенко Н.П.** см. **Ромодин Л.А.**
- Ляховецкий В.А.** см. **Шошина И.И.**
- Макаров А.А.** см. **Петрушанко И.Ю.**
- Макаров В.В.** см. **Заломова Л.В.**
- МакДоналд С.** см. **Лиу Р.**
- Макеев В.Ю.** см. **Ильинский В.В.**
- Макеева И.Ю., Пузина Т.И.** Функциональное состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля в условиях деструкции тубулинового цитоскелета 903
- Маклецова М.Г.** см. **Рихирева Г.Т.**
- Максимов Г.В.** см. **Слатинская О.В.**
- Мальшко В.В.** см. **Елкина А.А.**
- Мальшко В.В.** см. **Козин С.В.**
- Мальшко Е.В., Багрова О.Е., Твердислов В.А.** Связь хиральных иерархических структур белков с их функциями 439
- Мальшко Е.В., Муртазина А.Р., Твердислов В.А.** Хиральность как физическая основа иерархической периодизации структур биомакромолекул 213
- Мамонтов С.П.** см. **Субекин А.Ю.**
- Манжурцев А.** см. **Яковлев А.Н.**
- Марнаутон Н.А., Серженков В.А., Комиссарова Л.Х., Ткачев Н.А., Татиколов А.С., Голощапов А.Н., Ванин А.Ф.** Оценка биораспределения магнитолипосом в опухоли и органах мышей методом электронного парамагнитного резонанса 769
- Мартинovich Г.Г., Мартинovich И.В., Вчерашняя А.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Черенкевич С.Н.** Хемосенсибилизация опухолевых клеток фенольными антиоксидантами: роль фактора транскрипции Nrf2 1081
- Мартинovich И.В.** см. **Мартинovich Г.Г.**
- Мартирасова Е.И.** см. **Сажина Н.Н.**
- Марченко В.Ю.** см. **Онхонова Г.С.**
- Маскевич А.А.** см. **Ильич Т.В.**
- Маслаков А.С.** см. **Ризниченко Г.Ю.**
- Матвеева О.В.** см. **Нечипуренко Ю.Д.**
- Маторин Д.Н., Тимофеев Н.П., Тодоренко Д.А., Братковская Л.Б., Горячев С.Н.** Сезонные изменения флуоресценции хлорофилла водоемов Звенигородской станции Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова 331
- Махапатра Г.С.** см. **Бисвас С.**
- Межевикина Л.М.** см. **Заломова Л.В.**
- Мельничкая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И.** Лиганды рецепторов сигма-1 – хлорпромазин и трифлуоперазин – ингибируют транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки 920
- Меньшиков П.** см. **Яковлев А.Н.**
- Меньщикова Е.Б.** см. **Мартинovich Г.Г.**
- Микоян В.Д., Бургова Е.Н., Бородулин Р.Р., Ванин А.Ф.** Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами в основном представлены в живых организмах их биядерной формой 1142
- Мисин В.М.** см. **Волков В.А.**
- Митькевич В.А.** см. **Петрушанко И.Ю.**
- Мифтахов Р.А.** см. **Шершов В.Е.**
- Моисеев А.В.** см. **Елкина А.А.**
- Моисеев А.В.** см. **Козин С.В.**
- Моисеев А.Н.** см. **Белоусов А.В.**
- Мокрушников П.В.** Механизм взаимодействия наночастиц оксидов металлов с биологическими мембранами 74
- Моренков О.С.** см. **Жмурина М.А.**
- Морозов В.Н.** см. **Белоусов А.В.**
- Морозов В.Н., Белоусов А.В., Зверев В.И., Штиль А.А., Кольванова М.А., Кривошапкин П.В.** Перспективы металлоксидных нанорadiосенсибилизаторов: влияние элементного состава частиц и характеристик источников излучения на увеличение поглощенной дозы 629
- Муртазина А.Р.** см. **Мальшко Е.В.**
- Нагель А.С.** см. **Сиунов А.В.**
- Намиот В.А.** К вопросу о различии между искусственным и естественным интеллектом 202
- Намиот В.А.** см. **Балашова Л.М.**
- Нарциссов Я.Р.** см. **Копылова В.С.**
- Наседкина Т.В.** см. **Шершов В.Е.**
- Неверова Г.П.** см. **Фрисман Е.Я.**
- Некрасов А.Н., Козмин Ю.П., Козырев С.В., Есипова Н.Г., Зиганшин Р.Х., Анашкина А.А.** Уровни иерархической организации белковых последовательностей. Анализ энтропийных характеристик 1065

- Некрасова Е.И. см. Ванин А.Ф.
 Некрасова Е.И. см. Корман Д.Б.
 Некрасова Е.И. см. Тронов В.А.
 Немова Е.Ф., Черкасова О.П., Николаев Н.А., Дульцева Г.Г. Исследование молекулярных механизмов взаимодействия терагерцового излучения с биополимерами на примере бычьего сывороточного альбумина 486
 Немцева Е.В. см. Суковатый Л.А.
 Нестеров С.В. см. Лобышева Н.В.
 Нечипуренко Ю.Д. см. Ильичева И.А.
 Нечипуренко Ю.Д., Анашкина А.А., Матвеева О.В. Изменение антигенных детерминант S-белка вируса SARS-CoV-2 как возможная причина антителизависимого усиления инфекции и цитокинового шторма 824
 Нешев Н.И. см. Соколова Е.М.
 Никитина Ю.В. см. Щербатюк Т.Г.
 Никиян А.Н. см. Летута С.Н.
 Николаев Г.М. см. Полетаева И.И.
 Николаев Н.А. см. Немова Е.Ф.
 Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Снижение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах после воздействия определенных режимов слабых комбинированных магнитных полей 97
 Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Влияние слабого постоянного магнитного поля в диапазоне величин от «нулевого» поля (0,01 мкТл) до 100 мкТл на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах 524
 Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Снижение продукции супероксидного анион-радикала в нейтрофилах в результате действия «нулевого» магнитного поля 735
 Новиков В.Э. см. Олешкевич А.А.
 Новикова В.В. см. Кобякова М.И.
 Новикова Л.Ю. см. Таратухин О.Д.
 Новожилова Т.И. см. Субекин А.Ю.
 Новоселов В.И. см. Гончаров Р.Г.
 Новоселов В.И. см. Гордеева А.Е.
 Нуждин С.В. см. Канапин А.А.
 Нуждин С.В. см. Соколкова А.Б.
 Нуждин С.В. см. Таратухин О.Д.
 Нуждина Н.В. см. Соколкова А.Б.
 Обридко В.Н. см. Рагульская М.В.
 Овсянников Д.А. см. Оськин С.В.
 Овсянников Д.А. см. Оськин С.В.
 Овсянников Л.Л., Шпитонков М.И. Классификация адаптивных признаков и вывод критериев их эволюционной оптимальности 1171
 Овчаренко Е.Н. см. Белов С.В.
 Од А. см. Лиу Р.
 Олешкевич А.А., Новиков В.Э., Данилова М.А. Эффекты низкочастотного электрического поля на активность рекомбинантной люциферазы 656
 Онхонова Г.С., Торжкова П.Ю., Марченко В.Ю., Святченко С.В., Гудымо А.С., Рыжиков А.Б. Анализ рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа А методом поверхностного плазмонного резонанса 259
 Орлов В.И., Ивлев С.А., Бондарь Г.Г. Способ мини-мизации повреждений при введении микроэлектрода в нейрон 741
 Орлов С.Н., см. Слатинская О.В.
 Осинникова Д.Н. см. Пастон С.В.
 Островская Л.А. см. Ванин А.Ф.
 Островская Л.А. см. Корман Д.Б.
 Островская Л.А., Корман Д.Б., Блюхтерова Н.В., Фомина М.М., Рыкова В.А., Абзаева К.А. Сравнительное экспериментальное изучение противоопухолевой активности аурумакрила и цитостатиков различного механизма действия 360
 Оськин С.В., Овсянников Д.А. Моделирование весенней агрегации пчел в улье при больших суточных колебаниях температуры наружного воздуха 978
 Оськин С.В., Овсянников Д.А. Моделирование тепловых физических процессов в пчелином улье с электроподогревом 381
 Павлова Г.В. см. Полетаева И.И.
 Павловская Н.Е. см. Волков В.А.
 Пал Д. см. Бисвас С.
 Палеч Б. см. Ильич Т.В.
 Пальмина Н.П. см. Сажина Н.Н.
 Панаит А.И. см. Погорелов А.Г.
 Панова Г.Г. см. Кулешова Т.Э.
 Панчелюга В.А. см. Диатроптов М.Е.
 Панченко Л.А. см. Ильичева И.А.
 Парсаданян М.А. см. Аракелян В.Б.
 Паршина С.С., Самсонов С.Н., Афанасьева Т.Н., Петрова П.Г., Стрекаловская А.А., Петрова В.Д., Кодочигова А.И., Комзин К.В., Токаева Л.К. Особенности ответной реакции сердечно-сосудистой системы на геомагнитную возмущенность на различных широтах 1161
 Пастон С.В., Поляничко А.М., Шуленкина О.В., Осинникова Д.Н. Изучение структуры ДНК в пленках методом ИК-Фурье-спектроскопии 1058
 Пашкевич С.Н. см. Летута С.Н.
 Переварюха А.Ю. Непрерывная модель для осциллирующей вспышки численности чешуекрылого фитофага *Malacosoma disstria* (Lepidoptera, Lasiocampidae) 138
 Педлар Ш. см. Лиу Р.
 Перебейнос В.В. см. Беспалова С.В.
 Перепелкина О.В. см. Полетаева И.И.
 Петренко В.С. см. Жмурина М.А.
 Петрова В.Д. см. Паршина С.С.
 Петрова И.В., Бирулина Ю.Г., Беляева С.Н., Трубачева О.А., Сидехменова А.В., Смаглий Л.В., Ковалев И.В., Гусакова С.В. Влияние газомедиаторов на Ca²⁺-зависимую калиевую проницаемость мембраны красных клеток крови 722
 Петрова П.Г. см. Паршина С.С.
 Петрушанко И.Ю., Митькевич В.А., Макаров А.А. Молекулярные механизмы редокс-регуляции Na,K-АТФазы 837

- Плахотный М.А., Кодунов А.М., Горина Е.В., Бояринцев В.В., Трофименко А.В., Бирюков С.А., Фильков Г.И.** Влияние условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на их жизнеспособность при трансплантации в субретинальное пространство 1126
- Плескачева М.Г.** см. **Полетаева И.И.**
- Плескова С.Н., Крюков Р.Н., Бобык С.З., Боряков А.В., Брилкина А.А.** Исследование межклеточных адгезионных контактов нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов методом атомно-силовой микроскопии 80
- Плотникова Л.В.** см. **Тельная Е.А.**
- Плюснина Т.Ю.** см. **Ризниченко Г.Ю.**
- Погорелов А.Г., Степанова Т.А., Панаит А.И., Балашов В.А., Гулин А.А., Погорелова В.Н.** Нанокapsула на основе природного минерала клиноптилолита с оболочкой из лецитина 872
- Погорелова В.Н.** см. **Погорелов А.Г.**
- Подольный Б.С., Гурский В.В., Самсонова М.Г.** Анализ экспрессии генов цветения в сорте нута CDC Frontier методами машинного обучения 263
- Полетаева И.И., Перепелкина О.В., Николаев Г.М., Федотова И.Б., Плескачева М.Г., Кошлянь И.В., Богданова Ю.В., Кошлянь Н.А., Павлова Г.В., Ревещин А.В.** Влияние ионизирующего облучения на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии и поведение крыс линии Крушинского-Молодкиной 773
- Полозов Р.В.** см. **Ильичева И.А.**
- Полушкина Л.Б.** см. **Асауленко З.П.**
- Поляничко А.М.** см. **Пастон С.В.**
- Поляничко А.М.** см. **Тельная Е.А.**
- Поляничко А.М.** см. **Чихиржина Е.В.**
- Поляновский В.О.** см. **Каменев Г.К.**
- Пономарева Е.Н., Фирсова А.В., Тихомиров А.М., Андреев А. А.** Формирование микрочастиц льда в овариальной жидкости и гомогенате неоплодотворенных яйцеклеток русского осетра при охлаждении до -196°C 552
- Поройков В.В.** см. **Филимонов Д.А.**
- Постникова Г.Б., Шеховцова Е.А., Сивожелезов В.С.** Электростатическое взаимодействие глобинов с фосфолипидными мембранами 1072
- Пронин С.В.** см. **Шошина И.И.**
- Проценко Ю.Л.** см. **Балакин А.А.**
- Пузина Т.И.** см. **Макеева И.Ю.**
- Рагульская М.В., Обридко В.Н., Храмова Е.Г.** Галактические факторы, молодое солнце, земля и биофизика живых систем 804
- Ревещин А.В.** см. **Полетаева И.И.**
- Решетников Д.А.** см. **Заломова Л.В.**
- Ризниченко Г.Ю., Беляева Н.Е., Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б., Маслаков А.С., Антал Т.К., Горячев С.Н., Плюснина Т.Ю., Федоров В.А., Хрущев С.С., Рубин А.Б.** Модели фотосинтетического электронного транспорта 886
- Рихирева Г.Т., Маклецова М.Г.** Применение ЭПР-спектроскопии в изучении метаболизма железа при болезни Паркинсона 376
- Романова В.С.** см. **Волков В.А.**
- Романчук С.М.** см. **Беспалова С.В.**
- Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Шангин С.В., Владимиров Г.К., Лысенко Н.П., Демихов Е.И.** Изохинолизиновые производные кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции в реакциях липидной перекисидации 680
- Рубин А.Б.** см. **Бульчев А.А.**
- Рубин А.Б.** см. **Ризниченко Г.Ю.**
- Рудик А.В.** см. **Филимонов Д.А.**
- Рыжиков А.Б.** см. **Онхонова Г.С.**
- Рыкова В.А.** см. **Ванин А.Ф.**
- Рыкова В.А.** см. **Островская Л.А.**
- Рябая О.О.** см. **Ванин А.Ф.**
- Рябая О.О.** см. **Корман Д.Б.**
- Савин А.В.** см. **Смирнов А.Н.**
- Савостьянов Г.А.** Представление трехмерной структуры эпителия как регулярной клеточной сети (на примере глаза дрозофилы) 986
- Савранский В.В.** см. **Белов С.В.**
- Сажина Н.Н., Семенова М.Г., Антипова А.С., Мартиросова Е.И., Пальмина Н.П.** Влияние состава липосомных комплексов на антиокислительную активность плазмы крови и липидов печени и мозга мышей 760
- Саманта Г.П.** см. **Бисвас С.**
- Самойлов А.С.** см. **Белоусов А.В.**
- Самойлов В.О.** см. **Божокин С.В.**
- Самсонов С.Н.** см. **Паршина С.С.**
- Самсонова А.А.** см. **Канапин А.А.**
- Самсонова М.Г.** см. **Грецова М.В.**
- Самсонова М.Г.** см. **Канапин А.А.**
- Самсонова М.Г.** см. **Подольный Б.С.**
- Самсонова М.Г.** см. **Соколкова А.Б.**
- Самсонова М.Г.** см. **Таратухин О.Д.**
- Сапега Т.С., Гурия Г.Т.** Анализ устойчивости системы внутриклеточной сигнализации PI3K-Akt-mTOR 300
- Д.А. Саранча** см. **Г.К. Каменев**
- Святченко С.В.** см. **Онхонова Г.С.**
- Селищева А.А.** см. **Куликов Е.А.**
- Семенова М.Г.** см. **Сажина Н.Н.**
- Семенова Н.** см. **Яковлев А.Н.**
- Сенина И.Н.** см. **Тютюнов Ю.В.**
- Сенотов А.С.** см. **Кобякова М.И.**
- Середин И.С.** см. **Кулешова Т.Э.**
- Сереженков В.А.** см. **Марнаутов Н.А.**
- Сереженков В.А., Ткачев Н.А., Артюшина З.С., Кузнецова М.И., Ковач М., Ванин А.Ф.** Пониженная биодоступность оксида азота у лошадей с симптомокомплексом колики: оценка методом ЭПР-спектроскопии 1017
- Сеферова И.В.** см. **Таратухин О.Д.**
- Сибаров Д.А.** см. **Карелина Т.В.**
- Сивожелезов В.С.** см. **Постникова Г.Б.**
- Сигов А.С.** см. **Смирнов А.Н.**
- Сидехменова А.В.** см. **Петрова И.В.**
- Сидорова А.Э.** см. **Гараева А.Я.**

- Сирота Т.В.** Цепная реакция автоокисления адреналина – модель хиноидного окисления катехоламинов 646
- Сиунов А.В., Борисова М.П., Андреева-Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Колесников А.С., Сурин А.К., Солонин А.С.** Порообразующие свойства хеликазы SsoHel308 из *Saccharolobus solfataricus* 1051
- Скарга Ю.Ю.** см. **Жмурина М.А.**
- Скоркина М.Ю.** см. **Сладкова Е.А.**
- Скоробогатова Ю.А.** см. **Лобышева Н.В.**
- Сладкова Е.А.** Изменение электрических свойств форменных элементов крови в условиях механического стресса *in vitro* 910
- Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю.** Особенности биофизических свойств форменных элементов крови людей пожилого возраста в условиях механического стресса *in vitro* 1114
- Слагинская О.В., Лунева О.Г., Деев Л.И., Орлов С.Н., Максимов Г.В.** Исследования изменений конформации гема и глубина при нормобарической гипоксии 250
- Смаглий Л.В.** см. **Петрова И.В.**
- Смирнов А.Н., Савин А.В., Сигов А.С.** Структурные превращения в жидкой воде 408
- Смирнова О.И.** см. **Грунина Н.А.**
- Соколкова А.Б.** см. **Канапин А.А.**
- Соколкова А.Б., Чанг П.Л., Карраскила-Гарсия Н., Нуждина Н.В., Кук Д.Р., Нуждин С.В., Самсонова М.Г.** Следы экологической адаптации в геномах староместных сортов нута 276
- Соколова Е.М., Нешев Н.И.** Уравнение Аррениуса в анализе механизма гемолиза эритроцитов 530
- Солдатов А.А., Андреева А.Ю., Кухарева Т.А., Андреев Т.И.** Метгемоглобин, активность каталазы и супероксиддисмутазы в ядерных эритроцитах *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) в условиях экспериментальной гипоксии (*in vitro*) 534
- Соловьева Э.Ю.** см. **Казаринов К.Д.**
- Солонин А.С.** см. **Сиунов А.В.**
- Соснина И.С.** см. **Шошина И.И.**
- Станкевич А.А.** см. **Диатроптов М.Е.**
- Старкова Т.Ю.** см. **Чихиржина Е.В.**
- Степаненко Ю.Д.** см. **Карелина Т.В.**
- Степанова Т.А.** см. **Погорелов А.Г.**
- Степняк А.** см. **Ильич Т.В.**
- Стоун Дж.** см. **Лиу Р.**
- Стрекаловская А.А.** см. **Паршина С.С.**
- Субекин А.Ю., Кукушкин В.И., Новожилова Т.И., Мамонтов С.П., Кулик Л.В., Хрусталёв Р.А.** К вопросу о выборе блокирующего белкового агента при создании метода иммунохимического анализа с использованием поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии 17
- Суковатый Л.А., Лисица А.Е., Кратасюк В.А., Немцева Е.В.** Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты 1135
- Сурин А.К.** см. **Сиунов А.В.**
- Таги-заде Т.П., Касумов Х.М.** Свойства ионных каналов в липидных мембранах, модифицированных ароматическим антибиотиком леворином A₂ 713
- Тазырова К.А.** см. **Волощук О.Н.**
- Тальгин Е.А.** см. **Тхагапсова М.М.**
- Танканаг А.В., Гриневиц А.А., Тихонова И.В., Чермерис Н.К.** Анализ фазовых взаимосвязей между колебательными процессами в сердечно-сосудистой системе человека 184
- Таратухин О.Д., Новикова Л.Ю., Сеферова И.В., Герасимова Т.В., Нуждин С.В., Самсонова М.Г., Козлов К.Н.** Нейросетевая модель прогнозирования фенологии скороспелых сортов сои по климатическим факторам 125
- Татицолов А.С.** см. **Марнаутов Н.А.**
- Твердислов В.А.** см. **Гараева А.Я.**
- Твердислов В.А.** см. **Мальшко Е.В.**
- Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П.** Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля 664
- Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Тумаев Е.Н., Ильченко Г.П.** Влияние переменного магнитного поля и наночастиц серебра на спектральные характеристики водного раствора человеческого сывороточного альбумина 479
- Тельная Е.А., Плотникова Л.В., Гарифуллин А.Д., Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Поляничко А.М.** Инфракрасная спектроскопия сыворотки крови больных онкогематологическими заболеваниями 1154
- Терпугов Е.Л.** Эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия в исследовании биологических молекул 5
- Тимофеев Н.П.** см. **Маторин Д.Н.**
- Титова Л.И.** см. **Тютюнов Ю.В.**
- Тихомиров А.М.** см. **Пономарева Е.Н.**
- Тихонова И.В.** см. **Танканаг А.В.**
- Ткачев Н.А.** см. **Марнаутов Н.А.**
- Ткачев Н.А.** см. **Серезенков В.А.**
- Тодоренко Д.А.** см. **Маторин Д.Н.**
- Токаева Л.К.** см. **Паршина С.С.**
- Торжкова П.Ю.** см. **Онхонова Г.С.**
- Трибрат Н.С.** см. **Хусаинов Д.Р.**
- Трибрат Н.С.** см. **Чуян Е.Н.**
- Тронов В.А., Некрасова Е.И.** Повреждение ДНК и белка p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины 543
- Трофименко А.В.** см. **Волкова М.В.**
- Трофименко А.В.** см. **Гончаров Р.Г.**
- Трофименко А.В.** см. **Плахотный М.А.**
- Трубачева О.А.** см. **Петрова И.В.**
- Тулеханов С.Т.** см. **Шаповалов Ю.А.**
- Тумаев Е.Н.** см. **Елкина А.А.**
- Тумаев Е.Н.** см. **Текуцкая Е.Е.**
- Туманянц К.Н.** см. **Хусаинов Д.Р.**
- Туроверов К.К.** см. **Козин С.В.**
- Тхагапсова М.М., Тальгин Е.А., Жоржوليани Ш.Т., Агафонов А.В., Дорофеев А.В., Городков А.Ю., Кик-**

надзе Г.И., Бокерия Л.А. Сравнительное анатомическое исследование параметров закрученного потока в полости левого желудочка у животных различного размера на основании концепции смерчеобразных течений вязкой жидкости 165

Тютюнов Ю.В., Сенина И.Н., Титова Л.И., Дашкевич Л.В. Оправдался ли долгосрочный прогноз риска вымирания азовского судака? 390

Ублинский М. см. Яковлев А.Н.

Уграйская С.В. см. Заломова Л.В.

Удалова О.Р. см. Кулешова Т.Э.

Удальцов С.Н. см. Балашова Л.М.

Узденский А.Б. Многофункциональные белки 464

Урошлев Л.А., Баль Н.В., Чеснокова Е.А. Использование нейронных сетей с памятью 676

Фадеев Р.С. см. Кобякова М.И.

Фадеева И.С. см. Кобякова М.И.

Федин А.И. см. Казаринов К.Д.

Федоров В.А. см. Ризниченко Г.Ю.

Федотова И.Б. см. Полетаева И.И.

Феофанов С.В. см. Кулешова Т.Э.

Фесенко (мл.) Е.Е. см. Заломова Л.В.

Фесенко (мл.) Е.Е., Гагаринский Е.Л., Аверин А.С., Грудинин Н.В., Гурия А.Е., Шишова Н.В., Швирст Н.Э., Гольтяев М.В., Ковтун А.Л. Оценка сохранности миокарда крысы и изолированного сердца барана после пролонгированной 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода 780

Фесенко Е.Е. см. Гордеева А.Е.

Фесенко Е.Е. см. Новиков В.В.

Филимонов Д.А., Рудик А.В., Дмитриев А.В., Лагунин А.А., Поройков В.В. Компьютерная оценка вероятности образования метаболитов ксенобиотиков в организме человека 1203

Филиппов С.В., Быстров В.С. Визуально-дифференциальный анализ структурных особенностей внутренних полостей двух хиральных форм дифенилаланиновых нанотрубок 445

Фильков Г.И. см. Волкова М.В.

Фильков Г.И. см. Гончаров Р.Г.

Фильков Г.И. см. Плахотный М.А.

Фирсова А.В. см. Пономарева Е.Н.

Фомина М.М. см. Ванин А.Ф.

Фомина М.М. см. Островская Л.А.

Фонин А.В. см. Козин С.В.

Фрисман Е.Я., Жданова О.Л., Неверова Г.П. Эколого-генетические модели в популяционной биофизике 949

Хайруллин А.Е., Зиганшин А.У., Гришин С.Н. Влияние гипотермии на пуриnergическую синаптическую модуляцию в диафрагме крысы 1003

Хайтович Ф.Е. см. Канапин А.А.

Ходыков М.В. см. Ильичева И.А.

Хомяков Ю.В. см. Кулешова Т.Э.

Хорольская Е.Д. см. Хусаинов Д.Р.

Храмова Е.Г. см. Рагульская М.В.

Хрусталёв Р.А. см. Субекин А.Ю.

Хрущев С.С. см. Ризниченко Г.Ю.

Хусаинов Д.Р., Коренюк И.И., Шахматова В.И., Туманянц К.Н., Трибрат Н.С., Хорольская Е.Д., Чайка А.В., Борзова И.А. Особенности когнитивных процессов крыс в условиях умеренной гипомагнитной среды 1025

Церетели Г.И. см. Грунина Н.А.

Чайка А.В. см. Хусаинов Д.Р.

Чанг П.Л. см. Соколкова А.Б.

Чапльгина А.В. см. Крылова А.Е.

Чеканов А.В. см. Казаринов К.Д.

Чемерис Н.К. см. Танканаг А.В.

Черенкевич С.Н. см. Мартинович Г.Г.

Черкасова О.П. см. Немова Е.Ф.

Черкашин Д.Р. см. Балашова Л.М.

Черноусов И.Н. см. Кулешова Т.Э.

Чеснокова Е.А. см. Урошлев Л.А.

Четырбоцкий А.Н. см. Четырбоцкий В.А.

Четырбоцкий В.А., Четырбоцкий А.Н., Левин Б.В. Математическое моделирование динамики минерального питания растений в системе «удобрение—почва—растение» 1219

Чихиржина Е.В. см. Козин С.В.

Чихиржина Е.В., Старкова Т.Ю., Поляничко А.М. Роль линкерных гистонов в структурной организации хроматина. 2. Взаимодействие с ДНК и ядерными белками 237

Чудинов А.В. см. Шершов В.Е.

Чуркина А.В. см. Елкина А.А.

Чуркина А.В. см. Козин С.В.

Чурюкина К.А., Жузе А.Л., Иванов А.А., Замулаева И.А. Эффекты комбинированного действия димерных бисбензимидазолов и ионизирующего излучения на стволовые клетки рака молочной железы линии MCF-7 87

Чуфицкий С.В. см. Беспалова С.В.

Чуян Е.Н., Джелдубаева Э.Р., Трибрат Н.С. Модификация болевой чувствительности у крыс с помощью низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования 594

Шагинян М.А. см. Аракелян В.Б.

Шаев И.А. см. Новиков В.В.

Шайтан К.В. см. Эрендженева А.А.

Шангин С.В. см. Ромодин Л.А.

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

Шарапов М.Г. см. Гончаров Р.Г.

Шарапов М.Г. см. Гордеева А.Е.

Шахматова В.И. см. Хусаинов Д.Р.

Швецова Е.В. см. Шаповалов Ю.А.

Швирст Н.Э. см. Фесенко (мл.) Е.Е.

- Шершов В.Е., Иконникова А.Ю., Василисков В.А., Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Кузнецова В.Е., Чудинов А.В., Наседкина Т.В.** Исследование эффективности маркирования ДНК флуоресцентными красителями ближнего инфракрасного диапазона 865
- Шеховцова Е.А.** см. **Постникова Г.Б.**
- Шилин Л.Г.** см. **Белов С.В.**
- Шишова Н.В.** см. **Фесенко (мл.) Е.Е.**
- Шошина И.И., Соснина И.С., Зеленский К.А., Карпинская В.Ю., Ляховецкий В.А., Пронин С.В.** Контрастная чувствительность зрительной системы в условиях «сухой» иммерсии 798
- Шпитонков М.И.** см. **Овсянников Л.Л.**
- Штиль А.А.** см. **Белоусов А.В.**
- Штиль А.А.** см. **Морозов В.Н.**
- Шуленина О.В.** см. **Пастон С.В.**
- Шурыгина Л.В.** см. **Козин С.В.**
- Щеглов С.А.** см. **Кулешова Т.Э.**
- Щегольков А.В.** см. **Канапин А.А.**
- Щелконогов В.А.** см. **Казаринов К.Д.**
- Щербатюк Т.Г., Жукова (Плеханова) Е.С., Никитина Ю.В., Гапеев А.Б.** Окислительная модификация белков в тканях крыс при опухолевом росте в условиях озono-фотодинамического воздействия 367
- Эрендженова А.А., Армеев Г.А., Шайтан К.В.** Влияние вязкости среды на молекулярную динамику формирования вторичной структуры полипептидов (AlaGly)₂₅ и (AlaGly)₇₅ 860
- Юдин С.М.** см. **Заломова Л.В.**
- Яблокова Е.В.** см. **Новиков В.В.**
- Яковлев А.Н., Манжурцев А., Меньшиков П., Ублинский М., Божко О., Ахадов Т., Семенова Н.** Эффект зрительной стимуляции на уровни гамма-аминомасляной кислоты и макромолекул в головном мозге человека *in vivo* 61
- Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г.** Об активации системы комплемента амилоидными агрегатами пептидов A β (1-40) и A β (1-42): факты и предположения 24
- Якушевич Л.В.** см. **Краснобаева Л.А.**
- Ямскова О.В.** см. **Волков В.А.**
- Янковский Н.К.** см. **Ильинский В.В.**

СОДЕРЖАНИЕ ТОМА 65, 2020 г.

номер 1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия в исследовании биологических молекул <i>Е.Л. Терпугов</i>	5
К вопросу о выборе блокирующего белкового агента при создании метода иммунохимического анализа с использованием поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии <i>А.Ю. Субекин, В.И. Кукушкин, Т.И. Новожилова, С.П. Мамонтов, Л.В. Кулик, Р.А. Хрусталёв</i>	17
Об активации системы комплемента амилоидными агрегатами пептидов Аβ(1-40) и Аβ(1-42): факты и предположения <i>Э.И. Якупова, Л.Г. Бобылёва, И.М. Вихлянцева, А.Г. Бобылёв</i>	24
Динамические и статистические свойства кинков ДНК <i>Л.А. Краснобаева, Л.В. Якушевич</i>	29
Проявление гистерезиса в тепловых свойствах наносистем на примере переохлажденных кластеров воды во влажных G-сефадексах <i>Н.А. Грунина, Т.В. Белопольская, Г.И. Цертели, О.И. Смирнова</i>	36
Противоопухолевые свойства динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами и S-нитрозоглутатиона в эксперименте <i>А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина</i>	48
Эффект зрительной стимуляции на уровне гамма-аминомасляной кислоты и макромолекул в головном мозге человека <i>in vivo</i> <i>А.Н. Яковлев, А. Манжурцев, П. Меньщиков, М. Ублинский, О. Божко, Т. Ахадов, Н. Семенова</i>	61
Образование липофусцина у дрозофил при нагревании и ультрафиолетовом облучении <i>А.Е. Крылова, А.В. Чаплыгина, Н.Л. Векшин</i>	69

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Механизм взаимодействия наночастиц оксидов металлов с биологическими мембранами <i>П.В. Мокрушников</i>	74
Исследование межклеточных адгезионных контактов нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов методом атомно-силовой микроскопии <i>С.Н. Плескова, Р.Н. Крюков, С.З. Бобык, А.В. Боряков, А.А. Брилкина</i>	80
Эффекты комбинированного действия димерных бисбензимидазолов и ионизирующего излучения на стволовые клетки рака молочной железы линии MCF-7 <i>К.А. Чурюкина, А.Л. Жузе, А.А. Иванов, И.А. Замулаева</i>	87
Снижение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах после воздействия определенных режимов слабых комбинированных магнитных полей <i>В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко</i>	97
Ингибирование гамкергической передачи как модель гиперактивации клеток Пуркинье мозжечка крыс <i>Т.В. Карелина, Ю.Д. Степаненко, Д.А. Сибаров, П.А. Абушик, С.М. Антонов</i>	104

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Влияние спектральных особенностей световой среды на поглощение света листьями салата и его нетто-продуктивность <i>Т.Э. Кулешова, И.Н. Черноусов, О.Р. Удалова, Л.М. Аникина, Ю.В. Хомяков, А.В. Александров, И.С. Середин, С.В. Феофанов, С.А. Щеглов, Н.Р. Галль, Г.Г. Панова</i>	112
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Нейросетевая модель прогнозирования фенологии скороспелых сортов сои по климатическим факторам <i>О.Д. Таратухин, Л.Ю. Новикова, И.В. Сеферова, Герасимова Т.В., С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова, К.Н. Козлов</i>	125
Непрерывная модель для осциллирующей вспышки численности чешуекрылого фитофага <i>Malacosoma dissitria</i> (Lepidoptera, Lasiocampidae) <i>А.Ю. Переварюха</i>	138
Динамика смены первостепенного махового оперения у воробьиных птиц, возможные факторы синхронизации <i>М.Е. Диатроптов, В.А. Панчелюга, А.А. Станкевич</i>	152
Сравнительное анатомическое исследование параметров закрученного потока в полости левого желудочка у животных различного размера на основании концепции смерчеобразных течений вязкой жидкости <i>М.М. Тхагапсова, Е.А. Талыгин, Ш.Т. Жоржוליани, А.В. Агафонов, А.В. Дорофеев, А.Ю. Городков, Г.И. Кикнадзе, Л.А. Бокерия</i>	165
Нестационарная вариабельность сердечного ритма во время антиортостатической пробы <i>С.В. Божокин, Е.М. Лесова, В.О. Самойлов, К.А. Баранцев</i>	175
Анализ фазовых взаимосвязей между колебательными процессами в сердечно-сосудистой системе человека <i>А.В. Танканаг, А.А. Гриневич, И.В. Тихонова, Н.К. Чемерис</i>	184
Смертность как показатель старения: возможности и ограничения <i>В.Н. Крутько, В.И. Донцов</i>	190
Моделирование полной кривой смертности человека: регуляторная модель старения <i>В.И. Донцов, В.Н. Крутько</i>	198

ДИСКУССИИ

К вопросу о различии между искусственным и естественным интеллектом <i>В.А. Намиот</i>	202
-------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

Генетическая идентификация сортов сои с использованием однонуклеотидных полиморфизмов <i>М.В. Грецова, М.Г. Самсонова</i>	206
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

номер 2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Хиральность как физическая основа иерархической периодизации структур биомолекул <i>Е.В. Малышко, А.Р. Муртазина, В.А. Твердислов</i>	213
Молекулярно-динамическое моделирование связанных с атомарными кластерами полиамфолитных полипептидов на поверхностях металлоподобных нанобъектов <i>Н.Ю. Кручинин, М.Г. Кучеренко</i>	219
Изменение функциональной активности пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в средах с различным изотопным $^2\text{H}/^1\text{H}$ составом <i>С.В. Козин, А.А. Кравцов, К.К. Туроверов, А.В. Фонин, Е.В. Чихиржина, В.В. Малышко, А.В. Моисеев, А.В. Чуркина</i>	229
Роль линкерных гистонов в структурной организации хроматина. 2. Взаимодействие с ДНК и ядерными белками <i>Е.В. Чихиржина, Т.Ю. Старкова, А.М. Поляничко</i>	237
Исследования изменений конформации гема и глобина при нормобарической гипоксии <i>О.В. Слатинская, О.Г. Лулева, Л.И. Деев, С.Н. Орлов, Г.В. Максимов</i>	250

Анализ рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа А методом поверхностного плазмонного резонанса <i>Г.С. Онхонова, П.Ю. Торжкова, В.Ю. Марченко, С.В. Святченко, А.С. Гудымо, А.Б. Рыжиков</i>	259
Анализ экспрессии генов цветения в сорте нута CDC Frontier методами машинного обучения <i>Б.С. Подольный, В.В. Гурский, М.Г. Самсонова</i>	263
Следы экологической адаптации в геномах староместных сортов нута <i>А.Б. Соколкова, П.Л. Чанг, Н. Карраскила-Гарсия, Н.В. Нуждина, Д.Р. Кук, С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова</i>	276
Генетические варианты, ассоциированные с продуктивностью и содержанием белка и масла у сои <i>А.А. Канапин, А.Б. Соколкова, А.А. Самсонова, А.В. Щегольков, С.В. Болдырев, А.Ф. Аюпова, Ф.Е. Хайтович, С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова</i>	280

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Течение цитоплазмы как внутриклеточный конвейер: влияние на фотосинтез и потоки H^+ в клетках <i>Chara</i> <i>А.А. Булычев, А.В. Алова, Н.А. Крупенина, А.Б. Рубин</i>	290
Анализ устойчивости системы внутриклеточной сигнализации PI3K–Akt–mTOR <i>Т.С. Сапега, Г.Т. Гурия</i>	300
Особенности энергообеспечения гепатоцитов в условиях различного содержания в рационе нутриентов <i>О.Н. Волощук, Г.П. Копыльчук, К.А. Тазырова</i>	310
Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия <i>Н.В. Лобышева, С.В. Нестеров, Ю.А. Скоробогатова, В.И. Лобышев</i>	315
Исследование макрофагальной дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах <i>М.И. Кобякова, Я.В. Евстратова, А.С. Сенотов, А.И. Ломовский, В.В. Новикова, К.С. Краснов, И.С. Фадеева, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев</i>	320

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Стимуляция роста растений водным раствором, активированным плазмой тлеющего разряда <i>С.В. Белов, Л.М. Апашева, Ю.К. Данилейко, А.Б. Егоров, А.В. Лобанов, В.И. Луканин, Е.Н. Овчаренко, В.В. Савранский, Л.Г. Шилин</i>	326
Сезонные изменения флуоресценции хлорофилла водоемов Звенигородской станции Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова <i>Д.Н. Маторин, Н.П. Тимофеев, Д.А. Тодоренко, Л.Б. Братковская, С.Н. Горячев</i>	331
Влияние экзогенного пероксида водорода на функциональные параметры изолированной почки крысы <i>А.Е. Гордеева, М.Г. Шарапов, В.А. Евдокимов, В.И. Новоселов, Е.Е. Фесенко</i>	340
Защитный эффект химерного фермента-антиоксиданта PSH при ишемически-реперфузионном поражении почек <i>Р.Г. Гончаров, Г.И. Фильков, А.В. Трофименко, В.В. Бояринцев, В.И. Новоселов, М.Г. Шарапов</i>	349
Сравнительное экспериментальное изучение противоопухолевой активности аурумарила и цитостатиков различного механизма действия <i>Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.А. Рыкова, К.А. Абзаева</i>	360
Окислительная модификация белков в тканях крыс при опухолевом росте в условиях озono-фотодинамического воздействия <i>Т.Г. Щербатюк, Е.С. Жукова (Плеханова), Ю.В. Никитина, А.Б. Ганеев</i>	367
Применение ЭПР-спектроскопии в изучении метаболизма железа при болезни Паркинсона <i>Г.Т. Рихирева, М.Г. Маклецова</i>	376
Моделирование теплофизических процессов в пчелином улье с электроподогревом <i>С.В. Оськин, Д.А. Овсянников</i>	381

Оправдался ли долгосрочный прогноз риска вымирания азовского судака? <i>Ю.В. Тютюнов, И.Н. Сенина, Л.И. Титова, Л.В. Дашкевич</i>	390
Пороговая характеристика ретино-гипоталамического тракта управления циркадианной активностью человека солнечным излучением <i>А.В. Леонидов</i>	402

ДИСКУССИИ

Структурные превращения в жидкой воде <i>А.Н. Смирнов, А.В. Савин, А.С. Сигов</i>	408
Электрон-колебательные возбужденные комплексы в ферментативных реакциях <i>Н.Л. Векшин</i>	412

номер 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

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

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

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

Повреждение ДНК и белка p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины <i>В.А. Тронов, Е.И. Некрасова</i>	543
Формирование микрочастиц льда в овариальной жидкости и гомогенате неоплодотворенных яйцеклеток русского осетра при охлаждении до -196°C <i>Е.Н. Пономарева, А.В. Фирсова, А.М. Тихомиров, А. А. Андреев</i>	552

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Фенотипическое приспособление у морских ежей, выращенных в условиях геометрических ограничений <i>Р. Лиу, Ш. Педлар, А. Од, С. МакДоналд, Дж. Стоун</i>	557
Восприятие и специфичность реагирования медоносных пчел, бумажных ос и рыжих лесных муравьев на низкочастотное электрическое поле <i>Е.К. Еськов</i>	565
Кинетика внутриклеточного кальция и потенциал действия в миокарде желудочков спонтанно-гипертензивных крыс линии ISIAH <i>А.А. Балакин, О.Н. Лукин, Д.А. Кузнецов, Ю.Л. Проценко</i>	574
Применение фрактального анализа для оценки артериальной системы мозга крысы <i>В.С. Копылова, С.Е. Бороновский, Я.Р. Нарциссов</i>	583
Модификация болевой чувствительности у крыс с помощью низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования <i>Е.Н. Чуян, Э.Р. Джелдубаева, Н.С. Трибрат</i>	594
Спектрально-селективные преобразования солнечного излучения фотоприемниками сетчатки при управлении циркадианным ритмом организма человека в 11-летнем цикле солнечной активности <i>А.В. Леонидов</i>	605

ДИСКУССИИ

Перколяционная решетка естественного отбора как коммутатор детерминированных и случайных процессов в потоке мутаций <i>А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, Н.Т. Левашова, В.А. Твердислов</i>	614
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

номер 4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Перспективы металлооксидных нанорадиосенсибилизаторов: влияние элементного состава частиц и характеристик источников излучения на увеличение поглощенной дозы <i>В.Н. Морозов, А.В. Белоусов, В.И. Зверев, А.А. Штиль, М.А. Колыванова, П.В. Кривошапки</i>	629
Изменение линейной передачи энергии клинического пучка протонов при добавлении в облучаемую мишень наночастиц золота <i>А.В. Белоусов, В.Н. Морозов, Г.А. Крусанов, А.Н. Моисеев, А.С. Давыдов, А.А. Штиль, В.А. Климанов, М.А. Колыванова, А.С. Самойлов</i>	638
Цепная реакция автоокисления адреналина – модель хиноидного окисления катехоламинов <i>Т.В. Сирота</i>	646
Эффекты низкочастотного электрического поля на активность рекомбинантной люциферазы <i>А.А. Олешкевич, В.Э. Новиков, М.А. Данилова</i>	656
Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля <i>Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Л.Р. Гусарук, Г.П. Ильченко</i>	664
Изменение выходного сигнала ДНК-биосенсора, индуцированного адсорбцией лигандов на дуплексы ДНК в флуктуирующей среде <i>В.Б. Аракелян, А.П. Антонян, М.А. Парсаданян, М.А. Шагинян, П.О. Вардеванян</i>	670
Использование нейронных сетей с памятью <i>Л.А. Урошлев, Н.В. Баль, Е.А. Чеснокова</i>	676

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Изохинолизиновые производные кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции в реакциях липидной перекисидации <i>Л.А. Ромодин, Ю.А. Владимиров, С.В. Шангин, Г.К. Владимиров, Н.П. Лысенко, Е.И. Демихов</i>	680
Радикалы в структурах клетки <i>Ю.А. Шаповалов, П.П. Гладышев, С.Т. Тулеуханов, Е.В. Швецова, Ж.Т. Абдрасулова</i>	691
Фототермическая инактивация микроорганизмов при релаксации высоковозбужденных состояний сенсibilизаторов <i>С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян</i>	705
Свойства ионных каналов в липидных мембранах, модифицированных ароматическим антибиотиком леворином А ₂ <i>Т.П. Таги-заде, Х.М. Касумов</i>	713
Влияние газомедиаторов на Са ²⁺ -зависимую калиевую проницаемость мембраны красных клеток крови <i>И.В. Петрова, Ю.Г. Бирулина, С.Н. Беляева, О.А. Трубачева, А.В. Сидехменова, Л.В. Смаглий, И.В. Ковалев, С.В. Гусакова</i>	722
Эффекты ингибиторов ионных каналов на генерацию электрических импульсов у клеток водителя ритма правого предсердия десятисуточного куриного эмбриона <i>Е.А. Лебедева, В.А. Головки</i>	728
Снижение продукции супероксидного анион-радикала в нейтрофилах в результате действия «нулевого» магнитного поля <i>В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Е.Е. Фесенко</i>	735
Способ минимизации повреждений при введении микроэлектрода в нейрон <i>В.И. Орлов, С.А. Ивлев, Г.Г. Бондарь</i>	741

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Новые стимуляторы роста растений на основе водорастворимых наночастиц <i>n</i> -замещенных моноаминокислотных производных фуллерена С ₆₀ и изучение механизма их действия <i>В.А. Волков, О.В. Ямскова, М.В. Воронков, Д.В. Курилов, В.С. Романова, В.М. Мисин, И.Н. Гагарина, Н.Е. Павловская, И.В. Горькова, А.В. Лушников</i>	745
Изменения архитектуры кроны деревьев пихты сибирской при нарушении гомеостаза <i>Е.В. Бажина</i>	753
Влияние состава липосомных комплексов на антиокислительную активность плазмы крови и липидов печени и мозга мышей <i>Н.Н. Сажина, М.Г. Семенова, А.С. Антипова, Е.И. Мартиросова, Н.П. Пальмина</i>	760
Оценка биораспределения магнитолипосом в опухоли и органах мышей методом электронного парамагнитного резонанса <i>Н.А. Марнаутов, В.А. Сереженков, Л.Х. Комиссарова, Н.А. Ткачев, А.С. Татиколов, А.Н. Голощапов, А.Ф. Ванин</i>	769
Влияние ионизирующего облучения на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии и поведение крыс линии Крушинского-Молодкиной <i>И.И. Полетаева, О.В. Перепелкина, Г.М. Николаев, И.Б. Федотова, М.Г. Плещачева, И.В. Кошлань, Ю.В. Богданова, Н.А. Кошлань, Г.В. Павлова, А.В. Ревущин</i>	773
оценка сохранности миокарда крысы и изолированного сердца барана после пролонгированной 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода <i>Е.Е. Фесенко (мл.), Е.Л. Гагаринский, А.С. Аверин, Н.В. Грудинин, А.Е. Гурин, Н.В. Шишова, Н.Э. Швирст, М.В. Гольтяев, А.Л. Ковтун</i>	780
Морфологическая дифференциальная диагностика первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с использованием компьютерного кластерного анализа мегакариоцитарного ростка миелоидной ткани <i>З.П. Асауленко, Л.Б. Полушкина, А.И. Лепский, Ю.А. Криволапов</i>	792
Контрастная чувствительность зрительной системы в условиях «сухой» иммерсии <i>И.И. Шошина, И.С. Соснина, К.А. Зеленский, В.Ю. Карпинская, В.А. Ляховецкий, С.В. Пронин</i>	798

Галактические факторы, молодое солнце, земля и биофизика живых систем <i>М.В. Рагульская, В.Н. Обридко, Е.Г. Храмова</i>	804
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ДИСКУССИИ

Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут как доноры катионов нитрозония подавлять вирусные инфекции (гипотеза) <i>А.Ф. Ванин</i>	818
Изменение антигенных детерминант S-белка вируса SARS-CoV-2 как возможная причина антителозависимого усиления инфекции и цитокинового шторма <i>Ю.Д. Нечипуренко, А.А. Анашкина, О.В. Матвеева</i>	824

номер 5

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Молекулярные механизмы редокс-регуляции Na,K-АТФазы <i>И.Ю. Петрушанко, В.А. Митькевич, А.А. Макаров</i>	837
Влияние вязкости среды на молекулярную динамику формирования вторичной структуры полипептидов (AlaGly) ₂₅ и (AlaGly) ₇₅ <i>А.А. Эрендженева, Г.А. Армеев, К.В. Шайтан</i>	860
Исследование эффективности маркирования ДНК флуоресцентными красителями ближнего инфракрасного диапазона <i>В.Е. Шершов, А.Ю. Иконникова, В.А. Василисков, С.А. Лапа, Р.А. Мифтахов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина</i>	865
Нанокapsула на основе природного минерала клиноптилолита с оболочкой из лецитина <i>А.Г. Погорелов, Т.А. Степанова, А.И. Панаит, В.А. Балашов, А.А. Гулин, В.Н. Погорелова</i>	872
Микробный синтез наночастиц: механизмы, характеристики, применение <i>Т.А. Воейкова, О.А. Журавлева, В.С. Кулигин, Е.И. Кожухова, Е.В. Иванов, В.Г. Дебабов</i>	878

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Модели фотосинтетического электронного транспорта <i>Г.Ю. Ризниченко, Н.Е. Беляева, А.Н. Дьяконова, И.Б. Коваленко, А.С. Маслаков, Т.К. Антал, С.Н. Горячев, Т.Ю. Плюснина, В.А. Федоров, С.С. Хрущев, А.Б. Рубин</i>	886
Функциональное состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля в условиях деструкции тубулинового цитоскелета <i>И.Ю. Макеева, Т.И. Пузина</i>	903
Изменение электрических свойств форменных элементов крови в условиях механического стресса <i>in vitro</i> <i>Е.А. Сладкова</i>	910
Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах воздействия в опытах <i>in vitro</i> <i>В.В. Зинчук, Е.С. Билецкая</i>	915
Лиганды рецепторов сигма-1 – хлорпромазин и трифлуоперазин – ингибируют транспорт Na ⁺ в эпителии кожи лягушки <i>А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая</i>	920
Эффективность консервации в жидком азоте микробиоты кишечника человека в зависимости от состава криозащитной среды <i>Л.В. Заломова, Д.А. Решетников, С.В. Уграицкая, Л.М. Межевикина, А.В. Загайнова, В.В. Макаров, С.М. Юдин, Е.Е. Фесенко (мл.)</i>	924

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Модель предпосылок видообразования в представлениях теорий перколяций и самоорганизованной критичности <i>А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, В.А. Твердислов, Н.Т. Левашова</i>	932
Эколого-генетические модели в популяционной биофизике <i>Е.Я. Фрисман, О.Л. Жданова, Г.П. Неверова</i>	949

Динамика системы «хищник—жертва» со стадным поведением в обоих случаях и сильным эффектом Олли у жертвы <i>С. Бисвас, Д. Пал, Г.С. Махапатра, Г.П. Саманта</i>	967
Моделирование весенней агрегации пчел в улье при больших суточных колебаниях температуры наружного воздуха <i>С.В. Оськин, Д.А. Овсянников</i>	978
Представление трехмерной структуры эпителия как регулярной клеточной сети (на примере глаза дрозофилы) <i>Г.А. Савостьянов</i>	986
Флуориметрический анализ влияния шламовых загрязнителей на фитопланктон <i>С.В. Беспалова, С.М. Романчук, С.В. Чуфицкий, В.В. Перебейнос, Б.А. Готин</i>	994
Влияние гипотермии на пуринергическую синаптическую модуляцию в диафрагме крысы <i>А.Е. Хайруллин, А.У. Зиганшин, С.Н. Гришин</i>	1003
Влияние природы лиганда на противоопухолевую активность и цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа <i>А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, О.О. Рябая, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина</i>	1009
Пониженная биодоступность оксида азота у лошадей с симптомокомплексом колики: оценка методом ЭПР-спектроскопии <i>В.А. Сереженков, Н.А. Ткачев, З.С. Артюшина, М.И. Кузнецова, М. Ковач, А.Ф. Ванин</i>	1017
Особенности когнитивных процессов крыс в условиях умеренной гипомагнитной среды <i>Д.Р. Хусаинов, И.И. Коренюк, В.И. Шахматова, К.Н. Туманяни, Н.С. Трибрат, Е.Д. Хорольская, А.В. Чайка, И.А. Борзова</i>	1025

ДИСКУССИИ

Механизмы взаимодействия стабильных изотопов с биологическими объектами с учетом нескомпенсированного нейтрона в химических связях <i>А.А. Елкина, Е.Н. Тумаев, А.А. Басов, А.В. Моисеев, В.В. Мальшко, Е.В. Барышева, А.В. Чуркина, С.С. Джимак</i>	1034
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

номер 6

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Эффективность определения 5-метилцитозина в ДНК клеток <i>Escherichia coli</i> , несущих гены бактериальных ДНК-метилтрансфераз, с помощью установки Oxford Nanopore <i>В.В. Ильинский, Е.М. Козлова, С.Х. Дегтярев, Н.К. Янковский, В.Ю. Макеев</i>	1045
Порообразующие свойства хеликазы SsoHel308 из <i>Saccharolobus solfataricus</i> <i>А.В. Сиунов, М.П. Борисова, Ж.И. Андреева-Ковалевская, А.С. Нагель, А.С. Колесников, А.К. Сурин, А.С. Солонин</i>	1051
Изучение структуры ДНК в пленках методом ИК-Фурье-спектроскопии <i>С.В. Пастон, А.М. Поляничко, О.В. Шуленина, Д.Н. Осинникова</i>	1058
Уровни иерархической организации белковых последовательностей. Анализ энтропийных характеристик <i>А.Н. Некрасов, Ю.П. Козмин, С.В. Козырев, Н.Г. Есипова, Р.Х. Зиганшин, А.А. Анашкина</i>	1065
Электростатическое взаимодействие глобинов с фосфолипидными мембранами <i>Г.Б. Постникова, Е.А. Шеховцова, В.С. Сивожелезов</i>	1072

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Хемосенсибилизация опухолевых клеток фенольными антиоксидантами: роль фактора транскрипции Nrf2 <i>Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, А.В. Вчерашняя, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, С.Н. Черенкевич</i>	1081
Цитотоксическое действие полиакрилата золота (аурумакрил) на фибробласты кожи человека <i>Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, Л.А. Островская, О.О. Рябая, Н.В. Блюхтерова, К.А. Абзаева</i>	1093

Адаптация метода интерферометрии слоя биомолекул для количественной оценки содержания фактора роста эндотелия сосудов в кондиционированной клеточной среде <i>М.В. Волкова, В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, С.А. Бирюков, Е.В. Горина, Г.И. Фильков, М.О. Дурьманов</i>	1099
Влияние микроволнового излучения на чувствительность клеток к одноатомным спиртам в обогащенной тромбоцитами плазме <i>К.Д. Казаринов, В.А. Щелконогов, О.А. Баранова, А.В. Чеканов, Э.Ю. Соловьева, А.И. Федин</i>	1107
Особенности биофизических свойств форменных элементов крови людей пожилого возраста в условиях механического стресса <i>in vitro</i> <i>Е.А. Сладкова, М.Ю. Скоркина</i>	1114
Интернализация клетками и противоопухолевая активность антител и иммунотоксинов, специфичных к β -изоформе белка теплового шока 90 <i>М.А. Жмурина, В.В. Врублевская, Ю.Ю. Скарга, В.С. Петренко, В.К. Жалимов, О.С. Моренков</i>	1118
Влияние условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на их жизнеспособность при трансплантации в субретинальное пространство <i>М.А. Плахотный, А.М. Кодунов, Е.В. Горина, В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, С.А. Бирюков, Г.И. Фильков</i>	1126

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты <i>Л.А. Суковатый, А.Е. Лисица, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева</i>	1135
Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами в основном представлены в живых организмах их биядерной формой <i>В.Д. Микоян, Е.Н. Бургова, Р.Р. Бородулин, А.Ф. Ванин</i>	1142
Инфракрасная спектроскопия сыворотки крови больных онкогематологическими заболеваниями <i>Е.А. Тельная, Л.В. Плотникова, А.Д. Гарифуллин, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, А.М. Поляничко</i>	1154
Особенности ответной реакции сердечно-сосудистой системы на геомагнитную возмущенность на различных широтах <i>С.С. Паршина, С.Н. Самсонов, Т.Н. Афанасьева, П.Г. Петрова, А.А. Стрекаловская, В.Д. Петрова, А.И. Кодочигова, К.В. Комзин, Л.К. Токаева</i>	1161
Классификация адаптивных признаков и вывод критериев их эволюционной оптимальности <i>Л.Л. Овсянников, М.И. Шпитонков</i>	1171
О калибровке автономной модели тундровой биологической популяции леммингов <i>Г.К. Каменев, Д.А. Саранча, В.О. Поляновский</i>	1184
Влияние обедненного дейтерием питьевого рациона на функциональное состояние центральной нервной системы животных в условиях гипоксии <i>С.В. Козин, А.А. Кравцов, Э.И. Злищева, Л.В. Шурыгина, В.В. Мальшко, А.В. Моисеев, А.А. Елкина, М.Г. Барышев</i>	1196
Компьютерная оценка вероятности образования метаболитов ксенобиотиков в организме человека <i>Д.А. Филимонов, А.В. Рудик, А.В. Дмитриев, А.А. Лагунин, В.В. Поройков</i>	1203
Определение в слезной жидкости препаратов, используемых во взрослой офтальмоанестезиологической практике, с помощью метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии <i>Л.М. Балашова, В.А. Намиот, И.И. Колесниченко, Н.А. Бакунина, Л.С. Коробова, А.Н. Доронин, И.А. Балашов, Д.Р. Черкашин, С.Н. Удальцов</i>	1211
Математическое моделирование динамики минерального питания растений в системе «удобрение—почва—растение» <i>В.А. Четырбоцкий, А.Н. Четырбоцкий, Б.В. Левин</i>	1219
Авторский указатель к 65 тому за 2020 год	1230
Содержание тома 65, 2020 г.	1240