

СОДЕРЖАНИЕ

Том 66, номер 5, 2021

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Положение дел в понимании свойств жидкой воды: возможная альтернатива

А.А. Васин, А.А. Волков 837

Влияние газов на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании воды и криозащитных растворов: оптико-микроскопическое исследование

А.В. Кобелев, Н.В. Шишова, С.В. Уграицкая, Л.В. Заломова, В.А. Яшин, Н.В. Пеньков, Е.Е. Фесенко (мл.) 845

Исследования спектральных характеристик L-лизина и L-аргинина с помощью адсорбционной, стационарной и синхронной флуоресцентной спектроскопии

Е.Л. Терпугов, С.Н. Удальцов, О.В. Дегтярева 856

Биоэлектрохимическое моделирование диффузии толуидинового синего в гидрогеле в присутствии пероксидазы и трипсина

И.А. Черенков, М.Д. Кривилев, М.М. Игнатьева, Е.В. Вахрушева, В.Г. Сергеев 865

Изучение стероидных «ключей» для андрогенного рецептора

А.А. Самченко, В.М. Комаров, М.С. Кондратьев 871

Конформационные особенности тахикининового декапептида сиалокинина I

Г.А. Агаева 881

Моделирование взаимодействия гетеродимера UxuR-ExuR с компонентами метаболического пути утилизации гексуронатов в *Escherichia coli*

Ю.А. Пуртов, С.В. Тищенко, А.Д. Никулин 889

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Методы исследования сверхслабого свечения биологических объектов.

I. История, фундаментальное и прикладное значение исследований сверхслабого свечения, его типы и свойства

Е.В. Наумова, Ю.А. Владимиров, Л.В. Белоусов, В.В. Тучин, И.В. Володяев 900

Флуоресценция хлорофилла фитопланктона реки москва при воздействии ионов ртути

Ф.Ф. Протопопов, Д.А. Тодоренко, И.Н. Николаев, А.А. Алексеев, Л.Б. Братковская, Д.Н. Маторин 917

Физико-химические свойства липосом, реконструированных из липидов печени и головного мозга мышей, принимавших нанолипосомальные комплексы

Н.П. Пальмина, Н.Н. Сажина, Н.Г. Богданова, А.С. Антипова, Е.И. Мартиросова, И.Г. Плащина, В.В. Каспаров, М.Г. Семёнова 925

Исследование конформации гемоглобина в эритроците при изменении парциального давления кислорода

О.В. Слатинская, О.Г. Лунева, Л.И. Деев, П.И. Зарипов, Г.В. Максимов 937

Непроникающие в клетки пептидные фрагменты сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка ингибируют Hsp90-зависимую миграцию и инвазию опухолевых клеток

*В.С. Петренко, А.В. Снигирева, В.В. Врублевская, М.А. Жмурина,
Ю.Ю. Скарга, О.С. Моренков*

945

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Оптимизация кислотно-щелочного состава инкубационной среды для длительной и обратимой криоконсервации срезов мозга негипернтрирующих животных

А.А. Мокрушин

954

Влияние давления газовых смесей, содержащих монооксид углерода, кислород и аргон, на сохранность тканей сердца крысы при гипотермической консервации

А.Е. Гурин, Е.Л. Гагаринский, Е.Е. Фесенко (мл.)

964

Влияние гibernации на метаболизм липидов неокортекса якутского суслика *Spermophilus undulatus*

Л.Н. Маркевич, О.В. Быкова, А.А. Лахина, И.К. Коломийцева

972

Противоопухолевый и цитотоксический эффект полиакрилатов благородных металлов

*Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, Н.В.Блюхтерова, М.М. Фомина,
В.А. Рыкова, Ю.А. Хоченкова, К.А. Абзаева*

978

Гепатопротекторное действие пероксиредоксина 6 при ишемически-реперфузионном поражении почки

А.Е. Гордеева, Э.А. Курганова, В.И. Новоселов

985

Костная система — еще одно депо изотопов йода

Н.П. Лысенко, Л.В. Рогожина, Л.А. Ромодин, И.И. Ковалев

994

Сравнительный анализ алгоритмов оценки движения центра масс по результатам стабиллометрических измерений

П.А. Кручинин, М.А. Подоприхин, И.Д. Бекеров

997

К вопросу о самоорганизации процессов изменения численности населения Земли

С.О. Гладков

1005

ДИСКУССИИ

Происхождение жизни в контексте неживой природы

М.В. Фридман, В.А. Намиот

1015

Гипотеза о физической природе феномена жизни

А.М. Смолович

1018

Почему не прекращаются дискуссии на тему: что такое жизнь с точки зрения физики (ответ на статью А.М. Смоловича «Гипотеза о физической природе феномена жизни»)

Г.Р. Иваницкий

1022

Естественно-научный и теологический подходы к пониманию того, как «устроена» существующая реальность

В.А. Намиот

1030

Замеченные опечатки

1040

Contents

Vol. 66, No. 5, 2021

Molecular Biophysics

Current Understanding of the Properties of Liquid Water: Possible Alternative Solution <i>A.A. Vasin and A.A. Volkov</i>	837
Influence of Gases on the Structural Integrity of Ice Formed During the Freezing of Water and Cryoprotective Solutions: an Optical-Microscopic Study <i>A.V. Kobelev, N.V. Shishova, S.V. Ugraitskaya, L.V. Zalomova, V.A. Yashin, N.V. Penkov, and E.E. Fesenko (Jr.)</i>	845
Study of Spectral Characteristics of L-Lysine and L-Arginine Using UV-VIS Spectroscopy, Steady-State Fluorescence Spectroscopy and Synchronous Fluorescence Spectroscopy <i>E.L. Terpugov, S.N. Udaltsov, and O.V. Degtyareva</i>	856
Bioelectrochemical Modeling of Toluidine Blue Diffusion in a Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Trypsin <i>I.A. Cherenkov, M.D. Krivilev, M.M. Ignat'eva, E.V. Vahrusheva, and V.G. Sergeev</i>	865
Investigation of Steroids: "Keys" to Androgen Receptor <i>A.A. Samchenko, V.M. Komarov, and M.S. Kondratyev</i>	871
Conformational Particularities of Tachykinin-like Decapeptide Sialokinin I <i>G.A. Agaeva</i>	881
Modeling the Interaction of the UxuR-ExuR Heterodimer with the Components of the Metabolic Pathway for Hexuronate Utilization in <i>Escherichia coli</i> <i>Y.A. Purtov, S.V. Tishchenko, and A.D. Nikulin</i>	889

Cell Biophysics

Methods Used for Studying Ultraweak Photon Emission from Biological Objects. I. History, the Importance of Fundamental Research and Practical Application of Ultraweak Photon Emission, Its Types and Properties <i>E.V. Naumova, Yu.A. Vladimirov, L.V. Beloussov, V.V. Tuchin, and I.V. Volodyaev</i>	900
Fluorescence of Phytoplankton Chlorophyll from the Moskva River in the Presence of Mercury Ions <i>F.F. Protopopov, D.A. Todorenko, I.N. Nikolaev, A.A. Alekseev, L.B. Bratkovskaya, and D.N. Matorin</i>	917
Physicochemical Properties of Liposomes Made from Lipids of Liver and Brain of Mice Receiving Nanolipid Complexes <i>N.P. Palmina, N.N. Sazhina, N.G. Bogdanova, A.S. Antipova, E.I. Martirosova, I. G. Plashchina, V.V. Kasparov, and M.G. Semenova</i>	925
Investigation of Hemoglobin Conformation within Erythrocytes under Different Levels of the Partial Pressure of Oxygen <i>O.V. Slatinskaya, O.G. Luneva, L.I. Deev, P.I. Zaripov, and G.V. Maksimov</i>	937
Cell-Impermeable Peptide Fragments of Survivin and Hsp70/Hsp90-Organizing Protein Inhibit the Hsp90-Dependent Migration and Invasion of Tumor Cells <i>V.S. Petrenko, A.V. Snigireva, V.V. Vrublevskaya, M.A. Zhmurina, Y.Y. Skarga, and O.S. Morenkov</i>	945

Complex Systems Biophysics

Optimization of the Acidic-Alkaline Composition of the Incubation Medium
for a Long-Term and Reversible Cryopreservation of Brain Slices
of Non-Hibernating Animals

A.A. Mokrushin 954

Effects of Pressures of Gas Mixtures Containing Carbon Monoxide, Oxygen and Argon
on the Preservation of Rat Heart Tissues in Hypothermic Conditions

A.E. Gurin, E.L. Gagarinsky, and E.E. Fesenko (Jr.) 964

The Influence of Hibernation on Lipid Metabolism in the Neocortex of Yakutian
Ground Squirrel *Spermophilus undulates*

L.N. Markevich, O.V. Bykova, A.A. Lakhina, and I.K. Kolomiitseva 972

Antitumor and Cytotoxic Effects of Polyacrilates of Noble Metals

*L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, E.I. Nekrasova, N.V. Bluhterova, M.M. Fomina,
V.A. Rikova, U.A. Hochenkova, and K.A. Abzaeva* 978

Hepatoprotective Effect of Peroxiredoxin 6 in Ischemia-Reperfusion Kidney Injury

A.E. Gordeeva, E.A. Kurganova, and V.I. Novoselov 985

Skeletal System as an Additional Storage System for Iodine Isotopes

N.P. Lysenko, L.V. Rogozhina, L.A. Romodin, and I.I. Kovalev 994

A Comparative Analysis of Algorithms for Center of Mass Estimation
Based on Force Plate Data

P.A. Kruchinin, M.A. Podoprikhin, and I.D. Bekerov 997

On the Question of Self-Organization of Processes of Changing the Population on the Earth

S.O. Gladkov 1005

Discussions

The Origin of Life in the Context of Inanimate Nature

M.V. Fridman and V.A. Namiot 1015

A Hypothesis about the Physical Phenomenon of Life
(Contribution to the Discussion of the Paper by G.R. Ivanitskii
“21st Century: what Is Life from the Perspective of Physics”)

A.M. Smolovich 1018

Why the Topic “What Is Life from the Point of View of Physics”
Is still under Discussion (a Response to the Article by A.M. Smolovich
“A Hypothesis about the Physical Phenomenon of Life”)

G.R. Ivanitskii 1022

Natural Scientific and Theological Approaches to the Understanding
of How the Existing Reality “Is Arranged”

V.A. Namiot 1030

Errata 1040

ПОЛОЖЕНИЕ ДЕЛ В ПОНИМАНИИ СВОЙСТВ ЖИДКОЙ ВОДЫ: ВОЗМОЖНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА

© 2021 г. А.А. Васин, А.А. Волков

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 38*

E-mail: aavol@bk.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

На основе литературных данных анализируется состояние дел в понимании свойств жидкой воды. Отмечается несоответствие затраченных усилий и достигнутых результатов, отсутствие модели, обладающей общностью, и неопределенность перспектив. Для выхода из кризиса предлагается газотвердотельная модель Френкеля, дополненная протонным обменом, радикально отличающаяся от существующих взаимопревращением молекул и ионов. Демонстрируется пример единообразного и последовательного описания моделью важнейших параметров жидкой воды — диэлектрической проницаемости, энтальпии испарения, коэффициента самодиффузии, вязкости и теплопроводности.

Ключевые слова: вода, водородные связи, протонный обмен, спектр поглощения, pH.

DOI: 10.31857/S000630292105001X

Вода является базовым веществом в биологии. На ее основе формируются жизненно важные водонаполненные среды, свойства которых интенсивно исследуются [1–3]. По собственным свойствам вода обычно рассматривается как нейтральный буфер [4]. Пренебрежение химической активностью воды в биологических средах находится в явном противоречии с признанным постулатом, что без воды жизни нет [5]. При том что важность воды не оспаривается, не существует обоснования этого убеждения на молекулярном уровне [6].

По мере привлечения все новых экспериментальных и расчетных методов проблема понимания свойств воды не снимается, количество неясных и спорных вопросов непрерывно растет: «Чем больше смотрим, тем больше проблем; новые методы, проникая все глубже в молекулярную архитектуру воды, подбрасывают все новые головоломки» [5]. Стало привычным, что предлагаемые модели общих выводов не дают. Они всегда специфичны и объясняют связанные с водой явления «по месту»: «подобно слепым со слонем, разные модели описывают разные аспекты поведения воды» [7].

В современном описании воды противоречий так много, что они составляют норму, а сама вода как жидкость считается аномальной [8, 9]. Непонятности коллекционируются, и коллекция с го-

дами растет [10]. В работах последних лет высказывается догадка, что базовая парадигма воды выстроена неправильно, потому и дела «идут криво» [11].

О СЕТКЕ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ

Около ста авторов от водного сообщества в тематическом сборнике «Water — The Most Anomalous Liquid» оценили современное состояние дел, провели инвентаризацию существующих знаний и пришли к выводу, что центральным из нерешенных является вопрос о водородных связях: «Какова структура и динамика сетки водородных связей в воде, ответственной за уникальные свойства? Этот вопрос дискутируется более 100 лет и все еще не решен» [8]. По современным представлениям, все богатство свойств воды обязано динамическим процессам в структуре водородных связей — их непрекращающимся разрывам и восстановлением [12–14]. Проблема понимания свойств воды таким образом сводится к пониманию свойств сетки водородных связей.

Идея о сетке водородных связей для воды была высказана в 1933 г. Дж. Берналом и Р. Фаулером: «Чистая вода, за исключением небольшой естественной ионизации, состоит из молекул H_2O . Нет оснований полагать, что эти молекулы, отличаются от молекул H_2O в паре. При 100°C одна

связь из четырех будет разорвана, а при 250°C — половина связей» [15]. Это представление неизменно по сей день, на нем базируются все современные исследования [16, 17]. Находящиеся в сетке водородных связей молекулы «непрерывно меняют своих соседей, среднее время жизни водородной связи составляет несколько пикосекунд» [18]. В принятой картине вода бурлит с образованием молекулярных сгустков, пустот, кластеров, ламелей, цепочек, дырок и т.п. (см., например, рис. 1 в работе [19]). Молекулы поворачиваются и перемещаются при случайно возникающих удобных условиях. Картина выглядит сверхсложной, для ее описания часто исходят из «разумных соображений». Предложено несметное количество моделей, но ни одна не стала общеупотребимой. Много ссылок по теме приведено в работе [20].

Проблему мы видим в том, что водородная связь как важный атрибут воды и центральный объект исследований не имеет четкого определения: «Нет возможности прямого физического наблюдения водородных связей и есть произвол в интерпретации того, что фактически измеряется» [21]. Только в общем понятно, что «водородная связь» случается при расположении атома водорода между двумя атомами кислорода: «Когда это происходит, говорят, что образовалась водородная связь» [22]. Уточнения сразу же требуют договоренностей [12]. Критериев множество — геометрических, энергетических, смешанных. По воле исследователей водородные связи могут быть длинными и короткими, сильными и слабыми, прямыми и изогнутыми, натянутыми и провисшими, целыми и разорванными, подлинными и случайными, относящимися к первой, второй и т.д. координационным сферам, непрерывно существующими и мерцающими, долго- и короткоживущими. Произвол в выборе начальных условий ведет к разбросу результатов [23]. Еще в 70-х годах прошлого века высказывалось предостережение, что описание свойств воды количеством разорванных водородных связей нельзя считать подходящим параметром [24]. И 40 лет спустя сомнения остались: «Нет согласия в том, как должна быть определена структура и как должна быть измерена или рассчитана сетка водородных связей» [25].

Суммируя, заключаем, что концепция сетки водородных связей противоречива, и соглашаемся с тем, что ее следует пересмотреть [26]. По всем признакам решение проблемы лежит на базовом уровне [11]. Для выработки правильного понимания требуется новый нестандартный подход [27]. В рамках существующих представлений задача выглядит неподъемной [28, 29].

В работах [30–32] мы опробовали обход существующих трудностей, обратившись к газотвердотельной модели Френкеля, в которой понятие

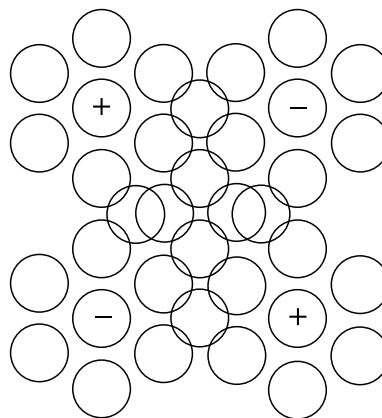


Рис. 1. Ион-молекулярная газотвердотельная модель жидкой воды. Пустые кружки — нейтральные дипольные молекулы H_2O , кружки с плюсами и минусами — ионы H_3O^+ и OH^- . Для простоты и наглядности протоны не показаны; концентрация ионов увеличена вдвое. Наслоение кружков в центре рисунка символизирует трехмерность среды.

водородных связей не используется [33]. Отказаться от водородных связей позволяет тот факт, что они устанавливаются на очень короткие (пикосекундные) времена [34]. В этих условиях взаимодействия молекул можно представить как столкновения. Жидкая вода выглядит тогда плотным газом частиц, находящихся в тепловом столкновительном движении, при котором каждая частица диффундирует и одновременно колеблется в клетке из окружающих ее соседей. Дополнительно мы отказались от постулата о неделимости молекул H_2O и ввели в модель условие, что при столкновениях между частицами происходит протонный обмен [35, 36], в результате которого молекулы и ионы взаимопревращаются.

ПРЕДЛАГАЕМАЯ МОДЕЛЬ

В литературе обращает на себя внимание серия работ 60-х годов прошлого века по квазиупругому рассеянию нейтронов в жидкой воде [37, 38]. Масштаб этих исследований на общем фоне мал, но они важны для нас подходом к интерпретации экспериментальных данных. Авторами использовалась газотвердотельная модель Френкеля, в рамках которой молекулы в воде движутся в режиме «прыжок—ожидание» с коэффициентом диффузии при комнатной температуре $D \sim 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ и временем пребывания в локализованном колебательном состоянии $t_0 \sim 3 \text{ пс}$. Была сделана попытка согласовать модель с представлением о вращении молекул в сетке водородных связей, но успехом она не увенчалась, а именно, выделить ожидавшуюся вращательную составляющую движения не удалось [37]. Этим мы объясняем факт, что отмеченные ис-

следования забыты и в современных публикациях практически не цитируются. Однако именно это полузабытое представление о диффузно-колебательном движении молекул позволяет отказаться от использования для жидкой воды понятия сетки водородных связей.

В работах [30–32] с целью описания панорамных диэлектрических спектров жидкой воды мы сформулировали постулаты, которые высветили картину отвечающей им среды. Эта молекулярная среда с диэлектрическими свойствами жидкой воды представлена на рис. 1. В последующих работах мы исследовали ее за пределами электродинамики для описания тепловых и транспортных свойств воды [39, 40].

Описание модельной среды. Среда состоит из атомов кислорода с закрепленными на них протонами в количестве одного, двух и/или трех (на рисунке не показаны). Полыми кружками представлены молекулы H_2O , а кружками со значками «+» и «–» — ионы H_3O^+ и OH^- (молекулы с нечетным числом протонов, с лишним и/или недостающим протоном по отношению к нейтральной молекуле H_2O). Кружки диаметром $d = 2.8 \text{ \AA}$ разделены зазором в четверть диаметра, $\delta = 0.7 \text{ \AA}$, что соответствует реальному расположению молекул в жидкой воде [24]. На мгновенном снимке всегда есть группы поляризованных молекул, центрированных ионами (ионы в гидратной оболочке, показаны в углах рис. 1). Совокупность гидратированных ионов представляет собой надмолекулярную структуру, имеющую собственную степень свободы движения. Для сравнения заметим, что в традиционной картине воды кружки зарядов «+» и «–» не имеют (считается, что их пренебрежимо мало), и они связаны палочками водородных связей, исходящими из каждого кружка в количестве от нуля до четырех.

Когезия модельной среды. Изображенная на рис. 1 среда состоит из нейтральных дипольных частиц массой $m = 3 \cdot 10^{-26} \text{ кг}$ с дипольным моментом $p = 1.84 \text{ Д}$ и ионов с зарядом величиной $q = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ Кл}$. Частицы удерживаются силами ион-ионного, диполь-ионного и слабого диполь-дипольного взаимодействий. Нейтральные молекулы притягиваются к ионам диполь-ионным притяжением, а ионы разного знака друг к другу — ион-ионным притяжением. Из сказанного следует, что связующим фактором молекул является кулоновское поле лишних протонов и протонных дырок, броуновским способом блуждающих по молекулам H_2O . Характер связи — динамический. В силу обобщественности протонов она сродни металлической — с обобщественными электронами. И только на временах, меньших пикосекунд, связь можно считать направленной (водородной или ковалентной).

Тепловая динамика модельной среды. Частицы находятся в тепловом столкновительном движении. При комнатной температуре средняя скорость молекул составляет 640 м/с и время пролета зазора — 0.1 пс . При столкновениях лишние протоны и дырки могут переходить с кислорода на кислород, «менять хозяина». Межкислородный переход протонов есть фундаментально присущий жидкой воде протонный обмен [35, 36]. Его следствием в нашей модели является то, что нейтральные молекулы и ионы с определенным темпом взаимопревращаются: каждая молекула (пустой кружок на рис.1) становится ионом (кружком с «+» или «–»), а каждый ион — молекулой. Процесс ион-молекулярных взаимопревращений определяет времена жизни молекул и ионов. В среде с указанными выше параметрами они составляют нано- и пикосекунды. При фиксированной температуре поддерживается ион-молекулярный концентрационно-временной баланс [32]:

$$N_w/\tau_w = N_i/\tau_i, \quad (1)$$

где N и τ с индексами w и i — концентрации и времена жизни соответственно молекул и ионов.

Лишний протон или дырка на молекуле воды придает частице заряд, который благодаря соударениям и протонному обмену случайно блуждает в объеме, совершает диффузионное движение. В физике ионных проводников, где изучается такое движение, частица в зависимости от того, движется она неэкранированной или экранированной, называется голый или одетой [41]. В одетом режиме резко увеличивается эффективная масса частицы и падает ее подвижность. При электромагнитном зондировании голые и одетые частицы дают отклик на разных участках спектра. Соответственно при спектральных измерениях на разных участках спектра зондируются разные частицы — с одинаковым зарядом q , но разными эффективной массой m и подвижностью μ .

Электродинамика модельной среды. Избранный нами френкелевский подход предполагает для частиц диффузно-колебательный режим движения, а именно: на коротких временах — колебания частицы внутри клетки из ближайших соседей (со смещением, меньшим межатомного расстояния), а на длинных временах — перемещение частицы на расстояния, большие межатомного. Поскольку молекулы помечены зарядами «+» или «–», их перемещения активны в спектрах электромагнитного поглощения. Вид этого спектра, в силу электромагнитной природы вещества, напрямую отражает молекулярное строение зондируемой среды.

Движение частиц в среде реализуется поэтапно. Самый быстрый процесс — межкислородный перескок протона, происходящий при столкновении иона и молекулы. Он происходит

за времена порядка долей пикосекунды и наблюдается в спектре поглощения в виде широкого пика на частотах $\sim 10^{13}$ Гц. За перескоком протона следует на порядок более медленное перемещение гидратной клетки (поляризационной конфигурации окружающих молекул). Оно проявляется в спектре поглощения в форме плоского плато на частотах $10^{12} - 10^9$ Гц. За смещениями протона и гидратной клетки с наибольшим запаздыванием следует перемещение ионного облака, первоначально равновесно окружавшего выделенный ион. Последнее движение дважды экранированного протона (или дырки) регистрируется на частотах ниже 10^7 Гц.

Жидкая вода, на которую ориентирована наша модель, имеет выразительный сверхвысокочастотный инфракрасный спектр поглощения, состоящий из нескольких мощных полос [32, 42]. Согласно модели их интерпретация следующая: пик в районе 5 ТГц есть колебания голого иона, а спадающие от него в сторону низких частот ступеньки — диффузия иона, одетого сначала в гидратную оболочку (до частот $\sim 10^9$ Гц), а затем дополнительно в ионную оболочку (ниже $\sim 10^7$ Гц). Низкочастотная часть спектра в двойном логарифмическом масштабе выглядит как сильно наклоненная вправо буква *S* с двумя полками — нижней и верхней [31, 42]. Проводимость на полках передается формулой для проводимости свободных независимых частиц:

$$\sigma_i = N_i q \mu_i, \quad (2)$$

где N_i — концентрация заряженных частиц, q — элементарный заряд и μ_i — подвижность частицы. Индексы $i = 2$ и 3 относятся к гидратированному иону и ему же, дополнительно одетому в ионную шубу.

Каждая ступенька дает вклад $\Delta\epsilon_i$ в статическую диэлектрическую проницаемость $\epsilon(0)$. Последняя является интегральной характеристикой динамики и суммарно представляет всю палитру микроскопических движений, связанных с разделением зарядов. Наибольший вклад $\Delta\epsilon_D$ (более 90%) исходит от ступеньки 2, от присущей воде так называемой дебаевской релаксации, производящей широко известный сверхвысокочастотный нагрев воды. Высокое значение $\Delta\epsilon_D$ (74 при комнатной температуре) ведет к высокому значению всей статической проницаемости $\epsilon(0) = 80$ и придает воде высокую растворяющую способность. И растворяющая способность, и сверхвысокочастотный нагрев воды таким образом происходят из $\Delta\epsilon_D$ и являются двумя сторонами одной медали.

Происхождение $\Delta\epsilon_D$ обычно связывают с динамикой дефектов сетки водородных связей. Молекулярные модели на этом поле продолжают

множиться [43]. В нашей газотвердотельной модели $\Delta\epsilon_D$ отражает пространственную ограниченность движения гидратированного иона внутри ионного облака (стадия 2) [32]. В аналитическом выражении она выглядит как температурная гиперболола [44]:

$$\Delta\epsilon_D = (2N_i)^{1/3} q^2 / [12\pi\epsilon_0(1 + \tau_s/\tau_i)k_B T], \quad (3)$$

где τ_i — время жизни иона (из формулы (1)), τ_s — время релаксации гидратной клетки, ϵ_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума, k_B — константа Больцмана, T — температура. Формула наглядно демонстрирует отличие предлагаемого подхода от принятого: в ней отсутствует всегда присутствующий в других моделях источник поляризации — дипольный момент отдельной молекулы воды. В нашей модели поляризация среды определяется не упорядочением молекулярных диполей, а токами зарядов, их концентрацией и подвижностью. Подвижность задается временами τ_i и τ_s , которые извлекаются из диэлектрических спектров. Формула содержит единственный свободный параметр N_i . Она удовлетворительно передает величину и температурный ход диэлектрической проницаемости воды в широком интервале температур (будет графически представлена ниже в пакете с тепловыми и транспортными параметрами воды).

На низких частотах, в области нижней ступеньки (при долгих временах однонаправленности поля), перемещения всех частиц (голых и одетых) усредняются. В пределе бесконечно больших времен (на нулевой частоте зондирования) молекулярные диполи H_2O , по нашей модели, постоянно пребывают в стягивающем кулоновском поле однозарядного иона H_3O^+ или OH^- .

Тепловые и транспортные свойства среды. В работах [39, 40] нами было найдено, что помимо электродинамической среда обладает еще рядом параметров, совпадающих с присущими воде. На рис. 2 представлено сравнение в широком интервале температур экспериментальных и рассчитанных по модели температурных зависимостей коэффициента самодиффузии D , вязкости η , энтальпии испарения H , диэлектрического вклада дебаевской релаксации $\Delta\epsilon$ и теплопроводности θ . Расчетные кривые ложатся на экспериментальные подбором единственного и общего для всех кривых параметра — концентрации ионов $N_i = 2.3 \cdot 10^{27} \text{ м}^{-3}$. Принципиально важно, что в формировании перечисленных свойств наравне с молекулами участвуют протоны, наделенные в нашей модели собственной (быстрой) степенью свободы. Количество параметров, охваченных единым описанием, беспрецедентно велико. Этим модель отвечает важнейшему требованию

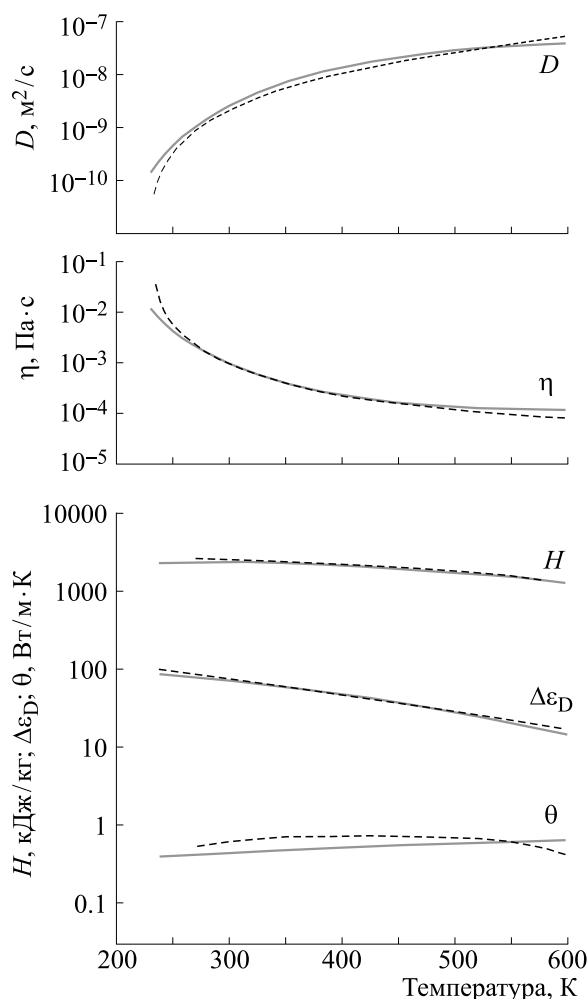


Рис. 2. Пример описания моделью коэффициентов диффузии D , вязкости η , энтальпии испарения H , диэлектрического вклада $\Delta\epsilon_D$ и теплопроводности θ жидкой воды [40]. Пунктирные черные кривые — эксперимент [45], сплошные серые кривые — модельный расчет с общим для всех кривых параметром (концентрацией ионов) $N_i = 2.3 \cdot 10^{27} \text{ м}^{-3}$.

последних лет — передавать свойства воды с максимальной полнотой [46].

ДИСКУССИЯ

Несмотря на успешность в описании свойств воды, модель встречает возражения. Главная — за пределами высокая, с точки зрения принятых представлений, концентрация ионов H_3O^+ и OH^- («+» и «-» на рис. 1): «Модель требует концентрации ионов, на семь порядков превышающей реальную концентрацию $[\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-7} \text{ моль/дм}^3$, так что выглядит неправдоподобной» [47] (курсив наш).

Корень конфликта — в словосочетании «реальная концентрация». Обращаем внимание, что ме-

тогда прямого измерения такой концентрации N_i не существует. Величина $N_i = 10^{-7} \text{ моль/л}$ принята по соглашению на основе результатов косвенных измерений, интерпретированных с использованием целого набора предположений. Для расчета концентрации N_i используют уже упомянутую выше формулу (2) в предположении, что ионов H_3O^+ и OH^- мало и они друг с другом не взаимодействуют [48, 49]. Собственную проводимость воды принимают равной $5.5 \cdot 10^{-8} \text{ Ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (удельное сопротивление $18 \text{ МОм} \cdot \text{м}$ для чистой воды при комнатной температуре), а величину μ для ионов H_3O^+ и OH^- получают путем проведения серии процедур с водными растворами электролитов [48, 49]. Сначала из перекрестного сравнения параметров ионного разделения в растворах электролитов разного химического состава по теории Аррениуса определяют подвижности ионов электролита, а далее экстраполируют эти значения на случай бесконечного разбавления, когда ионов электролита в растворе не остается совсем, но проводимость не пропадает. Таким путем по остаточному принципу рассчитывают подвижности ионов воды H_3O^+ и OH^- (получают соответственно 349.8 и $198.5 \text{ См} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$ при комнатной температуре) и, суммируя аддитивно по закону Кольрауша (с результатом $548.3 \text{ См} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$), из приведенной формулы (2) для проводимости получают величину 10^{-7} моль/л . Ее и принимают за концентрацию N_i собственных ионов воды и работают с водой в предположении, что концентрация ионов мала. Полученная описанным способом концентрация $N_i = 10^{-7} \text{ моль/л}$ есть не экспериментальный факт, а лишь интерпретация кондуктометрических экспериментов с водными растворами электролитов.

В схеме не учитывается факт, что между ионами H_3O^+ , OH^- и нейтральными молекулами H_2O происходит быстрый протонный обмен, отчего молекулы и ионы долго не живут. Проблему хорошо понимали классики: « H_2O present in pure water occurs in less than 10^{-4} с » (с. 509 в работе [50]). В свете современных знаний неучет протонного обмена неприемлем [51]. Уже и компьютерные симуляции, хотя и редко, предлагают сценарии генерации в воде высокой концентрации короткоживущих ионов [36].

Учет взаимодействий требует радикального пересмотра принятой интерпретации спектра проводимости воды [30, 31]. Сто лет назад, когда освоенными для диэлектрических измерений были только отдельные участки спектра, рост проводимости в районе 10^7 Гц назывался эффектом Дебая—Фалькенхагена, а сильное поглощение в

районе 10^9 Гц — эффектом Дебая—Хюккеля [48]. Нижнюю полку (проводимость «на постоянном токе», dc -проводимость, нашу σ_3) связали и до сих пор связывают с перемещением протонов, а верхнюю (проводимость «на переменном токе», ac -проводимость, нашу σ_2) — с переориентацией молекулярных диполей. Первая, по принятому соглашению, считается отражающей концентрацию свободных протонов ($pH = 7$ при комнатной температуре), а вторая — концентрацию вращающихся диполей (дебаевская релаксация, сверхвысокочастотный нагрев). Вплоть до настоящего времени dc - и ac -проводимости изучаются как самостоятельные явления, ничего общего друг с другом не имеющие. Низкое значение dc -проводимости принимается как свидетельство низкой концентрации N_i свободных зарядов (протонов и дырок).

С позиций нашей модели принятая концентрация N_i относится не к свободным (голым) ионам, а к дважды экранированным, одетым гидратной и ионной оболочками. Мы исходим из того, что истинная концентрация зарядов в среде («реальная концентрация») может быть корректно определена только из измерений на высоких частотах, когда за время однонаправленного действия поля взаимодействие не успевает включаться, т. е. когда заряженные частицы являются голыми. На низких частотах, как уже говорилось, они одеваются разными видами взаимодействий. В соответствии с этим мы интерпретируем малость величины dc -проводимости воды не малостью концентрации N_i независимых ионов, а, наоборот, высокой концентрацией N_i сильно взаимодействующих ионов, имеющих низкую подвижность [30–32]. Концентрацию N_i свободных ионов в таких условиях представляет не нижняя полка спектра проводимости, как принято, $\sigma_{dc} = 5.5 \cdot 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \text{ м}^{-1}$, а верхняя, $\sigma_{ac} = 79 \text{ Ом}^{-1} \text{ м}^{-1}$, которая лежит на семь порядков выше. Из этого следует и на семь порядков более высокая концентрация носителей тока.

Интерпретация спектра проводимости напрямую связана с понятием водородного показателя pH . Считается, что он определяет концентрацию ионов водорода (pH есть «логарифм концентрации ионов водорода, взятый с обратным знаком» [52]). При кондуктометрическом определении pH концентрацию N_i рассчитывают, как говорилось, по формуле (2) делением значения dc -проводимости водного раствора на подвижность μ ионов гидроксония H_3O^+ . В этой процедуре проводимость экранированной (одетой) частицы σ_3 делится на подвижность свободной (голой) части-

цы μ_2 . Частицам с большой эффективной массой приписывается подвижность частиц с массой, на семь порядков меньшей. Так определяемый pH формируется из параметров частиц, откликающихся в диэлектрическом спектре на разных его участках. В рамках нашей модели, таким образом, pH отражает отношение скоростей диффузии свободных и экранированных частиц (протонов и протонных дырок). Тема pH подробно обсуждается нами в работе [53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По литературным данным проанализировано положение дел в понимании свойств жидкой воды. Оно найдено неудовлетворительным из-за отсутствия сколько-нибудь общей модели для описания присущих воде свойств и отсутствия перспектив изменения ситуации. Предложен путь выхода из кризиса с опорой на данные спектральных диэлектрических измерений и использование для их описания газо-динамической модели Френкеля. Схематично представлена предлагаемая модель и приведено свидетельство успешности описания ею таких свойств воды, как диэлектрическая проницаемость, коэффициент самодиффузии, вязкость, теплопроводность и энтальпия испарения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-02-00446).

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. Ph. Ball, Proc. Natl. Acad. Sci USA **114**, 13327 (2017). DOI: 10.1073/pnas.1703781114
2. V. C. Nibali and M. Havenith, J. Am. Chem. Soc. **136**, 12800 (2014). DOI: 10.1021/ja504441h
3. C. Messori, Open Access Library J. **6**, e5435 (2019). DOI: 10.4236/oalib.1105435
4. M. Gerstein and M. Levitt, Sci. Amer. **279**, 101 (1998). DOI: 10.1038/scientificamerican1198-100
5. Ph. Ball, Chem. Rev. **108**, 74 (2008). DOI: 10.1021/cr068037a
6. S. L. Meadley and C. A. Angell, in *Water and its relatives: The stable, supercooled and particularly the*

- stretched regimes*, Ed. by P. G. Debenedetti, M. A. Ricci, and F. Bruni (Varenna, Italy, 2013), pp. 19–23. DOI: 10.3254/978-1-61499-507-4-19
7. K. A. Dill, T. M. Truskett, V. Vlachy, and B. Hribar-Lee, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Structure* **34**, 173 (2005). DOI: 10.1146/annurev.biophys. 34.040204.144517
 8. L. G. M. Pettersson, R. H. Henchman, and A. Nilsson, *Chem. Rev.* **116**, 7459 (2016). DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00363
 9. V. Raicu and Yu. Feldman, *Dielectric Relaxation in Biological Systems: Physical Principles, Methods, and Applications* (Oxford Scholarship, 2015). DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199686513.001.0001
 10. M. Chaplin, *Water Structure and Science*, https://www1.lsbu.ac.uk/water/water_anomalies.html.
 11. V. P. Sokhan, A. P. Jones, F. S. Cipcigan, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **112**, 6341 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1418982112
 12. M. J. Gillan, D. Alfè, and A. Michaelides, *J. Chem. Phys.* **144**, 130901 (2016). DOI: 10.1063/1.4944633
 13. F. N. Keutsch, R. S. Fellers, M. G. Brown, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5938 (2001). DOI: 10.1073/pnas.191266498
 14. B. Ruscic, *J. Phys. Chem. A* **117**, 11940 (2013). DOI: 10.1021/jp403197t
 15. J. D. Bernal and R. H. Fowler, *J. Chem. Phys.* **1**, 515 (1933). DOI: 10.1063/1.1749327
 16. N. A. Chumaevskii and M. N. Rodnikova, *J. Mol. Liquids* **106**, 167 (2003). DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199686513.001.0001
 17. V. Petkov, Y. Ren, and M. Suchomel, *J. Phys.: Cond. Matter* **24**, 155102 (2012). DOI: 10.1088/0953-8984/24/15/155102
 18. Г. Г. Маленков, *Журн. структур. химии* **47**, 5 (2006).
 19. J. C. Del Valle, C. Arago, M. I. Marques, and J. A. Gonzalo, *Ferroelectrics* **46**, 166 (2014). DOI: 10.1080/00150193.2014.895217
 20. R. H. Henchman, *J. Phys.: Condens. Matter* **28**, 384001 (2016). DOI: 10.1088/0953-8984/28/38/384001
 21. M. V. Fernández-Serra and E. Artacho, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 016404 (2006). DOI: 10.1103/PhysRevLett.96.016404
 22. P. G. Debenedetti, *J. Phys.: Condens. Matter* **15**, 1669 (2003). DOI: 10.1088/0953-8984/15/45/R01
 23. J.-J. Max and C. Chapados, *J. Chem. Phys.* **134**, 164502 (2011). DOI: 10.1063/1.3581035
 24. Д. Эйзенберг и В. Кауцман, *Структура и свойства воды* (Гидрометеиздат, Л., 1975).
 25. Y. Marcus, *Ions in Water and Biophysical Implications* (Springer, 2012). DOI: 10.1007/978-94-007-4647-3
 26. J. D. Eaves, J. J. Loparo, C. J. Fecko, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **102**, 13019 (2005). DOI: 10.1073/pnas.0505125102
 27. C. H. Cho, S. Singh, and G. W. Robinson, *J. Chem. Phys.* **107**, 7979 (1997), DOI: 10.1063/1.475060
 28. K. Amann-Winkel, R. Böhmer, F. Fujara, et al., *Rev. Modern Phys.* **88**, 011002 (2016). DOI: 10.1103/RevModPhys.88.011002
 29. J. L. F. Abascal and C. Vega, *J. Chem. Phys.* **123**, 234505 (2005). DOI: 10.1063/1.2121687
 30. A. A. Volkov, V. G. Artemov, and A. V. Pronin, *Eur. Phys. Lett.* **106**, 46004 (2014). DOI: 10.1209/0295-5075/106/46004
 31. V. G. Artemov, A. A. Volkov, A. V. Pronin, and A. A. Volkov, *Biophysics* **59**, 520 (2014). DOI: 10.1134/S0006350914040022
 32. A. A. Volkov, V. G. Artemov, A. A. Volkov Jr, and N. N. Sysoev, *J. Mol. Liquids* **248**, 564 (2017). DOI: 10.1016/j.molliq.2017.10.071
 33. Я. И. Френкель, *Кинетическая теория жидкостей* (Наука, М., 1975).
 34. J. D. Eaves, J. J. Loparo, C. J. Fecko, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **102**, 13019 (2005). DOI: 10.1073/pnas.0505125102
 35. D. Marx, *Chem. Phys. Chem.* **7**, 1849 (2006). DOI: 10.1002/cphc.200600128
 36. P. L. Geissler, C. Dellago, D. Chandler, et al., *Science* **291**, 2121 (2001). DOI: 10.1126/science.1056991
 37. K. S. Singwi and A. Sjolander, *Phys. Rev.* **119**, 863 (1960). DOI: 10.1103/PhysRev.119.863
 38. В. С. Оскотский, *Физика твердого тела* **5**, 1082 (1963).
 39. A. A. Volkov, A. A. Vasin, and A. A. Volkov Jr., *Ferroelectrics* **561**, 57 (2020). DOI: 10.1080/00150193.2020.1736915
 40. A. A. Vasin and A. A. Volkov, *Tech. Physics* **65**, 1411 (2020). DOI: 10.1134/S1063784220090285
 41. М. Б. Саламон, *Физика суперионных проводников* (Зинатне, Рига, 1982).
 42. А. А. Волков, А. А. Васин А. А. Волков (мл), *Изв. РАН, сер. физ.* **84**, 1241 (2020). DOI: 10.31857/S0367676520090392
 43. I. Popov, P. B. Ishai, A. Khamzin, and Y. Feldman, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 13941 (2016). DOI: 10.1039/C6CP02195F
 44. A. A. Volkov, A. A. Vasin, and A. A. Volkov Jr., *Ferroelectrics* **538**, 83 (2019). DOI: 10.1080/00150193.2019.1569989
 45. IAPWS-Releases, <http://www.iapws.org/release.html>.
 46. J. L. Aragones, L. G. MacDowell, and C. Vega, *J. Phys. Chem. A* **115**, 5745 (2011). DOI: 10.1021/jp105975c
 47. U. Kaatz, *J. Mol. Liquids* **259**, 304 (2018). DOI: 10.1016/j.molliq.2018.03.038
 48. С. Глестон, *Введение в электрохимию* (ИЛ, М., 1951).
 49. J. O'M. Bockris and A. K. N. Reddy, *Modern Electrochemistry* (Kluwer Acad. Publ., NY, 2002).
 50. M. Eigen and L. de Maeyer, *Proc. Roy. Soc. Lond. A* **247** (1251), 505 (1958). DOI: 10.1098/rspa.1958.0208
 51. M. Chaplin, *Science in Society* **58**, 41 (2013).
 52. Б. Б. Дамаскин, О. А. Петрий и Г. А. Цирлина, *Электрохимия* (Химия, М., 2006).
 53. V. G. Artemov, A. A. Volkov, N. N. Sysoev, and A. A. Volkov Jr, *Doklady Physics* **61**, 1 (2016). DOI: 10.1134/S1028335816010043

Current Understanding of the Properties of Liquid Water: Possible Alternative Solution

A.A. Vasin and A.A. Volkov

Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia

Based on information extracted from the published literature, we have analyzed the current state of knowledge linking to the properties of liquid water. There is a discrepancy between the efforts made and the results achieved, there is no model of commonality and the certainty in prospects. While searching for optimal solution to the problem, we propose to use the gas-solid state Frenkel approach which takes into account the interconversion of molecules and ions. It has been demonstrated that this model can be used to provide a uniform and consistent description of the most important parameters of liquid water such as dielectric constant, evaporation enthalpy, self-diffusion coefficient, viscosity and thermal conductivity.

Keywords: water, hydrogen bonds, proton exchange, absorption spectrum, pH

ВЛИЯНИЕ ГАЗОВ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ СТРУКТУРЫ ЛЬДА, ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ВОДЫ И КРИОЗАЩИТНЫХ РАСТВОРОВ: ОПТИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2021 г. А.В. Кобелев, Н.В. Шишова, С.В. Уграицкая, Л.В. Заломова, В.А. Яшин,
Н.В. Пеньков, Е.Е. Фесенко (мл.)

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

E-mail: eugeny.ef@gmail.com

Поступила в редакцию 22.07.2021 г.

После доработки 27.07.2021 г.

Принята к публикации 29.07.2021 г.

С помощью оптической микроскопии исследовано влияние воздуха, гелия, аргона, ксенона и гексафторида серы на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании воды и ряда криозащитных растворов в температурном диапазоне от 0 до -50°C . Показано, что кристаллизация капли воды объемом ≈ 200 мкл в атмосфере воздуха происходит с нарушением целостности структуры льда. В замороженных образцах наблюдается образование газовых микропузырьков диаметром до 250 мкм. Продувка над поверхностью капли воды аргона, ксенона или гексафторида серы перед замораживанием позволяет снизить максимальный размер микропузырьков до 100 мкм. Продувка гелия над поверхностью воды, растворов DMEM и «ЕвроКоллинз» позволяет полностью устранить или значительно уменьшить образование газовых микропузырьков в процессе кристаллизации. Для формируемого при этом массива льда характерна тенденция к снижению вероятности растрескивания при охлаждении до -50°C , что может способствовать выживаемости биологического материала при консервации. Добавление криопротектора этиленгликоля в концентрации 1–10 об. % в раствор позволяет снизить или полностью предотвратить выделение микропузырьков газа при замораживании. Механизм, с помощью которого реализуется данный феномен, остается неясным. Добавление этиленгликоля в концентрации 10 об. % и более также предотвращает растрескивание льда при охлаждении до -50°C .

Ключевые слова: криоконсервация, кристаллы льда, этиленгликоль, инертные газы, гелий, микропузырьки, растрескивание.

DOI: 10.31857/S0006302921050021

Методы криоконсервации (глубокого замораживания биообъектов) возникли в середине прошлого века [1], активно развивались и в настоящее время широко применяются в различных сферах — науке, медицине, сельском хозяйстве, биотехнологическом производстве. Выживаемость биологических объектов при глубоком замораживании зависит от физических процессов, происходящих в водных растворах в процессе замораживания и оттаивания. Состав растворов и применяемые криопротекторы оказывают влияние на зарождение и рост кристаллов льда, их форму, размер, на возможность стеклования растворов, температурное сжатие и расширение. Существенную роль в перечисленных процессах играют растворенные в жидкой среде газы. Считается, что некоторые газы, например ксенон или

гексафторид серы, способны повысить живучесть биологического материала при криоконсервации [2–7]. В нашей лаборатории на модели клеточных культур были показаны криозащитные свойства гелия [8].

Газы растворяются в воде по «пустотному механизму», внедряясь в полости, образованные молекулами воды [9]. Во время кристаллизации водных растворов газы вытесняются из образующихся кристаллов льда в окружающий водный раствор, что вызывает нарастание концентрации газов в остаточном незамерзшем растворе. В итоге достигается пересыщение раствора газами, и они начинают выделяться из раствора, образуя микропузырьки [10, 11]. Если имеется односторонний фронт кристаллизации, то газы могут быть выдавлены из жидкости. Если же

фронт неравномерный (например, в случае помещенной в жидкий азот криопробирки с жидкостью), то газы окажутся в ловушке, образованной кристаллами льда на периферии объема жидкости. При затвердевании раствора микропузырьки газа создают неоднородности. Именно эти неоднородности служат местами наиболее вероятного образования трещин при дальнейшем охлаждении отвердевших растворов вследствие процессов температурного сжатия и расширения, т.е. температурных деформаций. Кроме того, наличие микропузырьков способствует увеличению температурных градиентов при охлаждении/разогреве материала [11]. В процессе замораживания суспензии животных клеток нуклеация кристаллов льда происходит вне клеток, и при дальнейшем замораживании клетки, как правило, оттесняются растущими кристаллами и сосредотачиваются в остаточном незамерзшем растворе [12]. Следовательно, очаги возникновения микропузырьков будут находиться вблизи клеток и перечисленные негативные явления с большой вероятностью могут служить повреждающими факторами.

Ранее нами была высказана гипотеза, что снижение концентрации растворенных газов в биологическом материале может снизить количество неоднородностей в растворе при замораживании и повысить выживаемость криоконсервированных клеток [8]. Наиболее распространенный физический способ дегазации жидкостей — вакуумирование, но к живым клеткам и тканям млекопитающих подобный метод неприменим. Однако значительно снизить количество растворенных газов в системе с живыми объектами можно методом инкубации в атмосфере газа с низкой растворимостью. При инкубации суспензии клеток в атмосфере определенного состава газы, находящиеся в растворе, будут выходить из него по градиенту концентрации, а газ из газообразной фазы будет переходить в раствор в количестве, определяющемся коэффициентом растворимости. Чем меньше коэффициент растворимости такого газа в жидкости, тем меньше окажется общее количество газов, растворенных в жидкой фазе, в результате инкубации в его атмосфере.

Особенно интересен в этом отношении гелий. Это нетоксичный инертный газ, с низким коэффициентом растворимости в воде и водных растворах. Помимо низкой растворимости в воде, гелий, в отличие от большинства других газов, имеет сравнительно высокий коэффициент растворимости во льду. При одной и той же температуре его растворимость во льду выше, чем в воде [13]. Очевидно, что при образовании льда гелий, встраиваясь в кристаллическую решетку льда, не будет вытесняться в окружающий раствор и, следовательно, не будет образовывать микропузырьки.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния газовой атмосферы на замораживание воды и консервирующих растворов, в том числе содержащих классические криопротекторы (на примере этиленгликоля). Мы сравнивали процесс кристаллизации и структуру отвердевшей капли, замороженной в атмосфере гелия, аргона, ксенона, гексафторида серы и воздуха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наиболее информативным методом наблюдения за различными процессами в реальном времени является оптическая микроскопия. В ряде работ оптическую микроскопию применяли для наблюдения за образованием и ростом кристаллов газовых гидратов [14–16]. В работе [17] нами отработана методика наблюдения за образованием и ростом кристаллов газовых гидратов в герметичной ячейке под давлением газа. Для изучения влияния инертных газов (гелий, аргон, ксенон) и гексафторида серы на структуру образующегося льда была использована аналогичная методика наблюдения за каплей жидкости в герметичной ячейке. Этот метод позволяет заменить газовый состав, окружающий каплю, на время, достаточное для газообмена в жидкости, и наблюдать за процессами в охлаждаемой капле в реальном времени с разрешением $\sim (1–10)$ мкм.

Процесс образования льда исследовали в титановой кювете-барокамере (рис. 1) (далее по тексту — барокамера), установленной в поле зрения стереомикроскопа MZ16A (Leica, Германия). При исследовании капли применяли метод проходящего, нижнего и бокового освещения.

Внутри основного отсека барокамеры помещали каплю исследуемой жидкости объемом 250 мкл (диаметр капли ≈ 12 мм, высота (толщина) ≈ 1.7 мм). При комнатной температуре к барокамере подсоединяли пластиковый баллон, направленный 2 л исследуемого газа при атмосферном давлении. Предварительно для вытеснения атмосферных газов из внутреннего объема барокамеры ее продували 200 мл газа. Исследуемую жидкость выдерживали при комнатной температуре 1 ч, в течение которого каждые 2 мин подавали в барокамеру газ из баллона порциями по 50 мл. Излишки газа выходили через ослабленную заглушку, поэтому давление в камере не превышало атмосферное. Между газовой средой и жидкостью протекали процессы сорбции/десорбции газов. Растворенные в жидкой капле атмосферные газы диффундировали из жидкости в газовую среду и удалялись при продувке газа через камеру. Растворение инертного газа в воде происходило до достижения максимальной равновесной концентрации при данных значениях давления и температуры. Таким образом происходила смена состава газов, растворенных в капле

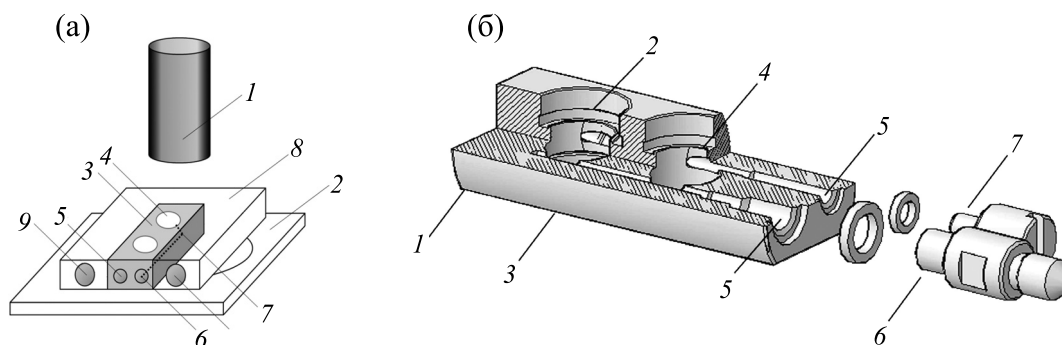


Рис. 1. (а) — Схема экспериментальной установки, используемой для изучения кристаллизации растворов в газовой атмосфере: 1 — объектив микроскопа с CCD-камерой, 2 — столик микроскопа, 3 — кювета-барокамера, 4 — смотровое окно, 5 — вход газа, 6 — выход газа и вход термопары, 7 — термопара, 8 — теплообменник, 9 — каналы для подключения охлаждающего термостата. (б) — Схема титановой кюветы-барокамеры: 1 — корпус; 2 — основной отсек, объем 1 мл, место установки верхнего смотрового окна; 3 — место установки нижнего смотрового окна; 4 — резервный отсек, объем 1 мл, место установки дополнительного верхнего смотрового окна; 5 — газовые каналы; 6 — входной штуцер; 7 — выходной штуцер с ниппелем.

жидкости. Перед охлаждением входной и выходной штуцеры затягивали, перекрывая ход газа, и далее газовую атмосферу не меняли. Скорость охлаждения капли в барокамере составляла 1°C/мин. Система была снабжена системой термостатирования, которая позволила проводить наблюдения при контролируемой температуре в интервале от 0°C до –50°C. Кювету вставляли в П-образный теплообменник, охлаждающий ее с задней и боковых поверхностей. Теплообменник подключали к жидкостному криотермостату FT-311-80 (ЛОИП, Россия). В качестве хладагента использовали этиловый спирт. Температуру барокамеры контролировали при помощи цифрового термометра АТТ-2006 (ЗАО НПП «Эликс», Россия) с точностью 0.1°C (термопара ТМКн). Термопару вводили в корпус барокамеры через выходной газовый канал, ввод герметизировали. Датчик располагали над каплей, касаясь ее поверхности (виден на снимках, например, на рис. 4г). Чтобы атмосферная влага не конденсировалась на смотровом окне и не ухудшала изображение исследуемой системы, наблюдения проводили через тонкий слой этилового спирта, который наносили на внешнюю поверхность верхнего смотрового окна.

В качестве исследуемой жидкости использовали деионизированную воду высокой степени очистки с удельным сопротивлением 17 МОм·см, (Sartorius Arium Pro, Weighing Technology GmbH, Германия), среду DMEM (Gibco, Life Technology Corp., Великобритания), консервирующий раствор «ЕвроКоллинз» (KH_2PO_4 — 2.04 г/л, KCl — 1.12 г/л, K_2HPO_4 — 7.3 г/л, NaHCO_3 — 0.84 г/л, глюкоза — 34.96 г/л), раствор «ЕвроКоллинз без глюкозы», а также этиленгликоль (Sigma-Aldrich, США). Растворы исследовали под атмосферой

гелия, аргона, ксенона и гексафторида серы. В качестве контроля использовали атмосферный воздух.

При наблюдении за замораживанием воды и растворов фиксировали температуру льдообразования, сайты первичной нуклеации льда, наличие и рост микропузырьков газа, наличие и паттерн растрескивания криогидрата при дальнейшем охлаждении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние газов на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании воды. В первом эксперименте мы исследовали влияние аргона, ксенона, гексафторида серы, а также гелия на структуру массива льда, образующегося при замораживании исследуемой аликвоты воды. В качестве контроля наблюдали замораживание капли в атмосфере воздуха.

Известно, что вследствие преодоления энергетического барьера при охлаждении кристаллизация происходит не в точке равновесного кристаллообразования, а при более низкой температуре в переохлажденной жидкости. Нуклеация льда при охлаждении является стохастическим процессом и ее точная температура зависит от скорости охлаждения и наличия частиц-нуклеаторов в растворе или на границах капли [18]. В наших экспериментах нуклеация воды происходила в диапазоне –4 ~ –7°C (см. табл. 1) и начиналась с быстрого образования тонкой корки льда на поверхности, после чего продолжалась в объеме капли.

Состав газовой фазы внутри барокамеры не оказывал влияния ни на температуру нуклеации кристаллов льда, ни на местоположение сайтов

Таблица 1. Характеристика замораживания воды в атмосфере различных газов

Атмосфера	Температура (°C) и характер нуклеации при скорости охлаждения 1°C/мин	Наличие газовых микропузырьков в поле капли	Температура (°C) начала процесса растрескивания и наличие трещин при температуре –50°C
Воздух $n = 8$	-5.2 ± 0.8 Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–250 мкм по всему полю капли	-32.0 ± 5.0 Наличие множества трещин в объеме капли
Гелий $n = 10$	-5.0 ± 1.0 Первичная нуклеация на поверхности капли	Незначительное количество микропузырьков в поле капли или их полное отсутствие	-33.4 ± 4.0 Наличие трещин в объеме капли
Аргон $n = 10$	-4.8 ± 0.3 Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–100 мкм по всему полю капли	-29.6 ± 5.4 Наличие множества трещин в объеме капли
Ксенон $n = 4$	-5.3 ± 1.5 Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–100 мкм по всему полю капли	н/о Наличие множества трещин в объеме капли
Гексафторид серы $n = 10$	-5.5 ± 0.5 Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки размером 5–100 мкм по всему полю капли	-31.7 ± 6.4 Наличие множества трещин в объеме капли

первичной нуклеации. Фронт кристаллизации продвигался симметрично от краев капли, где она наиболее интенсивно охлаждалась, к центру. Так как плотность льда меньше плотности жидкой воды, то по мере кристаллизации объем аликвоты воды увеличивался, за счет чего в центре отвердевшей капли образовывалось вздутие. Такая деформация формы капли сама по себе не вызывала растрескивания льда.

При дальнейшем охлаждении наблюдали растрескивание льда. Процесс растрескивания начался в диапазоне температур от -20 до -40°C . Мы не выявили какого-либо влияния газовой атмосферы на температуру появления первых трещин (рис. 2а–е). Что касается количества возникших трещин, то в атмосфере гелия мы фиксировали как образцы с выраженными явлениями растрескивания льда, так и практически полностью лишенные их (рис. 2д, е). С нашей точки зрения можно говорить о тенденции к снижению явления растрескивания в атмосфере гелия, что логично связать с сокращением газовой фазы в растворе. Однако чтобы эту тенденцию достоверно подтвердить, требуются эксперименты в составе большей выборки, а также модель подсчета выраженности процесса явления растрескивания, например, по общей протяженности трещин в поле образца.

При замораживании капли воды в атмосфере воздуха наблюдали возникновение многочисленных микропузырьков размером 5–250 мкм (рис. 3а).

Кристаллизация воды в атмосфере аргона, ксенона и гексафторида серы также происходила с образованием газовых микропузырьков размером 5–100 мкм (рис. 3б–г). При описанных методах наблюдения не было выявлено заметной разницы в количестве и размере микропузырьков газа при замораживании в атмосфере аргона, ксенона и гексафторида серы. Кристаллизация капли воды в атмосфере гелия резко отличалась, так как при этом либо не наблюдалось образования микропузырьков газа, либо они были малочисленны. Образовавшийся лед был прозрачным, с наличием единичных микропузырьков (рис. 3д, е).

Примечательно, что структура льда, замороженного в атмосфере аргона, ксенона, гексафторида серы и воздуха визуально выглядела сходной. При этом аргон, ксенон и гексафторид серы значительно отличаются по показателю растворимости в воде. Ксенон имеет сравнительно высокий коэффициент растворимости (5.0 ммоль/л при 20°C), в то время как гексафторид серы слабо растворим в воде (0.29 ммоль/л) и по этому показателю близок к гелию (0.40 ммоль/л при 20°C , растворимость дана по работе [19]). Образцы

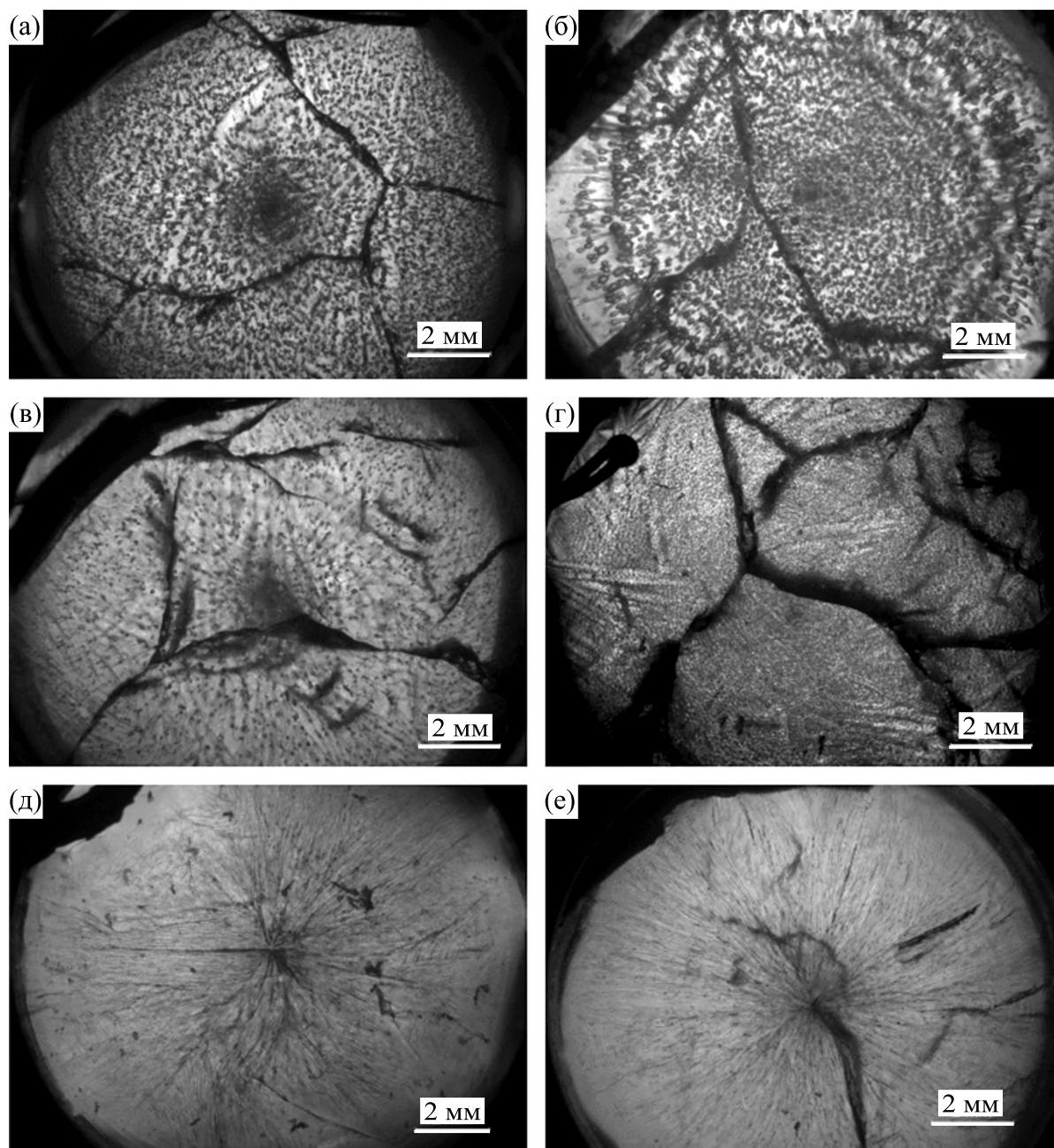


Рис. 2. Фотографические изображения явления растрескивания массива льда капли воды, замороженной в кювете-барокамере в условиях продувки воздухом (а), аргоном (б), ксеноном (в), гексафторидом серы (г) и гелием (д, е). Изображения получены при температуре -50°C .

льда, полученные в атмосфере ксенона и гексафторида серы, мало отличались друг от друга, тогда как использование гелия привело к заметным изменениям. По-видимому, существенное влияние на возникновение нарушений структуры льда оказывает не только количество растворенного газа, но и его природа. Гелий (наряду с водородом и неоном) обладает аномально высоким коэффициентом растворимости во льду, обусловленным малым размером молекулы, позволяю-

щим ему встраиваться в кристаллическую решетку льда [20]. Вероятно, именно это свойство послужило причиной резкого отличия льда, замороженного в атмосфере гелия.

2. Влияние гелия на целостность структуры льда, формирующегося при замораживании растворов ДМЕМ, «ЕвроКоллинз» и «ЕвроКоллинз без глюкозы». В связи выраженным действием гелия, предохраняющим массив льда от образования микропузырьков, замораживание растворов ре-

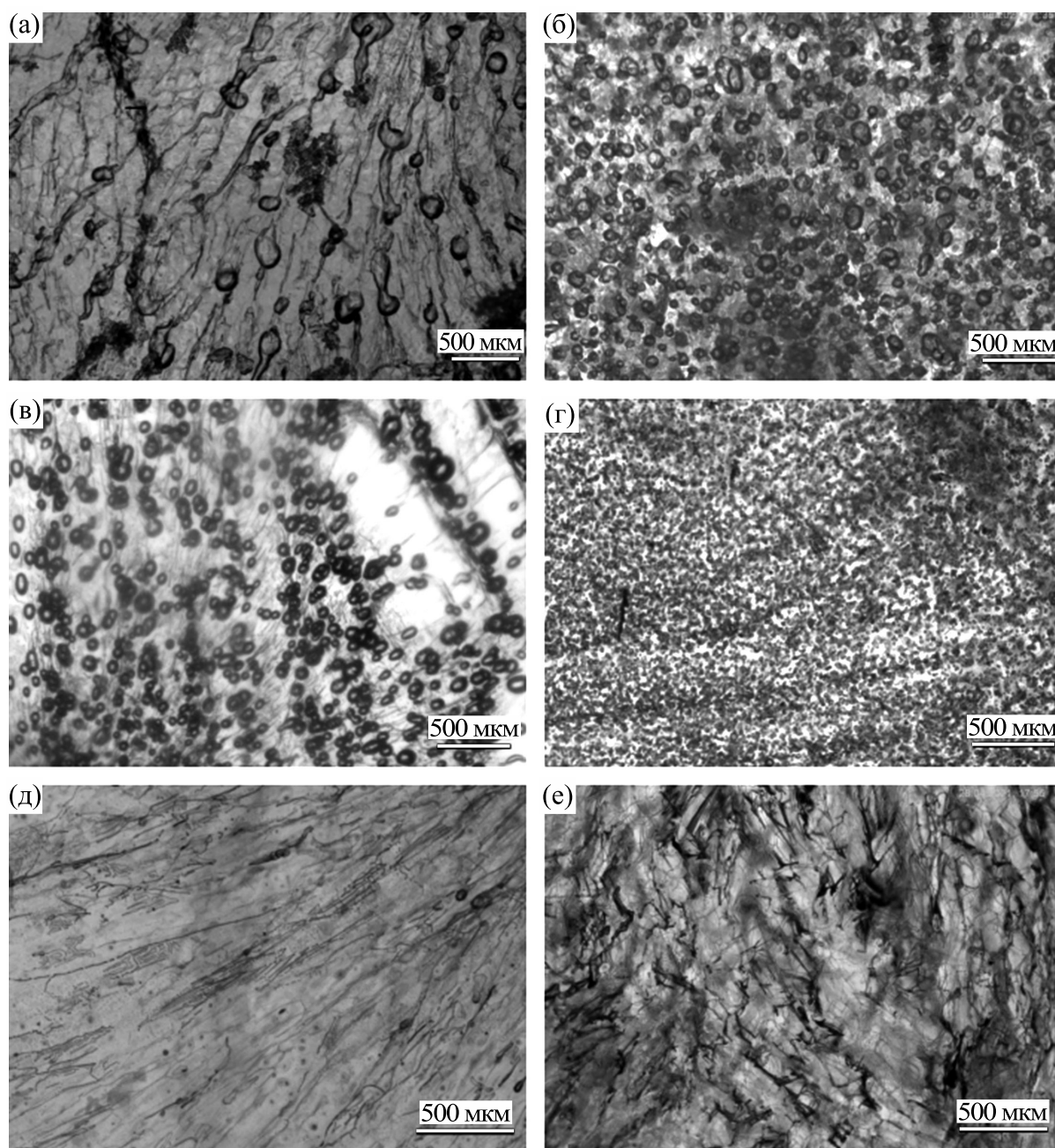


Рис. 3. Фотографические изображения структуры льда капли воды, замороженной в кювете-барокамере в условиях продувки воздухом (а), аргоном (б), ксеноном (в), гексафторидом серы (г) и гелием (д, е). Изображения получены при температуре -50°C .

гистрировали в атмосфере воздуха и гелия. Среду DMEM часто используют для консервации линий эукариотических клеток, добавляя в нее стандартные криопротекторы. Раствор «Евро-Коллинз» относится к первому поколению консервирующих растворов для гипотермического хранения органов. Консервирующие растворы в будущем имеют шанс войти в состав криозащитных растворов для криоконсервации органов, когда такая технология будет разработана.

В процессе медленного замораживания исследуемых растворов часть воды кристаллизуется в виде чистого льда. В оставшихся незамерзшими областях концентрируются соли и прочие вещества. Эти области отвердевают в виде криогидрата при более низкой температуре, чем водный лед.

При замораживании DMEM (рис. 4а) и «Евро-Коллинз» в атмосфере воздуха образование криогидрата сопровождалось выделением микропузырь-

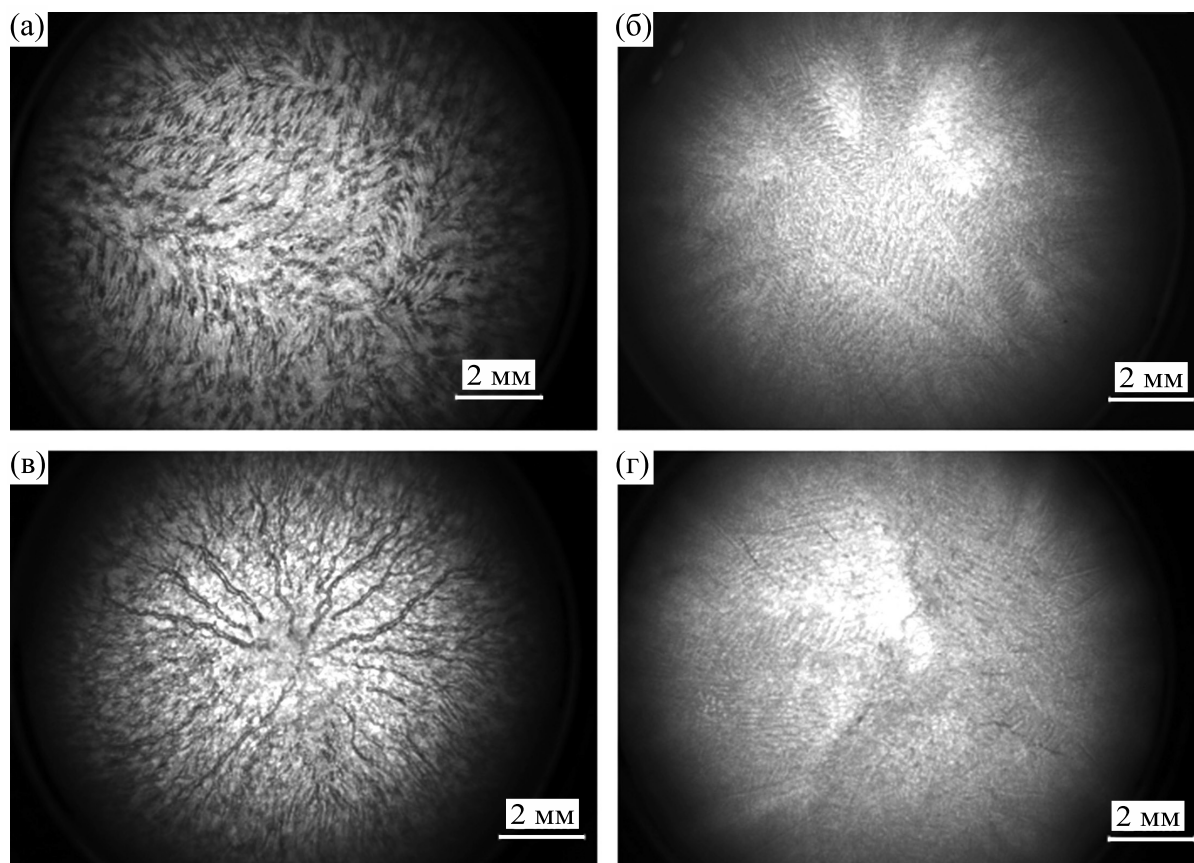


Рис. 4. Фотографические изображения массива льда растворов DMEM (а, б) и «ЕвроКоллинз без глюкозы» (в, г), замороженных в кювете-барокамере в атмосфере воздуха (а, в) и гелия (б, г). Изображения получены при температуре -12°C .

ков растворенных газов. Располагаясь между кристаллитами, микропузырьки вызывали появление микротрещин и разломов в массиве льда. Первые очаги трещин появлялись при температуре около -13°C через 1–2 мин после начала кристаллизации. Из каждого очага формировалось несколько разломов длиной до 200 мкм и шириной 10–50 мкм. Через 2–5 мин микротрещины распространялись по всей видимой поверхности замороженной капли. Кристаллизация раствора «ЕвроКоллинз без глюкозы» (рис. 4в) несколько отличалась: скопления газовых микропузырьков, сливаясь, образовывали протяженные полости длиной 2–5 мм, в последующем формирующие трещины.

Различие в структуре криогидрата, образованного раствором «ЕвроКоллинз без глюкозы» и остальными растворами, можно объяснить тем, что последний содержит исключительно неорганические соли, в то время как остальные растворы помимо солей содержат сахара либо аминокислоты. Как сахара, так и большинство аминокислот обладают криозащитными свойствами и

оказывают существенное влияние на структуру замороженных растворов [21]. Добавление этих веществ повышает вязкость жидкости и способствует стеклованию криогидрата. Возникающие аморфные структуры обладают одновременно повышенной эластичностью и более высоким коэффициентом температурного сжатия по сравнению с кристаллами льда, что приводит к возникновению термомеханических напряжений при дальнейшем охлаждении [22,23].

Продувка гелия над растворами DMEM и «ЕвроКоллинз» (стандартным и без глюкозы) непосредственно перед замораживанием в подавляющем большинстве экспериментов позволила предохранить образующийся лед от возникновения газовых полостей или отдельных микропузырьков (рис. 4б, г). В серии экспериментов наблюдения за образовавшимся льдом проводили в течение 1 ч при -50°C . За это время образование микронеоднородностей во льду не наблюдалось.

3. Влияние этиленгликоля на целостность структуры льда и поведение газовой фазы при заморажи-

Таблица 2. Характеристика замораживания растворов этиленгликоля до -50°C

Раствор	Температура ($^{\circ}\text{C}$) и характер нуклеации при скорости охлаждения $1^{\circ}/\text{мин}$	Наличие микропузырьков в поле капли, а также характер растрескивания льда и криогидрата при охлаждении
Вода + этиленгликоль (1%)	-9.5 ± 1.3 Первичная нуклеация на поверхности капли	Микропузырьки отсутствуют. Наличие микротрещин ($10-50 \times 200$ мкм) после кристаллизации объема капли
Вода + этиленгликоль (10%)	-11.0 ± 1.1 Первичная нуклеация в объеме капли; образуются дендритоподобные кристаллы	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют
Вода + этиленгликоль (45%)	-41.6 ± 3.6 Первичная нуклеация на стенках отсека или вблизи них; образуется лед в виде массива тонкой слоистой структуры	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют
DMEM + этиленгликоль (10%)	-11.0 ± 1.6 Первичная нуклеация в объеме капли; образуются дендритоподобные кристаллы	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют
DMEM + этиленгликоль (45%)	-41.0 ± 3.4 Первичная нуклеация на стенках отсека или вблизи них; образуется лед в виде массива тонкой слоистой структуры	Микропузырьки отсутствуют. Трещины отсутствуют

Примечание. Для всех растворов $n = 4$.

вании. На следующем этапе мы исследовали влияние криопротектора этиленгликоля на структуру твердой фазы при замораживании в атмосфере воздуха. Для этого мы замораживали ряд растворов этиленгликоля разной концентрации до температуры -50°C (см. табл. 2).

Замораживание водного раствора этиленгликоля низкой концентрации (1 об. %) имело как сходства, так и отличия от кристаллизации чистой воды. После образования поверхностной корки льда объем жидкости кристаллизовался симметрично от краев к центру. Даже такое незначительное содержание криопротектора предотвратило образование видимых газовых микропузырьков. Однако его оказалось недостаточно для предохранения массива льда от возникновения микротрещин при дальнейшем охлаждении. Неясным остается механизм, с помощью которого реализовался феномен отсутствия видимой газовой фазы при отвердевании раствора, поскольку снижением коэффициента растворимости газов в системе «вода—этиленгликоль» при таком содержании этиленгликоля можно пренебречь.

Следует отметить, что полное отвердевание водных растворов этиленгликоля происходит при температуре ниже -75°C , поэтому в наших экспериментах полное отвердевание раствора не происходило.

С увеличением содержания криопротектора до 10 об. % изменился характер замораживания растворов. Образование твердой фазы в растворах с 10 об. % этиленгликоля начиналось в объеме жидкости без возникновения поверхностного льда. Первые дендритоподобные кристаллы появлялись на боковой поверхности отсека барокамеры (рис. 5а). Микропузырьки или трещины в твердой фазе отсутствовали (рис. 5б). Дальнейший рост содержания этиленгликоля вызвал снижение температуры кристаллизации переохлажденной капли до -40°C . Характер кристаллизации в растворах с 45 об. % этиленгликоля отличался от кристаллизации более разбавленных растворов. Образование твердой фазы начиналось на стенках отсека или вблизи них. Твердая фаза образовывалась в виде крупного массива, который имел слоистую структуру, образованную тонкими плоскими дендритами (рис. 5в).

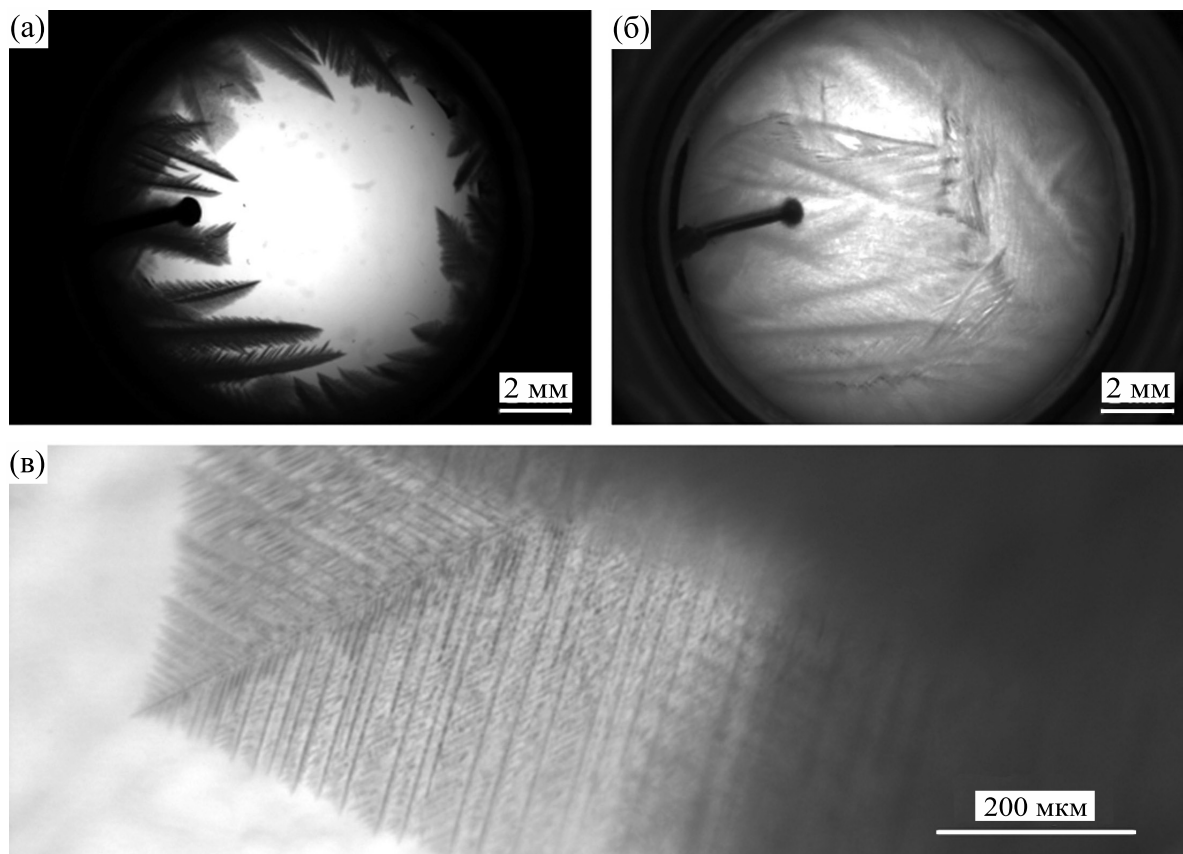


Рис. 5. Фотографические изображения капель 10%-го (а, б) и 45%-го (в) водного раствора этиленгликоля, охлаждаемых в кювете-барокамере в атмосфере воздуха. (а) — Появление первых дендритоподобных кристаллов льда при температуре -7°C ; (б) — отвердевший 10%-й раствор при температуре -15°C ; (в) — структура дендритов, образованных в процессе кристаллизации 45%-го раствора этиленгликоля; изображение получено при температуре -45°C .

Массив имел однородное строение без трещин и включений микропузырьков газа или жидкости. В серии наблюдений в течение 1 ч с охлаждением до -50°C целостность массива сохранялась неизменной.

Известно, что криопротекторы оказывают существенное влияние на структуру замороженных водных растворов. Введение криопротекторов в раствор снижает соотношение кристаллического льда относительно остеклованного криогидрата в отвердевших растворах [24, 25], изменяет морфологию льда [21, 26], в отдельных случаях может менять тип образующихся кристаллов льда, способствуя образованию метастабильного кубического льда вместо гексагонального даже при умеренных скоростях охлаждения [27]. Криопротекторы также повышают эластичность остеклованного криогидрата [21]. Наше исследование подтверждает сильное влияние этиленгликоля на структуру отвердевшего раствора. При этом газовая составляющая оказывает тем меньшее влия-

ние на структуру криогидрата, чем выше содержание криопротектора.

Уже 1 об. % этиленгликоля предотвращает выделение газа в виде наблюдаемых в световой микроскоп микропузырьков. Однако применяемые нами методы исследования не позволяют с уверенностью утверждать об отсутствии наноразмерных пузырьков, не фиксируемых световым микроскопом. Более высокие концентрации этиленгликоля предотвратили как образование видимых микропузырьков, так и растрескивание криогидрата при охлаждении до -50°C . В то же время нельзя исключить, что растрескивание будет происходить в более низкой температурной зоне, как это показано для некоторых витрифицирующих растворов с криопротекторами [28], так как применяемая нами система не позволяла проводить наблюдения при более низких температурах.

ВЫВОДЫ

1. Кристаллизация капли воды (объем ≈ 200 мкл, диаметр ≈ 12 мм; высота ≈ 1.7 мм) в атмосфере воздуха происходит с нарушением целостности структуры льда. В замороженных образцах наблюдается образование газовых микропузырьков диаметром до 250 мкм. Продувка над поверхностью капли воды аргона, ксенона или гексафторида серы перед замораживанием позволяет снизить максимальный размер микропузырьков до 100 мкм.

2. Продувка гелия над поверхностью воды, растворов ДМЕМ и «ЕвроКоллинз» перед замораживанием позволяет устранить или значительно уменьшить образование газовых микропузырьков в процессе кристаллизации. Для формируемого при этом массива льда характерна тенденция к снижению вероятности растрескивания при охлаждении до -50°C , что может способствовать выживаемости биологического материала при консервации. Данный феномен позволяет объяснить механизм криозащитного эффекта гелия, отмеченного при замораживании некоторых клеточных линий млекопитающих [8].

3. Добавление в раствор криопротектора — этиленгликоля — в концентрации 1–10 об. % позволяет снизить или полностью предотвратить выделение газов в виде микропузырьков при замораживании. Механизм, с помощью которого реализуется данный феномен, остается неясным. Добавление этиленгликоля в концентрации 10 об. % и более предотвращает растрескивание растворов при охлаждении до -50°C .

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №АААА-А20-120101390069-4) (блоки 2 и 3 раздела «Результаты»), а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90187 (блок 1 раздела «Результаты»).

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. C. Polge, A. U. Smith, and A. S. Parkes, *Nature* **164**, 666 (1949).
2. S. Sheleg, H. Nixson, B. L. Cohen, et al., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **1** (5), 440 (2008).
3. S. V. Sheleg, H. L. Nixson, S. A. Svarovsky, and B. Cohen, Patent US8124329B2 (2012).
4. P. Shannon, *J. Dairy Sci.* **48**, 1357 (1965).
5. P. Shannon, N. Z. Dairy Board. **47**, 16 (1971).
6. А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. И. Зверева и др., в сб. *Материалы III межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии — практическому здравоохранению»* (Екатеринбург, 2014), сс. 78–83.
7. А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. И. Зверева и др., *Вестн. Урал. мед. академ. науки* **5**, 98 (2014).
8. С. В. Уграйская, Н. В. Шишова, Е. Л. Гагаринский и др., *Биофизика* **63** (3), 510 (2018).
9. М. Н. Буслаева и О. Я. Самойлов, *Журн. структурной химии* **4** (4), 502 (1963).
10. S. S. Bari and J. Hallett, *J. Glaciol.* **13** (69), 489 (1974).
11. G. Kletetschka and J. Hrubá, *BioRes. Open Access* **4** (1), 209 (2015).
12. G. J. Morris, E. Acton, B. J. Murray, et al., *Cryobiology* **64**, 71 (2012).
13. В. И. Косяков, В. А. Шестаков, *Ж. физ. химии* **76** (5), 815 (2002).
14. E. A. Smelik and H. E. King Jr., *Amer. Mineralogist* **82**, 88 (1997).
15. S. Takeya, T. Uchida, J. Nagao, et al., *Chem. Eng. Sci.* **60** (5), 1383 (2005).
16. H. Shimizu, S. Hori, T. Kume, et al., *Chem. Phys. Lett.* **368**, 132 (2003).
17. A. Kobelev, V. Yashin, N. Penkov, et al., *Crystals* **9** (4), 215 (2019).
18. T. Koop and B. Zobrist, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11** (46), 10839 (2009).
19. А. Ю. Намиот, *Растворимость газов в воде. Справочное пособие* (Недра, М., 1991).
20. В. И. Косяков и В. А. Шестаков, *Журн. физ. химии* **76** (5), 815 (2002).
21. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова и Н. А. Ивлиева, *Биофизика* **62** (2), 213 (2017).
22. P. S. Steif, M. C. Palastro, and Y. Rabin, *Med. Eng. Phys.* **29** (6), 661 (2007).
23. D. P. Eisenberg, P. S. Steif, and Y. Rabin, *Cryogenics (Guildf)* **64**, 86 (2014).
24. G. M. Fahy, *Cryobiology* **17** (4), 371 (1980).
25. S. Zhang, X. Yu, Z. Chen, et al., *Cryobiology* **66** (2), 186 (2013).
26. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Э. Н. Гахова и др., *Биофизика* **54** (5), 869 (2009).
27. P. Boutron, P. Mehl, A. Kaufmann, et al., *Cryobiology* **23** (5), 453 (1986).
28. Y. Rabin, P. Steif, K. Hess, et al., *Cryobiology* **53** (1), 75 (2006).

Influence of Gases on the Structural Integrity of Ice Formed During the Freezing of Water and Cryoprotective Solutions: an Optical-Microscopic Study

**A.V. Kobelev, N.V. Shishova, S.V. Ugraitskaya, L.V. Zalomova, V.A. Yashin,
N.V. Penkov, and E.E. Fesenko (Jr.)**

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

Using optical microscopy, the influence of air, helium, argon, xenon and sulfur hexafluoride on the integrity of the ice, formed during the freezing of water and a number of cryoprotective solutions in the temperature range from 0 to -50°C , was investigated. It is shown that crystallization of a water droplet with a volume of $\approx 200\text{ }\mu\text{l}$ in the ambient air leads to a change in the structural integrity of ice. In frozen samples, the formation of gas microbubbles up to $250\text{ }\mu\text{m}$ in diameter is observed. The process of blowing with argon, xenon, or sulfur hexafluoride over the surface of a water droplet before freezing gives the possibility to decrease the maximum size of microbubbles to $100\text{ }\mu\text{m}$. The helium blowing over the surface of water, DMEM and Euro-Collins solutions can completely eliminate or significantly reduce the formation of gas microbubbles during crystallization. As a result, there is a tendency of the ice mass formed to become more resistant to cracking when the temperatures down to -50°C . This effect may contribute to survival of the biological material following cryopreservation. Addition of a cryoprotectant ethylene glycol at a concentration of 1–10 vol. % to the solution reduces or completely prevents the release of gas microbubbles during freezing. The mechanism underlying this phenomenon remains unclear. Also, addition of ethylene glycol at a concentration of 10 vol. % or more keeps ice from cracking when cooled to -50°C .

Keywords: cryopreservation, ice crystals, ethylene glycol, inert gases, helium, microbubbles, cracking

ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК L-ЛИЗИНА И L-АРГИНИНА С ПОМОЩЬЮ АДсорбЦИОННОЙ, СТАЦИОНАРНОЙ И СИНХРОННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2021 г. Е.Л. Терпугов*, С.Н. Удальцов**, О.В. Дегтярева*

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

**Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 2/2

E-mail: olga_degt@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2021 г.

После доработки 24.06.2021 г.

Принята к публикации 29.06.2021 г.

Недавно обнаруженные люминесцентные свойства неароматических аминокислот с зависимой от возбуждения фотолюминесценцией в отсутствие конъюгации внутри отдельных молекул вызвали большой интерес. Хотя существование явления внутренней люминесценции больше не вызывает сомнений, механизм, участвующий в этом процессе, остается неясным. В работе на примере изучения спектрально-люминесцентных свойств L-лизина и L-аргинина авторы попытались продвинуться в понимании этих процессов с помощью адсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовом и видимом диапазонах, а также спектроскопии стационарной и синхронной флуоресцентной спектроскопии.

Ключевые слова: моногидрохлорид L-лизина, моногидрохлорид L-аргинина, возбуждающая фотолюминесценция, синхронная флуоресценция, УФ/видимая спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302921050033

К важнейшим биологически активным веществам относятся аминокислоты — основные строительные блоки белков и биополимеров, выполняющие самые разнообразные функции в организмах. Критически важное для жизни значение аминокислот обеспечивает устойчивый интерес к их биологическим и физико-химическим свойствам. Для объяснения свойств аминокислот, а также для выявления общих структурных закономерностей, характерных для аминокислот и белков, важно знание строения и внутренней динамики отдельных молекул аминокислот, а также знание их возможных межмолекулярных взаимодействий в конденсированном состоянии. Последняя область очень важна в направлении понимания физики и внутреннего механизма функционирования живой системы.

Собственная люминесценция природных белков дает значительную информацию об их структуре и динамике и поэтому часто используется

для изучения конформационных переходов, прочности водородных связей, связанных реакций и других биохимических процессов [1–4]. Как правило, считается, что флуоресценция белка происходит от аминокислот с циклическими группами, такими как триптофан, тирозин и фенилаланин, поглощающих и излучающих эмиссию в ближней ультрафиолетовой (УФ) области. Между тем в последнее время стало известно, что триптофаноподобной флуоресценцией обладают также неароматические аминокислоты, не имеющие в своей структуре системы с сопряженными двойными связями. Этот новый феномен наблюдали не только у свободных аминокислот [5–8], но также в полипептидах и белках, которые не содержали в своем составе ароматические остатки [9–12]. Такие свойства были обнаружены в белках с относительно высоким содержанием бета-сшивок в их структуре, что, как оказалось, характерно для амилоидной формы белков. Явление внутренней флуоресценции было приписано де-локализации электронов через образование водородных связей в структуре бета-сшивки, которая дает возможность электронных переходов с более

Сокращения: УФ — ультрафиолетовый, L-Lys·HCl — моногидрохлорид L-лизина, L-Arg·HCl — моногидрохлорид L-аргинина.

низкой энергией [9, 10]. Было показано, что амилоидные фибриллы из различных полипептидных последовательностей при агрегации приобретают собственную характерную флуоресценцию в видимом диапазоне. Хотя существование автолюминесценции как феномена у неароматических аминокислот и белков, не имеющих в своем составе ароматических остатков, в настоящее время твердо установлено, механизм, вовлеченный в этот процесс, остается все еще не до конца изученным.

В противоположность ароматическим аминокислотам, анализ спектров возбужденных электронных состояний которых удастся проводить лишь в случае растворов с низкой концентрацией, заметная люминесценция у неароматических аминокислот была обнаружена в концентрированном состоянии и практически не выявлялась в разбавленных растворах. Первоначально это новое свойство было обнаружено в растворе моногидрохлорида L-лизина [5]; было сделано предположение о его уникальности в случае агрегации лизина, что подтвердили последующие эксперименты с полилизинном [6]. Однако позже появились экспериментальные свидетельства автолюминесценции в сильно концентрированных растворах не только лизина, но и других неароматических аминокислот, которая могла возбуждаться не только ультрафиолетовым, но и видимым светом [7, 8, 11, 12]. Открытие нового свойства у алифатических аминокислот переворачивает представление о флуоресценции биомолекул как обусловленной исключительно присутствием «ароматики» в их структуре. В большинстве своем исследователи полагают, что автолюминесценция неароматических аминокислот может быть хорошо объяснена с помощью механизма эмиссии, инициируемой кластеризацией мономеров, а именно кластеризацией нетрадиционных хромофорных (амино-, карбокси- и гидроксильной) групп, обуславливающей перекрывание электронных облаков и увеличение делокализации электронов с одновременным усилением ригидности конформации. В действительности задействованные в этом новом феномене механизмы являются более сложными, чем представлялось ранее. Чтобы получить больше информации об излучении неароматических аминокислот и выявить общие закономерности в люминесценции нетрадиционных люминофоров, в настоящей работе с помощью обычной и синхронной флуоресцентной спектроскопии мы изучали спектральные характеристики диаминокарбоновых аминокислот аргинина и лизина, а также их изменение в связи с эффектом разведения. Исследование методом синхронной флуоресценции позволяет выявить флуорофоры, которые слабо разрешимы в обычном спектре излучения флуоресценции, измеренном при фиксированной длине волны возбуждения. Этот метод был разработан

для многокомпонентного анализа и использовался для повышения селективности анализа сложных химических и биологических систем [13, 14]. Насколько известно авторам, синхронная флуоресценция еще не использовалась для изучения алифатических аминокислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химически чистые образцы L-лизина моногидрохлорида (L-Lys·HCl) и L-аргинина моногидрохлорида (L-Arg·HCl) производства фирмы «Реанал» (Венгрия) использовали для приготовления растворов на основе деионизованной воды (pH ~ 6.8) при 293 К. Чистота воды подтверждена величиной проводимости в 18 МΩ. Дополнительно для устранения нерастворенных твердых частиц готовые приготовленные растворы пропускали через фильтр Millex® CV с размером пор 0.22 мкм. Концентрации аминокислот составляли 1.00–0.01 М для L-Lys·HCl и 0.5–0.01 М для L-Arg·HCl.

Спектрофотометрические измерения в УФ- и видимой области были выполнены на спектрофотометре модели UV/VIS Evolution 600 (Thermo Scientific, США), люминесцентная спектроскопия проведена с использованием спектрофлуориметра Lumina Fluorescence (Thermo Scientific, США). Были сняты спектры возбуждения и излучения стационарной люминесценции. Во все спектры вносились поправки на изменения интенсивности возбуждающего света и чувствительность детектора к длине волны по всему спектру. Спектры излучения флуоресценции были получены при разных длинах волн возбуждения: 280, 310, 340, 355, 370 и 410 и 436 нм. Для сравнения между собой все спектры изучаемых аминокислот впоследствии были нормированы на единицу. Была также выполнена коррекция всех спектров на фоновые рассеяние и люминесценцию путем вычитания спектров деионизованной воды, полученных в идентичных условиях. Образцы всегда были свежеприготовленными, все измерения проводили при комнатной температуре в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Синхронные спектры флуоресценции измеряли путем сканирования интенсивности флуоресценции в диапазоне длин волн возбуждения ($\lambda_{\text{возб}} = 200\text{--}650$ нм) и излучения ($\lambda_{\text{изл}} = 200\text{--}650$ нм) для создания трехмерных графиков интенсивности-возбуждения-эмиссии, которые обеспечивают более полное многомерное обнаружение флуоресценции. 3D-спектры регистрировали с интервалом длин волн $\Delta\lambda = 10$ нм, скорость сканирования составляла 600 нм/с, а напряжение ФЭУ — 700–800 В. Ширина эмиссионной щели и щели при возбуждении равнялась

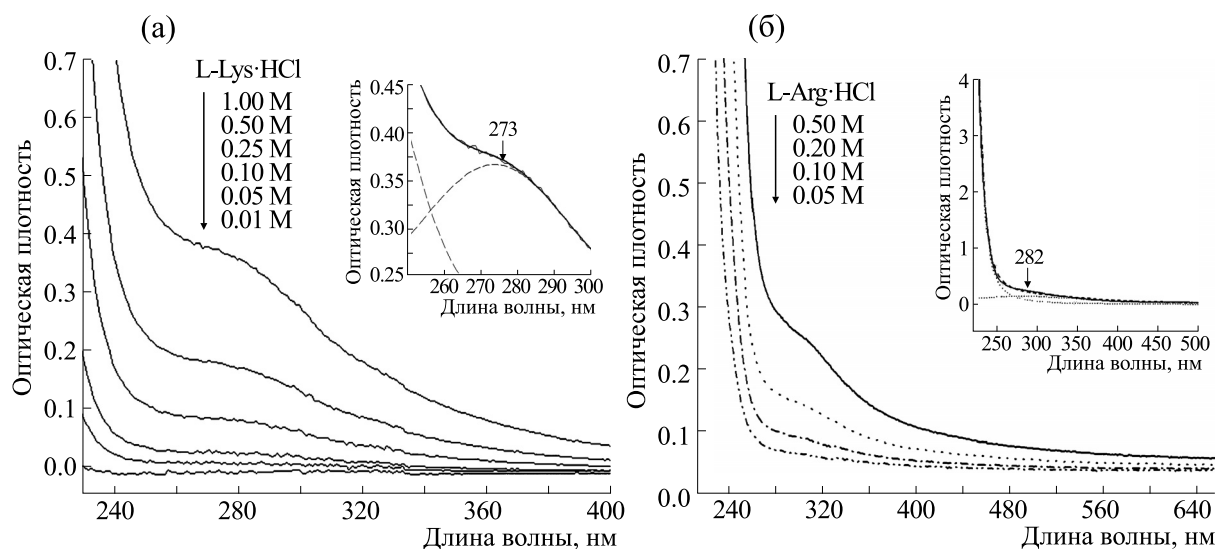


Рис. 1. (а) — Спектры поглощения L-Lys-HCl в концентрациях 1.0–0.01 М; на врезке — кривая поглощения L-Lys-HCl и ее аппроксимация разложением на компоненты с помощью гауссовых кривых 230 и 273 нм. (б) — Спектры поглощения L-Arg-HCl в концентрациях 0.5–0.05 М; на врезке — кривая поглощения L-Arg-HCl и ее аппроксимация разложением на компоненты с помощью гауссовых кривых 224 и 282 нм.

5 нм. Источником возбуждения служила ксеноновая лампа мощностью 100 Вт. Для измерения использовали прямоугольную геометрию. Спектр сканирования синхронной флуоресценции в каждом интервале длин волн измеряли с шагом 10 нм.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Origin (версия 8.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены электронные спектры поглощения водных растворов L-Lys-HCl и L-Arg-HCl в области 220–400 нм.

Видно, что в спектре сильно разбавленных растворов аргинина и лизина отсутствует поглощение за пределами УФ-области 220 нм, что соответствует представлению о светопоглощении неароматических аминокислот в изолированном состоянии. Известно, что все аминокислоты обладают одним общим свойством — отсутствием поглощения излучения во всей видимой области спектра [15, 16]. L-лизин и L-аргинин являются основными аминокислотами с боковыми цепями, состоящими соответственно из трех и четырех ($-\text{CH}_2$)-групп, которые не могут поглощать в ближней УФ-области в своей мономерной форме. Поглощение в дальней УФ-области обусловлено присутствием в структуре аминокислот простой хромофорной ($\text{C}=\text{O}$)-группы. Электронные переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ в карбоксильной группе происходят по ненасыщенным связям «углерод–кислород» и наблюдаются при 190–220 нм [17–19]. В зависимости от ионного состояния (кати-

он, цвиттерион, анион) и их концентрации в воде может присутствовать водородная связь, которая может дать спектр, смещенный относительно главного на определенный небольшой интервал частот. Боковые цепи этих аминокислот полярны и поэтому гидрофильны. Лизин имеет первичную аминогруппу на конце боковой цепи, аргинин — гуанидиновую группу. Обе концевые группы заряжены положительно при нейтральных значениях pH. Вода как растворитель содержит OH-группу, которая способна вступать в водородную связь с концевыми имино-, amino- и карбонильными группами аминокислот, образуя различные по составу и ориентации межмолекулярные соединения. Из наблюдаемых спектров было установлено, что с ростом концентрации аминокислот происходит гигантское «красное» смещение нижней границы полосы и распространение ее в ближнюю УФ- и даже видимую область (выше 400 нм). Одновременно с этим отмечено повышение коэффициента поглощения. Кроме того, начиная с концентрации 0.20 М, в спектрах обоих образцов выявлено появление дополнительного пика в области ~ 270–280 нм. Хотя подобные особенности спектрального поведения неароматических аминокислот были уже отмечены в первой работе по автолюминесценции лизина [5], молекулярный механизм этого феномена остается все еще неизученным.

Спектральные свойства растворенных аминокислот в возбужденном состоянии могут отличаться от таковых в основном состоянии, что показало исследование спектральных характеристик возбуждаемой люминесценции L-Lys-HCl и

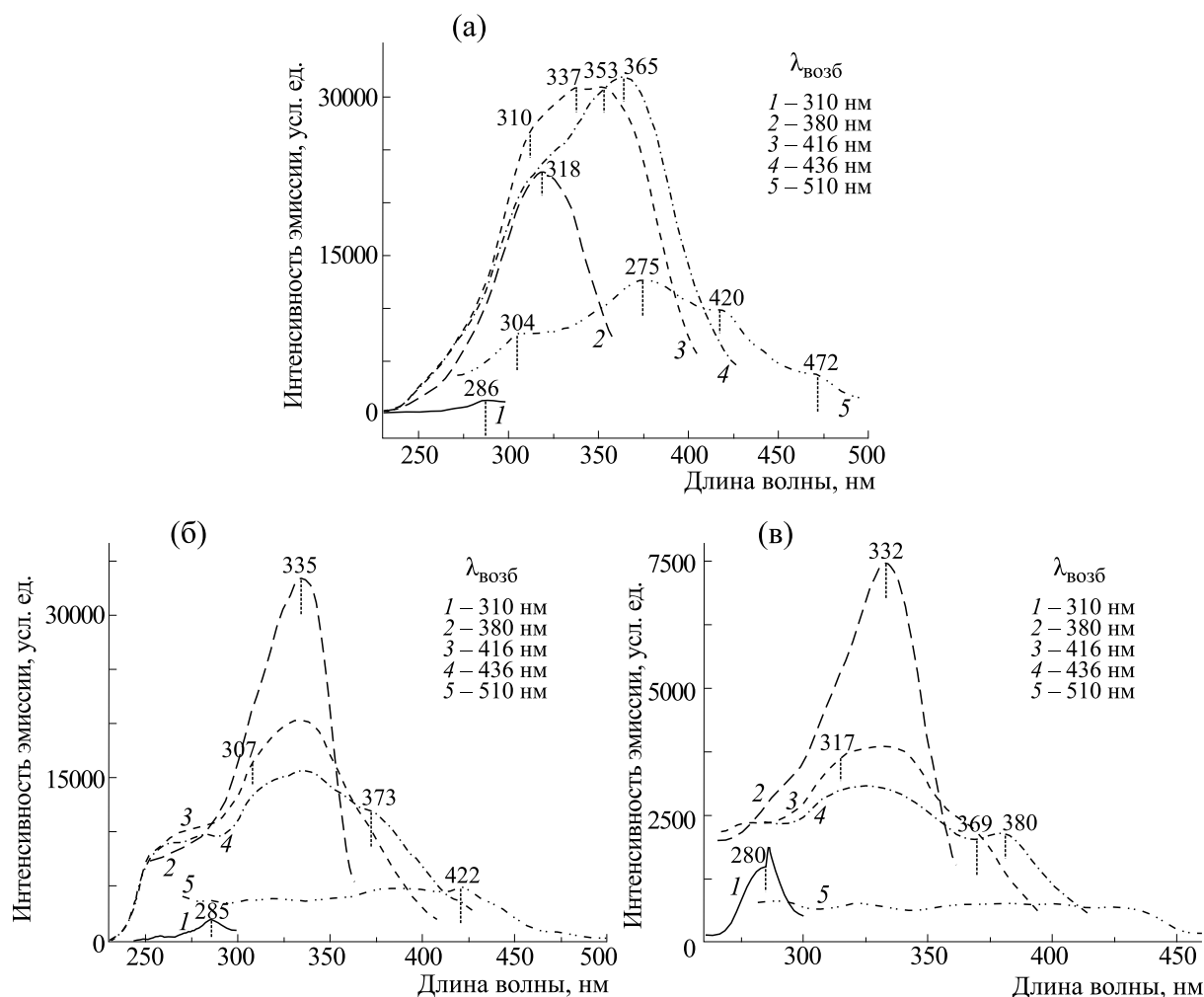


Рис. 2. Спектры возбуждения 1.0 М водного раствора L-Lys-HCl (а); L-Arg-HCl при концентрациях 0.5 М (б) и 0.05 М (в). Спектры 1–5 записаны при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}} = 310, 380, 416, 436$ и 510 нм соответственно.

L-Arg-HCl при комнатной температуре. При определенном в сходстве в спектральном поведении дикарбоновых аминокислот было также отмечено различие в их свойствах в возбужденном состоянии, что иллюстрирует рис. 2а,б, где представлены спектры возбуждения концентрированных растворов лизина и аргинина, записанные при разных длинах волн возбуждения (310, 380, 416, 436 и 510 нм). При использовании короткой длины волны (310 нм) в обоих образцах была выявлена довольно слабая одиночная полоса с максимумом возле ~280 нм. Положение максимума этой полосы совпадало с локализацией пика в соответствующих спектрах поглощения, что тем самым подтверждало присутствие в используемых растворах новой поглощающей структуры. Однако слабая интенсивность этой полосы свидетельствовала о крайне низкой эффективности поглощения у нового образования. Интересно, что при использовании более длинных волн возбуждения мы наблюдали значительное усиление сигнала,

который, проходя через пороговое значение, спадал почти до уровня сигнала при длине волны возбуждения 310 нм. Максимальный уровень сигнала в спектре возбуждения аргинина наблюдали на длине волны 370 нм, в то время как в спектре лизина — на длине волны 436 нм. Как можно видеть на рис. 1, в этих условиях поглощение обеих исследуемых аминокислот крайне низкое (ниже 10% от максимума), а сами спектры представляют собой гладкую кривую без выраженных максимумов. Таким образом, полученные нами данные показывают, что спектры возбуждения растворенных в воде аминокислот лизина и аргинина не совпадают с их спектром поглощения и демонстрируют зависимость от длины волны возбуждения, что не характерно для спектров возбуждения одиночных мономеров [15]. Зависимость спектров возбуждения дикарбоновых кислот от длины волны эмиссии свидетельствует прежде всего о неоднородности растворенных аминокислот и многообразии флуоресцирующих объектов, ко-

торые могут возникать в результате различных взаимодействий (полярных, гидрофобных) между заряженными частицами, какими являются цвиттерионы, преобладающие в жидкости при нейтральном значении pH. Также появлению этих новых образований, как мы полагаем, может способствовать присутствие света, который влияет на электронную структуру цвиттерионов и изменяет взаимодействие аминокислот между собой и с молекулами воды. Это происходит потому, что помимо способности фотонов вызывать электронное возбуждение в хромофорах, свет индуцирует в среде осциллирующее электрическое поле, которое может влиять на частоту колебаний связанных электронов, изменять внутренние характеристики диполей в результате смещения связанных зарядов и производить дипольные переходы [20, 21]. Аминокислоты, как известно, обладают помимо постоянного наведенным дипольным моментом, т. е. под действием света дипольный момент возбужденного состояния больше, чем дипольный момент основного их состояния [22–26]. Следовательно, для стабилизации системы в окружении возбужденного иона лизина или аргинина должна произойти соответствующая перестройка. Ранее на примере глицина было показано, что на локальном уровне электрическое поле электромагнитного излучения способно изменять дополнительный потенциал взаимодействия, приводя к увеличению концентрации и образованию молекулярных ассоциатов и даже зародышей кристаллов [27–29]. Таким образом, свет, помимо эффектов поляризации, может вызывать специфические взаимодействия аминокислот между собой и/или с молекулами воды, приводящие к образованию водородных связей и кластерных структур. И то, и другое может влиять на их спектральные характеристики в возбужденном состоянии [19].

Поскольку спектры возбуждения особенно чувствительны к взаимодействию с микроокружением, мы исследовали влияние концентрации растворов исследуемых аминокислот на спектральный отклик при разбавлении растворов (в десять и более раз), полагая, что при низких концентрациях растворенных веществ каждая молекула аминокислоты полностью окружена молекулами воды, и поэтому взаимодействие между мономерами экранировано молекулами воды, о чем свидетельствуют данные теоретических [30] и экспериментальных [31] работ. Следовательно, из-за недостаточной конъюгации мономеры будут трудно возбудить. В действительности же оказалось, что при разбавлении растворов в десять и более раз мы могли наблюдать хотя и слабую, но вполне регистрируемую фотолюминесценцию. Более того, мы не обнаружили существенного влияния подобного разведения на спектральное поведение системы, которая при меньшем уровне

сигнала продемонстрировала зависимость спектров возбуждения от длины волны наблюдения аналогично той, что наблюдали в исходном состоянии (рис. 2в). Таким образом, в этом случае особенности спектрального поведения растворенных аминокислот нельзя объяснить исключительно агрегацией молекул. Очевидно, что свет меняет свойства растворенных в воде аминокислот, способствуя кластеризации изолированных видов молекул и создавая в них локальные возбужденные состояния.

В работе помимо спектров возбуждения были исследованы и спектры эмиссии. Как и ожидалось, наблюдаемая выше изменчивость спектров возбуждения в полной мере отразилась в их спектрах излучения. На рис. 3 представлены спектры эмиссии 500 mM L-Arg-HCl и 1M L-Lys-HCl, записанные при разных длинах волн возбуждения ($\lambda_{\text{возб}} = 280, 310, 355, 380, 410, 436$ и 480 нм). Как видно, эмиссионные спектры сильно зависят от длины волны возбуждения, которая влияет не только на интенсивность, но и на форму спектральных кривых и положение главного максимума. При переходе от короткой к более длинной длине волны возбуждения наблюдался рост сигнала, который, достигнув порога, спадал до нулевого уровня. При этом отмечалось сужение спектра и сдвиг главного максимума в красную область, от 381/398 к 493/504 нм для длин волн возбуждения от 310 до 435 нм соответственно для аргинина и лизина. Чтобы исследовать зависимость излучения от возбуждения более подробно, мы построили графики длин волн пиков излучения в зависимости от длины волны возбуждения. Как можно видеть на рис. 3в, данные демонстрируют четкую линейную зависимость ($R^2 = 0.981$ и 0.976) с крутизной 0.77 и 0.49 между длинами волн излучения и возбуждения для L-Lys-HCl и L-Arg-HCl соответственно. Наклон, определяемый как изменение длины волны пикового излучения при изменении длины волны возбуждения, т.е. $\Delta\lambda_{\text{эм}}/\Delta\lambda_{\text{возб}}$, остается практически постоянным до 440 нм. Эти данные подтверждают более ранние наблюдения, показывающие, что каждому спектру флуоресценции соответствует своя длина волны возбуждения. Таким образом, применяя несколько длин волн возбуждения в УФ- и видимом спектральном диапазоне, удалось обнаружить присутствие в растворе целого ряда эндогенных флуорофоров, которые вносят вклад в наблюдаемый флуоресцентный сигнал.

Флуоресценция как в лизине, так и в аргинине наблюдалась при возбуждении как УФ-, так и видимым светом. Хотя флуоресценция при возбуждении видимым светом при 480 нм была довольно слабая (кривая 5 на рис. 3а), чувствительность прибора позволяла достаточно надежно регистрировать ее сигнал.

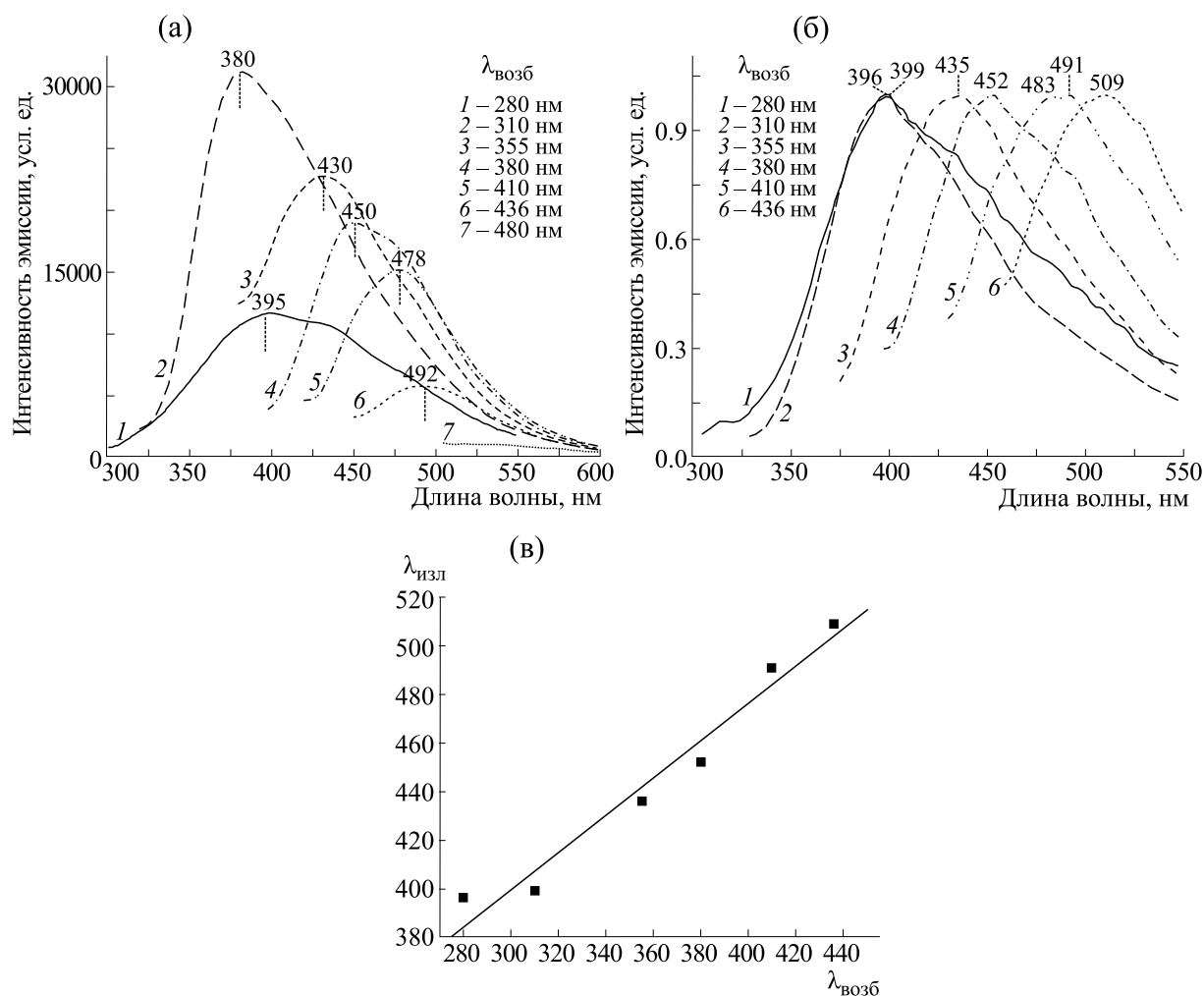


Рис. 3. Иллюстрация зависимости флуоресценции дикарбоновых аминокислот от длины волны накачки: (а) — реальные спектры 500 мМ водного раствора L-Arg-HCl; (б) — нормированные спектры 1 М водного раствора L-Lys-HCl, записанные при различных длинах волн возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$ = 280, 310, 355, 380, 410, 436 и 480 нм); (в) — линейная зависимость максимума длины волны излучения лизина от длины волны возбуждения.

Для оценки всех присутствующих в жидкости эндогенных флуорофоров, которые вносят вклад в наблюдаемый флуоресцентный сигнал, можно использовать метод синхронной флуоресцентной спектроскопии, когда возбуждение и излучение сканируются одновременно. Спектр излучения регистрируется для всех длин волн возбуждения образца. В этом случае оба монохроматора возбуждения и эмиссии сканируются одновременно, сохраняя фиксированный интервал длин волн между ними. Синхронное сканирование флуоресценции приводит к сужению регистрируемых максимумов излучения и в целом улучшает разрешение излучающих состояний [13, 14]. Результирующие синхронные спектры возбуждения-испускания представлены на рис. 4 в виде трехмерного графика, где интенсивность испускаемого света отображена в виде контурной диаграммы как функция длин волн возбуждения и испускаемого света.

На полученных спектральных картах выявляются определенные «островки» интенсивности флуоресценции, которые соответствуют определенному флуорофору с определенным максимумом возбуждения и испускаемого света, что тем самым подтверждает присутствие в двухкомпонентной среде не одного, а целого ряда эндогенных флуорофоров, включая и те, которые могут возбуждаться видимым светом, а это практически не наблюдается у ароматических аминокислот. При этом отметим, что длинноволновая полоса излучения может возникать как из длинноволнового спектра возбуждения, так и при коротковолновом возбуждении. Это означает, что испускание света может быть обусловлено как структурами, которые непосредственно возбуждаются при поглощении света, так и другими структурами, которые сенсibiliзируются за счет безизлучатель-

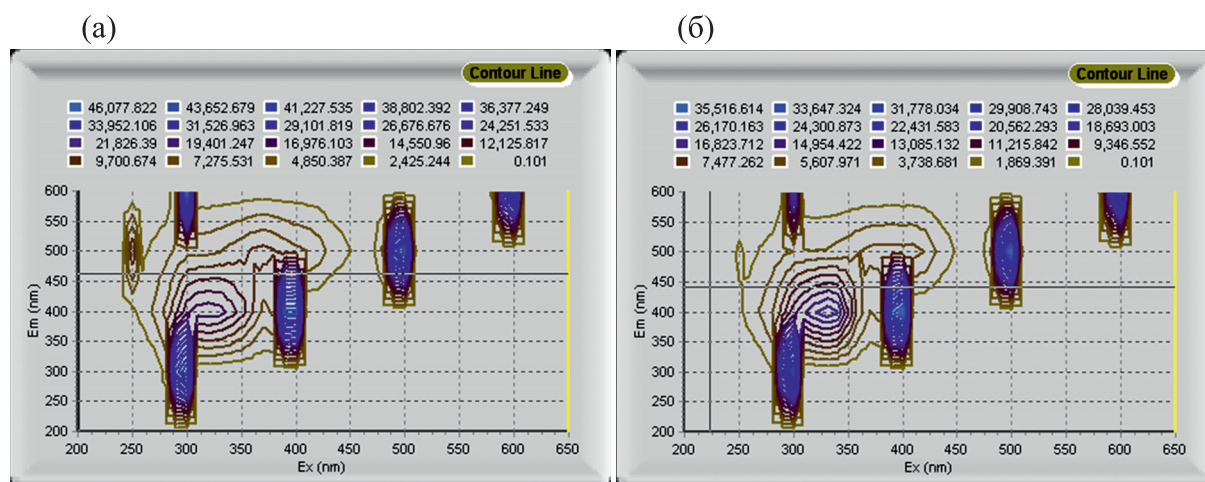


Рис. 4. Трехмерная контурная диаграмма возбуждения-эмиссии лизина (а) и аргинина (б) в концентрации 1 М и 0.05 М соответственно.

ной передачи энергии возбуждения или в результате переноса заряда.

Как видно на рис. 4, топографический график лизина отличается от такового для аргинина по распределению максимальной интенсивности флуоресценции и профилю контурных кривых, что отражает специфику их структуры и динамики в возбужденном состоянии.

В работе этим методом был также проанализирован спектральный отклик при разбавлении растворов. Результирующие спектры представлены на рис. 5. Согласно полученным данным, неоднородность популяции излучающих видов обоих образцов сохраняется также и в разбавленном состоянии (рис. 5). Однако топографические графики разбавленных растворов несколько отличаются от приведенных выше для концентрированных растворов, что может быть результатом различного влияния среды на электронную

структуру и динамику лизина и аргинина в возбужденном состоянии.

На основе полученных данных можно заключить, что аминокислоты в растворе демонстрируют фотофизические свойства, подобные тем, что наблюдаются у органических хромофоров, у которых эти свойства связаны с явлением двойной флуоресценции [32–36]. Механизм, ответственный за двойную флуоресценцию, по своей сути противоречит хорошо установленным теориям, таким как, например, правило Вавилова–Каши [14, 19], согласно которому независимо от длины волны возбуждения излучение флуоресценции в молекуле красителя происходит всегда с самого нижнего синглетного уровня, поэтому для одного типа молекул полоса возбуждения одного перехода приводит к одной полосе излучения и спектр излучения одного перехода не показывает зависимости от длины волны. В то же время показано, что явлению двойной флуоресценции способ-

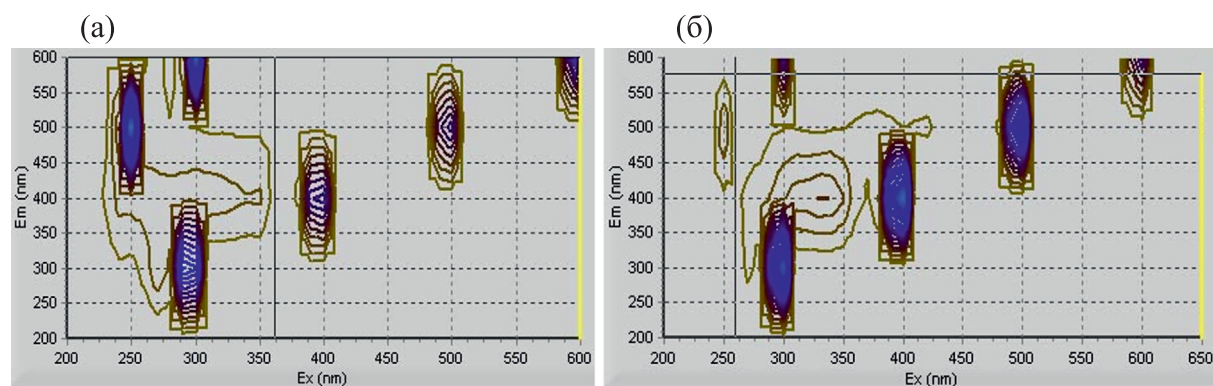


Рис. 5. Трехмерная контурная диаграмма возбуждения-эмиссии лизина (а) и аргинина (б) в концентрации 0.1 М и 0.005 М соответственно.

ствует образование водородных связей и возникновение состояний с переносом заряда [32–36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследование аминокислот и их хромофорных групп является одним из наиболее интересных направлений, которое может пролить света на дальнейшее понимание эндогенной люминесценции биомолекул и механизмов функционирования биологических систем на молекулярном уровне. Это также представляется важным с точки зрения разработки новых диагностических средств в ближней УФ- и видимой области.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою благодарность за помощь в работе сотрудникам Н.К. Призовой и Л.М. Хайбулаевой. Работа была выполнена с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (<http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>).

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. E. A. Permyakov, *Luminescent Spectroscopy of Proteins* (CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 1993).
2. C. A. Royer, *Chem. Rev.* **106**, 1769 (2006).
3. D. Zhong, in *Advances in Chemical Physics*, Ed. by S. A. Rice (J. Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA, 2009), pp. 83–149.
4. P. R. Callis, *J. Mol. Struct.* **1077**, 22 (2014).
5. L. Homchaudhuri and R. Swaminathan, *Chem. Lett.* **30**, 844 (2001).
6. L. Homchaudhuri and R. Swaminathan, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **77**, 765 (2004).
7. B.-H. Chai, J.-m. Zheng, Q. Zhao, and G. H. Pollack, *J. Phys. Chem. A*, **112**, 2242 (2008).
8. C. Niyangoda, T. Miti, L. Breydo, et al., *PLoS One* **12** (5), e0176983 (2017).
9. X. Chen, W. Luo, H. Ma, et al., *Sci. China Chem.* **61**, 351 (2018).
10. P. Guptasarma, *Arch. Biochem. Biophys.* **478**, 127 (2008).
11. A. Shukla, S. Mukherjee, S. Sharma, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **428**, 144 (2004).
12. S. Prasad, I. Mandal, S. Singh, et al., *Chem. Sci.* **8**, 5416 (2017).
13. T. Vo-Dinh, *Appl. Spectrosc.* **36**, 576 (1982).
14. J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, Boston, MA, 2006).
15. V. M. Parkin, *Absorption spectroscopy of organic molecules* (Addison–Wesley Publ. Comp., Lond., 1974).
16. Д. Браун, А. Флорид и М. Сейнберри, *Спектроскопия органических веществ* (Мир, М., 1992).
17. T. Goto and A. Ikehata, in *Far and Deep-Ultraviolet Spectroscopy*, Ed. by Yu. Ozaki and S. Kawata (Springer Japan, Tokyo, 2015), pp. 67–69.
18. J. S. McConnell, R. M. McConnell, and L. R. Hossner, *Proc. Arkansas Acad. Sci.* **47**, 73 (1993).
19. А. Н. Теренин, *Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений* (Наука, Л., 1967).
20. М. Борн и Э. М. Вольф, *Основы оптики* (Наука, М., 1973).
21. C. Z. Tan, *Physica B* **269**, 373 (1999).
22. D. V. Bent and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2612 (1975).
23. D. V. Bent and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2599 (1975).
24. D. V. Bent and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2606 (1975).
25. G. Khanariam and W. J. Moore, *Austr. J. Chem.* **33**, 1727 (1980).
26. F. Hausen, L. Jensen, P.-O. Astrand, et al., *J. Chem. Theory Comput.* **1**, 626 (2005).
27. B. A. Garetz, J. Matic, and A. S. Myerson, *Phys. Rev. Lett.* **89**, 175501 (2002).
28. О. В. Дегтярева, В. Н. Афанасьев, Н. Н. Хечинашвили и Е. Л. Терпугов, *Современные проблемы науки и образования*, № 4, 10010 (2013).
29. E. L. Terpuhov, M. S. Kondratyev, and O. V. Degtyareva, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **39** (1), 108 (2020). DOI: 10.1080/07391102.2020.1717628
30. A. Panuszko, B. Adamczak, J. Czub, et al., *Amino Acids* **47**, 2265, (2015).
31. М. В. Агупова, О. В. Бобрешова и С. И. Карпов, *Сорбционные и хроматографические процессы* **8** (1), 117 (2008).
32. K.-M. Lee, W.-Y. Cheng, Ch.-Yu. Chen, et al., *Nature Commun.* **4**, 1544 (2013).
33. C. J. Jödicke and H. P. Lüthi, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (1), 252 (2003).
34. P. T. Chou, M. L. Martinez, and J. H. Clements, *J. Phys. Chem.* **97** (11), 2618 (1993).
35. A. D. Gorse and M. Pesquer, *J. Phys. Chem.* **99** (12), 4039 (1995).
36. T. Chatterjee, M. Mandal, A. Das, et al., *J. Phys. Chem. B* **120**, 3503 (2016).

Study of Spectral Characteristics of L-Lysine and L-Arginine Using UV-VIS Spectroscopy, Steady-State Fluorescence Spectroscopy and Synchronous Fluorescence Spectroscopy

E.L. Terpugov*, S.N. Udaltsov, and O.V. Degtyareva***

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

***Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2/2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Recently discovered luminescence properties of non-aromatic amino acids, with excitation-dependent photoluminescence in the absence of conjugation within individual molecules, have attracted a great deal of interest. There is no doubt that intrinsic luminescence phenomenon is a reality, but so far the mechanism involved in this process is not yet defined. In this study, spectral-luminescence properties of L-lysine and L-arginine were investigated to provide an in-depth understanding of these processes by using UV-VIS spectroscopy, steady-state fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy.

Keywords: L-lysine monohydrochloride, L-arginine monohydrochloride, excitation-dependent photoluminescence, synchronous fluorescence, UV-VIS spectroscopy

БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В ГИДРОГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ И ТРИПСИНА

© 2021 г. И.А. Черенков*, **, М.Д. Кривилев*, ***, М.М. Игнатьева*,
Е.В. Вахрушева*, **, В.Г. Сергеев*, **

*Удмуртский государственный университет, 426034, Ижевск, ул. Университетская, 1

**Ижевская государственная медицинская академия, 426034, Ижевск, ул. Коммунаров, 281

***Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, 426067, Ижевск, ул. Татьяны Барамзиной, 34

E-mail: ivch75@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.03.2021 г.

После доработки 29.03.2021 г.

Принята к публикации 20.07.2021 г.

Методом циклической вольтамперометрии изучено электрохимическое поведение феноксиазинового красителя толуидинового синего в желатиновом гидрогеле в присутствии трипсина, пероксидазы и их комбинации. Показано, что содержащаяся в гидрогеле пероксидаза оказывает существенное влияние на электрохимические превращения толуидинового синего в течение первых 30 с измерений. Добавление трипсина усиливает эффект пероксидазного катализа. Экспериментально обоснована возможность одновременной оценки протеолиза и окислительно-восстановительного равновесия в модельной гидрогелевой системе при анализе вольтамперных кривых циклической вольтамперометрии. Полученные результаты обосновывают схему и принципы биоэлектрохимического моделирования диффузии электроактивных молекул в межклеточном матриксе.

Ключевые слова: циклическая вольтамперометрия, биоэлектрохимия, гидрогели, трипсин, пероксидаза, толуидиновый синий, *in electrode-модели*.

DOI: 10.31857/S0006302921050045

Электрохимические методы стали неотъемлемым элементом современной физико-химической биологии [1–5], а в последнее десятилетие электрохимия из аналитического метода превратилась в информативный инструмент моделирования биологических процессов *in electrode* [6]. В контексте электрохимического моделирования процессов, происходящих на уровне тканей, большой интерес представляет исследование гидрогелевых сред, являющихся естественными для большинства клеток многоклеточного организма [7–11]. На наш взгляд, электрохимические эксперименты с использованием гидрогелевых сред наиболее адекватно отражают процессы, происходящие во внеклеточном матриксе, и могут служить прототипами *in electrode-моделей* биологически значимых процессов (воспаление, морфогенез, регенерация, синтез и выделение гормональных продуктов, и др.), которые во многом определяются физико-химическими свой-

ствами матрикса [11]. Такие модели оптимальны и для изучения свойств матриксов тканеинженерных конструкций, и для конструирования электрохимических биосенсоров [10, 12–14].

Одной из проблем при создании *in electrode-моделей* является то, что окислительно-восстановительные реакции, сравнительно легко воспроизводимые в электрохимическом эксперименте, в биологических средах, как правило, осложняются ферментативным катализом. При этом ферменты матрикса оказывают влияние не только на скорость собственно редокс-превращений реагентов, но и на диффузионные свойства биологического гидрогеля, определяющие их локальные концентрации.

Для сопряжения биохимических реакций с электродными целесообразно использовать медиаторы — молекулы, способные к быстрым и обратимым окислительно-восстановительным превращениям как в биологических, так и в электрохимических процессах [15]. В настоящей работе в качестве электрохимического медиатора использовали феноксиазиновый краситель толуидиновый синий (ТС). В предыдущих исследованиях

Сокращения: ТС — краситель толуидиновый синий, ФСБ — фосфатно-солевой буферный раствор, ЦВА — циклическая вольтамперометрия.

мы выяснили, что ТС в нейтральных буферных растворах обладает воспроизводимым электрохимическим поведением [16], которое хорошо соответствует диагностическим критериям обратимости [17]. При этом лимитирующей стадией электрохимических превращений ТС является его диффузия к электродной поверхности. Это подтверждается экспериментами в гидрогелевых средах, когда протеолиз существенно ускоряет рост пиковых значений силы тока, повышая значения эффективного коэффициента диффузии ТС в гелевой среде [16, 18]. Пероксидаза способна использовать ТС в качестве восстановителя [19], оказывая влияние на соотношение окисленных и восстановленных форм красителя в системе, что позволяет применять ее для моделирования сдвигов окислительно-восстановительного равновесия в тканях при использовании ТС как электроактивной метки.

Таким образом, на поведение электроактивной метки в межклеточном матриксе влияет комплекс разнообразных факторов, нуждающийся в детальном изучении, в том числе и методами электрохимического моделирования. Поэтому целью настоящей работы стало исследование электрохимического поведения толуидинового синего как электроактивного медиатора в условиях модельной гидрогелевой среды при действии трипсина и пероксидазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали планарные электродные системы (ООО НПП «Автоком», Москва, Россия), изготовленные методом трафаретной печати и включающие рабочий и вспомогательный электроды на основе графита, электрод сравнения — хлорсеребряный.

Фоновым электролитом во всех измерениях служил фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) (рН 7.2), на котором готовили и все рабочие растворы. Перед измерениями электроды подвергали циклированию в буферном растворе в диапазоне потенциалов +1000...–1000 мВ для стабилизации характеристик. Для формирования гидрогеля на рабочий электрод наносили 1 мкл раствора желатина (1.5 масс.%) или 1 мкл раствора желатина, содержащего пероксидазу из корней хрена ($RZ > 3.0$) с удельной активностью 250 ед/мг. После формирования на рабочем электроде гидрогеля в ячейку вносили раствор ТС (0.1 мМ) с эквимоларным раствором пероксида водорода. В отдельной серии экспериментов для моделирования протеолиза к перечисленным реагентам добавляли трипсин из поджелудочной железы свиньи с удельной активностью 250 ед/мг до конечной концентрации в ячейке 0.001 масс. %.

Измерения проводили методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостат-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия) (точность измерений потенциала ± 1 мкВ, токов ± 1 нА). Использовали диапазон потенциалов 0...+460 мВ со скоростью развертки потенциала 130 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводили в течение 21 мин с интервалом 7 с в первую минуту, а затем каждые 3 мин. Согласно рекомендациям ИЮПАК на графиках ЦВА отрицательные токи соответствуют процессам электровосстановления, а положительные — процессам электроокисления [16]. Значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При отсутствии ферментов вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего, диффундирующего в желатиновом гидрогеле в среде фосфатно-солевого буферного раствора, характеризуются наличием хорошо выраженного анодного пика ($E_{pa} = -219.8$ мВ), соответствующего электроокислению ТС, и катодного пика ($E_{pc} = -280.2$ мВ), сопровождающего его электровосстановление. Значение $\Delta E = 60.4$ мВ, а потенциал полуволны $E_{1/2} = 250$ мВ (рис. 1, врезка). Пиковые значения силы тока нарастают в ходе эксперимента, достигая 0.62 мкА в анодной области (рис. 1) и –0.80 мкА — в катодной области, отражая поступление красителя к электродной поверхности.

Анализ характера изменения анодного тока показывает (рис. 1), что процесс электроокисления ТС в среде с ограниченной диффузией (гидрогеле) имеет две стадии, отличающиеся механизмом формирования тока окисления. В интервале времени 0–720 с анодный ток возрастает за счет поступления красителя к поверхности согласно закону $I_{pa} \sim \sqrt{t}$ до значения I^* , которое в проведенном эксперименте достигается при $t = 720$ с. Такая зависимость соответствует диффузионно-лимитируемому характеру электрохимической реакции. Свыше $t = 720$ с наблюдается переход к линейному характеру $I_{pa} \sim I^* + \alpha t$, что может быть объяснено насыщением поверхности электрода толуидиновым синим и затруднением отвода прореагировавших молекул от электрода.

Внесение в ячейку трипсина не приводило к существенному изменению пиковых значений силы тока по сравнению с условиями гидрогеля, не содержащего фермента. При используемых соотношениях желатина и трипсина явных изменений диффузионных свойств геля, регистрируемых по скорости роста пиковых значений катодных и анодных токов, не обнаружено.

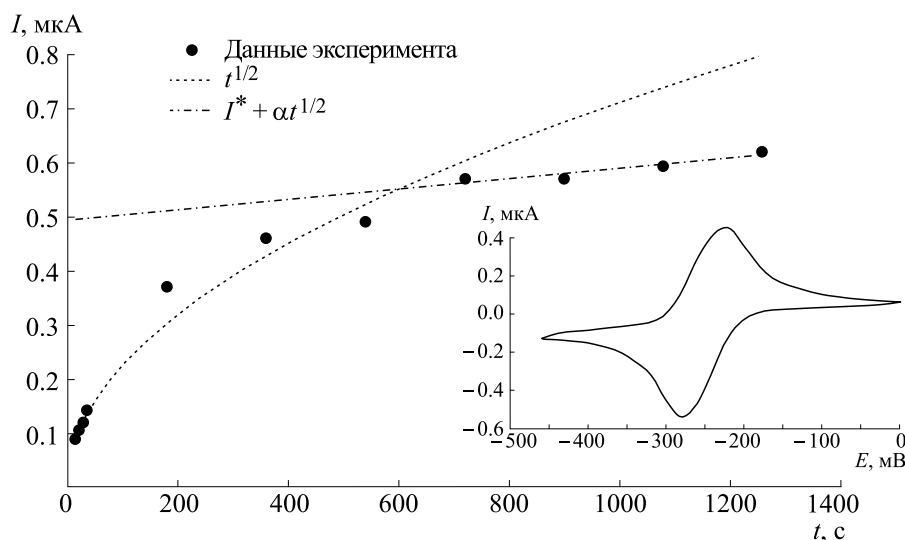


Рис. 1. Графики зависимости пиковых значений анодного тока от времени эксперимента в интервале 0–1260 с. На врезке: типичная вольтамперная кривая ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) на графитовом планарном электроде в среде желатинового геля, не содержащего ферментов, соответствующая моменту времени 720 с. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2) с добавлением пероксида водорода (0.1 мМ). Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

При диффузии ТС в желатиновом гидрогеле, содержащем пероксидазу, характер вольтамперограмм наиболее существенно менялся на начальной стадии эксперимента. На 7-й–14-й секундах в анодной области ожидаемый ($E_{pa} = -219.8$ мВ) пик электроокисления ТС (рис. 2, кривые 1) практически отсутствует (рис. 2, кривые 2), а в катодной области наблюдается выраженный рост силы тока, достигающий максимума в точке разворота развертки потенциала.

Качественные изменения кривых ЦВА на начальных этапах эксперимента, очевидно, отража-

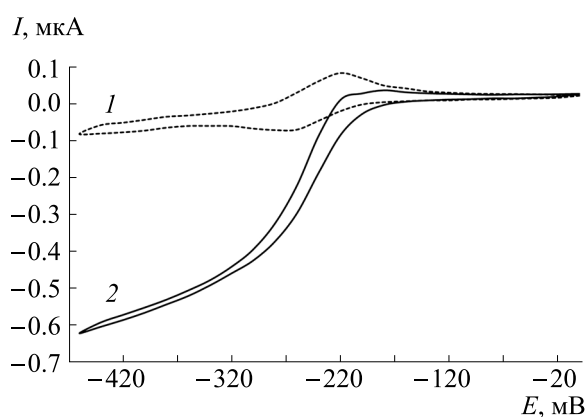


Рис. 2. Вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) в среде желатинового геля (кривые 1) и в присутствии пероксидазы (кривые 2) на 14-й секунде эксперимента. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2) с добавлением 0.1 мМ пероксида водорода. Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

ют эффективный пероксидазный катализ. Восстановленная форма ТС выступает в качестве второго субстрата – донора электронов для пероксидазы [19]. В результате высокой скорости ферментативного окисления ТС в приэлектродном слое повышается концентрация окисленной формы красителя, что сопровождается ростом токов электровосстановления (катодных) и отсутствием локального повышения значений силы тока электроокисления ТС в анодной области (рис. 3).

К третьей минуте эксперимента становятся заметными характерные пики ($E_{pa} = -219.8$ мВ; $E_{pc} = -280.2$ мВ), соответствующие электрохимическим превращениям красителя, и кривые ЦВА приобретают сходство с зависимостями, полученными при отсутствии пероксидазы (рис. 4). Вероятной причиной таких изменений кривых ЦВА во времени может служить избранная схема иммобилизации фермента на электроде. При нанесении фермента в составе геля в приэлектродной области оказывается сравнительно небольшое количество пероксидазы, которое и формирует картину ЦВА на начальных этапах.

Еще одной гипотезой, объясняющей характер изменения вольтамперных кривых, может служить представление об адсорбции красителя на поверхность электрода, ограничивающей участие в электрохимических превращениях диффундирующих из геля молекул ТС, окисленных пероксидазой. Поскольку большая часть молекул фермента находится в геле на относительно большом расстоянии от электродной поверхности, эффект ферментативного катализа существенен только

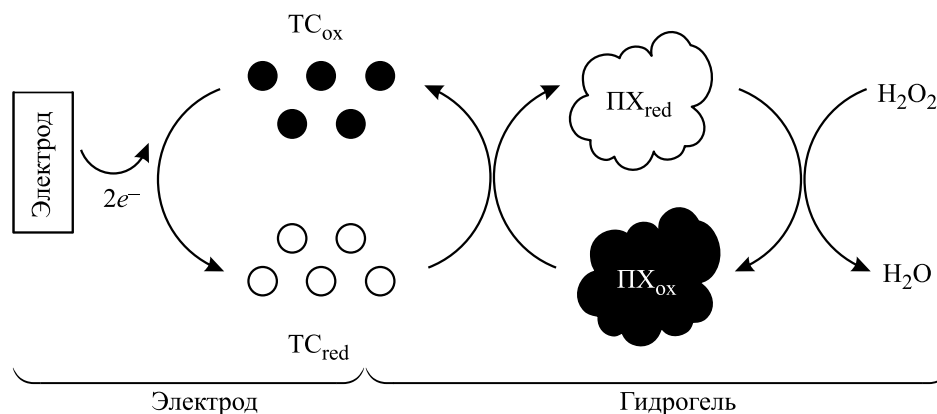


Рис. 3. Общая схема сопряжения электрохимического и биокаталитического процессов в эксперименте (по работе [19] с изменениями). ПХ – пероксидаза из корней хрена.

на начальных этапах эксперимента. Затем основной вклад в формирование вольтамперограмм вносят молекулы красителя, адсорбированные на электроде, состояние которых определяется электрохимическими циклами окисления-восстановления, а диффузия их от электрода затруднена гидрогелем.

Если в растворе присутствует трипсин, то кривые ЦВА на начальных стадиях эксперимента (7-я–14-я секунды) приобретают характерную S-образную форму, соответствующую пероксидазному окислению ТС (рис. 5, кривые 2). Значения катодных токов и скорость их нарастания существенно превосходят показатели, полученные в отсутствие протеолиза (рис. 5, кривые 1).

Роль трипсина в формировании таких вольтамперограмм, вероятно, сводится к ускорению

диффузии субстратов пероксидазы (ТС и пероксида водорода) и самого фермента к приповерхностному слою электрода, где его каталитическая активность начинает более существенно влиять на электрохимические превращения ТС.

Протеолиз желатина облегчает диффузию ТС в направлении раствора, что повышает вероятность электровосстановления окисленных пероксидазой молекул. Подтверждением ускорения диффузионных процессов служит формирование в условиях протеолиза более выраженного пика в анодной области ($E \approx -200$ мВ), соответствующего электроокислению ТС.

Информативным показателем, характеризующим процессы, происходящие на электроде, оказалось соотношение пиковых значений силы тока (рис. 6). Для идеально обратимого электрохимического процесса этот показатель стремится к

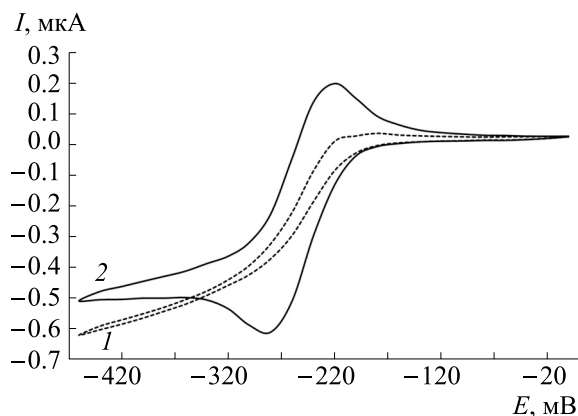


Рис. 4. Вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) в среде желатинового геля в присутствии пероксидазы: на 14-й секунде эксперимента (кривые 1) и через 3 мин (кривые 2) после начала измерений. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2) с добавлением 0.1 мМ пероксида водорода. Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

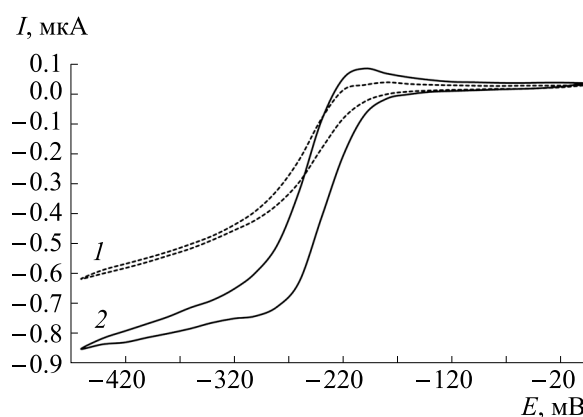


Рис. 5. Вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) в среде желатинового геля в присутствии пероксидазы хрена (кривые 1), при добавлении трипсина (кривые 2) на 14-й секунде эксперимента. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2). Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

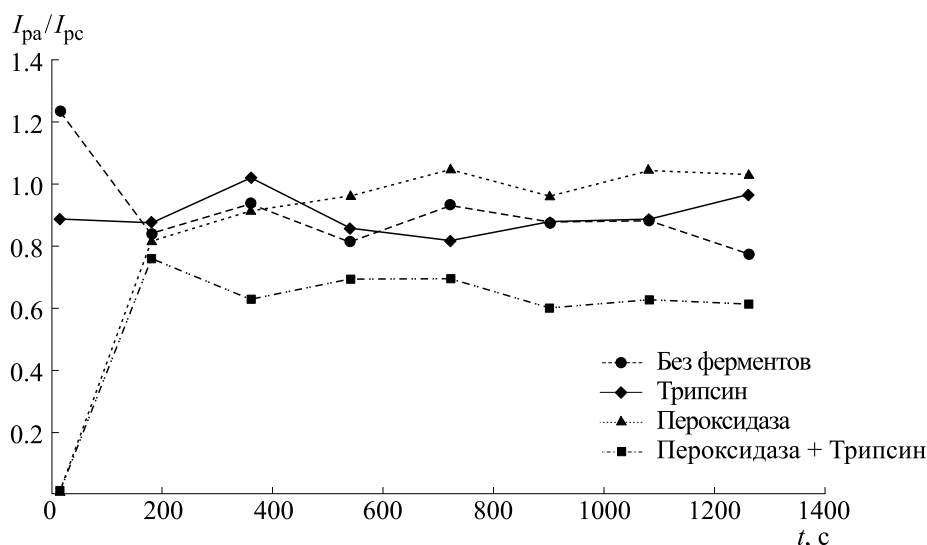


Рис. 6. Изменения соотношения пиковых значений анодных и катодных токов при разных условиях эксперимента. Фоновый электролит — ФСБ (pH 7.2) с добавлением пероксида водорода (0.1 мМ). Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

единице [17]. В условиях наших экспериментов соотношение токов определялось прежде всего присутствием пероксидазы или трипсина, либо их комбинации, а также диффузионными ограничениями, накладываемыми гидрогелевой средой.

В среде гидрогеля с естественным насыщением кислородом соотношение пиковых значений силы тока I_{pa}/I_{pc} в начале измерений составило 1.2, что может быть объяснено некоторым преобладанием на начальном этапе окисленной формы ТС. К концу эксперимента этот показатель выравнивался, и среднее значение в серии измерений составляло 0.9.

Трипсиновый протеолиз, не оказывая существенного влияния на пиковые значения силы тока, отражался на их соотношении. Оно оказалось близким к единице и более стабильным в ходе эксперимента, чем в отсутствие трипсина, что может быть объяснено меньшими диффузионными ограничениями.

Особенно выраженное влияние на соотношение I_{pa}/I_{pc} оказывает пероксидаза. Вследствие ферментативного окисления в начальный момент времени соотношение токов резко смещалось в сторону электровосстановления ТС. К третьей минуте показатель выравнивался и сохранялся близким к единице до конца эксперимента.

В присутствии трипсина эффект пероксидазного катализа отражался на значениях силы тока до конца эксперимента. Соотношение I_{pa}/I_{pc} оказалось низким в начале эксперимента, затем сместилось к единице, а с девятой минуты для всех циклов было стабильным (≈ 0.6). Этот пока-

затель близок к критериям так называемого EC' -процесса (каталитической электродной реакции) [17], но в условиях диффузионных ограничений белкового гидрогеля его удастся достичь только с помощью протеолиза.

Таким образом, комбинированное действие трипсина и пероксидазы в желатиновом гидрогеле усиливает ферментативное окисление ТС и облегчает его регистрацию методом циклической вольтамперометрии. При создании моделей биологических тканей *in electrode* или при использовании электрохимических методов *in vivo* необходимо учитывать, что протеолиз, как правило, не приводящий к образованию электроактивных продуктов, может оказывать существенное влияние на результаты электрохимического эксперимента.

ВЫВОДЫ

1. Диффузия толуидинового синего в желатиновом гидрогеле (1.5 масс. %) в отсутствие ферментов может быть оценена как серия вольтамперных кривых ЦВА с логарифмическим ростом пиковых значений силы тока (от 0.0072 мкА до 0.8 мкА в анодной области ($E_{pa} = -219.8$ мВ); от -0.0089 мкА до -0.62 мкА — в катодной ($E_{pc} = -280.2$ мВ)).

2. Внесение в желатиновый гидрогель пероксидазы приводит к формированию на начальных этапах эксперимента катодных токов, достигающих -0.6 мкА, и снижению анодных токов до 0.004 мкА.

3. Трипсин, вносимый одновременно с субстратами пероксидазы, приводит к повышению

на 14-й секунде катодных токов до -0.85 мкА и стабильному снижению соотношения I_{pa}/I_{pc} до 0.6 с девятой минуты эксперимента.

4. Исследование вольтамперного поведения толудинового синего в модельном белковом гидрогеле позволяет оценить его диффузионные свойства и пероксидазную активность с учетом влияния протеолиза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-79-20012).

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. Heiskanen and J. Emnéus, in *Modern aspects of electrochemistry*, Ed. by N. Eliaz **52**, 1 (2011).
2. Y. Cao, J. Yu, B. Bo, et al., *Biosens. Bioelectron.* **45**, 1 (2013).
3. E. González-Fernández, N. Avlonitis, A. F. Murray, et al., *Biosens. Bioelectron.* **84**, 82 (2016).
4. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., *Биофизика* **63** (6), 1088 (2019).
5. M. Stoytcheva, R. Zlateva, S. Cosnier, et al., *Electrochim. Acta* **76**, 43 (2012).
6. В. В. Шумянцева, Т. В. Булко, Е. В. Супрун и др., *Биомед. химия* **61** (2), 188 (2015).
7. J. T. Trevors and G. H. Pollack, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **89** (1), 1 (2005).
8. K. B. Fonseca, S. J. Bidarra, M. J. Oliveira, et al., *Acta Biomater.* **7** (4), 1674 (2011).
9. B. Sarker, R. Singh, R. Silva, et al., *PLoS One* **9** (9), 1 (2014).
10. M. T. Spang and K. L. Christman, *Acta Biomater.* **68**, 1 (2019).
11. S. Park, S. Lim, P. Siriviriyakul, et al., *Phys. Rev. E* **101** (5), 052414 (2020).
12. G. G. Giobbe, C. Crowley, C. Luni, et al., *Nat. Commun.* **10** (1), 1 (2019).
13. J. H. Traverse, T. D. Henry, N. Dib, et al., *JACC Basic to Transl. Sci.* **4** (6), 659 (2019).
14. D. Buenger, F. Topuz, and J. Groll, *Prog. Polym. Sci.* **37** (12), 1678 (2012).
15. E. Katz, A. N. Shipway, and I. Willner, in *Encyclopedia of Electrochemistry*, Ed. by G. S. Wilson (Wiley-VCH GmbH, Weinheim, 2002), pp. 559–626.
16. И. А. Черенков, К. С. Раевских, В. Г. Сергеев и др., *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **3** (2), 422 (2018).
17. *Электроаналитические методы*, под ред. Ф.М. Шольца (Бином «Лаборатория знаний», М., 2010).
18. И. А. Черенков, Л. С. Березина, М. Д. Кривилев и др., *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **5** (3), 481 (2020).
19. K. Thenmozhi and S. S. Narayanan, *Mater. Sci. Eng. C* **70**, 223 (2017).

Bioelectrochemical Modeling of Toluidine Blue Diffusion in a Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Trypsin

I.A. Cherenkov*, **, M.D. Krivilev*, ****, M.M. Ignat'eva*,
E.V. Vahrusheva*, **, and V.G. Sergeev*, **

*Udmurt State University, Universitetskaya ul. 1, Izhevsk, 426034 Russia

**Izhevsk State Medical Academy, ul. Kommunarov 281, Izhevsk, 426034 Russia

***Udmurt Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Tatiany Baramzinoj 34, Izhevsk, 426067 Russia

The electrochemical properties of toluidine blue, a phenothiazine dye, in a gelatin hydrogel in the presence of trypsin, peroxidase, and their combination have been studied by means of cyclic voltammetry. It was shown that peroxidase present in the hydrogel has a significant effect on the electrochemical transformations of toluidine blue during the first 30 seconds of measurements. The addition of trypsin enhances the effect of peroxidase catalysis. The feasibility of simultaneous assessment of proteolysis and redox equilibrium in a model hydrogel system in the analysis of voltammetric curves of cyclic voltammetry has been experimentally validated. The obtained results demonstrate that the scheme and principles of bioelectrochemical modeling of the diffusion of electroactive molecules in the intercellular matrix work reasonably well.

Keywords: cyclic voltammetry, bioelectrochemistry, hydrogels, trypsin, peroxidase, toluidine blue, in electrode-models

УДК 573; 57:51-76

ИЗУЧЕНИЕ СТЕРОИДНЫХ «КЛЮЧЕЙ» ДЛЯ АНДРОГЕННОГО РЕЦЕПТОРА

© 2021 г. А.А. Самченко, В.М. Комаров, М.С. Кондратьев

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

E-mail: samchenkoa@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2021 г.

После доработки 22.06.2021 г.

Принята к публикации 23.06.2021 г.

В работе на основе полуэмпирических квантово-химических расчетов и докинга проанализировано конформационное многообразие изомеров природных и синтетических стероидов. Моделируется связывание различных изомеров и аналогов тестостерона с андрогенным рецептором. Особое внимание уделяется рассмотрению роли структурных и термодинамических факторов в определении предпочтительных изомеров тестостерона, обуславливающих, возможно, наилучшее обеспечение функционирования его комплекса с андрогенным рецептором.

Ключевые слова: тестостерон и его аналоги, электронная структура, изомеры, квантово-химический расчет, гибкий докинг, термодинамические параметры.

DOI: 10.31857/S0006302921050057

Тестостерон, андроген стероидной природы, является основным половым гормоном. В медицинской практике достаточно давно применяют при гипофункции яичек и связанных с этим нарушениях препараты тестостерона (например, тестостерона пропионат) либо его синтетические аналоги. Тестостерон также используют спортсмены для набора мышечной массы и роста силы, причем часто в виде производных и миметиков (и это считается допингом). Кроме этого, синтетический тестостерон используют при гормонально-заместительной терапии для мужчин старшего возраста, у которых наблюдается пониженный уровень мужского полового гормона. При участии тестостерона растут мышцы, образуются красные кровяные тельца, регенерируют ткани, сжигается жир, происходит липидный обмен в печени. В целом в любой ткани организма для нормальной жизнедеятельности необходим тестостерон [1–5]. Кроме того, ведутся исследования по применению стероидов как фармакофорного базиса новых инсектицидов [6].

Действие тестостерона начинается с его связывания с соответствующим рецептором. Первичные акты взаимодействия гормона с поверхностью клетки, образование комплекса с рецептором описаны во множестве работ. Наиболее подробными и последними из них являются работы [7, 8]. Важно отметить, что сам тестостерон биологически малоактивен и слабо связывается с

андрогенными рецепторами (является фактически прогормоном), прежде чем подействовать на андрогенные рецепторы клеток органов-мишеней, он должен подвергнуться непосредственно в клетках восстановлению в 5 α -позиции углеродного скелета с помощью фермента 5 α -редуктазы. При этом образуется биологически активная форма тестостерона — дигидротестостерон, который связывается с тем же андрогенным рецептором в клетке, что и тестостерон.

Как и многие биологически-активные молекулы, стероиды функционируют по принципу «ключ–замок». Они связываются в консервативной полости в глобуле рецепторного белка. Именно эти комплексы давно привлекали внимание исследователей. К настоящему времени экспериментально определены структуры рецепторов с некоторыми лигандами [9–11]. Несмотря на повышенный интерес к проблеме активации и ингибирования андрогенного рецептора, существенное значение уделяется проблеме строения самого андрогенного рецептора и определенных замен аминокислот внутри него. В то же время вопрос о конформационных возможностях молекулы тестостерона в сравнении с его аналогами при взаимодействии с рецептором представляется недостаточно ясным — учитывая строение указанного рецептора и высокую консервативность полости, где осуществляется взаимодействие. Опять же, интересен вопрос влияния водного

окружения и катионов на взаимодействия производных тестостерона с активным центром. Нами запланированы исследования в данном направлении, но на настоящем этапе мы начали исследование лигандов в газовой фазе, а сами расчеты и моделирование взаимодействия их с активным центром проводили без участия воды.

В данной работе на базе современных методов вычислительной химии проведен сравнительный анализ изомеров молекулы тестостерона, дигидротестостерона, а также некоторых их аналогов. На основании расчетов гибкого докинга изомеров указанных молекул на андрогенный рецептор мы картировали места их связывания и проанализировали полученные величины энергий такого взаимодействия.

Целью данной работы является теоретическое исследование структурных свойств изомеров тестостерона в изолированной форме. Помимо этого, в работе исследуется связывание различных изомеров и аналогов тестостерона с андрогенным рецептором. Особое внимание уделяется рассмотрению роли структурных и термодинамических факторов в определении предпочтительных изомеров тестостерона, обуславливающих по возможности наилучшее обеспечение функционирования его комплекса с андрогенным рецептором.

МЕТОДЫ

Для расчетов структурных, спектроскопических и термодинамических особенностей указанных биомолекул использовали полуэмпирическую квантово-химическую MNDO-методику в вариантах параметризации PM3. Выбор такого инструмента исследований обусловлен наилучшим соотношением (для данного типа задач) точности расчета и необходимых вычислительных ресурсов, неоднократно проверенных нами [12–14]. В ходе расчетов использовали усиленные критерии достижения глобального минимума поверхности потенциальной энергии исследуемых молекул. Мы добивались не только максимальных по значению теплот образования оптимизируемых структур, но и отсутствия отрицательных значений частот в рассчитанных спектрах нормальных колебаний всех возможных изомеров тестостерона. Этим достигалось исключение из рассмотрения большого числа промежуточных, метастабильных структур.

Для всех изомеров были проанализированы их основные структурные характеристики. Кроме того, нами были рассмотрены другие важные параметры: теплота образования, инерциальный дефект, абсолютная энтропия, дипольный момент.

Поиски и анализ мест связывания изомеров тестостерона с андрогенным рецептором были выполнены с помощью метода гибкого докинга, который хорошо реализован в пакете Autodock VINA [15]. В качестве моделей фермента, ставшего мишенью для докинга, в банке данных пространственных структур белков (Protein Data Bank, PDB) были выбраны структуры андрогенного рецептора человека (коды молекул: 2Q7I и 1T7T). Структуры были получены методом рентгеновской дифракции с разрешениями 1.87 и 1.7 Å соответственно, этого вполне достаточно для компьютерных расчетов методом гибкого докинга. В процессе подготовки к расчетам данные модели были очищены от молекул воды и других веществ. Важно отметить, что эти рецепторы были закристаллизованы вместе с тестостероном и дигидротестостероном, которые являются активаторами рецептора (при этом дигидротестостерон действует сильнее, нежели тестостерон [7, 16]). Поскольку местоположение этих молекул на рецепторе известно, мы начали наши расчеты с воссоздания структур экспериментально полученных комплексов. Этим достигалась калибровка выбранного пакета для докинга (Autodock VINA) на конкретных примерах комплексов «андрогенный рецептор + тестостерон». В начале расчета программа строит поверхность жесткой белковой глобулы с учетом частичных зарядов аминокислотных остатков. Для того чтобы провести поиск мест связывания лигандов на всей поверхности белка-мишени, мы не стали ограничивать область поиска какой-то небольшой ячейкой для докинга, а задали ее размер таким, чтобы в нее поместился весь рецептор ($50 \times 44 \times 54$ Å — для молекулы с кодом 2Q7I, $52 \times 50 \times 60$ Å — для молекулы с кодом 1T7T). Центры молекул находились в точках со следующими координатами: $x = 22.648$, $y = 5.739$ и $z = 11.037$ для рецептора с кодом 2Q7I; $x = -10.879$, $y = 9.907$ и $z = 44.556$ — для рецептора с кодом 1T7T. Эти же данные для мишеней мы использовали и для последующих расчетов всех полученных с помощью полуэмпирических методов изомеров тестостерона. Сами же лиганды в расчетах были максимально подвижны: в конформационном поиске допускалось вращение вокруг одинарных связей по всем степеням свободы. Выполненный нами расчет докинга основного изомера тестостерона позволил воспроизвести структуру комплекса, ранее полученную с помощью рентгеновской кристаллографии. При этом пакет Autodock VINA позволил соотнести конкретную геометрию лиганд-белкового комплекса с полной энергией связывания, которая здесь именуется аффинностью («сродство»). В VINA используется один из методов глобальной стохастической оптимизации — повторяющийся локальный поиск, описанный в работе [17]. В этом алгоритме последовательность шагов

принимается в соответствии с критерием Метрополиса, а локальная оптимизация достигается методом Бройдена—Флетчера—Голдфарба—Шанно. Программа производит расчет энергии связывания (аффинности) низкомолекулярного вещества к части белка:

$$\text{Энергия связывания } (\Delta G) = A + B + C - D, \\ \text{ккал/моль,}$$

где A — сумма общей межмолекулярной энергии, энергии ван-дер-ваальсового взаимодействия, электростатической энергии, энергии десольватации и энергии водородных связей; B — общая внутренняя энергия; C — свободная энергия вращения; D — несвязанная энергия системы.

Полная энергия связывания составила -10.6 и -11.0 ккал/моль соответственно для молекул с кодами 2Q7I и 1T7T. Для изучения геометрии получаемых комплексов и анализа типов взаимодействий мы использовали пакет PLIP [18]. Основные виды взаимодействия, стабилизирующие такой комплекс, — это водородные связи боковых групп аминокислот полости рецептора с атомами кислорода в составе лиганда, а также гидрофобные взаимодействия между стероидной циклической системой и лейцинами (Leu704 и Leu873) и фенилаланинами (Phe764 и Phe876) на внутренней поверхности полости андрогенного рецептора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе подготовки расчетов мы смоделировали 64 изомерных формы тестостерона. Для каждой из них был выполнен оптимизационный конформационный анализ с поиском глобальных минимумов энергии структур с контролем отсутствия отрицательных значений частот в рассчитанных спектрах нормальных колебаний — появление таких частот свидетельствовало бы о метастабильном, переходном состоянии молекулы [13, 14]. В табл. 1 представлены все изомеры, их теплоты образования и аффинности к рецепторам тестостерона (2Q7I и 1T7T).

Обращает на себя внимание чрезвычайно высокая консервативность связывания каждого из изомеров с рецептором — об этом свидетельствует идентичная локализация каждого из лигандов («+» в таблице означает, что исследуемая молекула с наилучшей аффинностью находилась в полости активного центра рецептора). При этом положение лигандов хорошо соответствует локализации тестостерона в комплексе, структура которого решена экспериментально [9, 10]. Все изомеры, которые находились в активном центре андрогенного рецептора, имели наибольшую аффинность по сравнению с аффинностями изомеров, не попадающих в активный центр рецептора. Аффинность этих локализаций по сравнению с

аффинностями в активном центре уступала, иногда даже с существенным значением (около 5 и более ккал/моль). Поэтому мы не приводим эти данные в таблице и не описываем подробно в статье, поскольку не считаем их основополагающими.

Величины аффинности связывания каждого из изомеров с рецептором отличаются друг от друга не столь существенно, как величины теплот образования каждого из лигандов. Различия в величинах энтальпии образования (ΔH_f^0) позволили нам выявить ряд структур с минимальными значениями этого параметра (выделены серым в табл. 1): это изомеры с номерами 10, 20, 24, 33, 40, 46 и 56 (вынесены в табл. 2).

Пространственные структуры изомеров тестостерона (табл. 2) представлены на рис. 1. Структуры представлены таким образом, что слева направо и сверху вниз постепенно у каждой структуры уменьшается теплота образования, т.е. самая верхняя и левая является самой выгодной по теплоте образования.

Говоря о пространственном строении тестостерона, следует отметить, что в состав его молекулы входят два кольца «циклогексана». У циклогексана существуют два основных конформера, которые существенно отличаются друг от друга по термодинамическим характеристикам [19–21].

Конформеры циклогексана представлены на рис. 2. Самым стабильным является конформер в форме «кресла» (рис. 2а). Вторым, менее стабильным конформером является конформер в форме «ванны», но так как геометрия «ванны» для циклогексана на самом деле является лишь теоретически предсказанной, то в природе эта форма имеет вид, представленный на рис. 2б (форма «полуванны»). При такой топологии не возникает напряженности между двумя водородными (ориентированными в одну сторону), которая возникала бы, если конформеры находились в идеальной форме «ванны» [19–21].

Анализ наиболее выгодных изомеров тестостерона (табл. 2, 20 и 46) позволяет отметить, что все «внутренние» циклогексановые кольца имеют конформацию «кресла». В то же время в других изомерах, представленных на рис. 1 и в табл. 2, лишь одно из двух циклогексановых колец имеет такую конформацию (схематически на рис. 1 конформации «кресла» обозначены цифрой 1, а «ванны» и «полуванны» — цифрой 2). В остальных структурах (не представленных на рис. 1) «внутренние» циклогексановые кольца совсем не имели самых стабильных форм конформера («кресло»). Такое состояние структур изомеров тестостерона вызвано наличием двух метильных групп в молекулах. Метильные группы являются внутренними ограничителями стереохимических изменений и перестроек разных изомеров тестосте-

Таблица 1. Теплоты образования всех изомеров тестостерона, их аффинности к рецепторам 2Q7I и 1T7T и локализация

№ изомера	Теплота образования (ΔH_f°), ккал/моль	Аффинность к рецептору 2Q7I, ккал/моль	Локализация	Аффинность к рецептору 1T7T, ккал/моль	Локализация
1	–110.443875	–9.9	+	–10.1	+
2	–109.535233	–10.0	+	–10.6	+
3	–101.640958	–10.7	+	–10.9	+
4	–104.770838	–10.1	+	–10.4	+
5	–108.507504	–9.7	+	–10.1	+
6	–105.000268	–8.7	+	–9.1	+
7	–105.558115	–9.7	+	–10.1	+
8	–108.929358	–10.1	+	–10.4	+
9	–107.545289	–8.9	+	–8.9	+
10	–112.850545	–8.5	+	–8.3	+
11	–103.262130	–9.4	+	–9.9	+
12	–106.739034	–9.9	+	–10.6	+
13	–107.356760	–9.3	+	–9.6	+
14	–110.301049	–9.2	+	–9.7	+
15	–105.571054	–9.1	+	–9.3	+
16	–108.419451	–8.9	+	–9.3	+
17	–104.799830	–9.5	+	–9.6	+
18	–109.348467	–8.9	+	–9.0	+
19	–110.268986	–10.4	+	–10.9	+
20	–113.400978	–10.6	+	–11.0	+
21	–105.352401	–10.3	+	–10.7	+
22	–108.362199	–10.3	+	–10.5	+
23	–109.664838	–9.6	+	–10.0	+
24	–112.848489	–10.2	+	–10.6	+
25	–103.293795	–9.3	+	–9.8	+
26	–108.562926	–9.1	+	–9.6	+
27	–106.560474	–9.6	+	–10.0	+
28	–109.836015	–10.3	+	–10.6	+
29	–104.948781	–9.5	+	–9.9	+
30	–108.233500	–10.2	+	–10.0	+

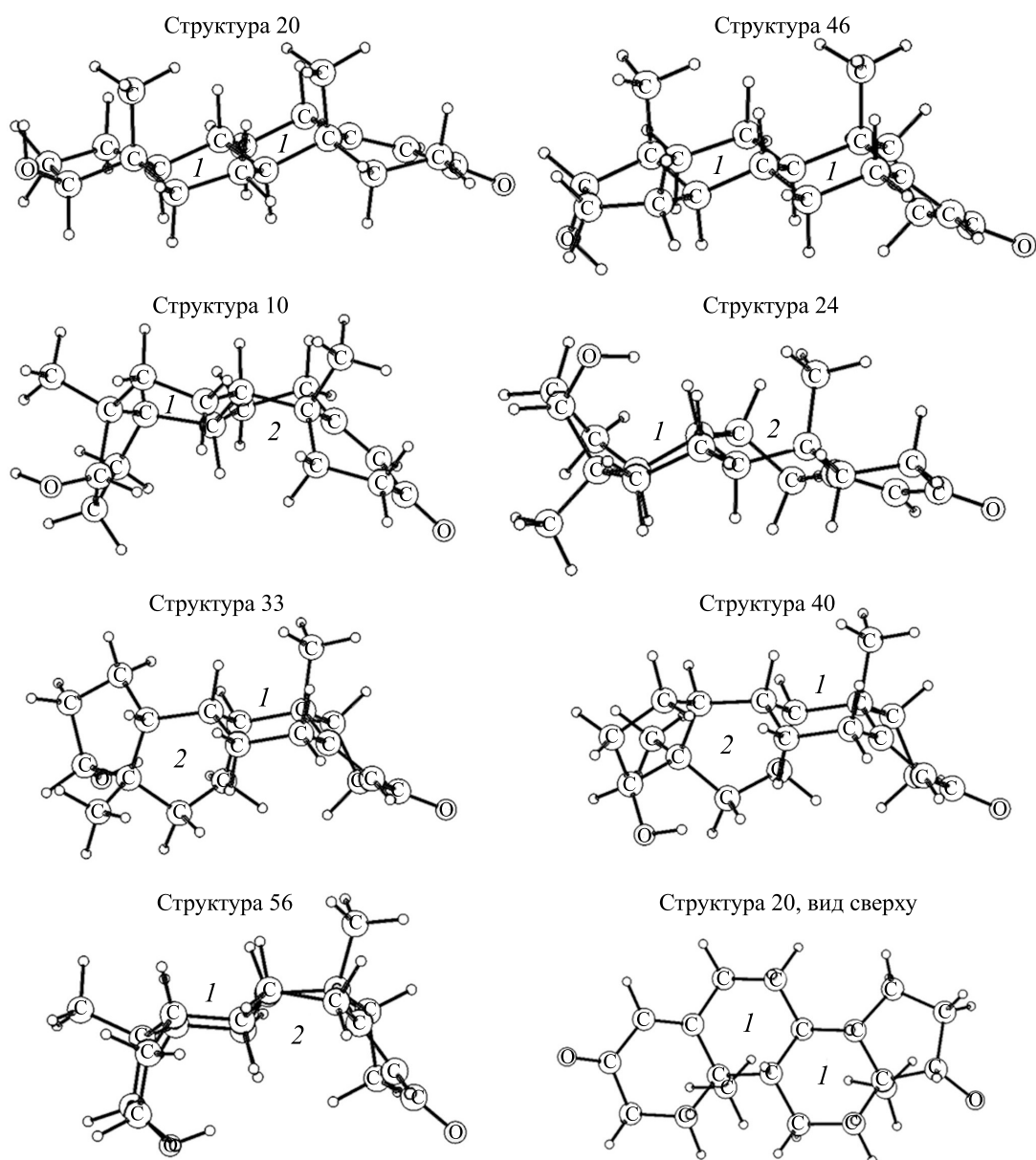
Таблица 1. Окончание

31	–107.210145	–9.1	+	–9.5	+
32	–110.092088	–9.3	+	–9.7	+
33	–112.592660	–9.4	+	–8.8	+
34	–109.614568	–9.1	+	–9.2	+
35	–93.297025	–8.6	+	–8.4	+
36	–96.259707	–9.0	+	–9.0	+
37	–107.123063	–9.7	+	–9.8	+
38	–103.722771	–9.8	+	–9.8	+
39	–109.148148	–9.7	+	–9.6	+
40	–111.840495	–9.5	+	–9.7	+
41	–104.823613	–9.4	+	–9.9	+
42	–109.140463	–9.6	+	–10.2	+
43	–104.174334	–9.6	+	–9.9	+
44	–107.435392	–9.1	+	–9.4	+
45	–110.133282	–9.8	+	–10.2	+
46	–113.083301	–9.0	+	–9.0	+
47	–109.493799	–10.1	+	–9.6	+
48	–113.805879	–9.2	+	–8.5	+
49	–104.857198	–9.3	+	–9.4	+
50	–108.821267	–10.1	+	–10.2	+
51	–104.648624	–9.5	+	–9.7	+
52	–107.691838	–8.8	+	–9.0	+
53	–98.760425	–9.9	+	–9.9	+
54	–101.723139	–9.4	+	–9.1	+
55	–108.228847	–9.2	+	–8.7	+
56	–111.115014	–9.1	+	–8.8	+
57	–101.765901	–9.0	+	–9.0	+
58	–107.148790	–9.0	+	–9.0	+
59	–104.641399	–9.6	+	–9.5	+
60	–108.168900	–8.5	+	–8.7	+
61	–102.650286	–9.6	+	–9.8	+
62	–105.837305	–8.9	+	–9.0	+
63	–106.849911	–9.9	+	–10.0	+
64	–110.084258	–9.9	+	–9.9	+

Примечание. Локализация – совпадение (+) или несовпадение (–) с рентгеноструктурными данными.

Таблица 2. Теплоты образования наиболее термодинамически выгодных изомеров тестостерона и их аффинности к рецепторам 2Q7I и 1T7T

№ изомера	Теплота образования (ΔH_f°), ккал/моль	Аффинность к рецептору 2Q7I, ккал/моль	Аффинность к рецептору 1T7T, ккал/моль
20	–113.400978	–10.6	–11.0
46	–113.083301	–9.0	–9.0
10	–112.850545	–8.5	–8.3
24	–112.848489	–10.2	–10.6
33	–112.592660	–9.4	–8.8
40	–111.840495	–9.5	–9.7
56	–111.115014	–9.1	–8.8

**Рис. 1.** Структуры изомеров тестостерона РМЗ МОРАС. Цифрами 1 и 2 обозначены конформеры циклогексана: «кресло» и «полу-ванна» соответственно.

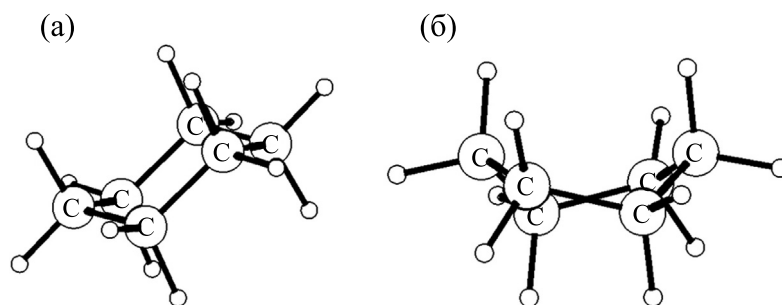


Рис. 2. Конформационные состояния циклогексана PM3 MORAS: (а) — «кресло», (б) — «полу-ванна».

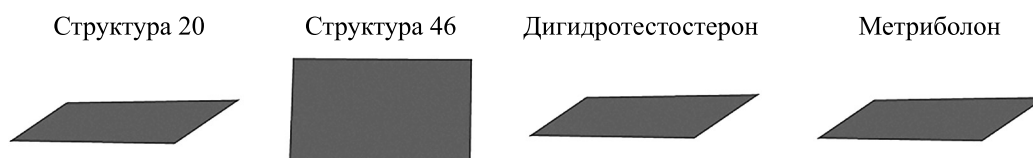


Рис. 3. Схематическое расположение тестостерона и его аналогов в активном центре андрогенного рецептора.

рона. Указанные особенности пространственного строения изомеров тестостерона влияют на локализацию каждого из изомеров при их связывании внутри андрогенного рецептора. Именно поэтому, несмотря на большое разнообразие изомерных форм, в роли активатора андрогенного рецептора выступает самый термодинамически стабильный изомер, который в настоящее время применяется в медицине и других областях — 17 β -гидрокси-10,13 β -диметиландрост-4-ен-3-он [1–8]. Его зеркально отраженная в плоскости структура (17 β -гидрокси-10,13 α -диметиландрост-4-ен-3-он) — энергетический эквивалент, тем не менее сильно уступающий в аффинности к андрогенному рецептору. Это является еще одним подтверждением высокой геометрической специфичности лиганда при образовании комплекса «тестостерон + рецептор». Данный факт потребовал более тщательного изучения взаимодействия с рецептором других, более сильных аналогов тестостерона: дигидротестостерона и метриболон.

Показано, что они являются более сильными активаторами андрогенного рецептора [7, 8, 22–24].

При исследовании положения структур в рецепторе нами было выявлено, что плоскости молекулы наиболее термодинамически стабильного изомера тестостерона (тестостерон 20), дигидротестостерона и метриболон полностью совпадают друг с другом. В то же время плоскость изомера тестостерона с номером 46 лежит внутри рецептора ровно перпендикулярно указанным изомерам (вдоль большой оси молекулы) (рис. 3).

Аффинности исследуемых молекул приведены в табл. 3. Примечательно, что тестостерон 20, дигидротестостерон и метриболон по аффинности эквивалентны: разница в свободной энергии связывания не превышает 1 ккал/моль, тогда как аффинность тестостерона 46 отличается от остальных примерно на 2 ккал/моль.

Анализ пространственного строения изучаемых биологически активных лигандов показал, что тестостерон 20, дигидротестостерон и метри-

Таблица 3. Аффинности лигандов к рецепторам 2Q7I и 1T7T

№ молекулы	Аффинность к рецептору 2Q7I, ккал/моль	Аффинность к рецептору 1T7T, ккал/моль
Тестостерон 20	–10.6	–11.0
Тестостерон 46	–9.0	–9.0
Дигидротестостерон	–10.7	–11.2
Метриболон	–9.8	–10.4

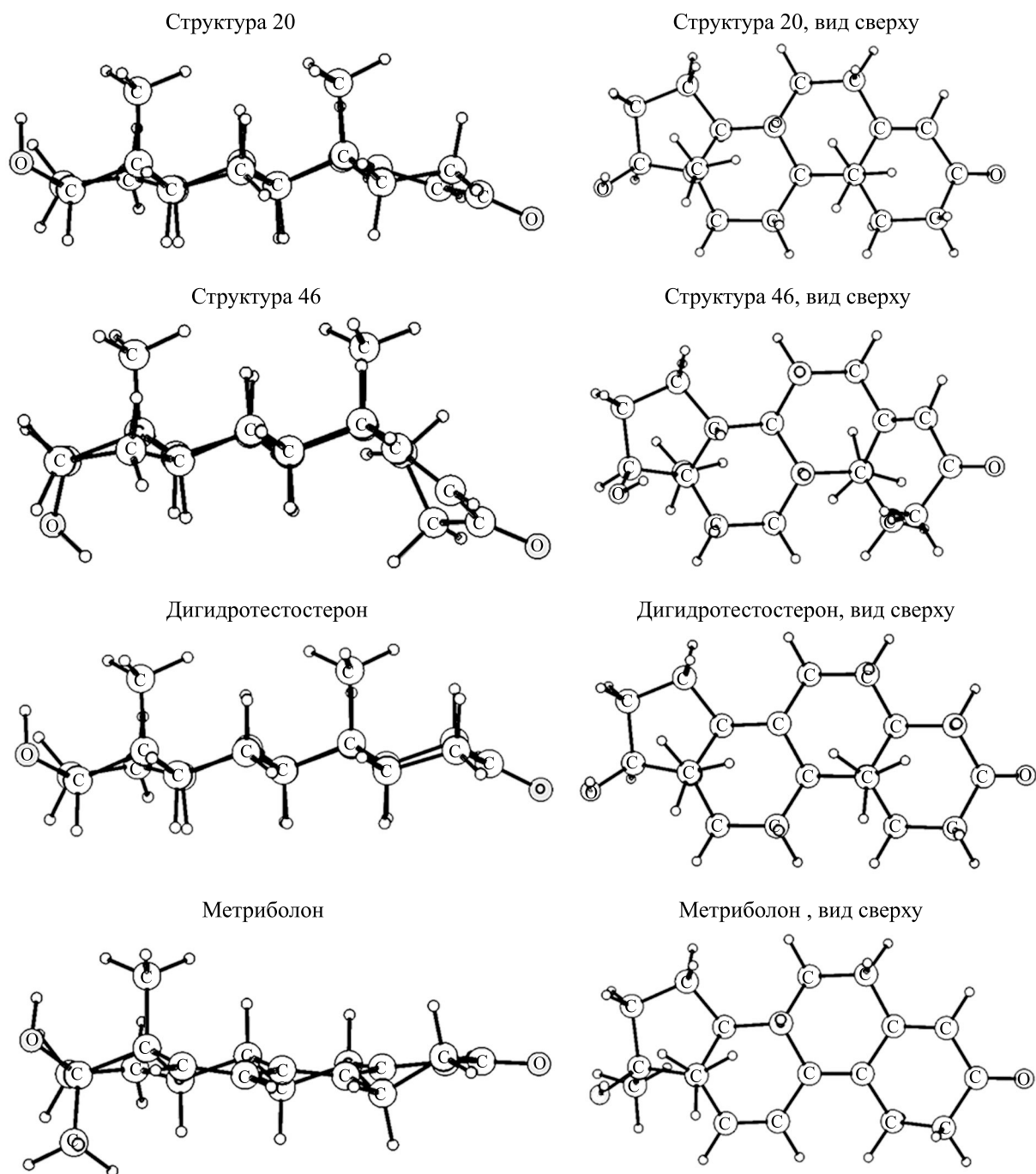


Рис. 4. Тестостерон и его аналоги.

болон являются более «плоскими» структурами по сравнению с тестостероном 46 (рис. 4).

Геометрический фактор, по-видимому, является одним из ключевых для ориентации лиганда при активации андрогенного рецептора. В ряду «тестостерон-20, дигидротестостерон, метриболол» наиболее плоским строением характеризуется метриболол, далее идет дигидротестостерон, а лишь потом тестостерон-20. Для количествен-

ной оценки степени «плоскости» каждой из молекул нами были рассчитаны величины инерциальных дефектов: $\Delta' = I_c - (I_a + I_b)$, где $I_{c(a,b)}$ – главные моменты инерции молекулы) [13, 14]. Это весьма чувствительный индикатор асимметрии формы молекулы. Следовало ожидать, что наибольшими значениями указанной величины, т.е. наименее компактными формами, будут об-

ладать «невыплощенные» молекулы, поскольку все три оси молекулы будут задействованы в расчете этой величины.

Как показал расчет, для этих структур наибольшая величина дефекта была у тестостерона-46: $\Delta' = -962.343 \text{ у.Å}^2$. Следом за ним идет тестостерон-20: $\Delta' = -510.888 \text{ у.Å}^2$ и далее дигидротестостерон ($\Delta' = -495.305 \text{ у.Å}^2$). Наконец, наиболее плоской молекулой является метриболон $\Delta' = -462.194 \text{ у.Å}^2$, как и было предсказано нами выше.

Из литературных данных известно, что самым «сильным» активатором андрогенного рецептора является метриболон, вторым по силе является дигидротестостерон и на третьем месте стоит тестостерон 20 [7, 16, 22–24].

Следует обратить внимание, что в данной работе нами детально не рассматривалось внутреннее строение андрогенного рецептора и топология его активного центра. При исследовании изомеров и аналогов тестостерона нам удалось выявить некоторые особенности взаимодействия этих биологически активных молекул с их рецептором. Следующим шагом в исследовании лигандов андрогенного рецептора будет изучение ингибиторов андрогенного рецептора, расчеты свойств этих молекул нами запланированы в следующих работах.

ВЫВОДЫ

Согласно расчетам, все изомеры тестостерона имеют высокое родство к аминокислотным остаткам в активном центре андрогенного рецептора (который представляет собой полость почти в центре глобулы).

Метильные группы являются внутренними ограничителями стереохимических изменений и перестроек разных изомеров тестостерона. Несмотря на большое разнообразие изомерных форм, самой высокой аффинностью к андрогеновому рецептору обладает самый термодинамически стабильный изомер, который в настоящее время применяется в медицине и других областях — 17 β -гидрокси-10,13 β -диметиландрост-4-ен-3-он.

Плоская пространственная структура тестостерона и других гормонов андрогенного типа имеет ключевое значение как для активации андрогенного рецептора, так и для высокой специфичности при сборке комплекса «лиганд–рецептор».

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. C. Eisenegger, J. Haushofer, and E. Fehr, *Trends Cognitive Sci.* **15** (6), 263 (2011).
2. V. Tyagi, M. Scordo, R. S. Yoon, et al., *Rev. Urol.* **19** (1), 16 (2017).
3. M. Bialek, P. Zaremba, K. K. Borowicz, and S. J. Czuczwar, *Pol. J. Pharmacol.* **56**, 509 (2004).
4. F. Saad and L. Gooren, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **114** (1–2), 40 (2009).
5. J. McHenry, N. Carrier, E. Hull, and M. Kabbaj, *Front. Neuroendocrinology* **35** (1), 42 (2014).
6. М. С. Кондратьев, А. А. Самченко, В. М. Комаров и Н. Н. Хечинашвили, *Актуальная биотехнология* **3**, 529 (2020).
7. M. H. E. Tan, J. Li, H. E. Xu, et al., *Acta Pharmacol. Sinica* **36**, 3 (2015).
8. L. Ni, R. Llewellyn, C. T. Kesler, et al., *Mol. Cell. Biol.* **8**, 26 (2013).
9. E. B. Askew, R. T. Gampe Jr, T. B. Stanley, et al., *J. Biol. Chem.* **282**, 25801 (2007).
10. E. Hur, S. J. Pfaff, E. S. Payne, et al., *PLoS Biol.* **2**, 274 (2004).
11. P. M. Matias, P. Donner, R. Coelho, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 26164 (2000).
12. М. С. Кондратьев, А. А. Самченко, В. М. Комаров и А. В. Кабанов, в сб. *Труды международ. конф. «Математика, компьютер, образование»* (Пушино, 2005), с. 899.
13. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.* **10**, 209 (1989).
14. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.* **10**, 221 (1989).
15. O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31**, 455 (2010).
16. P. B. Grino, J. E. Griffin, and J. D. Wilson, *Endocrinology* **126** (2), 1165 (1990).
17. R. Abagyan and M. Totrov, *Cur. Opin. Chem. Biol.* **5** (4), 375 (2001).
18. S. Salentin, S. Schreiber, V. J. Haupt, et al., *Nucl. Acids Res.* **43** (W1), W443 (2015).
19. H. L. Strauss and H. M. Pickett, *J. Am. Chem. Soc.* **92** (25), 7281 (1970).
20. R. Kahn, R. Fourme, D. André, and M. Renaud, *Acta Cryst.* **B29**, 131 (1973).
21. O. Bastiansen, L. Fernholt, H. M. Seip, et al., *J. Mol. Structure* **18** (2), 163 (1973).
22. H. Bojar, K. Maar, and W. Staib, *Urol. Int.* **35** (2), 154 (1980).
23. A. O. Brinkmann, G. G. J. M. Kuiper, W. de Boer, et al., *Steroid Biochem.* **24** (1), 245 (1986).
24. J. Y. Dube, R. R. Tremblay, and P. Chapdelaine, *Horm. Res.* **7** (6), 333 (1976).

Investigation of Steroids: “Keys” to Androgen Receptor

A.A. Samchenko, V.M. Komarov, and M.S. Kondratyev

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

In this work, quantum-chemical semiempirical calculations and docking have been used for the analysis of conformational multiplicity of natural and synthetic steroids. The binding of various testosterone isomers and analogs to the androgen receptor is simulated. A special attention is focused on the role of structural and thermodynamic factors in determination of the preferred testosterone isomers that likely contribute to the best interaction of testosterone in complex with the androgen receptor.

Keywords: testosterone and its analogs, electronic structure, isomers, quantum-chemical calculation, flexible docking, thermodynamic parameters

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТАХИКИНИНОВОГО ДЕКАПЕПТИДА СИАЛОКИНИНА I

© 2021 г. Г.А. Агаева

Бакинский государственный университет, AZ1148, Баку, ул. Академика З. Халилова, 23, Азербайджан

E-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию 29.12.2019 г.

После доработки 29.12.2019 г.

Принята к публикации 14.04.2021 г.

Методами молекулярной механики и молекулярной динамики исследованы особенности пространственной организации молекулы тахикининового декапептида сиалокинина I. На основе фрагментарного анализа определены стабильные пространственные структуры сиалокинина I, которые могут быть представлены в виде набора конформаций, характеризующихся относительно лабильным N-концевым трипептидом и конформационно жестким C-концевым гептапептидом. Показано, что молекула сиалокинина I предпочтительно формирует практически изоэнергетичные конформации с различными структурными типами на N-конце пептидной цепи, переходящими в виток альфа-спирали на C-конце. Методом молекулярной динамики была смоделирована картина внутримолекулярной подвижности стабильных конформаций молекулы сиалокинина I как в вакууме, так и в окружении молекул воды.

Ключевые слова: нейропептид, сиалокинина I, конформация, метод молекулярной механики, метод молекулярной динамики.

DOI: 10.31857/S0006302921050069

Широкий спектр биологической активности нейропептидов объясняется их хорошей специфической селективностью к различным типам рецепторов, которая в свою очередь реализуется благодаря конформационно-динамическим свойствам взаимодействующих молекул. Особное сходство по структуре и взаимодействию с рецепторами наблюдается между тахикининовыми нейропептидами, основными свойствами которых являются понижение артериального давления, стимулирование сокращения гладкой мускулатуры и перенос болевых ощущений. В работе [1] сообщалось, что слюна комара желтой лихорадки *Aedes aegypti* содержит пептид с фармакологическими свойствами, типичными для тахикининовых нейропептидов. Этот пептид был очищен до гомогенности; было обнаружено, что он состоит из двух пептидов: сиалокинина I и сиалокинина II, идентичного сиалокинину I, за исключением Asn в положении 1. Оба нейропептида содержат по 10 аминокислотных остатков в линейной последовательности:

— Сиалокинин I: H-Asn¹-Thr²-Gly³-Asp⁴-Lys⁵-Phe⁶-Tyr⁷-Gly⁸-Leu⁹-Met¹⁰-NH₂;

— Сиалокинин II: H-Asp¹-Thr²-Gly³-Asp⁴-Lys⁵-Phe⁶-Tyr⁷-Gly⁸-Leu⁹-Met¹⁰-NH₂.

Было выяснено [2], что сиалокинины I и II, два пептида, выделенные из слюнных желез комара желтой лихорадки, *Aedes aegypti*, являются вазодилататорами, действующими через тахикининовые рецепторы. Эти пептиды присутствуют в количестве 0.62 и 0.16 пмоль соответственно на пару слюнных желез. Как оказалось, при анализе на подвздошной кишке морской свинки оба пептида столь же активны, как и вещество Р из семейства тахикининовых пептидов млекопитающих. Известно, что сиалокинин I так же, как и все тахикинины, в той или иной мере может взаимодействовать с тремя различными типами тахикининовых рецепторов (NK1, NK2 и NK3), но является селективным агонистом NK1-рецепторов. Сиалокинин I способен инициировать ответ, связываясь с тахикининовым NK1-рецептором. Поскольку осуществление и эффективность фармакологических воздействий пептидного биорегулятора так или иначе связаны со структурной комплементарностью взаимодействующих пептида и рецептора, то для выяснения механизма биологического эффекта необходимо знание пространственного строения и конформационных возможностей пептидного биорегулятора и его эффективных структурных аналогов. Главной целью настоящей работы является исследование конформационных свойств молекулы сиалоки-

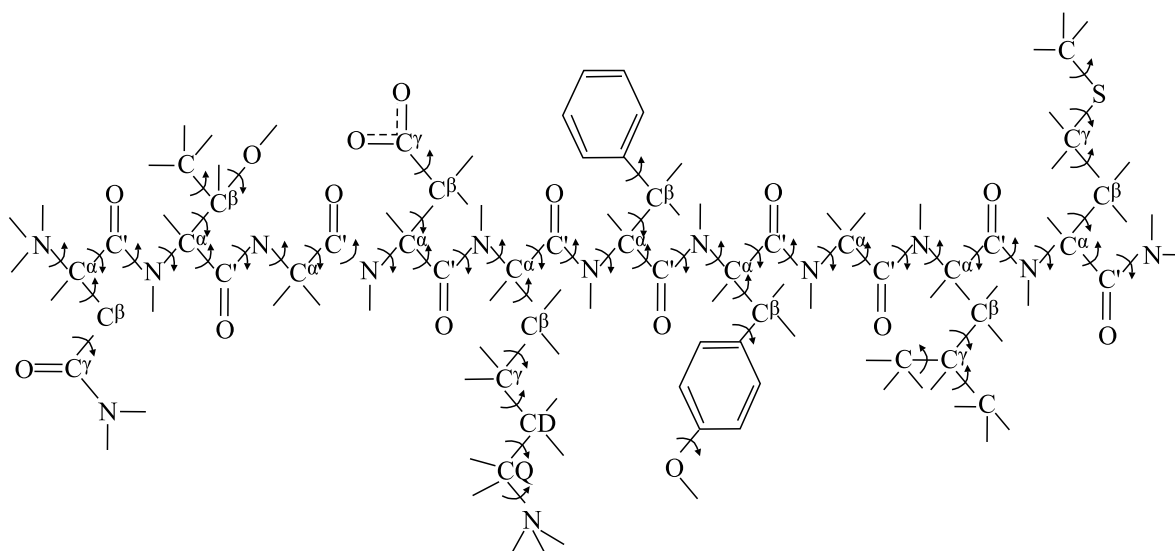


Рис. 1. Атомная расчетная модель и переменные двугранные углы молекулы сиалокинина I.

нина I с целью определения основных структурных требований, необходимых для лиганд-рецепторного взаимодействия.

МЕТОД РАСЧЕТА

Исследование пространственного строения молекулы сиалокинина I проводили методом молекулярной механики с использованием стандартной геометрии. При конформационном расчете пептидов учитывали невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. Расчет проводили согласно фрагментарному анализу молекулы. Используемая в данном исследовании классификация пептидных структур и потенциальные функции расчетной схемы полуэмпирического конформационного анализа и их параметризация описаны в работах [3–5]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [6]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов ϕ , ψ и ω основной цепи и χ_i боковых цепей. Углы ϕ и ψ основной цепи в конформациях находятся в низкоэнергетических областях стерической карты: R (ϕ , $\psi = -180^\circ \div 0^\circ$), B ($\phi = -180^\circ \div 0^\circ$, $\psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\phi = 0^\circ \div 180^\circ$, $\psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\phi = 0^\circ \div 180^\circ$, $\psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов ϕ и ψ . Поиск минимумов потенциальной энергии осуществляли методом сопряженных градиентов, ранее описанным и примененным в работах [6–8]. Расчет стабильных конформаций молекулы проводили с помощью программы, описанной в работе [9].

Отсчет двугранных углов вращения ϕ , ψ , ω и χ_i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [10].

Метод молекулярной динамики, основанный на компьютерном решении уравнения движения Ньютона, позволяет проследить конформационное поведение молекулы во времени. Достаточно широкие диапазоны этого метода позволяют обратиться к исследованию от небольших пептидных молекул до белков, как находящихся в вакууме, так и в присутствии растворителя [11, 12]. Молекулярную динамику молекул проводили в следующей последовательности: 1) ввод начальных данных; 2) минимизация энергии; 3) нагрев до 300 K; 4) равновесные симуляции; 5) молекулярное моделирование.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конформационное исследование сиалокинина I проводили в три этапа, на каждом из которых использовали результаты предшествующего этапа. В свою очередь, этапы делятся на ряд последовательно решаемых структурных задач. Расчетная атомная модель молекулы сиалокинина I и схема расчета приведены на рис. 1 и 2 соответственно. Первый этап расчета включал рассмотрение конформационных возможностей ряда дипептидных фрагментов согласно схеме расчета. На основе низкоэнергетических конформаций монопептида Gly и двух дипептидных фрагментов Phe⁶-Tyr⁷ и Leu⁸-Met¹⁰NH₂ были рассчитаны стабильные конформации C-концевого пентапептидного участка Phe⁶-Met¹⁰NH₂, одинакового для некоторых тахикининов. Полученные на первом этапе

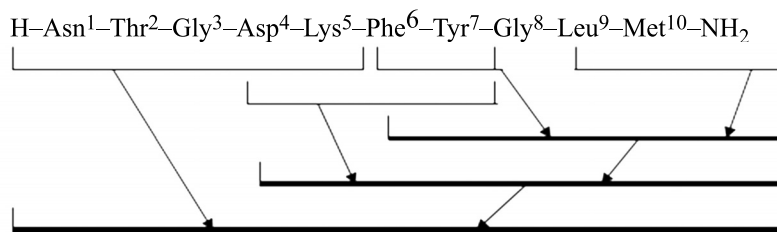


Рис. 2. Схема фрагментарного расчета молекулы сиалокинина I.

исследования низкоэнергетические конформации перекрывающихся пентапептидов H-Asn¹-Thr²-Gly³-Asp⁴-Lys⁵ и H-Asn¹-Thr²-Gly³-Asp⁴-Tyr⁷, которые, в свою очередь, были изучены на основе оптимальных структур соответствующих дипептидов, позволили последовательно рассмотреть конформационные возможности сначала С-концевого гептапептида Asp⁴-Met¹⁰NH₂ и, наконец, всей молекулы сиалокинина I, декапептида Asn¹-Met¹⁰NH₂. Из аминокислотной последовательности сиалокинина I видно, что в С-концевой части этой молекулы сосредоточены главным образом остатки с объемными гидрофобными боковыми цепями. Согласно экспериментальным данным, именно гидрофобный участок молекулы, локализованный на С-конце, ответственен за связывание с рецептором на поверхности реагирующей клетки. Надо отметить, что этот пентапептид считается сигнальной последовательностью для тахикининов. Почти все остатки, составляющие этот пентапептид, являются носителями объемных неполярных боковых цепей. Исключение составляет остаток глицина, у которого нет боковой цепи.

Для уменьшения числа возможных начальных приближений для С-концевого пентапептида сначала были определены оптимальные конформации составляющих его дипептидных фрагментов Phe-Tyr и Leu-Met. Начальные приближения дипептидов были составлены на основе низкоэнергетических конформационных состояний соответствующих монопептидов. Конформационный анализ этих дипептидов выявил для каждого из них набор разрешенных конформационных состояний, которые послужили основой для выбора начальных структурных вариантов для С-концевого пентапептида. При составлении вариантов для пентапептида были учтены конформационные особенности остатка Gly, отсутствие боковой цепи которого придает ему большую подвижность в пептидной цепи. Кроме того, в начальных вариантах пентапептида учитывали взаимные расположения боковых цепей остатков в пептидной цепи в зависимости от типа шейки.

Энергетически предпочтительной для пентапептида оказалась α -спиральная структура (R₂R₂RR₂₁R₃₂), принадлежащая *ffff*-шейпу. Как типичная α -спиральная структура, эта конформация стабилизируется двумя водородными связями между пептидными звеньями остатков *i* и *i* + 4 вдоль основной цепи. Спиральный виток способствует сближению N- и С-концевых участков фрагмента, о чем свидетельствует водородная связь NH(Met¹⁰)...CO(Phe⁶). При этом бензольное кольцо боковой цепи Phe⁶ сильно сближено с боковыми цепями остатков Leu⁹ и Met¹⁰, что благоприятствует образованию эффективных взаимодействий между ними.

Затем, согласно схеме расчета молекулы сиалокинина I, были исследованы конформационные возможности двух перекрывающихся фрагментов Asn¹-Lys⁵ и Asp⁴-Tyr⁷. Начальные структурные варианты для данных фрагментов были составлены с учетом особенностей всех восьми возможных для тетрапептидов шейпов. Самыми низкоэнергетическими конформациями свободного пентапептидного участка Asn¹-Lys⁵ оказались структуры α -спирального типа. Результаты расчетов конформаций N-концевого тетрапептида свидетельствуют о заметной конформационной лабильности этого свободного фрагмента. В последовательности следующего тетрапептидного фрагмента Asp⁴-Lys⁵-Phe⁶-Tyr⁷ также имеются противоположно заряженные остатки, как в предыдущем тетрапептиде. Как показал расчет, и для данного тетрапептида энергетически предпочтительными оказались α -спиральные конформации. α -Спиральная конформация R₁R₂₂R₂R₂ стабилизируется двумя водородными связями, образуемыми атомами пептидных звеньев. Эти водородные связи являются характерными для правой -спирали. Расчет конформаций тетрапептида Asp⁴-Tyr⁷ в свободном состоянии также показал, что этот сегмент имеет тенденцию к формированию менее стабильных полуизгибных форм. Исследование конформационных особенностей биологически активного С-концевого гептапептида сиалокинина I: Asp⁴-Ser⁵-Phe⁶-

Таблица 1. Энергетические вклады внутри- и межостаточных взаимодействий в самых низкоэнергетических конформациях молекулы сиалокинина I

	Asn ¹	Thr ²	Gly ³	Asp ⁴	Lys ⁵	Phe ⁶	Tyr ⁷	Gly ⁸	Leu ⁹	Met ¹⁰	№ остатка
I	1.3	−2.0	−0.9	−9.0	−1.4	−0.1	0.1	0.0	0.3	0.3	Asn ¹
II	3.7	−0.5	−2.2	−5.0	−1.7	−0.1	−0.1	−1.7	−3.4	0.0	
I		3.3	−0.6	−4.0	−1.7	−2.0	−0.1	0.0	0.1	0.4	Thr ²
II		2.6	−1.5	−4.5	−0.1	0.0	0.1	−1.2	−0.4	0.2	
		I	0.5	−0.9	−1.0	−1.9	−2.1	−0.1	0.0	0.0	Gly ³
		II	0.5	−2.1	−0.3	0.0	0.0	−0.3	0.0	0.0	
			I	2.2	−0.6	−11.1	−1.6	−1.9	−0.1	−0.4	Asp ⁴
			II	2.6	−1.8	−4.3	−3.2	−3.7	−1.0	−0.5	
				I	1.1	−0.2	−1.0	−1.5	−1.9	−0.2	Lys ⁵
				II	1.6	−2.3	−0.3	−0.3	−2.4	−0.2	
					I	0.0	−2.7	−1.0	−1.9	−4.2	Phe ⁶
					II	0.0	−0.7	−1.0	−1.4	−1.5	
						I	0.9	0.7	−1.1	−2.6	Tyr ⁷
						II	1.1	0.8	−1.2	−2.5	
							I	1.2	−0.7	−0.8	Gly ⁸
							II	1.2	−0.7	−0.8	
								I	−1.0	−3.6	Leu ⁹
								II	−1.0	−3.6	
									I	−2.4	Met ¹⁰
									II	−2.3	

Примечание. I – Конформация R₂₂R₃₃RR₁R₂₂R₂R₂RR₂₁R₃₂, II – конформация B₂₂R₂₂RB₁B₃₂R₃R₁RR₂₁R₃₂.

Val⁷-Gly⁸-Leu⁹-Met¹⁰NH₂ проводили на основе стабильных конформаций перекрывающихся по двум остаткам тетрапептида Asp⁴-Val⁷ и С-концевого пентапептида Phe⁶-Met¹⁰NH₂. При расчете учитывали конформации С-концевого пентапептида с относительной энергией до 7.5 ккал/моль и стабильные конформации всех восьми шейпов тетрапептида Asp⁴-Val⁷. Для данного фрагмента энергетически предпочтительными оказались α-спиральные конформации. Расчет конформаций гептапептида позволяет сделать заключение, что этот С-концевой фрагмент сиалокинина I обладает заметной конформационной ограниченностью. Это подтверждается наблюдаемой существенной дифференциацией шейпов, поскольку из 64 рассмотренных шейпов в интервал относительной энергии 0–10 ккал/моль попадают только 12. Глобальная α-спиральная конформация образует характерные для спирали водородные связи между атомами кислорода карбонильной группы и атомами водорода амидной группы пептидных звеньев: NH(Gly⁸)-OC(Asp⁴), NH(Leu⁹)-OC(Ser⁵) и NH(Met¹⁰)-OC(Phe⁶).

Для расчета стабильных конформаций всей молекулы сиалокинина I были выбраны стабильные конформации гептапептида Asp⁴-Met¹⁰NH₂,

относительная энергия которых не превышает 10 ккал/моль. В результаты расчетов энергетически предпочтительными и многочисленными оказались структуры, содержащие α-спираль на С-концевом гептапептиде. Иерархия предпочтительных структур спирального типа при переходе от гептапептидного фрагмента к декапептиду сохраняется. По-прежнему энергетически предпочтительны конформации, в которых α-спираль формируется на С-конце молекулы. В табл. 1 приведены энергетические вклады межостаточных взаимодействий в двух стабильных конформациях сиалокинина I. Сопоставление суммарных энергетических вкладов ди-, три-, тетра-, пента- и более дальних взаимодействий, образуемых этими структурами, показало, что α-спиральная конформация стабилизируется, как и следовало ожидать, за счет эффективных тетра- и пентапептидных взаимодействий, суммарный вклад которых составляет −33.8 ккал/моль, а суммарный энергетический вклад ди- и трипептидных взаимодействий этой структуры равен −21.5 ккал/моль. Вторая конформация B₂₂R₂₂RB₁B₃₂R₃R₁RR₂₁R₃₂ стабилизируется главным образом за счет эффективных ди- и трипептидных, а также тетра- и пентапептидных взаимодействий, суммарные вклады которых составляют соответственно −27.0 ккал/моль и −21.8 ккал/моль.

Эта конформация, в отличие от α -спиральной конформации, стабилизируется также эффективными окта- и нонапептидными взаимодействиями, общий вклад которых составляет -8.6 ккал/моль. Образование дальних взаимодействий свидетельствует о наличии поворота пептидной цепи в этой конформации. И действительно, как показал расчет, в N-концевой части конформации $B_{22}R_{22}RB_1B_{32}R_3R_1RR_{21}R_{32}$ формируются подряд два β -загиба, о чем свидетельствуют величины расстояний между атомами C^α остатков Asn¹ и Asp⁴, а также между атомами C^α остатков Asp⁴ и Tyr⁷, которые соответственно составляют 6.5 и 6.8 Å. Тем самым эти результаты подтверждают, что данная конформация реализует два β -загиба на N-концевом участке пептидной цепи.

Надо отметить, что в энергетически предпочтительных конформациях практически сохранены все эффективные межостаточные взаимодействия, образованные в низкоэнергетических конформациях соединяемых свободных фрагментов. Так, например, в α -спиральной конформации целой молекулы сохраняется эффективное взаимодействие между остатками Asn¹ и Asp⁴ (-9.0 ккал/моль), возникшее сначала в глобальной структуре его N-концевого тетрапептидного фрагмента. Другое эффективное взаимодействие между противоположно заряженными остатками Asp⁴ и Lys⁵ (-11.1 ккал/моль) также сохраняется.

Следует отметить, что образование низкоэнергетических конформаций декапептида сопровождается образованием внутримолекулярных водородных связей. Расчет показал, что в α -спиральной конформации образуется система регулярных водородных связей, характерных для правой α -спирали: NH(Lys⁵)...CO(Asn¹), NH(Phe⁶)...CO(Thr²), NH(Tyr⁷)...CO(Lys⁵), NH(Gly⁸)...CO(Asp⁴), NH(Leu⁹)...CO(Lys⁵) и NH(Phe⁶)...CO(Met¹⁰).

Конформационный анализ последовательно наращиваемых C-концевых фрагментов молекулы сиалокинина I выявил значительную преемственность результатов по мере увеличения длины рассматриваемой пептидной цепи. Действительно, начиная от C-концевого пентапептида и кончая декапептидамом от фрагмента к фрагменту энергетически предпочтительными оказывались α -спиральные конформации. Конформационный анализ каждого из рассматриваемых C-концевых фрагментов выявил ограниченный набор наиболее вероятных их конформаций и достаточно четко определил стабилизирующие эти структуры силы. Был также проведен поиск дополнительных локальных минимумов для боковых цепей каждого из остатков в поле стабильных конформационных состояний молекулы. В ре-

зультате этой процедуры были определены ключевые остатки, играющие существенную структурообразующую роль в пространственной организации молекулы сиалокинина I. В табл. 2 приведены величины двугранных углов двух стабильных конформационных состояний сиалокинина I. Как видим, в результате расчетов были определены энергетически предпочтительные области двугранных углов, взаимное расположение остатков и выявлена тенденция к образованию регулярной α -спиральной структуры в низкоэнергетических конформациях сиалокинина I. Было показано, что возможность образования развернутых структур по сравнению со свернутой спиральной формой выше на N-конце и ниже на C-конце этой молекулы.

Можно предположить, что молекула сиалокинина I в среде, моделирующей мембрану, формирует α -спиральный сегмент на участке C-концевой последовательности и имеет относительно подвижный N-конец. По-видимому, в зависимости от окружающей среды молекула сиалокинина I может принимать ту или иную оптимальную конформацию. Можно предположить, что α -спиральный сегмент на C-конце сиалокинина I является минимальным структурным элементом, необходимым для связывания с рецептором, а N-концевая часть этого пептида может выполнять двойную роль с одной стороны стабилизировать конформацию целой молекулы, а с другой — обеспечивать селективность к NK1 рецептору.

Таким образом результаты исследования показали, что N-концевая тетрапептидная последовательность пептида является относительно подвижным участком и способным образовывать бета- и гамма-изгибы благодаря наличию в цепи остатка глицина. В то же время C-концевая гептапептидная часть молекулы в стабильных конформационных состояниях энергетически предпочтительно формирует альфа-спиральную структуру. В результате расчетов были определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и взаимное расположение остатков в стабильных конформациях сиалокинина I. Конформационный анализ последовательно наращиваемых C-концевых фрагментов молекулы сиалокинина I выявил значительную преемственность результатов по мере увеличения длины рассматриваемой пептидной цепи. Полученные низкоэнергетические конформации молекулы сиалокинина, входящие в интервал относительной энергии $0-10$ ккал/моль, можно представить в виде отдельных семейств конформаций, характеризующиеся одинаковой структурой C-концевого гептапептида. Внутри каждого семейства конформации различаются структурным типом N-концевого фрагмента, который продолжен относительно жестким участком последовательности $5-10$. На втором этапе исследования

Таблица 2. Величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков декапептида сиалокинина I в низкоэнергетических конформациях

Остаток	№ конформации	Основная цепь			Боковая цепь				
		φ	ψ	ω	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	χ_5
Asn ¹	I	–57	–57	176	182	–90	–	–	–
	II	–55	–59	177	179	–89	–	–	–
Thr ²	I	–85	–39	179	–59	–68	188	–	–
	II	–67	–51	179	180	180	179	–	–
Gly ³	I	–69	–39	183	–	–	–	–	–
	II	–165	170	187	–	–	–	–	–
Asp ⁴	I	–78	–34	181	–60	89	–	–	–
	II	–60	165	175	60	90	–	–	–
Lys ⁵	I	–75	–35	180	180	180	180	180	180
	II	–63	–47	174	–60	180	180	180	180
Phe ⁶	I	–66	–41	179	178	90	–	–	–
	II	–55	–53	176	–64	91	–	–	–
Tyr ⁷	I	–78	–38	177	173	179	179	–	–
	II	–56	–44	179	73	180	180	–	–
Gly ⁸	I	–59	–37	182	–	–	–	–	–
	II	–63	–45	182	–	–	–	–	–
Leu ⁹	I	–82	–62	186	176	64	59	58	–
	II	–62	–58	186	176	64	59	58	–
Met ¹⁰	I	–91	–52	178	–60	180	180	180	–
	II	–60	–37	179	–60	180	180	180	–

Примечание. I – Конформация R₂₂R₃₃RR₁R₂R₂RR₂₁R₃₂ ($E_{\text{отн}} = 0.0$ ккал/моль), II – конформация R₂₂R₂₂BR₁R₃R₃R₁RR₂₁R₃₂ ($E_{\text{отн}} = 1.3$ ккал/моль).

использовался метод молекулярной динамики, который позволил моделировать картину внутри-молекулярной подвижности молекулы сиалокинина I. В качестве начальных приближений были использованы 10 наиболее стабильных конформационных состояний молекулы. Молекулярно-динамическое моделирование для молекулы сиалокинина I в конформации с минимальным значением полной энергии проводилось сначала в условиях вакуума, а затем в гипотетическом кубическом объеме с молекулами воды с наложенными периодическими граничными условиями. Размер ящика с водой подбирался в соответствии с размерами исследуемой молекулы. Далее проводилась релаксация молекул с учетом реального водного окружения молекул. Для имитации водного окружения частота столкновений атомов с молекулами воды была задана равной 50 пс^{–1}. Исходная структура и оптимизированная структура молекулы сиалокинина I в условиях вакуума и явно заданного водного окружения представлены на рис. 3.

Согласно результатам проведенного расчета, молекула сиалокинина I сохраняет свернутый характер пептидной цепи до и после оптимизации. В стабильных конформациях водородные связи между СО и NH-группами пептидной цепи не разрушаются в процессе молекулярной динамики, несмотря на изменения во внутримолекулярной энергии нейропептида на 10–15 ккал/моль. Устойчивость структуры отдельных фрагментов подтверждают также значения двугранных углов в основной цепи молекулы. Полученные данные позволяют заключить, что нейропептид сиалокинин I содержит устойчивые элементы пространственной структуры, которые могут быть ответственны за формирование конформаций, необходимых для связывания с рецепторами тахикининов. Допустимые изменения величин двугранных углов внутреннего вращения при моделировании МД в вакууме и водном окружении наблюдаются и в самой предпочтительной энергетически конформации молекулы. Согласно полученным расчетным результатам, в течение симуляции в вакууме молекулярного движения в предпочтительной конформации молекулы сиа-

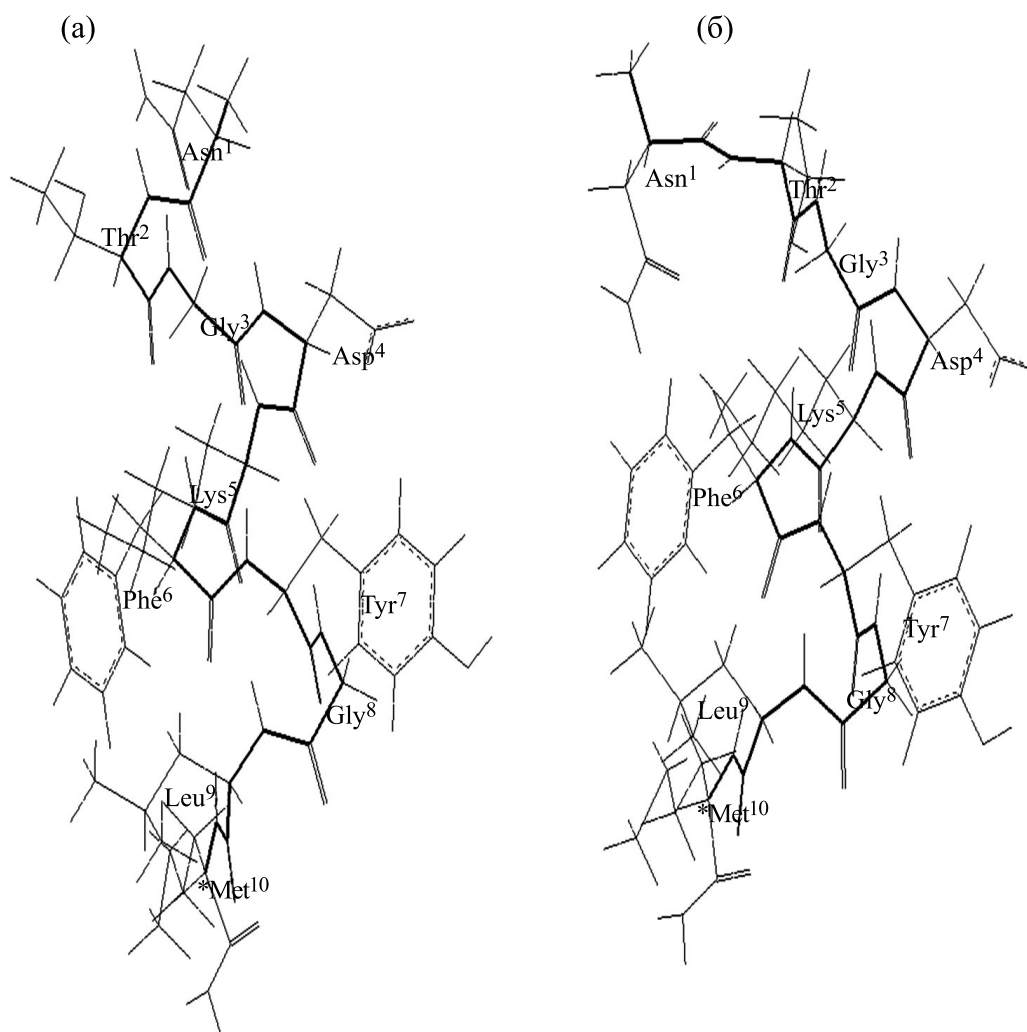


Рис. 3. Оптимизированная структура молекулы сиалокинина I в условиях вакуума (а) и явно заданного водного окружения (б). Жирной линией указан ход основной цепи.

локинина I имеют место заметные флуктуации остатков, главным образом, в N-концевой части молекулы. Следует отметить, такая тенденция к изменению конформационного состояния остатка Gly³ в пределах глобальной конформации молекулы наблюдалась и в результатах теоретического конформационного анализа, т.е. были получены несколько сравнимых по стабильности конформаций, различающихся лишь конформационным состоянием остатка Gly³. Эти результаты могут быть полезны при исследовании механизма действия сиалокинина I и создании новых, более эффективных аналогов нейропептидов этого семейства.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. M. C. Ribeiro, J. Exp. Biol. **165**, 61 (1992).
2. D. E. Champagne and J. M. C. Ribeiro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 138 (1994).
3. H. A. Scheraga, Biopolymers **22**, 1 (1983).
4. G. Nemethy, M. S. Pottle, and H. A. Scheraga, J. Phys. Chem. **87**, 1883 (1983).
5. F. A. Momany, R. F. McGuire, A. W. Burgess, and H. A. Scheraga, Phys. Chem. **79**, 2361 (1975).
6. E. M. Popov, Int. J. Quant. Chem. **16**, 707 (1979).
7. G. A. Agaeva, N. N. Kerimli, and N. M. Godjaev, Biofizika (Russian) **50** (2), 203 (2005).

8. G. A. Agaeva, N. N. Kerimli, and N. M. Godjaev, *Biofizika* (Russian) **50** (3), 404 (2005).
9. I. S. Maksumov, L. I. Ismailova, and N. M. Godjaev, *J. Struct. Khim.* **24** (4), 147 (1983).
10. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains, *Pure Appl. Chem.* **40**, 291 (1974).
11. W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179 (1995).
12. J. A. McCammon and S. C. Harvey, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids* (Cambridge Univ. Press, N. Y., 1987).

Conformational Particularities of Tachykinin-like Decapeptide Sialokinin I

G.A. Agaeva

Baku State University, ul Akademika Z. Khalilova 23, Baku, AZ1148 Azerbaijan

Molecular mechanics and molecular dynamics methods have been used for investigation of the spatial structure of tachykinin-like decapeptide sialokinin I. The determination of the stable structures of sialokinin I has been performed with the fragment analysis. These structures can be described as a set of conformations which have relatively variable N-terminal tripeptide and conformational valid C-terminal heptapeptide. It is shown that molecules of sialokinin I represent tend to form practically isoenergetic conformations at the N-terminus of a peptide chain which are able to convert into an alpha-helical turn at the C-terminal position. Molecular dynamics has been used for simulation of a picture of intramolecular dynamics of stable conformations of sialokinin I molecule both in vacuum and with the surrounding water molecules.

Keywords: neuropeptide, sialokinin I, conformation, molecular mechanics method, molecular dynamics method

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРОДИМЕРА UxuR-ExuR С КОМПОНЕНТАМИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУТИ УТИЛИЗАЦИИ ГЕКСУРОНАТОВ В *Escherichia coli*

© 2021 г. Ю.А. Пуртов*, **, С.В. Тищенко*, А.Д. Никулин*

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

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

E-mail: yapurtov@yahoo.com

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

После доработки 27.05.2021 г.

Принята к публикации 28.05.2021 г.

Фактор транскрипции UxuR является репрессором ряда генов катаболизма гексуронатов. Он может образовывать гетеродимеры со своим паралогом ExuR, что в присутствии глюкуроната ведет к активации репрессируемых UxuR генов. Ранее методом гибкого последовательного молекулярного докинга было предсказано, что сахара связываются с междоменными линкерами UxuR и ExuR, влияя на взаимное расположение доменов белков. Аналогичные расчеты на моделях гетеродимера UxuR-ExuR, соответствующих четырем точкам его молекулярно-динамической симуляции, тоже предсказывают связывание сахаров с междоменными линкерами. Изменения в конформации белка модулируют место и степень аффинности такого взаимодействия. Выдвигается гипотеза о появлении более стабильных комплексов UxuR-ExuR-глюкуронат с повышенной аффинностью связывания с некоторыми конформациями междоменных линкеров белков. Это уменьшает число свободных мономеров, а значит, и гомодимеров UxuR в присутствии этих сахаров, и снижает репрессию UxuR его регулона.

Ключевые слова: гетеродимер UxuR-ExuR, регуляция транскрипции, гексуронаты, гибкий молекулярный докинг, конформационные изменения белка.

DOI: 10.31857/S0006302921050070

Основным способом реакции прокариот на внешние трофические стимулы является избирательное модулирование транскрипционной активности соответствующих генов. Ферменты, вовлекаемые в метаболические пути, как правило, организованы в опероны и находятся под общим контролем транскрипционных факторов, зачастую чувствительных к компонентам контролируемых метаболических путей.

Необходимость связывания с низкомолекулярным лигандом, который является субстратом либо продуктом регулируемых ферментативных реакций, показана для многих белков-регуляторов транскрипции. Для некоторых транскрипционных факторов механизм активации при связывании с лигандом хорошо изучен и считается общим в пределах как минимум семейства этих факторов. Как правило, при взаимодействии с лигандом индуцируются изменения в конформации белка.

Представитель GntR-семейства транскрипционных факторов белок NagR из *Bacillus subtilis*

контролирует метаболизм N-ацетилглюкозамина [1], который связывается с С-концевым доменом белка, приводя к изменению конформации междоменного линкера, что, в свою очередь, влияет на ДНК-связывающие свойства NagR. При взаимодействии представителя ROK-семейства глюкокиназы SgGlcA из *Streptomyces griseus* с глюкозой [2] происходят структурные изменения в междоменном участке С-концевого домена белка, в результате которых SgGlcA взаимодействует с ДНК. Аналогичная схема активации регуляторов транскрипции наблюдается в LacI/GalR-семействе, классическим представителем которого является регулятор лактозного оперона [3]. У белков-регуляторов этого семейства функционально важны два структурно подвижных участка. В линкере между ДНК- и эффекторсвязывающими доменами возможно образование спирального участка «hinge helix», необходимого для специфического узнавания ДНК [4–7]. Между N- и С-концевыми субдоменами С-концевого домена, который является мишенью для связывания с мо-

лекулами-эффекторами, также возможно образование «шарнира», что приводит к переориентации N-концевого субдомена C-концевого домена и смещению «hinge helix» и N-концевого домена в позицию, которая способствует связыванию с ДНК.

Таким образом, подвижные малоструктурированные участки белка являются удобной мишенью для взаимодействия с молекулами-эффектора и через изменение конформации таких участков часто происходит модулирование активности содержащих их транскрипционных факторов.

Транскрипционный репрессор UxuR и его паралог ExuR (совпадение последовательности 45%) контролируют транскрипцию генов ключевых ферментов пути Эшвелла, в ходе которого гексуронаты и гексуроновые кислоты адаптируются для включения в цикл гликолиза [8–10]. Оба этих двухдоменных белка относятся к GntR-семейству транскрипционных факторов [10, 11] и функционально активны в форме димеров. N-концевой ДНК-связывающий домен имеет типичный wHtH-мотив [12], C-концевой эффекторсвязывающий димеризационный домен более разнороден по структуре. В зависимости от структуры C-домена выделяют семь подсемейств, различающихся количеством альфа-спиралей и наличием/количеством бета-слоев [13]. Белки UxuR и ExuR относятся к FadR-подсемейству GntR-семейства транскрипционных факторов.

Поскольку интермедиаты путей Эшвелла и Энтнера–Дудорова могут влиять на взаимодействие UxuR с ДНК [14], методом молекулярного докинга была изучена возможность образования комплексов мономерных форм этих белков с различными сахарами [15]. Были предсказаны места взаимодействия лигандов (сахаров, молекул-эффекторов) с белками, найдены два участка на молекуле UxuR и один — на ExuR. Оба белка связывали лиганды на поверхности междоменного линкера, причем общая область связывания занимала участок больший, чем необходим для связывания одного лиганда, а значения аффинности лигандов не предполагали явной предпочтительности какого-либо лиганда перед другими. Второй сайт взаимодействия UxuR с лигандом (наиболее вероятные кандидаты — D-фруктуронат, D-галактуронат и D-глюкуронат) располагался между альфа-спиралями C-концевого домена [16]. Аналогичные результаты по взаимодействию UxuR с лигандами были получены для димерной формы белка [17]. Как и в случае мономера белка, наблюдались два места связывания лигандов. Один располагался на поверхности, формируемой междоменными линкерами димера и, частично, первой альфа-спиралью N-концевого домена, второй — в кармане внутри C-концевого домена. Второй сайт в димерной форме белка,

так же как и в мономерной, был доступен D-фруктуронату, D-галактуронату и D-глюкуронату. Предполагается, что проникновение лигандов внутрь C-концевого домена белка провоцирует реорганизацию расположения альфа-спиралей домена и, как следствие, влияет на ориентацию междоменного линкера и ориентацию N-концевого домена относительно C-концевого.

В присутствии глюкуроната UxuR и ExuR способны образовывать гетеродимер [16], в результате чего происходит активация репрессируемых UxuR генов. Таким образом, ExuR может считаться фактором, снимающим в присутствии глюкуроната репрессорный эффект белка UxuR, что объясняет запуск бактериями процесса утилизации гексуронатов при их наличии в среде. Неясно, однако, какие структурные факторы делают более предпочтительным образование комплекса «UxuR–ExuR–гексуронат(глюкуронат)», чем комплексов гомодимерных форм этих белков с сахарами. Одним из путей исследования этого вопроса является построение модели гетеродимера в комплексе с различными лигандами и сравнение этих моделей с ранее полученными данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовавшиеся в работе модели молекул сахаров. В работе были использованы модели сахаров альфа-D-глюкозы, D-фруктуроната, D-галактуроната, D-глюконата и D-глюкуроната. 3D-модели сахаров получены из PubChem DB и подготовлены для моделирования с помощью программы OpenBabel (v. 2.2.3) [18]. Также были использованы фосфорилированные производные глюкозы (альфа-D-глюкозо-6-фосфат) и фруктозы (фруктозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат). 3D-модели этих сахаров получены из PubChem или ChemSpider и подготовлены для моделирования с помощью пакета программ Avogadro (v. 1.2.0.) [19].

Реконструкция димера UxuR. Реконструкция трехмерной структуры димера UxuR осуществлена с использованием аминокислотной последовательности UxuR *Escherichia coli* K-12 MG1655 (T00007 KEGG K13637) [14], а димера ExuR — с использованием аминокислотной последовательности UxuR *Escherichia coli* K-12 MG1655 (T00007 KEGG K19775) [10]. Поиск модели и реконструкцию белка проводили с помощью онлайн-ресурса SWISS-MODEL [20]. За основу был взят белок GntR из *Streptococcus agalactiae* (PDB 6az6) [21] с совпадением по последовательности 27.9% для UxuR и ExuR.

Реконструкция гетеродимера UxuR и ExuR на основе полученной в SWISS-MODEL модели проведена с использованием пакета программ

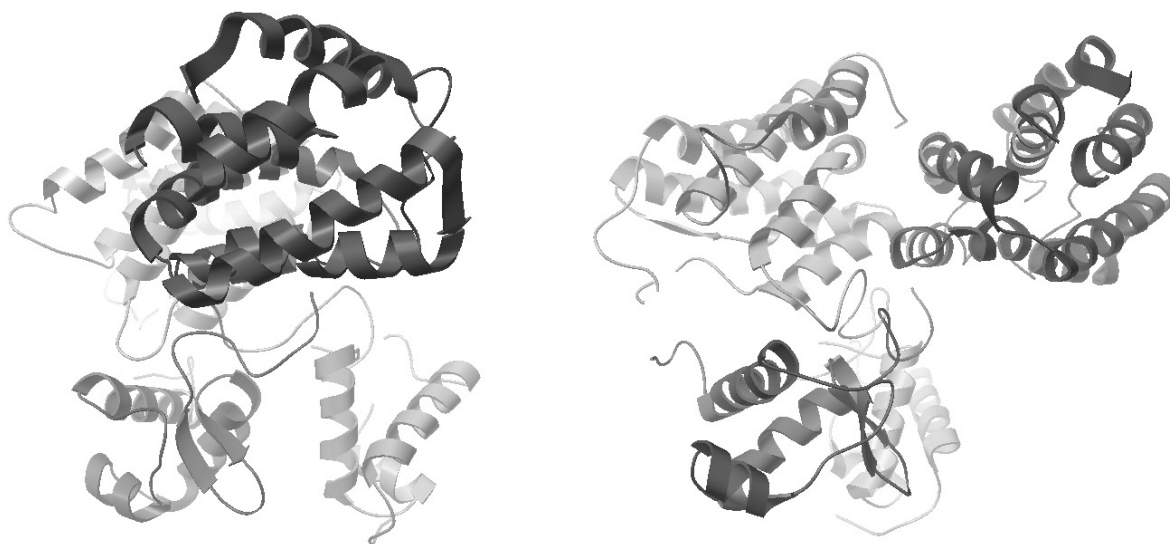


Рис. 1. Структура гетеродимера UxuR-ExuR, полученная на 100-й наносекунде молекулярно-динамической симуляции. Светло-серым цветом выделен мономер ExuR, темно-серым цветом — мономер UxuR. Структура гетеродимера представлена в двух проекциях, развернутых на 90° относительно друг друга, N-конец белка внизу.

Swiss-PdbViewer (v. 4.1.0) [22]. Полученная структура проведена через молекулярно-динамическую симуляцию для изучения позиционной вариативности атомов в белке и выбора структур для докинга. Для этого использовали пакет программ OpenMMZephyr (v. 2.0.3) [23]. Симуляцию проводили при температуре 310.15 K в силовом поле Amber96 и среде «accurate water» в течение 100 нс. В качестве мишеней для докинга использовали структурные модели белка, соответствующие 50-й (далее 50 нс), 60-й (далее 60 нс), 90-й (далее 90 нс) и 100-й наносекунде (далее 100 нс) молекулярно-динамической траектории, что позволяло сравнить изменения структуры как на относительно коротком (10 нс), так и на более продолжительном (50 нс) периоде времени.

Гибкий молекулярный докинг. Гибкий молекулярный докинг осуществляли с использованием программного ресурса Autodock VINA package [24]. Все потенциально подвижные связи в структуре каждого лиганда сохраняли гибкими. Для каждого лиганда были определены места предпочтительного связывания и рассчитаны значения ΔG (аффинность; чем больше изменение G , тем выше аффинность). Методом последовательного докинга определена заселенность каждой выявленной поверхности взаимодействия с лигандами. Для этого производилась серия последовательных расчетов, в каждом из которых учитывались результаты предыдущих раундов докинга, при этом лиганды с самой большой аффинностью последовательно добавлялись к мишени и полученные комплексы использовались в следующем раунде докинга. Для каждого углевода проводили по десять последовательных итераций.

Для визуализации результатов докинга использовали AutoDockToolsPython Molecular viewer (v. 1.5.6) [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура гетеродимера UxuR-ExuR. В соответствии с общим планом организации транскрипционных факторов семейства GntR входящие в состав гетеродимера мономеры UxuR и ExuR были смоделированы как двухдоменные белки с ДНК-связывающими N-концевыми доменами, димеризационными/эффекторсвязывающими C-концевыми доменами и слабоструктурированными линкерами между доменами. Для проверки стабильности полученной структуры и изучения позиционной вариативности атомов в белке гетеродимер UxuR-ExuR был проведен через молекулярно-динамическую симуляцию с продолжительностью траектории 100 нс (рис. 1).

N-концевой домен ExuR (Met1-Glu59) формировал три альфа-спирали, соответствующие мотиву wHtH. Заметной вариативности структуры не наблюдалось, альфа-спирали были стабильны с редкими и временными смещениями на один аминокислотный остаток в какую-либо сторону. Для модели, соответствующей 90 нс, на участке Glu2-Glu5 однократно формировалась структура, подобная бета-слою. N-концевой домен UxuR (Met1-Lys60) организован аналогичным образом, альфа-спирали также оставались достаточно стабильны. В неструктурированных участках домена могли временно формироваться структуры, подобные бета-слою (Thr25-Tyr285 на структуре, соответствующей 50 нс).

С-концевой домен белков UxuR и ExuR сформирован семью альфа-спиралями, что соответствует структурам гомологичных белков подсемейства FadR. В ExuR С-концевой домен включал в себя аминокислотные остатки с Pro94 по Ser258. Формирующие этот домен альфа-спирали и их взаимная конфигурация сохраняли стабильность на всех рассмотренных точках молекулярно-динамической траектории за исключением незначительных смещений на один-три аминокислотных остатка или незначительных временных деформаций альфа-спиралей. В неструктурированных участках могли возникать структуры, подобные бета-слою (Gln115-Thr117 — в структуре, соответствующей траектории 50 нс; Gln141-Asp143 и Phe226-Glu228 — в структуре, соответствующей траектории 60 нс; Ser140-Thr142 — в структуре, соответствующей траектории 100 нс). С-концевой домен UxuR сформирован аминокислотными остатками с Pro95 по Ala257. Аналогично ExuR, образующие этот домен UxuR альфа-спирали и их взаимная ориентация оставались стабильны с незначительными вариациями размещения и низкой степенью деформации структуры. Небольшие подобные бета-слоям участки временно возникали в неструктурированных участках домена (Ser138-Ala140, Asn177-Pro179 в структуре, соответствующей траектории 50 нс; Lys228-Leu231 в структуре, соответствующей траектории 90 нс; Asp253-Ala257 в структуре, соответствующей траектории 100 нс).

Междоменные линкеры в обоих белках (Gly60-Gly93 в ExuR и Gly61-Gly94 в UxuR) оставались слабоструктурированными во всех рассмотренных точках молекулярно-динамической траектории. В них могло происходить формирование коротких временных участков, похожих на бета-слой (Ile70-Val72 в структуре, соответствующей траектории 50 нс и Val62-Arg65 в структуре, соответствующей траектории 90 нс для ExuR; Val63-Arg66 и Val63-Val 65 на структуре, соответствующей 50-й и 100-й наносекунде траектории для UxuR). В целом линкеры располагались достаточно компактно, приближая N-концевой домен белка к поверхности С-концевого домена так, что расположенные в линкерах аминокислотные остатки могли взаимодействовать с аминокислотными остатками белка N- и С-концевых доменов. Формирование области контакта между С-концевыми доменами белков осуществлялось за счет взаимодействий первой и четвертой альфа-спиралей С-концевых доменов обоих белков (Pro94-Thr114 и Ser157-Arg170 — для ExuR, Pro95-Gln374 и Ser162-Ser171 — для UxuR). Таким образом, структура гетеродимера оставалась стабильной на протяжении всей траектории молекулярно-динамической симуляции (рис. 2).

Структура комплекса гетеродимера UxuR-ExuR с сахарами. Изучение распределения по поверх-

ности гетеродимера предсказываемых мест взаимодействия с сахарами показало, что поверхность, формируемая междоменными линкерами белков, предпочтительнее других мест связывания. Большинство рассмотренных сахаров при последовательном докинге формировали структуры, подобные тяжам, расположенным вдоль междоменных линкеров и прилегающих к ним участков, в прочих местах (преимущественно в пространстве между С-концевыми доменами) лиганды располагались редко (рис. 3).

Так, D-галактуронат, D-фруктуронат и альфа-D-глюкоза во всех четырех структурах формировали тяжи на линкерах белка. D-глюкуронат формировал тяж в структурах с траекториями 60, 90 и 100 нс, тогда как в структуре 50 нс половина лигандов располагалась в пространстве между С-концевыми доменами. В отличие от трех сахаров, D-глюконат только в структуре 90 нс формировал отчетливый тяж. На остальных структурах с линкерами взаимодействовало около половины лигандов, остальные распределялись по поверхности белка.

К сожалению, вариабельность значений аффинности, полученных в результате расчетов, в подавляющем большинстве случаев не позволяет уверенно говорить о специфичности взаимодействия лиганда с поверхностью белка. В норме диапазон изменения значений аффинности в пределах одного раунда докинга (разница между максимальным и минимальным значением аффинности в одном раунде докинга) не превышал 0.5 ккал/мол. Однако в ряде случаев диапазон изменения значений аффинности был больше этого значения (табл. 1).

Таким образом, четыре сахара могут продемонстрировать некоторую специфичность к участку взаимодействия на поверхности белка. Три из них (D-глюкуронат и D-галактуронат и в меньшей степени D-фруктуронат) предпочтительно связываются именно с междоменными линкерами белков. Область связывания D-глюконата локализована и охватывает дополнительно участки на поверхности С-концевых доменов. Высокое значение аффинности для альфа-D-глюкозы (1 ккал/мол для третьей итерации в структуре с временем моделирования 90 нс) связано по всей видимости с конфигурацией лигандов, полученных на первых двух итерациях докинга, рядом с которыми располагался лиганд третьей итерации.

Рассмотрение индивидуальных комплексов гетеродимера с молекулой сахара позволяет определить аминокислотные остатки, вовлеченные в такое взаимодействие. В UxuR такими остатками могут быть Gln8, Arg9, Gln12, Arg 19, Lys60, Arg67, Glu64, Arg66, Asp75, Asn76, Ser79, Gln80, Asn81, Asp83, Glu166, Arg169 и Ser171; в ExuR — Glu57,

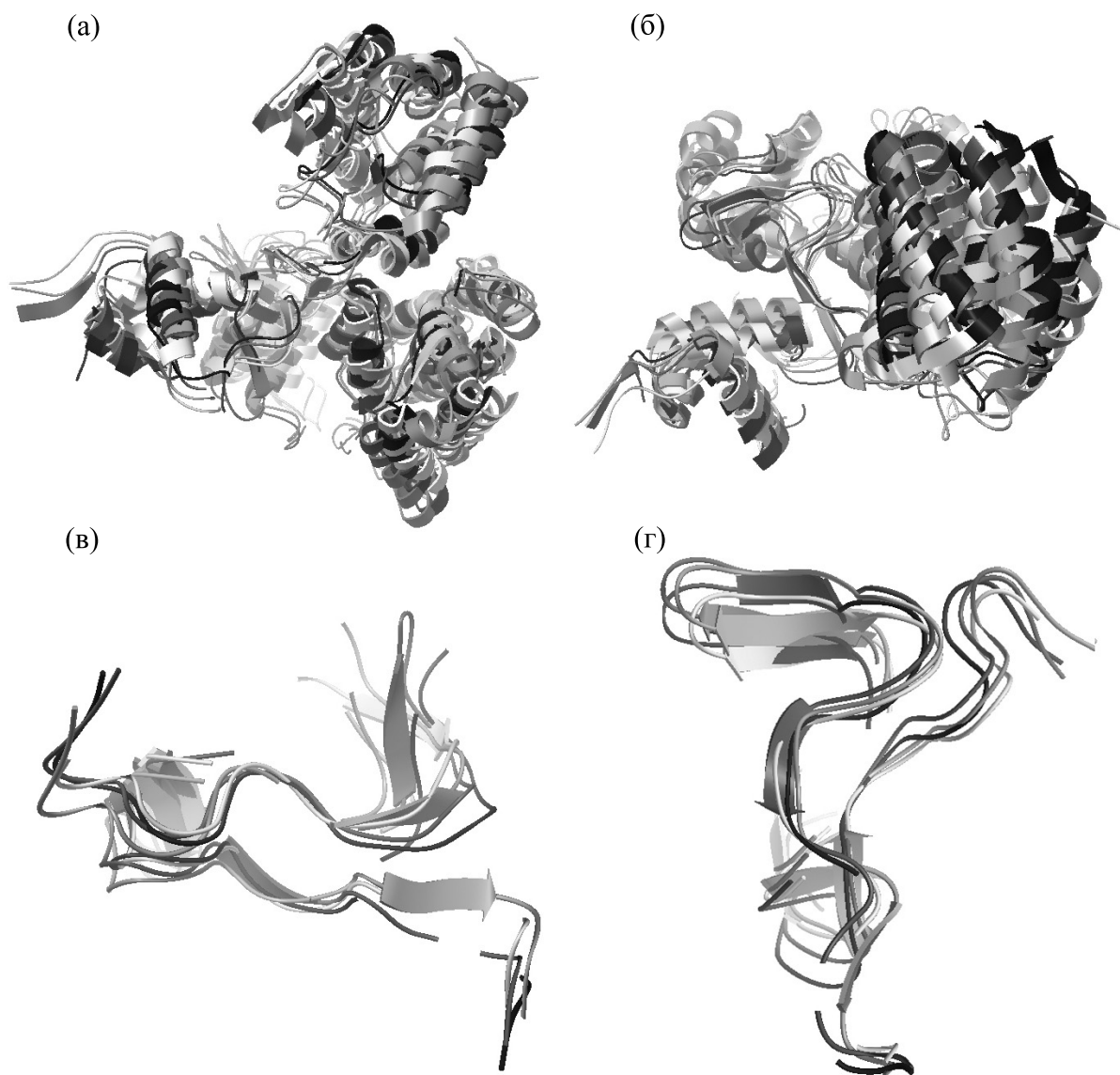


Рис. 2. Наложение структур гетеродимера UxuR-ExuR, полученных на 50-й, 60-й, 90-й и 100-й наносекундах молекулярно-динамической симуляции. Светло-серый цвет соответствует структуре 50 нс, темно-серый — 100 нс, промежуточные варианты — 60 нс и 90 нс соответственно. (а), (б) — Структуры гетеродимера в двух проекциях, развернутых на 90° относительно друг друга, N-конец белка находится слева; (в) — структура линкера, вид со стороны С-концевого домена; (г) — структуры линкера, вид с боковой стороны белка, соответствует линкеру на рис. (б).

Glu63, Arg65, Lys66, Asn75, Arg78, Gln80, Glu88, Asn107, Gln145, Glu164, Arg170, Ser171 и Asn173.

Таким образом, предсказанное взаимодействие гетеродимера UxuR-ExuR с молекулами сахаров происходило преимущественно на поверхности, формируемой междоменными линкерами и пространственно прилегающими к ним поверхностями первой и четвертой альфа-спиралей белков. Кроме этого, имело место взаимодействие сахаров с некоторыми межспиральными неструктурированными участками С-концевых доменов обоих белков. Тем не менее линкерный участок между доменами в большей степени вовлечен во

взаимодействие с сахарами, чем любая другая поверхность белка. По всей видимости, взаимодействие сахаров именно с этой областью будет оказывать влияние на структуру гетеродимера UxuR-ExuR.

Структура комплекса гетеродимера UxuR-ExuR с фосфорилированными производными сахаров. Помимо сахаров было изучено взаимодействие с гетеродимером некоторых фосфорилированных производных этих сахаров. Альфа-D-глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат являются компонентами практически

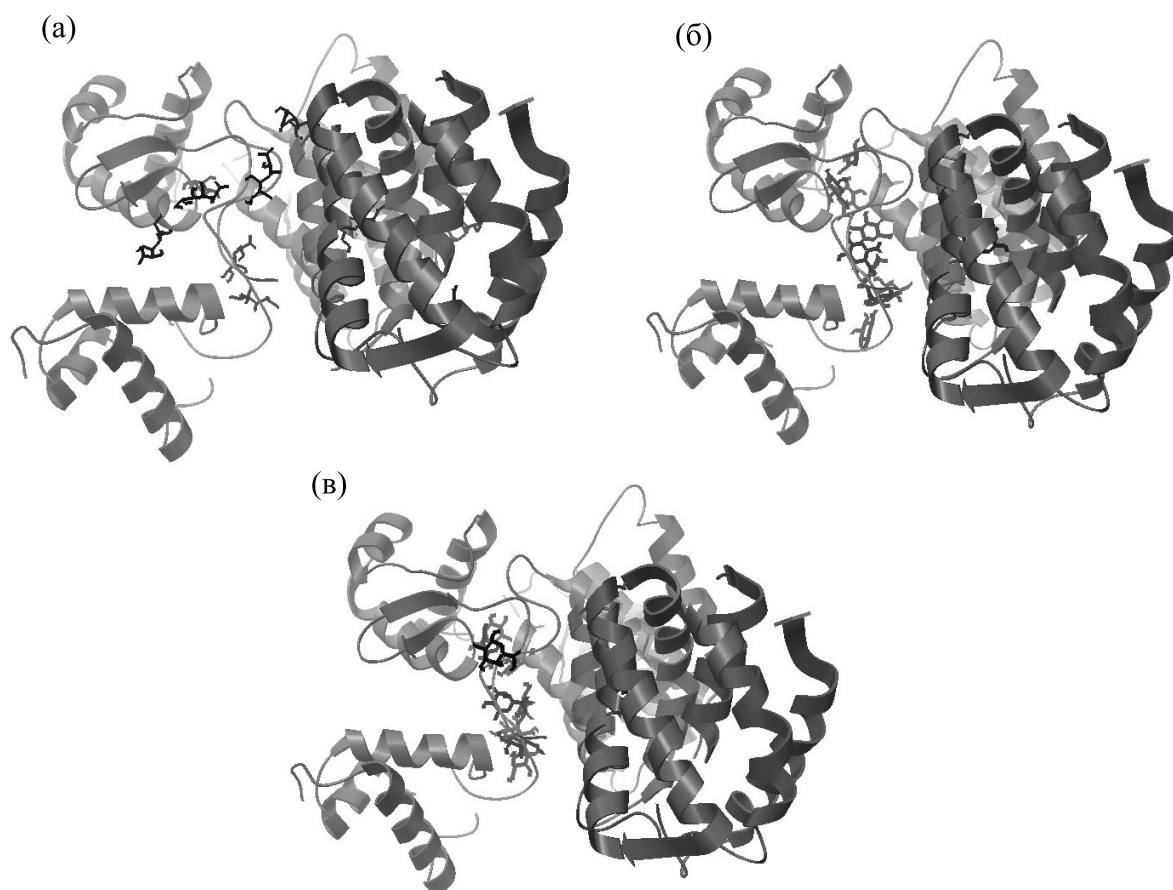


Рис. 3. Распределение по поверхности гетеродимера UxuR-ExuR (структура с траекторией 100 нс) моделей D-глюкозата (а), D-глюкуроната (б) и D-галактуроната (в).

Таблица 1. Распределение итераций последовательного докинга лигандов сахаров на моделях гетеродимера, полученных в результате молекулярно-динамической симуляции, с повышенным диапазоном изменения значений аффинности (>0.5 ккал/мол)

	50 нс	60 нс	90 нс	100 нс
Альфа-D-глюкоза			3 (1 ккал/мол)	
D-глюконат	<i>1 (0.8 ккал/мол)</i> 8 (0.9 ккал/мол)	4 (0.6 ккал/мол)	8 (0.6 ккал/мол)	<i>3 (0.7 ккал/мол)</i> 6 (0.7 ккал/мол)
D-глюкуронат	<i>1 (0.7 ккал/мол)</i>	2 (0.8 ккал/мол) 5 (0.6 ккал/мол) 6 (0.7 ккал/мол) 10 (0.9 ккал/мол)	4 (0.7 ккал/мол) 8 (0.7 ккал/мол)	2 (0.7 ккал/мол) 4 (0.6 ккал/мол) 7 (0.8 ккал/мол) 8 (0.7 ккал/мол)
D-галактуронат	<i>1 (0.8 ккал/мол)</i> 2 (0.9 ккал/мол)	<i>1 (0.6 ккал/мол)</i> 7 (0.6 ккал/мол)	5 (0.6 ккал/мол) 6 (0.7 ккал/мол) 9 (0.8 ккал/мол)	4 (0.6 ккал/мол) 9 (0.6 ккал/мол)
D-фруктуронат		9 (0.6 ккал/мол) 10 (0.9 ккал/мол)	4 (0.7 ккал/мол)	4 (0.8 ккал/мол) 9 (0.6 ккал/мол) 10 (0.7 ккал/мол)

Примечание. В скобках указан диапазон изменения значений аффинности для приведенных номеров итераций докинга. Курсивом обозначены итерации со связыванием лиганда с UxuR, прямым шрифтом – с ExuR. Темно-серым цветом отмечены итерации с размещением лиганда на С-концевом домене, кроме 1-й и 4-й альфа-спиралей; светло-серым – между С-концевыми доменами; без окраски – на линкере и на 1-й и 4-й альфа-спиралях С-концевого домена.

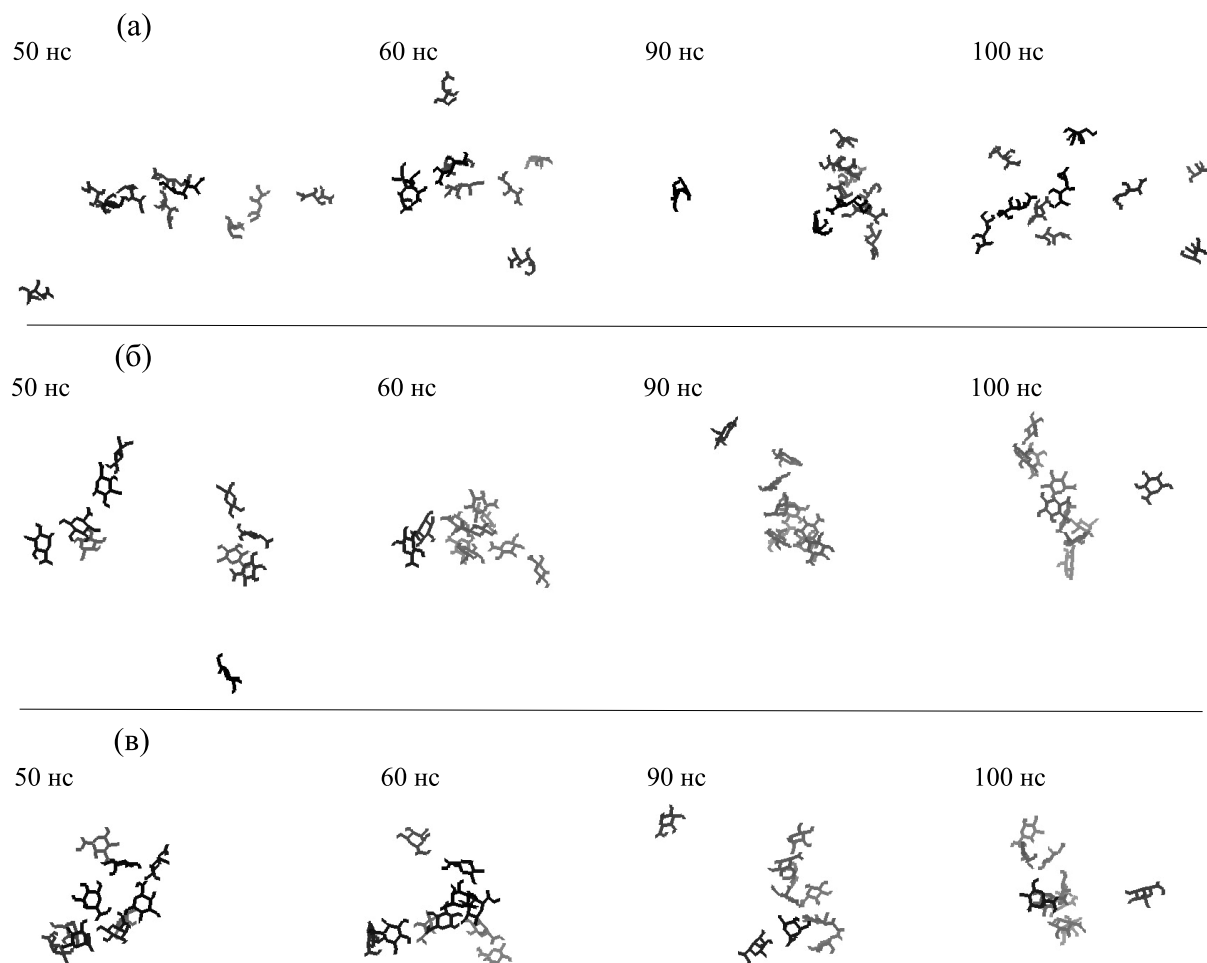


Рис. 4. Распределение лигандов D-глюконата (а), D-глюкуроната (б) и D-галактуроната (в) на моделях гетеродимера, полученное в результате молекулярно-динамической симуляции. Ориентация белка соответствует представленной на рис. 3.

всех ферментативных циклов в клетке и также могут взаимодействовать с поверхностью белка.

Распределение этих трех фосфорилированных производных сахаров по поверхности гетеродимера в целом воспроизводит распределение сахаров. Наиболее предпочтительной оставалась поверхность, формируемая междоменными линкерами белков. Однако распределялись фосфорилированные производные более разреженно, и большая их часть взаимодействовала с другими участками белковой поверхности, в основном с С-концевым доменом (рис. 5). Вариабельность значений аффинности в большинстве случаев также не превышала 0.5 ккал/мол, но, как и в случае с сахарами, в некоторых итерациях докинга для каждого фосфорилированного производного значения аффинности позволяют предполагать несколько большую специфичность связывания лигандов для определенных участков поверхности белка.

Несмотря на то что фосфорилированные производные сахаров, так же как и сами сахара, в основном связываются с областью междоменных линкеров и прилегающими областями на С-концевых доменах гетеродимера, их молекулы распределены более диффузно. Молекулы альфа-D-глюкоза-6-фосфата ($157 \text{ \AA}^2$), фруктозы-6-фосфата ($165 \text{ \AA}^2$) и фруктозы-1,6-бисфосфата ($203 \text{ \AA}^2$) несколько крупнее, чем молекулы рассмотренных ранее сахаров (D-галактоуронат ($127 \text{ \AA}^2$), D-глюкуронат ($138 \text{ \AA}^2$), D-фруктуронат ($127 \text{ \AA}^2$), альфа-D-глюкоза ($110 \text{ \AA}^2$)), что может затруднять их адаптацию к относительно подвижной поверхности линкеров (рис. 6). Взаимодействие фосфорилированных производных сахаров происходит с теми же аминокислотными остатками в белках, что и при взаимодействии с простыми сахарами. Таким образом, фосфорилированные производные сахаров сохраняют способность взаимодействовать с областью междоменных линкеров и

Таблица 2. Распределение итераций последовательного докинга лигандов фосфорилированных производных сахаров на моделях гетеродимера, полученных в результате молекулярно-динамической симуляции, с повышенным диапазоном изменения значений аффинности (>0.5 ккал/мол)

	50 нс	60 нс	90 нс	100 нс
Альфа-D-глюкоза-6-фосфат	<i>1 (0.6 ккал/мол)</i> <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>	<i>3 (0.6 ккал/мол)</i> <i>7 (0.7 ккал/мол)</i> <i>8 (0.8 ккал/мол)</i>	1 (0.6 ккал/мол) 3 (0.6 ккал/мол) 4 (0.8 ккал/мол) <i>10 (0.6 ккал/мол)</i>	2 (0.8 ккал/мол) <i>6 (0.6 ккал/мол)</i> <i>9 (0.7 ккал/мол)</i> <i>10 (0.7 ккал/мол)</i>
Фруктозо-6-фосфат	<i>1 (0.8 ккал/мол)</i> 2 (0.8 ккал/мол) <i>4 (0.9 ккал/мол)</i> <i>7 (0.6 ккал/мол)</i>	2 (0.8 ккал/мол) <i>6 (1 ккал/мол)</i> 7 (0.6 ккал/мол) 8 (0.6 ккал/мол) 9 (0.8 ккал/мол)	4 (0.8 ккал/мол) 8 (0.8 ккал/мол)	<i>1 (0.7 ккал/мол)</i> <i>5 (0.7 ккал/мол)</i> <i>7 (0.7 ккал/мол)</i> <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>
Фруктозо-1,6-бисфосфат	8 (0.6 ккал/мол) <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>			<i>1 (0.6 ккал/мол)</i> <i>3 (0.6 ккал/мол)</i> 8 (0.9 ккал/мол) <i>9 (0.7 ккал/мол)</i>

Примечание. В скобках указан диапазон изменения значений аффинности для приведенных итераций докинга. Курсивом обозначены итерации со связыванием лиганда с UxuR, прямым шрифтом — с ExuR. Светло-серым цветом отмечены итерации с размещением лиганда между С-концевыми доменами; без окраски — на линкере и на 1-й и 4-й альфа-спиралях С-концевого домена.

прилегающих областей на поверхности белков и, тем самым, влиять на гетеродимер UxuR-ExuR.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как ранее было показано, взаимодействие различных сахаров с димером UxuR и мономерами UxuR и ExuR происходит примерно с одной и той же областью на поверхности белка, включающей в себя линкер и прилегающие альфа-спирали С-концевого домена, и с невысокой аффинностью, слабо варьирующей от сахара к сахару [17]. Кроме того, D-фруктуронат, D-галактуронат и D-глюкуронат способны взаимодействовать с «карманом» на С-концевом домене UxuR, влияя тем самым на укладку альфа-спиралей в домене и, посредством этого, на конформацию междоменного линкера и ориентацию N-концевого домена относительно С-концевого домена и ДНК-мишени.

В исследуемом в данной работе комплексе гетеродимера с лигандами складывается в целом схожая ситуация. Основной мишенью для всех лигандов оказываются междоменные линкеры белков. Взаимодействие с «карманом» в С-концевом домене UxuR не происходит, что предполагает отсутствие у гетеродимера UxuR-ExuR способности регулировать транскрипцию с генов-мишеней UxuR. Аффинность взаимодействия гетеродимера к лигандам остается в основном не-

высокой и варьируется незначительно. Однако в случае некоторых сахаров (D-глюкуроната, D-галактоуроната и, в меньшей степени, D-фруктуроната) значения аффинности, полученные в итерациях докинга, имеют более высокие значения. Молекулы D-глюконата распределены по поверхности белка более диффузно, а в случае D-глюкозы специфичность взаимодействия невысока. Для фосфорилированных производных сахаров наблюдается аналогичная D-глюконату модель взаимодействия.

Междоменные линкеры, как правило, являются неструктурированными и лабильными участками белковой цепи. Несмотря на определенное постоянство их структуры, она достаточно подвижна, чтобы провоцировать изменение распределения по нему лигандов (при докинге в структурах 50 нс, 60 нс, 90 нс и 100 нс). Аффинность сахаров при этом также варьируется. Исходя из степени их вовлеченности во взаимодействие с несколькими лигандами (рис. 4 и 6), междоменные линкеры представляют собой некий интерфейс, несводимый к простому набору составляющих его аминокислотных остатков. Вариативность мест взаимодействия лигандов и вариативность аффинности такого взаимодействия предполагает, что чем выше количество лиганда, тем выше шанс для него «встретиться» с линкерами, находящимися в «нужной» конформации.

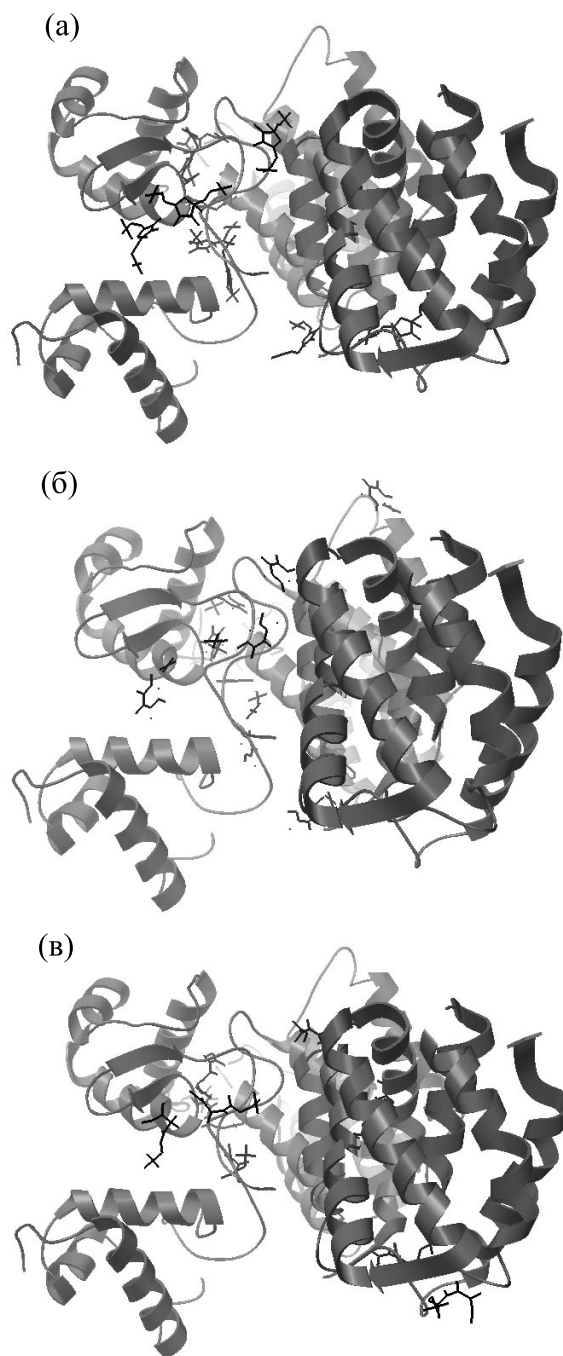


Рис. 5. Распределение по поверхности гетеродимера UxuR-ExuR (100 нс) моделей альфа-D-глюкозы (а), фруктозо-6-фосфата (б) и фруктозо-1-6-бисфосфата (в).

Таким образом, модель регуляции транскрипции генов, находящихся под контролем белка UxuR, можно дополнить следующим образом. При наличии в среде глюкуроната он связывается с гетеродимером UxuR-ExuR. Различия в конформациях подвижных линкеров белков могут приводить к формированию комплексов с различной стабильностью, определяемой местом

связывания лиганда на линкере и аффинностью такого связывания. Некоторые комплексы могут быть более стабильными за счет того, что поверхность, формируемая белковыми линкерами, будет в конфигурации, пригодной для более специфичного взаимодействия с глюкуронатом, что может привести к дополнительной фиксации линкеров относительно доменов белков и фикса-

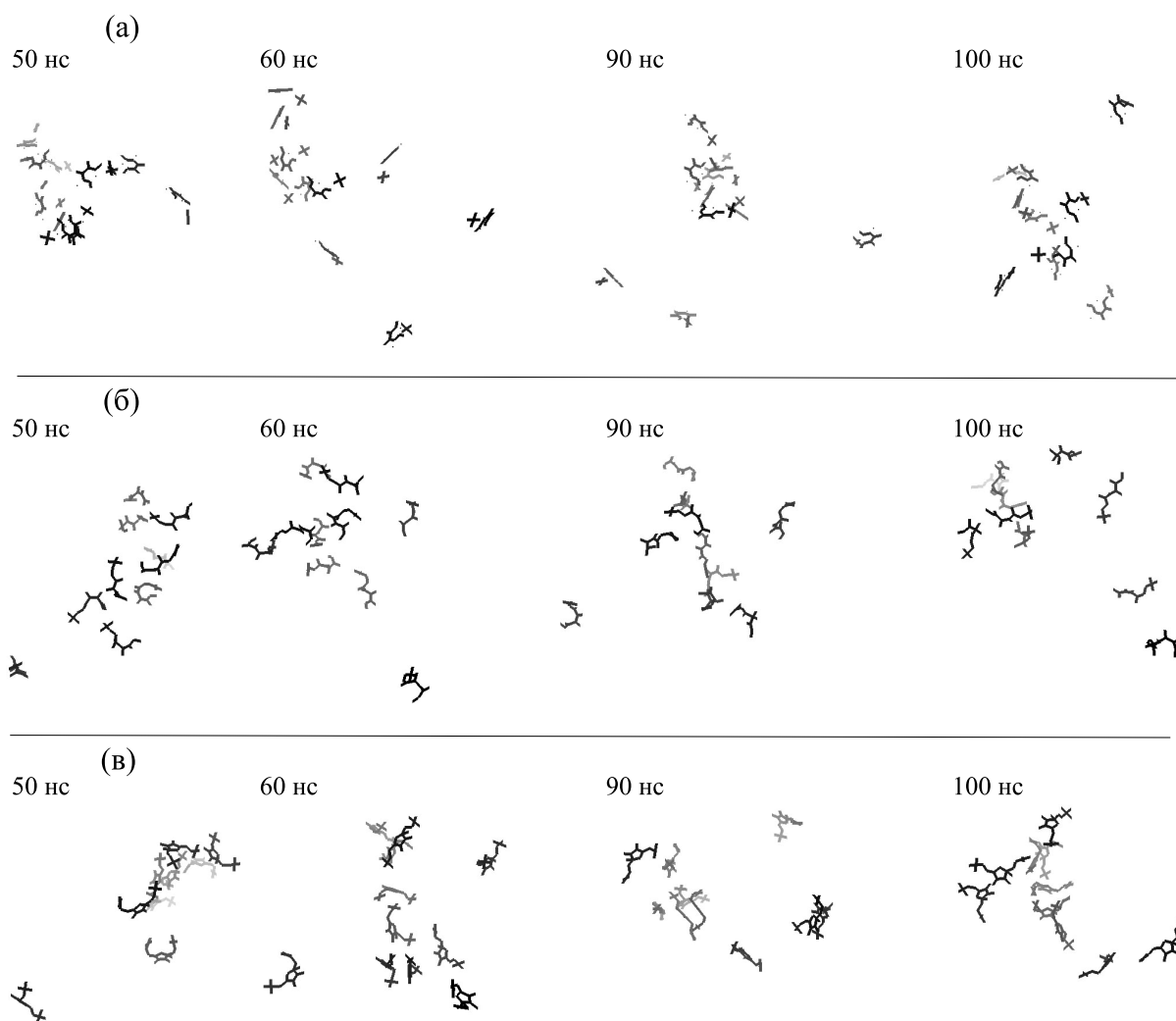


Рис. 6. Распределение лигандов альфа-D-глюкозы (а), фруктозо-6-фосфата (б) и фруктозо-1,6-бисфосфата (в) на моделях гетеродимера, полученных в результате молекулярно-динамической симуляции. Ориентация белка соответствует представленной на рис. 5.

ции доменов относительно друг друга. В результате более стабильные комплексы гетеродимеров UxuR-ExuR с глюкуронатом будут накапливаться, а количество мономеров UxuR, способных формировать гомодимер, будет уменьшаться, что снизит репрессию регулона UxuR.

Возможно, D-галактуронат будет взаимодействовать с гетеродимером UxuR-ExuR похожим образом, с проявлением аналогичного влияния на активность UxuR как транскрипционного фактора. В пользу этого свидетельствует сходство предсказываемых для него комплексов с гетеродимером с комплексами гетеродимера с D-глюкуронатом. Вариабельность интерфейса на линкере позволяет предположить концентрационно-зависимый от глюкуроната характер регуляции транскрипционной активности генов регулона

UxuR. Вероятность зафиксировать короткоживущую «нужную» конформацию линкера, которая необходима для образования стабильного комплекса с лигандом (или с несколькими молекулами лиганда), выше при относительно высоком количестве лиганда в среде (D-глюкуроната и, возможно, D-галактуроната). Мы предполагаем, что таким образом может осуществляться баланс между репрессией генов ферментов пути Эшвелла и количеством субстрата в среде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00322).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. B. Fillenberg, F. C. Grau, G. Seidel, and Y. A. Muller, *Nucl. Acids Res.* **43**, 1283 (2015).
2. K. Miyazono, N. Tabei, S. Morita, et al., *J. Bacteriol.* **194**, 607 (2012).
3. F. Jacob and J. Monod, *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
4. S. E. Bondos, L. Swint-Kruse, and K. S. Matthews, *J. Biol. Chem.* **290**, 24669 (2015).
5. M. A. Schumacher, G. S. Allen, M. Diel, et al., *Cell* **118**, 731 (2004).
6. C. G. Kalodimos, *Science* **305**, 386–389 (2004).
7. M. Lewis, G. Chang, N. C. Horton, et al., *Science* **271**, 1247 (1996).
8. R. Portalier, J. Robert-Baudouy, and F. Stoeber, *J. Bacteriol.* **143**, 1095 (1980).
9. P. Ritzenthaler, M. Mata-Gilsinger, and F. Stoeber, *J. Bacteriol.* **143**, 1116 (1980).
10. D. A. Rodionov, A. A. Mironov, A. B. Rakhmaninova, and M. S. Gelfand, *Mol. Microbiol.* **38**, 673 (2000).
11. S. Rigali, A. Derouaux, F. Giannotta, and J. Dusart, *J. Biol. Chem.* **277**, 12507 (2002).
12. L. Aravind, V. Anantharaman, S. Balaji, et al., *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 231 (2005).
13. D. Jain, *IUBMB Life* **67**, 556 (2015).
14. C. B. Utz, A. B. Nguyen, D. J. Smalley, et al., *J. Bacteriol.* **186**, 7690 (2004).
15. M. N. Tutukina, A. V. Potapova, P. K. Vlasov, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **34**, 2296 (2016).
16. M. N. Tutukina, A. V. Potapova, J. A. Cole, and O. N. Ozoline, *Microbiology* **162**, 1220 (2016).
17. Ю. А. Пуртов, М. Н. Тутукина, А. Д. Никулин и О. Н. Озолин, *Биофизика* **64**, 61 (2019).
18. N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, et al., *J. Cheminform.* **3**, 33 (2011).
19. M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, et al., *J. Cheminform.* **4**, 17 (2012).
20. A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, et al., *Nucl. Acids Res.* **46**, W296 (2018).
21. M. S. Little, S. J. Pellock, W. G. Walton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E152 (2018).
22. N. Guex and M. C. Peitsch, *Electrophoresis* **18**, 2714 (1997).
23. M. S. Friedrichs, P. Eastman, V. Vaidyanathan, et al., *J. Comput. Chem.* **30**, 864 (2009).
24. O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31**, 455 (2009).
25. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, et al., *J. Comput. Chem.* **30**, 2785 (2009).

Modeling the Interaction of the UxuR-ExuR Heterodimer with the Components of the Metabolic Pathway for Hexuronate Utilization in *Escherichia coli*

Y.A. Purtov*, **, S.V. Tishchenko*, and A.D. Nikulin*

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

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

The UxuR transcription factor is a repressor for a number of genes of the hexuronate catabolism. This protein can form heterodimers with its paralogous ExuR protein, leading to activation of repressed UxuR genes in the presence of glucuronate. Previously, when sequential molecular docking was done with the flexible receptor, it was predicted that sugars bind to the interdomain linkers UxuR and ExuR, affecting the mutual arrangement of the protein domains. Similar calculations for the models of the UxuR-ExuR heterodimer, corresponding to four points of its molecular dynamics simulation, also predict the binding of sugars to interdomain linkers. Changes in protein conformation modulate the location and degree of affinity of this interaction. A new hypothesis argues that UxuR-ExuR-glucuronate complexes become more stable with increased binding affinity to some conformations of protein interdomain linkers. This may lead to a decrease in the number of free monomers and, therefore, UxuR homodimers in the presence of these sugars, and relieves the UxuR-mediated repression of its regulon.

Keywords: UxuR-ExuR heterodimer, transcription regulation, hexuronates, flexible molecular docking, protein conformational changes

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ. I. ИСТОРИЯ, ФУНДАМЕНТАЛЬНОЕ И ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ, ЕГО ТИПЫ И СВОЙСТВА

© 2021 г. Е.В. Наумова*, Ю.А. Владимиров**, Л.В. Белоусов**,
В.В. Тучин***, ****, ***** И.В. Володяев**

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

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

***Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

****Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

*****Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028, Саратов, ул. Рабочая, 24

E-mail: naumova@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.06.2021 г.

После доработки 20.07.2021 г.

Принята к публикации 27.07.2021 г.

Обзор посвящен методам исследований сверхслабых свечений биологических объектов, причем кроме современных методов, направленных на исследования в видимом, ближнем инфракрасном и ближнем ультрафиолетовом диапазонах, значительное внимание уделено анализу методологии исследований компоненты, относящейся к среднему ультрафиолетовому диапазону (в ранних работах называемой митогенетическим излучением). Исследования митогенетического излучения проводились в 1923–1948 гг. и остаются частично спорными. Многие полученные результаты, революционные для того времени, уже подтверждены, а научная проблематика остальных представляет значительный интерес (например, фундаментальные результаты, касающиеся деления клеток и канцерогенеза, ранняя онкодиагностика), поэтому анализ их методологии актуален для дальнейшей экспериментальной проверки этих исследований. В первой из трех частей обзора рассмотрены общие вопросы – история исследований и развития методов, классификация и свойства сверхслабых свечений, прикладное и фундаментальное значение исследований (вторая и третья части обзора посвящены соответственно биологическим и физическим методам исследований).

Ключевые слова: сверхслабое свечение биологических объектов, хемилюминесценция, свободнорадикальная биология, митогенетическое излучение, регистрация сверхслабых излучений в оптическом диапазоне, биофотоника.

DOI: 10.31857/S0006302921050082

1.1. ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ

1.1.1. Исследования сверхслабого свечения в среднем ультрафиолетовом диапазоне (1922–1948 гг.). Сверхслабое свечение (ССС) биологических объектов было открыто выдающимся российским биологом-гистологом А.Г. Гурвичем в 1923 г. [1] в результате цикла работ по выявлению факторов, регулирующих развитие организма и, в частности, распределение клеточных делений в

тканях. Предположив, что помимо собственно «готовности клетки» к делению необходимо также появление внешнего триггера, автор обратился к поиску и идентификации таких триггеров и, после серии предварительных работ, обнаружил ультрафиолетовую (УФ) компоненту СССР, названную им митогенетическим излучением¹ (МГИ) [3, 4]. В последующие 25 лет явление СССР актив-

¹ Термин «митогенетическое излучение» сам А.Г. Гурвич впоследствии признавал неудачным, поскольку он не охватывал масштабов феномена и биологические свойства излучения не ограничивались стимуляцией митозов (см. работу [2]). В литературе 1920–1940-х гг. использовались также термины «лучи Гурвича», «митотические лучи».

Сокращения: СССР – сверхслабое свечение, МГИ – митогенетическое излучение, УФ – ультрафиолетовый, ФЭУ – фотоэлектронные умножители, ИК – инфракрасный

но исследовалось, но только в УФ-области, поскольку в качестве детекторов применялись высокочувствительные к УФ-излучению биологические объекты (корни лука, дрожжи, бактерии — см. рис. 1), а с начала 1930-х гг. — модифицированные счетчики Гейгера-Мюллера с УФ-чувствительными фотокатодами.

Работы велись в десятках лабораторий мира, в этой области работало более 100 исследователей в СССР [6], США [7] и Европе [8–10]. Феномену было посвящено более тысячи работ: часть — подтверждающих и развивающих концепцию [11, 12], часть — критических [13, 14], включая публикации в самых высокорейтинговых журналах [10, 15–22]. Многие ключевые эксперименты были выполнены выдающимися учеными того времени — Д. Габором [8], Р. Одюбером [23], Г.М. Франком [24–32], в том числе совместно с Ю.Б. Харитоном [33]. Комплексные исследования физических свойств ССС в Физико-техническом институте инициировал и курировал академик А.Ф. Иоффе [32, 33]. В рамках направления сформировалось несколько научных школ, среди которых масштабом проводимых исследований выделялась школа А.Г. Гурвича (см. монографии [2, 6, 34–37], а также сборники работ [38, 39]). А.Г. Гурвич был награжден за цикл работ по митогенетическому излучению Сталинской премией и одиннадцать раз номинирован на Нобелевскую премию [40].

В первые годы после открытия УФ-ССС в качестве биологических детекторов использовали лук [1, 8–10], затем его сменили дрожжевые и бактериальные детекторы [6, 11, 41] (подробно об этом будет рассказано в части II обзора). Были предложены методы биологического детектирования УФ-ССС, не связанные с характеристикой митотического режима, но они не получили распространения, например метод, основанный на изменении проницаемости биологических мембран (об этом судили по динамике окрашивания раствора пигментом лепестков цветов) [42]. В настоящее время, когда высокая чувствительность биорецепции хорошо известна², сам факт использования биологических объектов для детектирования физических или химических факторов не вызывает таких сомнений, как в начале прошлого века. Недоверие к биологическим детекторам укрепляли и отрицательные результаты попыток физической регистрации МГИ — с использованием фотографических пластинок [46–48] и фотоэлектрических камер [33, 49]. Поэтому, когда с 30-х годов XX века начались исследования ССС с помощью модифицированных счетчиков Гейгера-Мюллера с УФ-чувствительными фотокатода-



Рис. 1. Схема эксперимента по регистрации митогенетического излучения по его влиянию на деление клеток меристемы лука [5].

ми [25, 50–53] (подробно об этом будет рассказано в части III обзора), несмотря на то что их чувствительность была ниже, чем у биологических детекторов, они сыграли значительную роль в развитии направления. Это были первые физические приборы, которые подтвердили существование ССС биообъектов, а также хемилюминесцентную природу его излучения на примере модельных химических систем, в том числе так называемое вторичное ССС (см ниже раздел «Наименования и типы ССС»). Кроме того, с помощью счетчиков был подтвержден целый ряд выводов, сделанных исключительно на основании экспериментов с биологическими детекторами, например, о существовании/отсутствии УФ-ССС конкретных биообъектов. С помощью счетчиков Гейгера-Мюллера были также выполнены первые оценки интенсивности УФ-ССС биообъектов ($10\text{--}1000$ квантов $\cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), оценены интенсивность и квантовый выход хемилюминесценции в модельных химических системах, обнаружена УФ-хемилюминесценция целого ряда химических систем [23, 54–56]. Следует отметить, что в первой половине 30-х годов XX века, пока первые исследования ССС шли одновременно с разработкой конструкций и методов калибровки газоразрядных счетчиков, число позитивных работ было примерно равно количеству негативных³. Затем были разработаны достаточно хорошие конструкции и воспроизводимые методики, и после 1935 г. негативных экспериментов по регистрации ССС модифицированными газоразрядными счетчиками, насколько нам из-

² Биологические тест-системы типа Allium-тест применяются уже много десятилетий, в настоящее время активно разрабатываются биогибридные сенсоры [43–45].

³ В работах того же периода с биологическими детекторами негативные экспериментальные работы составили менее 3% от общего количества.

вестно, не было⁴, только положительные (см. работы [52, 56] и др.). После обширной серии работ Р. Одюбера [23, 57–73] существование УФ-хемилюминесценции как биологических объектов, так и модельных химических систем было окончательно признано ведущими мировыми учеными, специалистами по хемилюминесценции С.И. Вавиловым, П. Принсгеймом, Р.Г.В. Норришем⁵ [74].

В «митогенетический» период исследований СССР (1923–1948 гг.) было продемонстрировано излучение различных тканей, культур микроорганизмов, крови, мочи и слюны здоровых людей и животных, а также модельных химических/биохимических систем. На основании экспериментальных данных были развиты теоретические представления, что источником энергии спонтанного ССС, а также вторичного излучения, возникающего под его воздействием, являются цепные химические реакции с участием свободных радикалов [35, 75–79]. Вывод о хемилюминесцентном механизме генерации МГИ в 1930-х гг. был подкреплен совпадением спектров излучения биологических объектов и ряда модельных химических систем, в основном ферментативных [80–82]⁶. При этом было показано, что энергия, выделяющаяся при химической реакции, не всегда высвечивается непосредственно ее продуктами, а может передаваться некоторым другим веществам, которые впоследствии излучают ССС с собственным характерным спектром [22, 76].

В 30–40-х годах XX века были проведены оценки интенсивности ССС в области среднего

ультрафиолета [25, 26, 32, 50, 85–87], развит метод спектрального анализа с помощью биологических детекторов [88–100], исследованы спектры митогенетического излучения разнообразных биообъектов и химических систем, в том числе в динамике (отклик нервной системы на различные раздражения, мышечная активность и др.) [89, 96, 99–106], выполнены первые попытки 2D-картирования ССС [107]. В этот период были показаны широкие возможности практического применения ССС в биологии и медицине [35]. В частности, масштабные исследования митогенетического излучения крови позволили обнаружить универсальный онкомаркер крови пептидной природы, тушащий УФ-хемилюминесценцию [36, 108]. Методика ранней онкодиагностики, основанная на детектировании этого вещества с помощью дрожжевых детекторов, была подтверждена клиническими результатами (чувствительность и специфичность >95%) [109–113]. Во второй половине 40-х годов XX века, когда методика онкодиагностики была уже разработана, большая часть работ в этом направлении проводилась не в лаборатории Гурвича в ВИЭМ, а в медицинских организациях, в том числе клинических.

В США и Европе исследования МГИ практически полностью прекратились с началом Второй мировой войны и после нее уже не возобновлялись. Это было обусловлено общим спадом научной активности, не относящейся с военным разработкам, прекращением деятельности ряда ведущих специалистов (например, Л.К. Вольфа), эмиграцией ряда ученых немецкой школы, а также рядом резко критических статей. Следует отметить, что большинство аргументов критики того времени к настоящему времени устарели, как например, невозможность люминесценции, противоречащей закону Стокса [114]. Вместе с тем были и объективные причины, связанные с трудностями детектирования ССС методами того времени (см. части II и III обзора). После войны на Западе тема стала ассоциироваться с «лженаукой, царящей в СССР», в известной речи Нобелевского лауреата И. Ленгмюра о «патологической науке» (1953 г.) [115] митогенетические лучи мельком были упомянуты среди «лженаучных» направлений⁷. По иронии судьбы почти в это же время в СССР А.Г. Гурвича и его коллег обвинили в по-

⁴ Эксперименты с модифицированными счетчиками Гейгера–Мюллера, описанные в негативной работе А. Холландера и В.Д. Клауса в 1937 г., были выполнены в 1935 г. [13].

⁵ «...эмиссия ультрафиолета как при многочисленных химических реакциях, так и при биологических процессах окончательно установлена обычными физическими методами. ...Длины волн, установленные Одюбером, принадлежат к той же спектральной области, к которой относятся и спектры, определенные в лаборатории Гурвича...» (С.И. Вавилов), «я был в числе тех, кому проф. Одюбер продемонстрировал свои эксперименты более детально. Полагаю, что не может быть никаких сомнений в реальности наблюдаемого феномена» (Р.Г.В. Норриш) [74].

⁶ Спектры деградационного излучения, т.е. излучения, возникающего под влиянием физических или химических стрессов, существенно отличались от спектров спонтанного излучения тех же биообъектов и модельных ферментативных систем в «митогенетическом» диапазоне, более того, деградационное излучение было обнаружено у всех исследованных биологических объектов, в том числе тех, у которых без стрессового воздействия излучения не наблюдалось. Это привело к гипотезе о том, что в основе деградационного излучения лежит отличающийся механизм, и кванты, высвечиваемые при стрессовых воздействиях, генерируются при релаксации некоторых предварительно присутствовавших в системе электронно-возбужденных состояний (близкий теоретический подход к проблеме был развит Э. Бауэром [83], впоследствии — А. Сент-Дьердьи [84]).

⁷ Следует отметить, что несколько других приведенных в этой речи примеров «лженаучных» феноменов, требующих для регистрации достаточно высокой чувствительности приборов, к настоящему времени убедительно подтверждены, как например магнитострикционный и фотомеханический эффекты. Более того, из ошибки И. Ленгмюра, допущенной им в речи, можно предположить, что он не читал оригинальных работ о митогенетическом излучении, а был знаком с феноменом только по популярным статьям, в которых эта ошибка перепечатывалась десятилетиями.

собничестве буржуазной науке (вместе с генетиками) — в 1948 г. А.Г. Гурвич был отстранен от руководства научным коллективом, и работы в этом направлении практически полностью прекратились. В дальнейшем попытки выделить в СССР биообъектов и биохимических процессов компоненту, относящуюся к среднему УФ-диапазону, предпринимались крайне редко [116–120]. Эти эксперименты с использованием фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) подтвердили результаты ранних авторов — само существование слабой УФ-хемилюминесценции [6, 32, 121], появление ее в определенной фазе роста культур микроорганизмов (линейной и позже — в стационарном состоянии), оценки интенсивности и спектрального диапазона [120, 122], но не расширили кардинальным образом уже известные сведения об УФ-ССС. Истории и результатам исследований митогенетического излучения в 1923–1948 гг. посвящен ряд обзоров [123–126].

1.1.2. Исследования СССР в видимом, ближнем ультрафиолетовом и ближнем инфракрасном диапазонах. С середины 1950-х гг. для исследований СССР стали использоваться фотоэлектронные умножители, что подняло научные работы на качественно новый уровень. По сравнению со средним УФ-диапазоном, в котором проводились исследования «митогенетического» периода, в видимом диапазоне ФЭУ имели гораздо более высокое соотношение сигнал/шум, поскольку там были выше одновременно и интенсивность СССР, и прозрачность биологических сред, и чувствительность используемых фотокатодов. В соответствии со спектральной чувствительностью ФЭУ исследования часто захватывали кроме видимого диапазона прилегающие к нему полосы ближнего УФ- и ближнего инфракрасного (ИК) диапазонов, и практически все исследования СССР с середины 50-х гг. XX века и по настоящее время сосредоточены на диапазоне 370–1270 нм (см. обзоры [127–131]).

В этом диапазоне были обнаружены те же типы СССР биообъектов, которые наблюдались ранее в «митогенетический» период в среднем УФ-диапазоне: спонтанное излучение, не связанное с внешними воздействиями [132–134], стрессовое излучение [135–140], длительное (в отличие от обычной флуоресценции и фосфоресценции) послесвечение после облучения светом [135, 141, 142].

Исследования СССР с помощью ФЭУ начались с растительных объектов. В пионерской работе Б.Л. Стрелера и В. Арнольда [143] было обнаружено длительное, в течение нескольких минут, послесвечение зеленых водорослей и высших растений. Феноменологически аналогичное свечение было затем обнаружено в растворах и модельных системах, содержащих хлорофилл и кис-

лород. Развитие этих исследований привело к экспериментальному обнаружению фосфоресценции синглетного кислорода в химических и биологических системах (см. работы [142, 144–150], а также обзор [151]).

В дальнейшем было продемонстрировано спонтанное и фотоиндуцированное излучение как различных растительных [132, 152], так и животных объектов [133]; было показано, что практически все биологические системы являются источником СССР (см. обзоры [129, 153, 154]).

В истории исследований СССР клеток и тканей животных, а также модельных химических систем можно выделить «советский период» с 1958 по 1975 гг. В это время значительный вклад внесли группы под руководством Б.Н. Тарусова [128, 133, 155–157], Ю.А. Владимирова [127, 132, 135, 158–178], А.И. Журавлева [179–182], Р.Ф. Васильева и В.Я. Шляпинтоха [183–190], С.В. Конева [117, 118, 191–193], А.А. Гурвич [116, 119, 194–197]. Исследования в основном проводились на ФЭУ с охлаждением жидким азотом.

Исследования СССР печени живой мыши показали, что после облучения животного гамма-лучами интенсивность свечения увеличивалась в несколько раз; подобное явление наблюдалось и на экстрактах липидов печени [155]. На основании динамики СССР гомогенатов и ткани печени [162], а также изолированных митохондрий [161, 163, 164] под действием различных химических и физических факторов были исследованы механизмы окисления липидов, т.е. процессов, являющихся основным источником СССР живых организмов. В этот период были развиты схемы исследований СССР в динамике с добавлением к исследуемым системам инициаторов, активаторов и тушителей, заложены методологические основы интерпретации данных СССР.

Огромную роль в изучении механизмов генерации СССР сыграли работы групп Р.Ф. Васильева [186–190, 198–205] и В.Я. Шляпинтоха [206–209], детально исследовавших механизмы перекисного окисления в растворах углеводов. В обширной серии исследований на собственноручно сконструированных уникальных фоточувствительных установках авторы сумели продемонстрировать характерные времена [184, 202, 203], квантовые выходы [187, 198] и даже спектры [188, 199, 204] СССР различных модельных систем. При этом если вначале основные усилия были направлены на исследование суммарной интенсивности СССР без пространственного и временного разрешения, в относительных единицах, то к середине 1960-х гг. фокус исследований сместился на спектры СССР (в том числе в абсолютных единицах) с использованием сменных светофильтров [210] и высокоапертурных монохроматоров [199]. Эти данные позволили авторам охарактери-

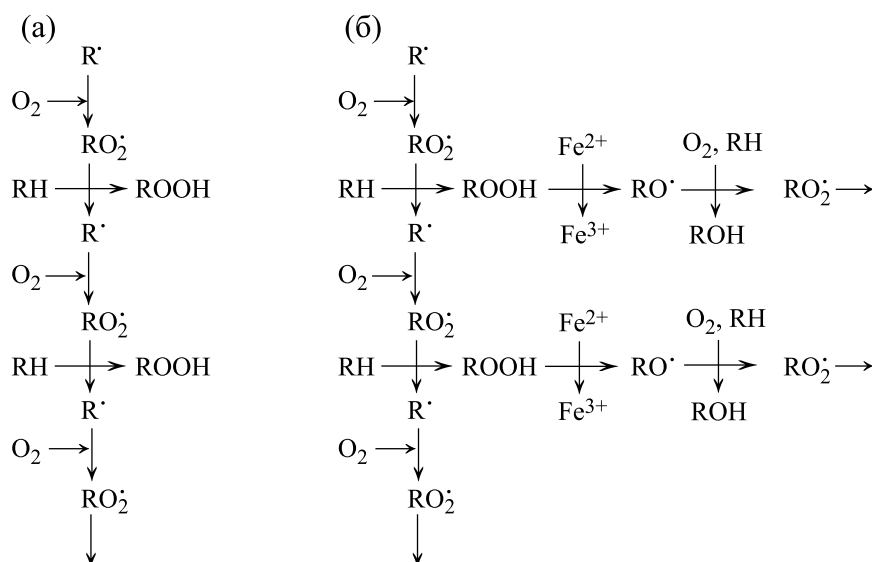


Рис. 2. Схема цепного перекисного окисления липидов с неразветвленными цепями (а) и с разветвленными цепями (б) (согласно работе [170]).

зовать молекулы-эмиттеры и их возбужденные состояния и построить ныне общепризнанную схему процессов свободно-радикального цепного перекисного окисления углеводородов (см. обзор [211]), распространенную впоследствии на жирные кислоты и липиды [127, 172] (см. рис. 2).

Применение в исследованиях многоканальных анализаторов позволило накапливать сигнал в течение многих циклов измерений и увеличить временное разрешение кривых динамики ССС, а также их точность. Это привело к активному исследованию динамики инициации, активации и тушения хемилюминесцентных реакций, лежащих в основе ССС биообъектов. Показанные в «митогенетический» период возможности хемилюминесцентного детектирования следовых количеств веществ в биологических средах были подтверждены и получили практическое развитие. Справедливость теоретических предположений 1930–1940-х гг., объяснявших ССС цепными химическими процессами с участием свободных радикалов [35, 75–79], была подтверждена в отношении ССС видимого и ближнего УФ- и ИК-диапазонов (370–1270 нм) (см. обзоры [127, 129, 172]). Были выявлены и исследованы основные механизмы ССС, каскады соответствующих реакций детально описаны в учебной литературе [153].

В 1971 г. из двух лабораторий появились независимые сообщения о ферментативной и неферментативной хемилюминесценции в микросомах печени [212, 213]. В период между 1977 и 1983 гг. в этой области была выполнена большая серия научных работ, главным образом в лаборатории Б. Чанса (США) [214–216]. Важным этапом стали

работы Р. Аллена, открывшего сверхслабое свечение стимулированных бактериями лейкоцитов крови человека [217, 218] и предложившего люминол в качестве активатора хемилюминесценции макрофагов [219].

Приведенные исследования привели к появлению значительной области — свободнорадикальной биологии [127, 216, 220]. Исследования роли свободных радикалов в нормальной физиологии и в развитии различных патологических процессов резко активизировались после открытия супероксиддисмутазы [221–223] и продолжают до сих пор, причем одним из основных инструментов свободнорадикальной биологии являются именно исследования ССС биообъектов и модельных биохимических систем. Была установлена роль активных форм кислорода в развитии свободнорадикальных процессов (см. монографии [224–226], важное значение окислительного (окислительного) стресса⁸ [229]. Методы исследования ССС позволяют определить окислительный стресс на ранних стадиях развития заболеваний, еще не проявившихся визуально [230, 231], охарактеризовать редокс-статус биообъекта, обнаружить протекание свободнорадикальных процессов, которые не могут быть детектированы

⁸ Оксидативный стресс — «патологическое состояние, связанное с избыточной продукцией свободных радикалов и их биохимически активных метаболитов, превышающего возможности защиты антиоксидантной системы и ведущее к деструктивным последствиям для клетки и организма» [227]. Согласно определению, данному в PubMed, «оксидативный стресс — это нарушение баланса про- и антиоксидантов в пользу первых, которое может привести к повреждению и развитию патологических процессов» (см. также развернутое определение в работе [228]).

другими методами. Существенным преимуществом этого подхода является то, что исследования ССС обычно не связаны с изменением хода процессов в исследуемых растворах, клетках или тканях и обеспечивают высокую чувствительность при обнаружении высокореакционных радикалов.

Впоследствии разработка фотокатодов, имеющих более низкие термоэмиссионные шумы, изменение конструкции ФЭУ и совершенствование обработки сигнала позволили детектировать ССС без охлаждения ФЭУ [232], что значительно упростило технику экспериментов и способствовало внедрению методов исследования ССС на практике [233, 234]. В 1980-х гг. разработка высокочувствительных приборов, позволяющих регистрировать 2D-изображения в режиме счета фотонов, открыла возможности получать изображения ССС [235]; наиболее активные исследования в этом направлении были развернуты в Японии под руководством Х. Инаба и впоследствии М. Кобаяши [137, 236–241, 242–248]. Основными вехами в технике исследований ССС с пространственным разрешением стали появление микроканальных пластин и электронно-оптических преобразователей, а затем CCD-камер [239, 243, 245, 249–251], эти устройства нашли также применение в полихроматических спектральных исследованиях (см. часть III настоящего обзора) [236, 252–254].

Значительное внимание к тематике ССС в 1980–90-х гг. привлекли работы Ф.А. Поппа с соавторами, в первую очередь гипотеза об особенных квантовых свойствах ССС биообъектов: аномально высокой когерентности, так называемом сжатом квантовом состоянии и пр. [255–258]. Авторы развивали это направление, пользуясь измерениями не столько собственного ССС биообъектов, сколько их фотоиндуцированной люминесценции [256]. Гипотеза не получила достаточно убедительного экспериментального подтверждения [131, 259, 260], но привела к значительному развитию методов исследования временных рядов ССС. Для исследования шумовых компонент применялись различные методы цифрового анализа первичных данных ССС, полученных на ФЭУ (автокорреляционный, мультифрактальный, Фурье- и вейвлет-анализ и др.) [261–263].

К настоящему времени продемонстрированы широкие возможности применения методов исследования ССС в медицине (см., например, монографии об исследованиях ССС опухолевых клеток и крови в процессе канцерогенеза [264, 265], обзор методов оценки функциональной активности моноцитов и нейтрофилов [266]), в сельском хозяйстве [267–270], пищевой про-

мышленности [271] и других прикладных направлениях.

1.2. ТИПЫ И ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ

1.2.1. Наименования и типы сверхслабого свечения. К сверхслабым относят обычно излучения с интенсивностью $\sim 10^3$ квантов $\cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и менее, термин сверхслабое свечение (ultraweak luminescence) был предложен в работе [132]. ССС биообъектов получило довольно много синонимичных наименований – сверхслабое излучение, сверхслабая хемилюминесценция биообъектов, сверхслабая биохемилюминесценция, сверхслабая биолуминесценция, биофотоны (последнее, как правило, используется только в популярной литературе) (ultra-weak photon emission, autoluminescence, weak luminescence, biophotons/biophoton emission, low-level chemiluminescence, ultra-weak light emission, ultra-weak bioluminescence, ultraweak emission, ultraweak bioluminescence, self-bioluminescent emission). Три основных типа ССС, обнаруженные при экспериментах с УФ-компонентой в 1920–30-х гг., зачастую получали новые названия при переоткрытии аналогичных явлений в оптическом, ближнем УФ- и ИК-диапазонах в 50-х и 60-х годах прошлого века:

- спонтанное излучение, не связанное с внешними воздействиями [132–134] (в ранних работах называлось также «первичное» [6]⁹);

- стрессовое излучение, возникающее под действием физических или химических факторов [135, 137–140] (в ранних работах – «деградационное» [272–275], см. также сноску⁶);

- длительное (в отличие от обычной флуоресценции и фосфоресценции) послесвечение после облучения светом, т.е. фотоиндуцированная хемилюминесценция [135, 141, 142] (в ранних работах – «вторичное» излучение [276, 277], см. также соответствующие главы в монографиях [6, 37], и «последующее» свечение [278]).

1.2.2. Классификация сверхслабого свечения по спектральным особенностям. Исследования ССС в среднем УФ-диапазоне активно проводились только в «митогенетический» период исследований – были выделены несколько основных спектров, большинство остальных представляло собой их сочетания. Наиболее распространенным был так называемый гликолитический спектр, который наблюдался при реакции расщепления глюкозы и был обусловлен высвечиванием выде-

⁹ Следует отметить, что спонтанным ССС в видимом диапазоне обладают все живые биологические объекты, а УФ-компонента спонтанного ССС по данным ранних авторов наблюдалась только у некоторых, например у раковых опухолей, донца луковицы.

Спектральные диапазоны некоторых электронно-возбужденных состояний, обуславливающих сверхслабое свечение в ближнем УФ-, видимом и ближнем ИК-диапазонах

Молекулы	Электронно-возбужденные состояния	Длины волн, нм	Литература
Карбонилы	Триплетные	350–550	[279, 280]
Меланин	Синглетные	360–560	[281, 282]
Хлорофилл	Синглетные	670–740	[283, 284]
Хлорофилл	Триплетные	870–1000	[285]
Кислород димолярный	Синглетные	634, 703	[286, 287]
Кислород мономолярный	Синглетные	688, 762, 1067, 1270	[288–290]

ляющей энергии целыми молекулами глюкозы (см. часть II настоящего обзора). Теоретические представления о механизмах генерации излучения биообъектами в области среднего УФ-диапазона не были существенно развиты после конца 40-х годов XX века. Напротив, процессы генерации более длинноволнового ССС (370–1270 нм) детально исследованы, установлено, с релаксацией каких возбужденных состояний связано ССС в различных спектральных областях, какие химические реакции являются источником энергии ССС, причем предложенные в 1930–40-х гг. гипотезы о свободнорадикальном механизме и цепном характере обуславливающих ССС реакций подтвердились для излучения видимого диапазона и прилегающих к нему областей ближнего ИК- и УФ-диапазонов (см. таблицу). ССС в этих диапазонах связано с окислением различных биомолекул — липидов, белков, ДНК. Наибольшую интенсивность ССС дают реакции цепного свободнорадикального окисления липидов.

1.2.3. Интенсивность сверхслабого свечения. Интенсивность эндогенного ССС биологических объектов в видимой области и прилегающих к ней полосах ближнего УФ- и ИК-диапазонов находится в диапазоне от 10 до 10^3 квантов $\cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Прижизненно обнаженные органы излучают обычно порядка нескольких десятков квантов $\cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, сывортка и плазма крови — порядка 10^2 квантов $\cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, у экстрагированных свободных липидов и жиров излучение интенсивнее из-за отсутствия естественных антиоксидантов — примерно до 10^3 квантов $\cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ [133, 291].

При патологиях интенсивность ССС существенно меняется, поскольку практически любые патологические состояния сопровождаются оксидативным стрессом, одним из наиболее ярких примеров являются злокачественные новообразования [238, 249, 265].

Как правило, интенсивность ССС биообъектов в среднем УФ-диапазоне оценивали ниже, чем в видимом, ближнем УФ- и ИК-диапазонах, что связано как с более низкой интенсивностью самого излучения, так и его более низким пропусканием биологическими тканями.

1.2.4. Временные характеристики сверхслабого свечения. Поскольку ССС видимого диапазона и ближнего УФ- и ИК-диапазонов связано с метаболическими процессами, неудивительно, что интенсивность ССС живых организмов, как и физиологическая активность, имеет суточную ритмичность (см., например работу [246]). В ССС среднего УФ-диапазона тоже были продемонстрированы характерные биологические ритмы интенсивности излучения, например, суточные колебания излучения крови [293], сезонная периодичность излучения корней лука [294]. Наблюдались и зависимости от жизненных циклов — стадий развития организма или культур микроорганизмов, например куриные эмбрионы излучали только на третьи-четвертые сутки [292], дрожжевые культуры — в фазе линейного роста [11].

Было показано, что спонтанное ССС биологических образцов состоит из отдельных вспышек длительностью не более 10^{-3} с [295, 296]. Этот же вывод сделан в 1930-е гг. в работах по «фракционированию МГИ» [6] (см. работу [125]).

Когерентность ССС до настоящего времени вызывает активную дискуссию и остается спорной (см. работы [131, 259, 297, 298]), в данном обзоре этот вопрос не рассматривается.

1.3. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ

В простейшем случае интенсивность свечения при хемилюминесцентной реакции (I_{ch}) зависит от трех параметров — скорости реакции (v_{ch}), вероятности образования продукта в электронно-возбужденном состоянии (квантового выхода

возбуждения, η_{exc}) и вероятности излучательной релаксации при переходе из электронно-возбужденного в основное состояние (квантового выхода люминесценции, η_{lum}) [232]:

$$I_{\text{ch}} \sim \nu_{\text{ch}} \cdot \eta_{\text{exc}} \cdot \eta_{\text{lum}}.$$

На хемилюминесценцию оказывает влияние целый ряд химических и физических факторов.

Вещества, усиливающие хемилюминесценцию:

Инициаторы — вещества, добавление которых в систему приводит к образованию свободных радикалов, например, перекиси и другие сильные окислители, а также ионы металлов переменной валентности (Fe, Co), которые служат донорами электронов.

Катализаторы — вещества, усиливающие хемилюминесценцию за счет увеличения скорости химических реакций (при этом сами они в процессе реакции не расходуются).

Активаторы — вещества, которые обеспечивают более эффективное преобразование энергии, выделяющейся в химической реакции, в излучательную энергию. Вещества-активаторы подразделяют на химические и физические [299]¹⁰. Химические активаторы вступают с активными веществами, такими как перекиси, органические радикалы, активные формы кислорода, в химические реакции. В ходе этих реакций образуются электронно-возбужденные состояния, релаксация которых сопровождается более интенсивным свечением. Классическими примерами химических активаторов являются люминол и люцигенин. Физические активаторы (сенситизаторы) не влияют на ход химических реакций и увеличивают интенсивность люминесценции за счет физического процесса переноса (миграции) энергии с электронно-возбужденного продукта реакции на молекулу активатора, которая обладает более высоким квантовым выходом люминесценции (примером физического активатора может служить кумарин С-525). Активаторы позволяют увеличить интенсивность свечения на три-пять порядков.

Вещества, ослабляющие хемилюминесценцию:

Ингибиторы — химически активные вещества, тормозящие реакцию, сопровождающуюся хемилюминесценцией, например антиоксиданты — вещества, снижающие количество свободных радикалов.

Разбавители — не участвующие в химической реакции вещества, инертные молекулы которых

пространственно разделяют реагенты, что приводит к замедлению реакции и снижению хемилюминесценции.

Тушители — антагонисты активаторов — вещества, которые перехватывают энергию, выделившуюся при химической реакции, и высвечивают ее с более низким квантовым выходом, например витамин А.

*Светофильтры*¹¹ — вещества, поглощающие ССС, они не влияют на сами химические процессы.

Кроме того, есть *биологические факторы*, влияющие на ССС биообъектов: *триггеры* — физиологические агенты, запускающие процессы с протеканием хемилюминесцентных реакций, и *стимуляторы* — антигены, на которые фагоциты реагируют образованием свободных радикалов.

Среди физических факторов, усиливающих хемилюминесценцию, следует отметить *нагревание*, которое повышает скорости химических реакций или же может выступать в роли инициатора за счет термического разложения веществ с образованием свободных радикалов, а также *воздействие излучений*, приводящее к образованию свободных радикалов.

1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ КАК МЕТОД ХАРАКТЕРИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ: ДОСТОИНСТВА, НЕДОСТАТКИ, ФУНДАМЕНТАЛЬНОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Исследование ССС как метод характеристики биологических объектов обладает важными достоинствами. Это неинвазивный метод (если не использовать специальные флуоресцентные метки), высокочувствительный, позволяющий получить информацию, недоступную другими методами (в первую очередь о процессах, связанных со свободными радикалами, активными формами кислорода, в частности исследования ССС являются основным экспериментальным инструментом свободнорадикальной биологии).

Исследования ССС являются непрямым методом характеристики объекта. Реабсорбция света, миграция энергии, сложность состава биологических систем (гетерогенность, множество параллельно протекающих процессов, от которых зависит ССС, целый ряд различных каскадов реакций, обуславливающих свечение), а также чувствительность к сторонним факторам затруд-

¹⁰ Встречается и другая терминология: активаторами называют только физические активаторы [187] — следует отметить, что в этой статье термин введен впервые [291], при этом химические активаторы — называют зондами [291].

¹¹ В старой терминологии их называли гасителями. В частности, прекращение МГИ крови при многих заболеваниях было объяснено гасителями, являющимися продуктами патологического обмена, например, кетоновыми телами при диабете [35].

няют интерпретацию регистрируемого сигнала ССС.

В настоящее время исследования ССС в диапазоне 370–1270 нм приобретают все более практическую направленность: методики, основанные на анализе хемилюминесценции биообъектов, находят применения в медицинской практике [300, 301], фундаментальных биомедицинских исследованиях [302–304], пищевой промышленности, сельском хозяйстве [271] и других областях. Вместе с тем продолжают фундаментальные исследования самого явления ССС в контексте как метаболических процессов [305], так и квантовых механизмов [306].

Значимость методов исследования ССС связана в первую очередь с тем, что это излучение обусловлено свободными радикалами, которые играют очень важную роль как в патологическом, так и в нормальном физиологическом метаболизме — в частности, в процессах пролиферации клеток, обеспечения их выживаемости, в провоспалительном ответе и реакции на повреждение ДНК.

Применение исследований ССС в качестве метода неинвазивной диагностики предлагается в разных областях медицины (см. обзоры [307, 308], а также диссертацию [309]), например, в офтальмологии [310], эндокринологии [311], но особенно широко — в области кожных заболеваний, связанных с оксидативным стрессом [312–318], и в онкологии [265, 319–321]. Раковые опухоли отличаются более интенсивным ССС¹², чем нормальные ткани [238, 249, 265, 328], например, по оценкам, выполненным с экспериментальным раком мыши — в 1.5–4.7 раза [238], причем интенсивность излучения коррелирует с размером опухоли [329]. Одной из причин более интенсивного ССС является более активный метаболизм раковых клеток [249], другой — пониженная концентрация ферментов, элиминирующих активные формы кислорода (супероксиддисмутазы, каталазы и др.), по сравнению с нормальными тканями [330].

В сельском хозяйстве исследования интенсивности и спектра ССС перспективны для оценки всхожести и показателей роста семян [331, 332], реакции растений на патогены [333], гербициды [334], влияние неблагоприятных факторов — засухи [335], солевого стресса [336] и др. Для пищевой промышленности перспективно использование ССС для экспресс-скрининга качества продуктов (см., например, установку, предложенную в работе [337]), показана корреляция ССС с каче-

ством различных продуктов — яиц [338], томатов [339] и др. [340], для фармацевтики продемонстрирована возможность оценки свежести и других качеств растительного сырья для лекарственных препаратов [341, 342]; см. также обзор [271].

Исследования ССС в видимом, ближнем УФ- и ИК-диапазонах помогают оценить состояние биологических систем, их адаптационные возможности и нарушения физиологического режима (часто для этого исследуют стрессовое ССС, например в работах [268–270]).

В отличие от успешно развивающихся исследований в видимом, ближнем УФ- и ИК-диапазонах современное состояние работ в области ССС биологических объектов в среднем УФ-диапазоне является крайне неудовлетворительным. Насколько нам известно, за последние две декады не было публикаций, посвященных экспериментальным исследованиям этого феномена физическими методами¹³. Это в первую очередь связано с распространенным негативным отношением к тематике, которое сложилось в основном из-за отсутствия доступа к оригинальной литературе и благодаря частным мнениям ряда влиятельных авторов, принимаемым на веру (например, [13, 46, 114, 115, 344, 345]). Само существование УФ-ССС в области 190–280 нм и биологический эффект, на котором было основано его детектирование (митогенетический эффект, т.е. изменение митотического режима биологического объекта под действием сверхслабого УФ-излучения), вопреки сложившемуся мнению, на самом деле не были убедительно опровергнуты ни экспериментально, ни теоретически и не противоречат никаким фактическим данным. Вместе с тем сомнительное отношение к масштабным результатам первых 25 лет исследований ССС, которые получили в 1920–30-х гг. достаточное признание научной общественности и вошли в учебники и справочники, отчасти оправдано не-

¹² Следует отметить, что исследователи митогенетического излучения также отмечали, что опухоли являются наиболее активными излучателями [8, 35, 322–327].

¹³ Наиболее «современные» физические исследования ССС биологических объектов, в которых была выделена ультрафиолетовая компонента, были выполнены почти 30 лет назад [120, 122]. Хотя приведенные в них данные о средней интенсивности и спектральном диапазоне вполне согласуются с известными по архивной литературе, они не могут служить их убедительным подтверждением из-за слишком широкого доверительного интервала (50%), приведенного на графиках (выбор такого широкого интервала был связан, вероятно, со значительными шумами). Имеется значительное количество публикаций по регистрации ССС различных биологических объектов с помощью широкополосных ФЭУ в диапазоне, охватывающем область от 200 нм, но без выделения УФ-компоненты. Кроме того, в течение последних двадцати лет были единичные публикации по регистрации хемилюминесценции чисто химических систем в диапазоне, частично охватывающем средний УФ (в работе [343], например, — от 250 нм).

достаточной доказательностью на современном уровне именно старых биологических методик детектирования¹⁴ (см часть II настоящего обзора). Вместе с тем следует отметить, что многие неординарные для того времени научные выводы, сделанные в «митогенетический период» с использованием этих методик, были убедительно подтверждены спустя десятилетия (существование пептидных онкомаркеров крови, свободно-радикальные механизмы сверхслабого свечения биологических объектов, роль цепных процессов, оценка интенсивности ССС, объяснение низкого квантового выхода хемилюминесценции в живых системах и др.). Все это вызывает значительный интерес к тем результатам, которые были получены в тех же авторитетных научных коллективах, с использованием тех же экспериментальных методов, но в дальнейшем не были ни опровергнуты, ни подтверждены, хотя по научной проблематике остаются высокоактуальными до настоящего времени (например, фундаментальные результаты, касающиеся деления клеток и канцерогенеза, онкодиагностика). В связи с этим, в данном обзоре критическому анализу методов, которыми они были получены, уделено значительное внимание (см часть II настоящего обзора), несмотря на то, что в настоящее время само применение биологических детекторов для исследования физических свойств ССС представляется неактуальным.

В связи с важностью затрагиваемых вопросов и достаточным развитием техники детектирования в среднем УФ-диапазоне, в ближайшее время можно ожидать ревизии результатов первых 25 лет исследований ССС, которые фактически остаются вычеркнуты из истории этого научного направления. Мы считаем необходимыми их экспериментальную проверку и современное объяснение.

Для обзора был использован уникальный архив научных публикаций, собранный А.Г. Гурвичем, его женой Л.Д. Гурвич, дочерью А.А. Гурвич и внуком Л.В. Белоусовым, за что авторы выражают благодарность их наследникам.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-12-50328.

¹⁴ Особенно неубедительными они выглядят в более поздних популярных изложениях, которые, как правило, основаны не на оригинальной литературе, а на ее «пересказах» из старых обзоров, обычно неоправданно категоричных и односторонних.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. G. Gurwitsch, *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* **100** (1–2), 11 (1923).
2. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Успехи соврем. биологии* **16** (3), 305 (1943).
3. A. G. Gurwitsch, *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* **103** (3–4), 490 (1924).
4. A. G. Gurwitsch, *Bulletin d'histologie appliquée a la physiologie et a la pathologie et de technique microscopique* **1** (11), 486 (1924).
5. A. G. Gurwitsch, *Das Problem der Zellteilung physiologisch betrachtet* (Julius Springer, Berlin, 1926).
6. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетическое излучение* (Изд. ВИЭМ, Ленинград, 1934).
7. O. Rahn, *Invisible radiations of organisms* (Gebrüder Bornträger, Berlin, 1936).
8. T. Reiter and D. Gabor, *Zellteilung und Strahlung* (Springer-Verlag, Berlin, 1928).
9. W. W. Siebert, *Biochemische Zeitschrift* **202**, 123 (1928).
10. L. K. Wolff and G. Ras, *Nature* **133** (3361), 499 (1934).
11. J. B. Tuthill and O. Rahn, *Archiv für Mikrobiologie* **4** (1–4), 565 (1933).
12. L. K. Wolff and G. Ras, *Zitrbl. f. Bakt. I.* **123**, 257 (1931).
13. A. Hollaender and W. D. Claus, *An experimental study of the problem of mitogenetic radiation* (National research council of the National academy of sciences, Washington, 1937).
14. Б. П. Токин, *Митогенетические лучи* (Гос. мед. изд-во, 1933).
15. M. Copisarow, *Nature* **130**, 1001 (1932).
16. A. Gurwitsch, *Nature* **131** (3321), 912 (1933).
17. J. B. Bateman, *Nature* **133** (860) (1934).
18. A. D. Braun, *Nature* **134** (3388), 536 (1934).
19. M. Heinemann, *Nature* **134**, 701 (1934).
20. E. G. Prokofiewa, *Nature* **134** (3389), 574 (1934).
21. Anonim, *Nature* (December, 11), 1007 (1937).
22. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, *Nature* **143** (3633), 1022 (1939).
23. R. Audubert, *Angewandte Chemie* **51** (11), 153 (1938).
24. G. M. Frank and A. G. Gurwitsch, *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. Mech. Org.* **109** (3), 451 (1927).
25. G. Frank and S. Rodionow, *Die Naturwissenschaften* **19** (30), 659 (1931).
26. G. Frank and S. Rodionow, *Biochemische Zeitschrift* **249** (4/6), 323 (1932).

27. С. Родионов и Г. М. Франк, Архив биол. наук, сер. Б **35** (1), 277 (1934).
28. G. M. Frank and M. Popoff, Comptes Rendus de l'Academie des Sciences **188**, 1010 (1929).
29. G. Frank and M. Kurepina, Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. Mech. Org. **121** (4), 634 (1930).
30. G. Frank and M. Popoff, Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere **223** (1), 301 (1930).
31. G. Frank, Biologisches Zentralblatt **52** (1), 1 (1932).
32. С. Родионов и Г. М. Франк, *Вопросы свето-биологии и измерения света* (Гос. техн.-теорет. изд-во, М.-Л., 1934).
33. J. Chariton, G. Frank, and N. Kannegiesser, Naturwissenschaften **18** (19), 411 (1930).
34. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетический анализ нервного возбуждения* (ВиЭМ, М.-Л., 1935).
35. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетическое излучение: Физико-химические основы и приложения в биологии и медицине* (Медгиз, М., 1945).
36. А. Г. Гурвич, Л. Д. Гурвич, С. Я. Залкинд и др., *Учение о раковом тушителе: Теория и клиника* (Изд-во АМН СССР, М., 1947).
37. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Введение в учение о митогенезе* (Изд-во Акад. мед. наук СССР, М., 1948).
38. *Сборник работ по митогенезу и теории биологического поля* (Изд-во АМН СССР, М., 1947).
39. *Исследования по митогенетическому излучению. Сборник, посвященный 10-летию открытия митогенетических лучей А. Г. Гурвичем (1923—1933)*. (Изд-во Всесоюз. Института экспериментальной медицины, Л., 1934).
40. N. P. N. Database, <https://www.nobelprize.org/nomination/archive>.
41. L. K. Wolff and G. Ras, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten **128**, 314 (1933).
42. A. Potozky, Protoplasma **25** (1), 49 (1936).
43. T. Yamada, H. Sugiura, H. Mimura, et al., **7** (3), eabd2013 (2021).
44. M. A. Mousa, M. Soliman, M. A. Saleh, et al., Sci. Rep. **11** (1), 3054 (2021).
45. J. Jung, Biohybrid sensor systems for the detection of metal ions in water: Dissertation (Faculty of Mechanical Science and Engineering, Technischen Universität, Dresden, 2020).
46. B. Rossmann, Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen **113** (2), 346 (1928).
47. W. Loos, Jahrb. Wiss. Bot. **72** (4), 611 (1930).
48. G. W. Taylor and E. N. Harvey, Biolog. Bull. **61** (3), 280 (1931).
49. H. Schreiber and W. Friedrich, Biochem. Zeitsch. (227), 386 (1930).
50. B. Rajewsky, in *Zehn Jahre Forschung auf dem physikalisch-medizinischen Grenzgebiet*, Ed. by F. Dessauer (Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1931), pp. 244—257.
51. W. W. Siebert and H. Seffert, Naturwissenschaften **21** (9), 193 (1933).
52. L. Grebe, A. Krost, and L. Peukert, Strahlenther Onkol. **60**, 538 (1938).
53. R. Audubert, Trans. Faraday Soc. **35** (213), 197 (1939).
54. W. Gerlach, Sitzungsber. Ges. Morphol. und Physiol. [München] **42**, 1 (1933).
55. H. Barth, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 29 (1934).
56. Г. Барт, Архив биол. наук **46** (1), 153 (1937).
57. R. Audubert and R. Lévy, Comptes Rendus Acad. Sci. **200**, 1634 (1935).
58. R. Audubert and R. Lévy, Comptes Rendus Acad. Sci. **201** (3), 236 (1935).
59. R. Audubert, Document Sci. **5**, 267 (1936).
60. R. Audubert, J. Chim. Physique **33**, 507 (1936).
61. R. Audubert, Comptes Rendus Acad. Sci. **202**, 406 (1936).
62. R. Audubert and V. Otakar, Comptes Rendus Acad. Sci. **202**, 1504 (1936).
63. R. Audubert and M. Prost, Comptes Rendus Acad. Sci. **202**, 1047 (1936).
64. M. M. R. Lévy and R. Audubert, Protoplasma **25** (1), 25 (1936).
65. R. Audubert, J. Chim. Phys **34**, 405 (1937).
66. R. Audubert, Comptes Rendus Acad. Sci. **204**, 1192 (1937).
67. R. Audubert, Comptes Rendus Acad. Sci. **205**, 133 (1937).
68. R. Audubert and H. Muraour, Comptes Rendus Acad. Sci. **204**, 431 (1937).
69. R. Audubert, Comptes Rendus Acad. Sci. **206**, 748 (1937).
70. R. Audubert and J. Maittlier, Comptes Rendus Acad. Sci. **206**, 1939 (1938).
71. R. Audubert and C. Raczy, Comptes Rendus Acad. Sci. **208** (23), 1810 (1939).
72. R. Audubert and R. Ralea, Comptes Rendus Acad. Sci. **208** (23), 983 (1939).
73. R. Audubert and E. T. Verdier, Comptes Rendus Acad. Sci. **208** (25), 1984 (1939).
74. W. E. Garner, M. Polanyi, H. Emeléus, et al., Trans. Faraday Soc. **35** (0), 204 (1939).
75. А. Е. Браунштейн и А. П. Потоцкая, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 87 (1934).
76. А. Гурвич, Л. Д. Гурвич, и А. А. Слюсарев, Архив биол. наук **55** (2), 104 (1939).
77. А. Г. Гурвич, Физиол. журн. **29** (4), 243 (1940).
78. А. А. Гурвич, Природа (5—6), 77 (1942).
79. А. Г. Гурвич, Изв. АН СССР (сер. физическая) **9** (4—5), 335 (1945).
80. A. Gurwitsch and L. Gurwitsch, *L'analyse mitogénétique spectrale* (Hermann & Cie, Paris, 1934).
81. Е. С. Биллиг, Н. Н. Каннегисер и Л. Т. Соловьев, Архив биол. наук, Сер. Б **35** (1), 37 (1934).
82. Е. С. Биллиг, Бюл. эксперим. биологии и медицины **5** (4), 314 (1938).
83. Э. С. Бауэр, *Теоретическая биология* (Изд-во ВИЭМ, М.-Л., 1935).
84. А. Сент-Дьердьи, *Биоэлектроника* (М, 1971).
85. B. Rajewsky, Zeits. f. Physik **63**, 576 (1930).

86. B. Rajewsky, *Strahlenther Onkol.* **39**, 194 (1930).
87. B. Rajewsky, *Zeitschrift für Krebsforschung* **35** (1), 387 (1932).
88. T. Reiter and D. Gabor, *Strahlenther Onkol.* (28), 125 (1928).
89. G. Frank, *Biologisches Zentralblatt* **49**, 129 (1929).
90. L. D. Gurwitsch, *Biochemische Zeitschrift* **236** (4–6), 425 (1931).
91. N. Kannegiesser, *Biochemische Zeitschrift* **236**, 415 (1931).
92. J. Ponomarewa, *Biochemische Zeitschrift* **239**, 424 (1931).
93. E. Billig, N. Kannegiesser, and L. Solowjew, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **210** (5–6), 220 (1932).
94. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, *Biochemische Zeitschrift* **246** (1–3), 124 (1932).
95. K. P. Golischewa, *Biochemische Zeitschrift* **260**, 52 (1933).
96. G. S. Kalendaroff, *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **231**, 238 (1933).
97. К. П. Голышева, *Архив биол. наук* **33** (1–2), 107 (1933).
98. G. E. Decker, *Архив биол. наук, Сер. Б* **35** (1), 145 (1934).
99. Л. Д. Гурвич, *Архив биол. наук, Сер. Б* **35** (1), 141 (1934).
100. Г. С. Календаров, *Архив биол. наук* **32** (1), 26 (1934).
101. A. A. Gurwitsch, *Ann. Physiol. Physicochem. Biol.* **10** (5), 1153 (1934).
102. А. А. Гурвич, *Архив биол. наук, Сер. Б* **35** (1), 127 (1934).
103. И. В. Цоглина, *Архив биол. наук, Сер. Б* **35** (1), 341 (1934).
104. Г. С. Календаров, *Архив биол. наук, Сер. Б* **35** (1), 183 (1934).
105. A. A. Gurwitsch, *Ann. Physiol. Physicochem. Biol.* **10** (5), 1166 (1934).
106. A. A. Gurwitsch, *Ann. Physiol.* **14** (2), 182 (1938).
107. A. Gurwitsch and L. Gurwitsch, *Protoplasma* **25** (1), 1 (1936).
108. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетический анализ биологии раковой клетки* (Изд. ВИЭМ, М, 1937).
109. Б. С. Песоченский, *Феномен тушения митогенетического излучения крови при раке и «предраковых состояниях»*: Дисс. ... д-ра мед. наук (Ленинградский онкологический институт, Ленинград, 1942).
110. Б. С. Песоченский, в кн. *Сборник работ по митогенезу и теории биологического поля*, под ред. А. Г. Гурвич (Изд-во АМН СССР, Москва, 1947), сс. 102–114.
111. Е. Е. Авчина, *О прогностическом значении реакции тушения митогенетического излучения крови при лечении рака матки*: Дисс. ... канд. мед. наук (Институт онкологии, Ленинград, 1950).
112. В. П. Нагорянская, *Митогенетическое излучение крови у больных злокачественными новообразованиями*: Дисс. ... канд. мед. наук (Центральный онкологический институт НКЗ РСФСР, Москва, 1945).
113. О. Е. Нудольская, *Предраковое состояние шейки и тела матки*: Дисс. ... д-ра мед. наук (2-й Московский государственный медицинский институт, Москва, 1945).
114. J. B. Bateman, *Biol. Rev.* **10** (1), 42 (1935).
115. I. Langmuir and R. N. Hall, *Phys. Today* **42** (1989).
116. A. A. Gurwitsch, V. F. Ereemeev, and Y. A. Karabchievsky, *Nature* **206**, 20 (1965).
117. Н. А. Троицкий, С. В. Конев и М. А. Катибников, *Биофизика* **6** (2), 238 (1961).
118. С. В. Конев, Т. И. Лыскова, и Г. Д. Нисенбаум, *Биофизика* **11** (2), 361 (1966).
119. А. А. Гурвич, В. Ф. Еремеев и Ю. А. Карабчиевский, *Энергетические основы митогенетического излучения и его регистрация на фотоэлектронных умножителях* (Медицина, Москва, 1974).
120. R. N. Tilbury and T. I. Quickenden, *J. Bioluminescence Chemiluminescence* **7** (4), 245 (1992).
121. Р. Одюбер, *Успехи химии* **7** (12), 1858 (1938).
122. Т. I. Quickenden and R. N. Tilbury, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **8** (2), 169 (1991).
123. Л. В. Белоусов, В. Л. Воейков и Ф.-А. Попп, *Природа* (3), 64 (1997).
124. V. L. Voeikov and L. V. Beloussov, in *Biophotonics and Coherent Systems in Biology* (Springer, Boston, MA, 2007), pp. 1–16.
125. I. V. Volodyaev and L. V. Beloussov, *Front. Physiol.* **6** (00241), 1 (2015).
126. E. V. Naumova, A. E. Naumova, D. A. Isaev, et al., *J. Biomed. Photonics & Engineering* **4** (4), 040201 (2018).
127. Ю. А. Владимиров, *Сверхслабые свечения при биохимических реакциях* ("Наука", М, 1966).
128. Б. Н. Тарусов, И. И. Иванов и Ю. М. Петрусевиц, *Сверхслабое свечение биологических систем*. (изд-во МГУ, М, 1967).
129. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
130. V. L. Voeikov, *Riv. Biol.* **103** (2–3), 321 (2010).
131. M. Cifra and P. Pospisil, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **139**, 2 (2014).
132. Ю. А. Владимиров и Ф. Ф. Литвин, *Биофизика* **4** (5), 601 (1959).
133. Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода и А. И. Журавлев, *Биофизика* **6** (4), 490 (1961).
134. J. Kim, Y. U. Kim, Y. J. Lee, et al., *J. Health Sci.* **53** (4), 481 (2007).
135. Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин и Т. Мань-ци, *Биофизика* **7** (6), 675 (1962).
136. В. В. Перелыгин и Б. Н. Тарусов, *Биофизика* **11**, 616 (1966).
137. S. Suzuki, M. Usa, T. Nagoshi, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **9** (2), 211 (1991).
138. D. Piao, *SN Appl. Sci.* **2** (9) (2020).
139. D. Piao, *SN Appl. Sci.* **2** (9) (2020).
140. M. Maccarrone, A. Finazzi Agro, and N. Rosato, *J. Bioluminescence Chemiluminescence* **13** (5), 287 (1998).
141. W. Arnold, *Science* **154** (3752), 1046 (1966).

142. А. А. Красновский мл. и Ф. Ф. Литвин, Докл. АН СССР **173** (2), 451 (1967).
143. B. L. Strehler and W. Arnold, J. Gen. Physiol. **34** (6), 809 (1951).
144. А. А. Красновский мл. и Ф. Ф. Литвин, Молекуляр. биология **1** (5), 712 (1967).
145. А. А. Красновский мл. и Ф. Ф. Литвин, Молекуляр. биология **3** (2), 282 (1969).
146. А. А. Красновский мл. и Ф. Ф. Литвин, Доклады АН СССР **194** (1), 197 (1970).
147. A. A. Krasnovsky Jr. and F. F. Litvin, Photochem. Photobiol. **20**, 133 (1974).
148. А. А. Красновский мл. и М. Г. Шапошникова, Молекуляр. биология **8** (5), 666 (1974).
149. А. А. Красновский мл., М. Г. Шапошникова и Ф. Ф. Литвин, Биофизика **19** (4), 650 (1974).
150. В. М. Ширяев, И. Б. Федорович, И. И. Сапезинский и др., Биофизика **25** (3), 439 (1980).
151. А. А. Красновский, в кн. *Фундаментальные науки-медицине: Биофизические медицинские технологии*, под ред. А. И. Григорьева и Ю. А. Владимирова (МАКС Пресс, М., 2015), т. 1, сс. 173–218.
152. L. Colli and U. Facchini, Il Nuovo Cimento **12** (1), 150 (1954).
153. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Лекции по медицинской биофизике (учебник)* (Изд-во МГУ, М., 2007).
154. E. P. A. Wijk and R. Wijk, Complementary Med. Res. **12** (2), 96 (2005).
155. Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода и А. И. Журавлев, Радиобиология **1** (1), 150 (1961).
156. Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода, А. И. Журавлев и др., Цитология **4**, 696 (1962).
157. Б. Н. Тарусов, *Сверхслабое свечение живых организмов* («Знание», М., 1972).
158. С. Л. Аксенцев, В. И. Оленев и Ю. А. Владимиров, в сб. *Тезисы докладов Всесоюзного совещания по биологическому действию УФ-облучения* («Медицина», Москва, Вильнюс, 1964), с. 65.
159. Ю. А. Владимиров и О. Ф. Львова, Биофизика **9** (4), 506 (1964).
160. О. Ф. Львова и Ю. А. Владимиров, в сб. *Тезисы докладов симпозиума «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»*, (1964), с. 34.
161. О. Ф. Львова и Ю. А. Владимиров, в сб. *Тезисы докладов XIII Совещания по люминесценции* (Харьков, 1964), сс. 75–76.
162. Ю. А. Владимиров и О. Ф. Львова, в кн. *Биофизика клетки*, под ред. Г. М. Франка (Наука, М., 1965), сс. 74–83.
163. Ю. А. Владимиров, О. Ф. Львова и З. П. Черемисина, Биохимия **31** (3), 507 (1966).
164. О. Ф. Львова и Ю. А. Владимиров, Труды МОИП **16**, 214 (1966).
165. О. Ф. Львова, З. П. Черемисина и Ю. А. Владимиров, в сб. *Тезисы докладов Всесоюз. конф. молодых ученых «Молекулярная биофизика»* (Пушино-на-Оке, 1966), сс. 48–49.
166. Ю. А. Владимиров, в кн. *Структура и функция биологических мембран. Реакции цепного окисления липидов в мембранных структурах клеток* (1968), сс. 12–14.
167. Ю. А. Владимиров, Т. Б. Суслова, В. И. Оленев и др., в кн. *Структура и функция биологических мембран. Реакции цепного окисления липидов в мембранных структурах клеток* (1968), сс. 203–207.
168. Ю. А. Владимиров, Т. Б. Суслова, и З. П. Черемисина, Биохимия **33** (4), 720 (1968).
169. Ю. А. Владимиров, в кн. *Сверхслабые свечения в биологии*, под ред. В. А. Веселовского (Изд-во МГУ, М., 1969), сс. 13–14.
170. Ю. А. Владимиров, Т. Б. Суслова и В. И. Оленев, Биофизика **14** (5), 836 (1969).
171. Т. Б. Суслова, В. И. Оленев и Ю. А. Владимиров, Биофизика **14**, 510 (1969).
172. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
173. М. В. Корчагина и Ю. А. Владимиров, Биофизика **17** (6), 1037 (1972).
174. Ю. А. Владимиров, П. В. Сергеев, Р. Д. Сейфулло и др., Молекуляр. биология **7** (2), 247 (1973).
175. А. И. Марзоев, Д. И. Рощупкин и Ю. А. Владимиров, Биофизика **18** (2), 258 (1973).
176. В. М. Гукасов, П. В. Сергеев, Р. Д. Сейфулло и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **78** (11), 54 (1974).
177. П. В. Сергеев, Ю. А. Владимиров, Р. Д. Сейфулло и др., Вопр. мед. химии **20** (4), 359 (1974).
178. Р. Р. Фархутдинов и Ю. А. Владимиров, Труды 2-го Моск. гос. мед. института им. Н.И. Пирогова. Сер. Хирургия **9** (8), 34 (1974).
179. А. И. Журавлев, Ю. И. Филиппов и В. В. Симонов, Биофизика **9** (6), 671 (1964).
180. А. И. Журавлев, Ю. И. Филиппов и В. В. Симонов, Биофизика **10** (2), 246 (1965).
181. О. П. Цвильев, С. М. Зубкова и А. И. Журавлев, в сб. *Сверхслабые свечения в медицине и сельском хозяйстве* (Изд-во МГУ, М., 1974), с. 49.
182. А. И. Журавлев и А. И. Журавлева, *Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике* (Медицина, М., 1975).
183. V. A. Belyakov and R. F. Vassil'ev, Photochem. Photobiol. **11** (3), 179 (1970).
184. R. F. Vassil'ev and A. A. Vichutinskii, Nature **194** (4835), 1276 (1962).
185. R. F. Vassil'ev, Nature **196** (4855), 668 (1962).
186. Р. Ф. Васильев и А. А. Вичутинский, Докл. АН СССР **142** (3), 615 (1962).
187. Р. Ф. Васильев и А. А. Вичутинский, Журн. физ. химии **36** (8), 1799 (1962).
188. Р. Ф. Васильев и И. Ф. Русина, Докл. АН СССР **156** (6), 1402 (1964).
189. Р. Ф. Васильев, Оптика и спектроскопия **18** (2), 236 (1965).
190. Р. Ф. Васильев, Оптика и спектроскопия **18** (3), 415 (1965).

191. С. В. Конев, в сб. *Труды МОИП: Билюминесценция* (Наука, М., 1965), т. 21, сс. 181–185.
192. С. В. Конев и И. Д. Волотовский, *Введение в молекулярную фотобиологию*. (Наука и техника, Минск, 1971).
193. S. V. Konev, in *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids*, Ed. by S. V. Konev (Springer, Boston, MA, 1967), pp. 177–191.
194. А. А. Гурвич, *Проблема митогенетического излучения как аспект молекулярной биологии* (Медицина, Л., 1968).
195. А. А. Гурвич, В. Ф. Еремеев и Ю. А. Карабчиевский, Докл. АН СССР **178** (6), 1432 (1968).
196. А. А. Гурвич, В. Ф. Еремеев и Ю. А. Карабчиевский, Докл. АН СССР. Сер. биол. **195** (4), 972 (1970).
197. Л. Л. Шляхтина и А. А. Гурвич, Биофизика **17** (6), 1146 (1972).
198. Р. Ф. Васильев, Дисс. ... докт. физ.-мат. наук (ЛГУ им. А. А. Жданова, Л., 1963).
199. Р. Ф. Васильев, в сб. *Труды МОИП: Билюминесценция* (Наука, М., 1965), т. 21, с. 170.
200. Р. Ф. Васильев и А. А. Вичутинский, Докл. АН СССР **145** (6), 1301 (1962).
201. Р. Ф. Васильев, А. А. Вичутинский и А. С. Черкасов, Докл. АН СССР **149** (1), 124 (1963).
202. Р. Ф. Васильев, О. И. Карпухин и В. Я. Шляпинтох, Докл. АН СССР **125** (1), 106 (1959).
203. Р. Ф. Васильев, О. Н. Карпухин и В. Я. Шляпинтох, Журн. физ. химии **35**, 461 (1961).
204. Р. Ф. Васильев и И. Ф. Русина, Изв. АН СССР, Сер. хим. **9**, 1728 (1964).
205. R. F. Vasiljev (Pergamon, N. Y., 1967), Vol. 4, p. 305.
206. V. Y. Shliapintokh, R. F. Vassil'ev, O. N. Karpukhine, et al., J. Chim. Phys. **57** (11–12), 1113 (1960).
207. В. Я. Шляпинтох, О. Н. Карпухин, Л. М. Постников и др., *Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов* (Наука, М., 1966).
208. О. Н. Карпухин, В. Я. Шляпинтох, Н. В. Золотова и др., Журн. физ. химии **37**, 1636 (1963).
209. О. Н. Карпухин, В. Я. Шляпинтох и Н. В. Золотова, Изв. АН СССР. Сер. хим. **10**, 1718 (1963).
210. А. А. Аревшатын, Автореферат дис. ... канд. биол. наук (Отделение биол. наук АН Армянской ССР, Ереван, 1966).
211. Р. Ф. Васильев, Успехи физ. наук **89** (3), 409 (1966).
212. Т. А. Александрова, А. И. Арчаков, Ю. А. Владимиров и др., Биофизика **16**, 946 (1971).
213. B. Chance and N. Oshino, Biochem. J. **122** (2), 225 (1971).
214. A. Boveris, N. Oshino, and B. Chance, Biochem. J. **128** (3), 617 (1972).
215. A. Boveris and B. Chance, Biochem. J. **134** (3), 707 (1973).
216. A. Boveris, E. Cadenas, and B. Chance, Fed. Proc. **40** (2), 195 (1981).
217. R. C. Allen, R. L. Stjernholm, and R. H. Steele, Biochem. Biophys. Res. Commun. **47**, 679 (1972).
218. R. L. Stjernholm, R. C. Allen, R. H. Steele, et al., Infect. Immun. **7** (2), 313 (1973).
219. R. C. Allen and L. D. Loose, Biochem. Biophys. Res. Commun. **69** (1), 245 (1976).
220. B. Chance and G. Gao, Environ. Health Perspectives **102** (Suppl), 29 (1994).
221. J. M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem. **244** (22), 6049 (1969).
222. J. M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem. **244** (22), 6056 (1969).
223. J. M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem. **245** (6), 1374 (1970).
224. Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев и др., *Свободные радикалы в живых системах* (ВИНИТИ, Москва, 1992).
225. К. Н. Новиков, Ю. П. Козлов и С. В. Котелевцев, *Свободно-радикальные процессы в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды* (РУДН, М., 2011).
226. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., *Источники и мишени свободных радикалов в крови человека* (МАКС Пресс, М., 2017).
227. Е. В. Проскурнина, *Методы оценки свободнорадикального гомеостаза крови* (Изд-во МГУ, М., 2018).
228. V. V. Tuchin, *Dictionary of Biomedical Optics and Biophotonics* (SPIE Press, Bellingham, Washington, 2012).
229. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5rd ed. (Oxford University Press, 2015).
230. M. Kobayashi, K. Sasaki, M. Enomoto, et al., J. Exp. Bot. **58** (3), 465 (2007).
231. Y. Gabe, M. Tobishi, K. Takeda, et al., J. Invest. Dermatol. **139** (9), S309 (2019).
232. Ю. А. Владимиров и А. Я. Потапенко, *Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебное пособие для медицинских и биологических спец. вузов* (Высш. шк., М., 1989).
233. В. М. Земсков, А. М. Барсуков, А. А. Безносенко и др., *Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток). Методические рекомендации МЗ РФ* (М., 1988).
234. Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин и Х. И. Истамов, *Экологическая иммунология* (ВНИРО, М., 1995).
235. Y. Tsuchiya, E. Inuzuka, T. Kurono, et al., in *Proc. 8th Symp. on Photo-Electronic Image Devices* (1986), pp. 21–31.
236. R. Q. Scott and H. Inaba, J. Bioluminescence Chemiluminescence **4** (1), 507 (1989).
237. R. Q. Scott, M. Usa, and H. Inaba, Appl. Phys. B **48** (2), 183 (1989).
238. T. Amano, M. Kobayashi, B. Devaraj, et al., Urol. Res. **23** (5), 315 (1995).
239. M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, et al., Photochem. Photobiol. **65** (3), 535 (1997).
240. M. Kobayashi, M. Takeda, K. I. Ito, et al., J. neurosci. Methods **93** (2), 163 (1999).

241. M. Kobayashi, M. Takeda, T. Sato, et al., *Neurosci. Res.* **34** (2), 103 (1999).
242. K. Tsuchida and M. Kobayashi, *Sci. Rep.* **10** (1), 9626 (2020).
243. S. Usui, M. Tada, and M. Kobayashi, *Sci. Rep.* **9** (1), 8576 (2019).
244. K. Tsuchida, T. Iwasa, and M. Kobayashi, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **198**, 111562 (2019).
245. M. Kobayashi, *J. Photochem. Photobiol. B* **139**, 34 (2014).
246. M. Kobayashi, D. Kikuchi, and H. Okamura, *PloS One* **4** (7), e6256 (2009).
247. E. Van Wijk, E. van Wijk, H. Koch, et al., *J. Altern. Complement. Med.* **12** (1), 31 (2006).
248. Kobayashi, M., in *Biophotonics — Optical Science and Engineering for the 21st Century*, Ed. by X. Shen and R. Van Wijk (Springer, N. Y., 2005), pp. 155–170.
249. M. Takeda, M. Kobayashi, M. Takayama, et al., *Cancer Sci.* **95** (8), 656 (2004).
250. E. van Wijk, M. Kobayashi, R. van Wijk, et al., *PloS One* **8** (12) (2013).
251. A. Prasad and P. Pospisil, *Sci. Rep.* **3**, 1211 (2013).
252. M. Kobayashi, T. Iwasa, and M. Tada, *J. Photochem. Photobiol. B* **159** (186–190) (2016).
253. T. Nagoshi, N. Watanabe, S. Suzuki, et al., *Photochem. Photobiol.* **56** (1), 89 (1992).
254. M. Tada, *Free Radic. Biol. Med.* **112**, 64 (2017).
255. F. A. Popp, B. Ruth, W. Bahr, et al., *Collective Phenomena* **3**, 187 (1981).
256. F. A. Popp and K. H. Li, *Int. J. Theor. Phys.* **32** (9), 1573 (1993).
257. R. P. Bajpai, *J. Theor. Biol.* **198** (3), 287 (1999).
258. F. A. Popp, J. J. Chang, A. Herzog, et al., *Phys. Lett. A* **293** (1–2), 98 (2002).
259. O. Kučera and M. Cifra, *Cell Commun. Signal.* **11**, 87 (2013).
260. S. N. Mayburov and I. V. Volodyaev, in *Proc. Symp. on Progress In Electromagnetics Research* (Moscow, 2009), pp. 1937–1941.
261. N. Rafieiollahosseini, M. Poplová, P. Sasanpour, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **162**, 50 (2016).
262. J.-J. Chang, *Indian J. Exp. Biol.* **46**, 371 (2008).
263. F. Scholkmann, M. Cifra, T. A. Moraes, et al., *J. Physics: Conf. Ser.* **329** (2011).
264. Я. И. Серкиз, Е. Е. Чеботарев, В. А. Барабой и др., *Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии* (Наук. думка, Киев, 1984).
265. Е. П. Сидорик, Е. А. Баглей и М. И. Данко, *Биохемилюминесценция клеток при опухолевом процессе* (Наук. думка, Киев, 1989).
266. И. В. Образцов и М. А. Годков, *Молекуляр. медицина*, № 4, 3 (2013).
267. Г. А. Тарашвили, Дисс. ... канд. биол. наук (НИИ защиты растений, Тбилиси, 1979).
268. Г. А. Даллакян, Е. Н. Маркарова, В. А. Веселовский и др., Патент СССР SU 717651 (1980).
269. Д. А. Джанумов, Е. А. Бочаров, В. С. Вшивцев и др., Патент СССР SU 499856 (1976).
270. Т. А. Гурова, в кн. *Методы и технические средства исследований физических процессов в сельском хозяйстве* (Новосибирск, 1999), сс. 28–33.
271. M. A. Nematollahi, Z. Alinasab, S. M. Nassiri, et al., *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* **12** (SP1), 18 (2020).
272. Ю. Н. Пономарева, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **2** (1), 16 (1936).
273. А. Г. Гурвич, *Архив биол. наук* **45** (2), 53 (1937).
274. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **4** (6), 471 (1937).
275. В. Ф. Еремеев, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **45** (6), 95 (1958).
276. A. Gurwitsch and L. Gurwitsch, *Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen* **109** (3), 362 (1927).
277. A. Potozky and I. Zoglina, *Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen* **114** (1), 1 (1928).
278. С. С. Бадалян, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **10** (1–2), 102 (1940).
279. E. Cadenas, *Photochem. Photobiol.* **40** (6), 823 (1984).
280. G. F. Fedorova, A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, et al., *Arkivoc* **8**, 163 (2007).
281. J. M. Gallas and M. Eisner, *Photochem. Photobiol.* **45** (5), 595 (1987).
282. P. Kayatz, G. Thumann, T. T. Luther, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42** (1), 241 (2001).
283. E. Hideg and H. Inaba, *Photochem. Photobiol.* **53** (1), 137 (1991).
284. H. M. Kalaji, V. Goltsev, K. Bosa, et al., *Photosynth. Res.* **114** (2), 69 (2012).
285. N. N. Lebedev, A. A. Krasnovsky, and F. F. Litvin, *Photosynth. Res.* **30** (1), 7 (1991).
286. E. Cadenas, A. Boveris, and B. Chance, *Biochem. J.* **186** (3), 659 (1980).
287. B. Devaraj and H. Inaba, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2**, 188 (1997).
288. A. A. Krasnovsky, *J. Photochem. Photobiol. A* **354**, 11 (2018).
289. W. Adam, D. V. Kazakov, and V. P. Kazakov, *Chem. Rev.* **105** (9), 3371 (2005).
290. O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, S. G. Sokolovski, A. Goltsov et al., *Progr. Quantum Electronics* **55**, 112 (2017).
291. А. И. Журавлёв, *Квантовая биофизика животных и человека: Учеб. пособие* (Бином, М., 2015).
292. A. N. Sorin, *Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen* **113** (4), 724 (1928).
293. С. Н. Брайнес, *Архив биол., Сер. Б* **35** (1), 325 (1934).

294. A. G. Gurwitsch, in *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Ed. by E. Abderhalden (Urban & Schwarzenberg, Berlin, Wien, 1929), Vol. V, pp. 1401–1470.
295. L. V. Belousov, *Eur. J. Biophys.* **1** (1), 6 (2013).
296. M. Kobayashi and H. Inaba, *Appl. Optics* **39** (1), 183 (2000).
297. M. Cifra, J. Z. Fields, and A. Farhadi, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **105** (3), 223 (2011).
298. C. Rossi, A. Foletti, A. Magnani, et al., *Semin. Cancer Biol.* **21** (3), 207 (2011).
299. Ю. А. Владимиров и М. П. Шерстнев, *Хемилюминесценция клеток животных* (М., 1989).
300. M. Calcerrada and C. Garcia-Ruiz, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **49** (4), 368 (2019).
301. X. Zhao, E. van Wijk, Y. Yan, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **162**, 529 (2016).
302. A. Shanei, Z. Alinasab, A. Kiani, et al., *J. Biomed. Phys. Eng.* **7** (4), 389 (2017).
303. R. C. R. Burgos, J. C. Schoeman, L. J. V. Winden, et al., *Sci. Rep.* **7** (1), 1229 (2017).
304. K. Nakamura and M. Hiramatsu, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **80** (2), 156 (2005).
305. R. C. Burgos, K. Cervinkova, T. van der Laan, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **163**, 237 (2016).
306. A. Prasad, A. Balukova, and P. Pospíšil, *Front. Physiol.* **9**, 1109 (2018).
307. J. A. Ives, E. P. A. van Wijk, N. Bat, et al., *PloS One* **9** (2), e87401 (2014).
308. F. Zapata, V. Pastor-Ruiz, F. Ortega-Ojeda, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **216**, 112141 (2021).
309. М. П. Н. Шерстнев, Дисс. ... докт. мед. наук (НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, Москва, 1997).
310. I. Bokkon, F. Scholkmann, V. Salari, et al., *Rev. Neurosci.* **27** (4), 411 (2016).
311. M. Yang, W. Ding, Y. Liu, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **16** (5), 736 (2017).
312. R. Hagens, F. Khabiri, V. Schreiner, et al., *Skin Res. Technol.* **14** (1), 112 (2008).
313. F. Khabiri, R. Hagens, C. Smuda, et al., *Skin Res. Technol.* **14** (1), 103 (2008).
314. H. Ou-Yang, G. Stamatias, C. Saliou, et al., *J. Invest. Dermatol.* **122** (4), 1020 (2004).
315. A. Prasad and P. Pospisil, *J. Biomed. Opt.* **17** (8), 085004 (2012).
316. A. Rastogi and P. Pospisil, *Skin Res. Technol.* **16** (3), 365 (2010).
317. A. Rastogi and P. Pospisil, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **123**, 59 (2013).
318. G. Sauermann, W. P. Mei, U. Hoppe, et al., *Methods Enzymology* **300**, 419 (1999).
319. Н. М. Эмануэль, Р. Е. Кавецкий, Б. Н. Тарусов и др., *Биофизика рака* (Наук. думка, Киев, 1976).
320. X. L. Zhao, J. X. Pang, J. L. Fu, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **166**, 232 (2017).
321. N. J. Murugan, M. A. Persinger, L. M. Karbowski, et al., *Cancers* **12** (4) (2020).
322. W. W. Siebert, *Biochem. Z* **202**, 115 (1928).
323. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, *Biochemische Zeitschrift* **196** (4.-6.), 257 (1928).
324. M. Kisliak-Statkewitsch, *Zeitschrift für Krebsforschung* **29** (1), 214 (1929).
325. L. Gurwitsch and A. Gurwitsch, *Zeitschrift für Krebsforschung* **29** (1-2), 220 (1929).
326. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, *Die mitogenetische Strahlung* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1932).
327. H. P. Ypsilanti and R. Paltauf, *Zeitschrift für Krebsforschung* **32** (1-2), 372 (1930).
328. F. Grasso, C. Grillo, F. Musumeci, et al., *Experientia* **48** (1), 10 (1992).
329. M. Takeda, Y. Tanno, M. Kobayashi, et al., *Cancer Lett* **127** (1-2), 155 (1998).
330. L. W. Oberley and D. R. Spitz, *Methods Enzymology* **105**, 457 (1984).
331. R. Grasso, M. Gulino, F. Giuffrida, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **187**, 126 (2018).
332. W. L. Chen, D. Xing, and Y. H. Tang, *Biomed. Photonics and Optoelectronic Imaging* **4224**, 214 (2000).
333. H. Iyozumi, K. Kato, and T. Makino, *Photochem. Photobiol.* **75** (3), 322 (2002).
334. H. Inagaki, Y. Ishida, A. Uchino, et al., *Weed Biol. Manag.* **8** (2), 78 (2008).
335. T. Ohya, S. Yoshida, R. Kawabata, et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (7A), 4766 (2002).
336. T. Ohya, H. Kurashige, H. Okabe, et al., *Jap. J. Appl. Phys.* **39** (Part 1, No. 6A), 3696 (2000).
337. P. Nawara, M. Gliniak, E. Popardowski, et al., in *Progress in Applied Electrical Engineering* (2018), pp. 1–5.
338. U. Egerer and M. A. Grashorn, *Tierärztliche Umschau* **63** (3), 150 (2008).
339. A. Triglia, G. Malfa, F. L. Musumeci, et al., *J. Food Sci.* **63** (3), 512 (1998).
340. K. Lambing, in *Recent Advances in Biophoton Research and Its Applications*, Ed. by F. A. Popp, H. K. Li, and Q. Gu (World Scientific, 1992), pp. 393–413.
341. M. Sun, S. Wang, Y. Jing, et al., *Chin. Med.* **14**, 47 (2019).
342. Y. Jia, M. Sun, Y. Shi, et al., *Chin. Med.* **15**, 6 (2020).
343. P. S. Francis, J. L. Adcock, and N. W. Barnett, *Spectrochim. Acta, Part A – Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **65** (3-4), 708 (2006).
344. T. I. Quickenden and R. N. Tilbury, *Radiat. Res.* **102**, 254 (1985).
345. М. В. Волькенштейн, *Физика и биология* (Наука, М., 1980).

Methods Used for Studying Ultraweak Photon Emission from Biological Objects.

I. History, the Importance of Fundamental Research and Practical Application of Ultraweak Photon Emission, Its Types and Properties

E.V. Naumova*, Yu.A. Vladimirov**, **L.V. Belousov****,
V.V. Tuchin***, ****, *****, and I.V. Volodyaev**

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

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

***Saratov State University, ul. Astrakhanskaya 83, Saratov, 410012 Russia

****National Research Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

*****Institute of Precision Mechanics and Control, Russian Academy of Sciences, ul. Rabochaya 24, Saratov, 410028 Russia

The review is devoted to the methods used for studying ultraweak photon emission from biological objects. In addition to modern methods used for the study in visible, near-infrared and near-ultraviolet regions, considerable attention has been given to the analysis of the methods used for studying the middle ultraviolet component called mitogenetic radiation in early works. Studies on mitogenetic radiation were conducted over the period from 1923 to 1948 and partially remain open to debate. Many of the obtained results were innovative for that time but have already been confirmed to date. As for the remaining findings, scientific topics, they present, are of high interest (among them research findings concerning cell division and carcinogenesis, early cancer diagnostics). Taking the above into the account, further study is needed to analyze the methods used in order to verify the results. The review is divided into three parts. The first part is focused on general issues such as the history of research and development of methodology, types and properties of ultraweak photon emission, the importance of fundamental research and practical application (in the second part and the third part, we discuss biological and physical methods, accordingly).

Keywords: ultraweak photon emission from biological objects, chemiluminescence, free-radical biology, mitogenetic radiation, registration of ultraweak radiation in the optical range, biophotonics

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА ФИТОПЛАНКТОНА РЕКИ МОСКВА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНОВ РТУТИ

© 2021 г. Ф.Ф. Протопопов*, Д.А. Тодоренко**, И.Н. Николаев*, А.А. Алексеев*, Л.Б. Братковская**, Д.Н. Маторин**

*Физико-технический институт Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова, 677013, Якутск, ул. Кулаковского, 48

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

E-mail: ff.protopopov@s-vfu.ru

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

После доработки 27.05.2021 г.

Принята к публикации 28.05.2021 г.

Представлены результаты мониторинговых наблюдений трех участков р. Москва, различающихся по уровню загрязнения с применением комплекса параметров флуоресценции хлорофилла. Фотосинтетическая активность фитопланктона по всему руслу была неодинаковой. Наиболее высокие значения активности фотохимических процессов фитопланктона обнаружены на условно чистом участке реки (на входе в город), тогда как на загрязненных участках (середина реки и на выходе из города) активность фитопланктона была снижена. Эффективность световых реакций фотосинтеза в фотосистеме II (F_V/F_M , PI_{ABS}) у фитопланктона весной была выше, чем в летний период. Эти процессы сопровождались уменьшением диссипации поглощенной энергии в тепло (F_{D0}). Инкубация фитопланктона из р. Москва в присутствии солей хлорида ртути выявила различия в чувствительности к токсическому воздействию фитопланктона из разных частей реки, а также более низкую устойчивость фитопланктона к ртути в летний сезон по сравнению с весенним. Наиболее чувствительным параметром к токсическому воздействию ртути был индекс производительности фотосистемы II (PI_{ABS}), который можно рекомендовать при проведении биотестирования и биомониторинга активности фотосинтетических реакций фитопланктона в природных условиях.

Ключевые слова: река Москва, хлорид ртути, фитопланктон, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, мониторинг загрязнения вод.

DOI: 10.31857/S0006302921050094

Москва-река является крупной водной артерией, протекающей через мегаполис. Состояние водной среды по руслу реки меняется в силу многих факторов, в том числе за счет загрязнения воды [1, 2]. Природный фитопланктон является первичным звеном трофической цепи водных экосистем [3–5]. Известно, что изменения на первичном трофическом уровне приводят к изменениям в остальных звеньях водной экосистемы. В связи с этим регистрация характеристик фитопланктона является одним из способов оценки состояния водной среды в целом.

Флуоресценция хлорофилла в настоящее время активно применяется для изучения фито-

планктона при проведении различных гидробиологических и токсикологических работ [4–15]. Флуоресцентный метод используется для оценки концентрации хлорофилла у интактных водорослей, а также в экстрагированных из них растворах пигментов [4, 7, 16–18]. На основе флуоресценции хлорофилла на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработана «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом» (ФР.1.39.2011.11246, ПНД Ф 14.2.268-2012). Методика допущена для целей государственного экологического контроля по разделу «Количественный химический анализ вод» [16]. Интенсивность начальной флуоресценции (F_0) рекомендуется для оценки биомассы и скорости роста водорослей, а отношение переменной флуоресценции к максимальной (F_V/F_M) для оценки квантового выхода фотосинтеза, ко-

Сокращения: ст. – станция, ФС II – фотосистема II, РЦ – реакционный центр, QA и QB – первичный и вторичный хинонные акцепторы электрона, КОС – Курьяновские очистные сооружения.

торый является мерой физиологической активности водорослей. Важным преимуществом этих методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние объектов непосредственно в среде его обитания *in situ*.

В последнее время для оценки работы фотосинтетического аппарата в культурах водорослей и природного фитопланктона активно начинают использовать методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением [6, 19, 20]. Характеристики кривых позволяют определить изменения на разных участках фотосинтетической электронтранспортной цепи. Ранее мы использовали флуоресцентные методы для изучения фотосинтетических процессов фитопланктона в р. Москва [3, 5, 7, 21].

Настоящая работа посвящена изучению энергозапасяющих фотосинтетических процессов фитопланктона на трех участках р. Москва, испытывающих различную антропогенную нагрузку, и при воздействии ионов ртути.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены в 2017 г. на трех станциях (ст.), расположенных по течению р. Москва — на входе реки в г. Москва в районе Тушино (ст. «Тушино»), на ст. «Воробьевы горы» и на выходе реки из города около г. Дзержинский (ст. «Дзержинский»). Отбор проб воды проводили в утренние часы в прибрежной зоне с глубины 0.5 м с помощью батометра. Воду отбирали в пластиковые емкости объемом 2 л и не более чем через 1.5 ч доставляли в лабораторию в переносной сумке-холодильнике. При проведении лабораторных экспериментов использовали колбы объемом 100 мл, в которых добавляли токсикант — хлорид ртути (HgCl_2 , Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 3 ч при освещении $100 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Концентрацию хлорофилла определяли по стандартной методике прямым спектрофотометрическим методом в ацетоновых экстрактах на спектрофотометре на базе портативного спектрометра USB 2000 (Ocean Optics Inc., США).

Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла регистрировали с высоким временным разрешением (начиная с 0.02 мс) на импульсном портативном флуориметре AquaPen-C AP-C 100 (Photon System Instruments, Чехия). Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла инициировали синим источником света ($\lambda = 450 \text{ нм}$) интенсивностью $3000 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Полевые исследования флуоресценции хлорофилла и измерения температуры воды проводили непосредственно на месте после отбора проб воды. Перед проведением регистрации флуоресценции

все исследуемые образцы выдерживали в темноте в течение 10–15 мин для окисления переносчиков в фотосинтетической электронтранспортной цепи.

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза по индукционным кривым флуоресценции рассчитывали параметры с помощью стандартного JIP-теста [6, 19, 20, 22]. Этот тест использует следующие характеристики кинетической кривой индукции флуоресценции: интенсивность флуоресценции при 50 мкс (F_0), 2 мс (F_J), 30 мс (F_I), а также F_M (максимальная интенсивность флуоресценции), а также усредненную величину в мс^{-1} начального наклона относительной переменной флуоресценции хлорофилла a (M_0). Эти величины затем использовали для расчета следующих параметров, которые подробно описаны в обзорных работах [6, 19, 20]:

— F_V/F_M ($= \Phi_{P_0}$) — максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в фотосистеме II (ФС II): $F_V/F_M = \Phi_{P_0} = (F_M - F_0)/F_M$;

— V_J — относительная амплитуда фазы O–J (после 2 мс освещения). Отражает количество закрытых реакционных центров (РЦ) по отношению к общему числу РЦ ФС II: $V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$;

— ψ_0 — параметр вероятности переноса электрона далее первичного хинонного акцептора (Q_A): $\psi_0 = 1 - V_J$;

— Φ_{E_0} — квантовый выход электронного транспорта за пределы Q_A (при $t = 0$): $\Phi_{E_0} = (1 - V_J)/(F_V/F_M)$;

Φ_{D_0} — квантовая эффективность рассеивания энергии в тепло: $\Phi_{D_0} = 1 - \Phi_{P_0} = F_0/F_M$;

— PI_{ABS} — индекс производительности — показатель функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии: $PI_{\text{ABS}} = [1 - (F_0/F_M)]/(M_0/V_J) [(F_M - F_0)/F_0] [(1 - V_J)/V_J]$.

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., США) и Statistica v.10 (StatSoft Inc., США). Подсчет концентрации хлорида ртути, вызывающей 50%-е ингибирование параметров флуоресценции хлорофилла (IC_{50}), определяли на основе дозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.0 (OriginLab Corp., США). Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, тест Tukey HSD при $\alpha = 0.05$). Объем выборки в полевых и лабораторных исследованиях составлял 10 повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Краткая характеристика экологического состояния районов исследования. Исторически по течению р. Москва в черте города выделяются три участка с различной степенью загрязнения. Первый участок — район Тушино, который традиционно считается наиболее чистым участком реки. Второй участок реки находится в центральной части города, в нем содержание нефтепродуктов и металлов колеблется как в течение года, так и вдоль течения реки. Третий участок расположен на выходе реки из города, здесь находятся Курьяновские очистные сооружения (КОС), сбросы воды из них приводят к увеличению в реке концентрации биогенных элементов (аммония, нитритов, фосфатов) [2]. Расстояние от стока вод из КОС до ст. «Дзержинский» составило 14 км. По данным Доклада Мосэкомониторинга за 2017 г. качество воды в р. Москва на входе в город соответствовало нормативам, установленным для водных объектов культурно-бытового назначения, и речные воды на этом участке характеризовались как «условно чистые». В центральной части города в 2017 г. наблюдалось увеличение содержания взвешенных веществ, аммония и нефтепродуктов по сравнению с содержанием этих веществ на входе реки в город. На выходе из города под влиянием сброса вод из КОС в реке значительно увеличиваются концентрации биогенных веществ. Как следствие, вода в р. Москва на выходе из города характеризовалась в 2017 г. как «слабо загрязненная» [2].

Ранее нами было показано, что на выходе реки из города (ст. «Дзержинский») температура воды в период гидрологической зимы (с ноября по март) была несколько выше, чем на ст. «Воробьевы горы» и значительно выше, чем на ст. «Тушино» [3]. Весенний подъем температуры поверхностного слоя воды в реке на ст. «Дзержинский» начинался уже в начале марта, в то время как повышение температуры воды на ст. «Тушино» и «Воробьевы горы» начиналось спустя месяц в первых числах апреля. Таким образом, на ст. «Дзержинский» были отмечены как более высокая температура воды в зимний период, так и ее более ранний весенний подъем.

По данным наших исследований температура воды на станциях отбора проб в середине мая составила 10–15°C, в июле повышалась до 20°C.

Содержание хлорофилла a в зимний период было наиболее низким. На участках реки на ст. «Тушино» и «Воробьевы горы» весеннее увеличение содержания хлорофилла a начиналось в апреле, а на ст. «Дзержинский» на несколько недель раньше, в марте, что, вероятно, связано с более высокими температурами поверхностного слоя этого участка реки. Содержание хлорофилла a в середине мая составило 19, 16 и 15 мкг · л⁻¹ и в середине

июля — 21, 23 и 19 мкг · л⁻¹ для станций «Тушино», «Воробьевы горы» и «Дзержинский» соответственно. Ранее было показано, что основные сукцессии фитопланктона в зоне влияния КОС такие же, как и на участках реки выше города [21]. Весной по числу видов и общей численности клеток преобладали диатомовые водоросли в пунктах на входе в город, выше КОС, а также на расстоянии в 14 км от стока вод из КОС. Летом преобладающими являлись зеленые водоросли и немного меньше — диатомовые.

Оценку активности природного фитопланктона проводили по параметру флуоресценции F_V/F_M , отражающим максимальный квантовый выход ФС II, связанной с разложением H₂O и выделением O₂ [15, 19]. В природных водоемах с высоким содержанием биогенных элементов значения F_V/F_M могут достигать 0.6–0.7. Под действием стрессовых факторов, в том числе и загрязняющих веществ, этот показатель может уменьшаться.

В динамике фотосинтетической активности фитопланктона, выраженной через величину F_V/F_M , так же как и в случае содержания хлорофилла a , прослеживалось влияние сезонного фактора. В зимний период активность фитопланктона на всех трех станциях была крайне низкой (F_V/F_M менее 0.01). Крайне низкие значения соотношения F_V/F_M в этот период были связаны, вероятно, с интенсивным охлаждением поверхностных вод и сменой комплекса фитопланктона на зимний.

В весенний период (с марта по май) наблюдалось резкое увеличение активности фитопланктона, которое связано с сезонным подъемом температуры воды. Уже в марте на ст. «Дзержинский» она составила 3.5°C, и, соответственно, величина соотношения F_V/F_M для пробы воды с этой станции достигла 0.25, тогда как на станциях «Тушино» и «Воробьевы горы» значения F_V/F_M в марте составили только 0.04 и 0.02 при температурах воды 0.3 и 0.4°C соответственно. В мае значения F_V/F_M в пробах воды с обследованных станций колебались уже в пределах 0.52–0.68, причем максимальное значение F_V/F_M было зарегистрировано на ст. «Тушино».

Важно отметить, что увеличение концентрации фитопланктона по хлорофиллу в 2017 г. несколько запаздывало по сравнению с активностью, определенной по F_V/F_M . Этот факт показывает, что появление в популяции клеток водорослей с высокой активностью фотосинтетического аппарата и соответственно с высоким значением F_V/F_M предшествует наступлению периода увеличения концентрации фитопланктона.

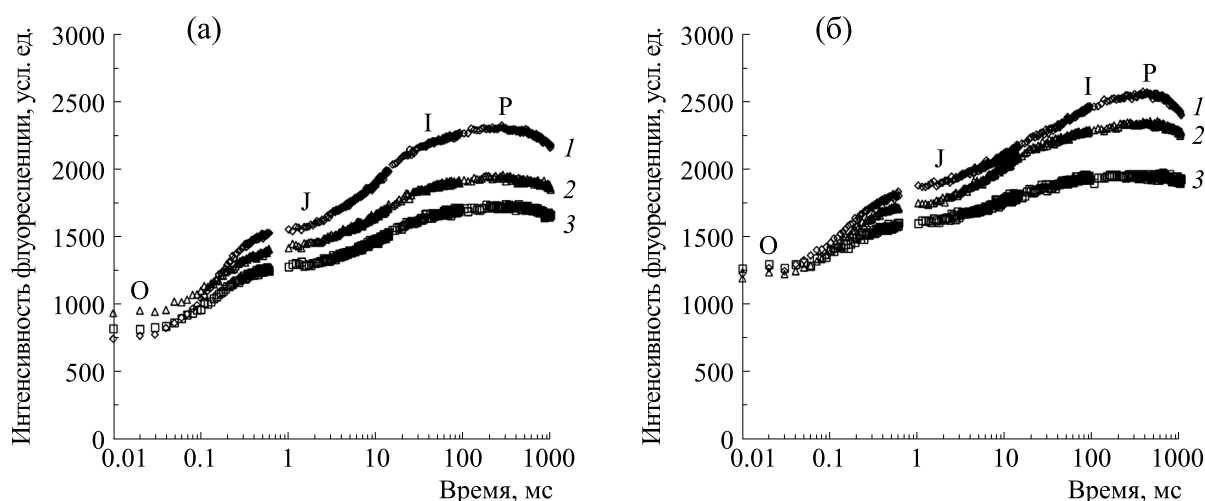


Рис. 1. Индукционные кривые быстрой флуоресценции фитопланктона р. Москва в середине мая (а) и в июле (б). Цифрами обозначены станции отбора проб воды: 1 – «Тушино», 2 – «Воробьевы горы», 3 – «Дзержинский».

Подобный эффект наблюдался нами на оз. Байкал [19].

Наибольший интерес представляло сравнить параметры индукции флуоресценции хлорофилла во время весеннего и летнего развития фитопланктона (рис. 1). Значения F_V/F_M и других параметров в мае и июле представлены на рис. 2. В майский период F_V/F_M достигал на всех станциях наиболее высоких значений, причем на ст. «Тушино» F_V/F_M был максимальным со значением 0.68, а на ст. «Воробьевы горы» и «Дзержинский» он составил 0.53 и 0.52 соответственно. Относительно высокая для речного фитопланктона фотосинтетическая активность, зарегистрирован-

ная в этот период на всех обследованных станциях, свидетельствует о том, что фитопланктон весной не был лимитирован по основным факторам среды. После весеннего максимума фотосинтетическая активность фитопланктона на всех трех станциях снижалась, причем этот спад был более всего выражен на ст. «Дзержинский» ($F_V/F_M = 0.39$). Это может свидетельствовать о негативном влиянии на активность фитопланктона различных загрязнений, поступающих в реку из мегаполиса и сбросов КОС. В то же время наиболее высокие F_V/F_M , наблюдавшиеся в летний период на ст. «Тушино» (0.53), вероятно, свидетельствуют о том, что условия для развития фи-

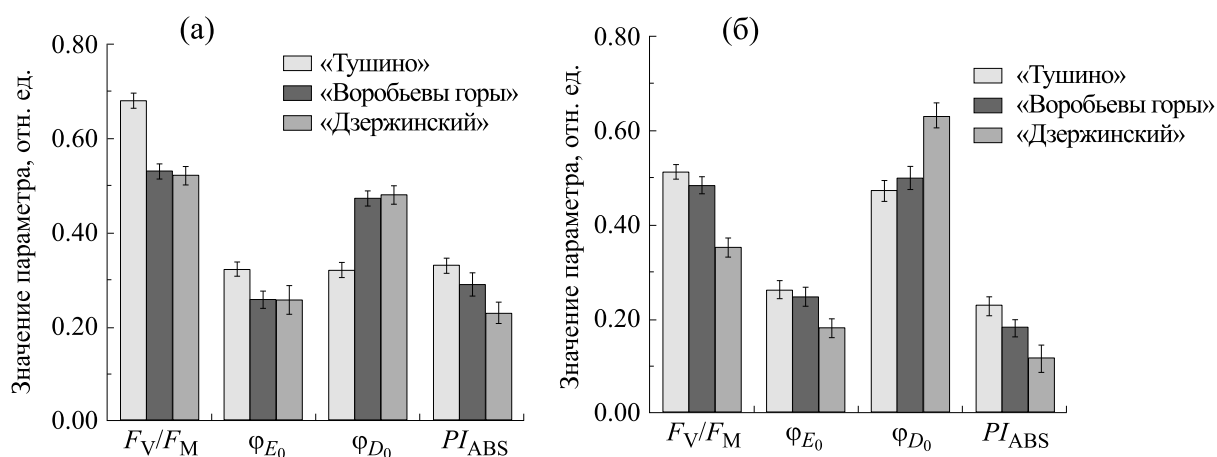


Рис. 2. Изменение параметров JIP-теста, рассчитанных из индукционных кривых флуоресценции хлорофилла (см. рис. 1), где F_V/F_M – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в ФС II, Φ_{E0} – квантовый выход электронного транспорта за пределы Q_A , Φ_{D0} – квантовая эффективность рассеивания энергии в тепло, $P_{I_{ABS}}$ – индекс производительности ФС II. Представлены данные по весеннему (а) и летнему (б) фитопланктону. Столбиками показаны значения параметров последовательно со станций «Тушино», «Воробьевы горы» и «Дзержинский». Планки погрешностей соответствуют доверительному интервалу (при $\alpha = 0.05$, $n = 10$).

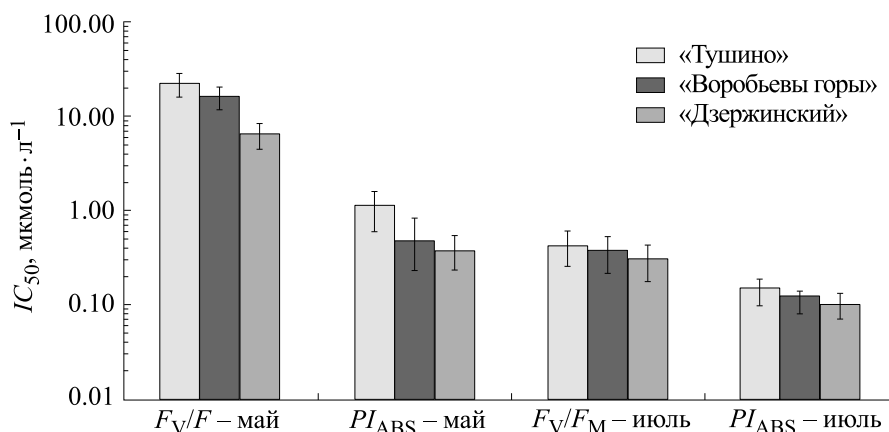


Рис. 3. Концентрации полуингибирующего воздействия хлорида ртути (IC_{50}) на параметры флуоресценции фитопланктона р. Москва, где F_v/F_m – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в ФС II, PI_{ABS} – индекс производительности ФС II. Фитопланктон весной (май) и летом (июль) инкубировали с хлоридом ртути в течение 3 ч. Планки погрешностей соответствуют доверительному интервалу (при $\alpha = 0.05$, $n = 10$)..

топланктонного сообщества здесь были наиболее благоприятными в летний период по сравнению с другими станциями.

Сравнение параметров флуоресценции, связанных с квантовыми потоками электронов, показало, что в весенний период на всех станциях наблюдается в среднем увеличение эффективности переноса электронов в ФС II (F_v/F_m и Φ_{E0}) и снижение доли диссипации энергии в тепло антенными комплексами (Φ_{D0}) по сравнению с июлем (рис. 2). Таким образом, в весенний период фотосинтетическая активность ФС II у фитопланктона была несколько выше, чем в летний период.

Нами было отмечено, что параметр вероятности переноса электрона далее первичного хинонного акцептора Q_A (ψ_0) изменялся незначительно на всех трех станциях р. Москва в мае и июле (данные не представлены). Это позволяет заключить, что в исследуемых пробах воды не отмечается существенного влияния факторов среды на сайт связывания Q_B – вторичного хинонного акцептора электрона. Тем самым, параметр квантового выхода электронного транспорта (Φ_{E0}) в ФС II снижается в летнее время, главным образом, счет снижения параметра F_v/F_m .

Известно, что изменение максимального квантового выхода (F_v/F_m) тесно связано с изменением сопряженности антенного комплекса с реакционным центром ФС II. Снижение количества активных РЦ обычно ведет к возрастанию доли неиспользуемой энергии, т.е. доли тушения энергии возбуждения в антенном комплексе за счет увеличения диссипации в тепло (Φ_{D0}). У летнего фитопланктона по сравнению с весенним наблюдалось увеличение квантового выхода дис-

сипации в тепло (Φ_{D0}), в особенности на ст. «Дзержинский» (рис. 2).

«Витальность» растений можно охарактеризовать индексом производительности PI_{ABS} [6, 22, 23]. Этот параметр включает в себя три независимых параметра: плотность «активных» РЦ ФС II; вероятность того, что поглощенный фотон будет захвачен РЦ и эффективность движения электрона по электрон-транспортной цепи. Индекс PI_{ABS} отражает функциональное состояние ФС II на свету и дает нам комплексную характеристику текущего состояния фотосинтетического аппарата [20]. В мае наблюдали высокие показатели индекса PI_{ABS} на всех станциях р. Москва. На ст. «Тушино» показатель PI_{ABS} был несколько выше, чем на ст. «Воробьевы горы» и «Дзержинский», тогда как в летнее время происходило некоторое снижение индекса производительности ФС II на всех станциях.

Определение чувствительности фитопланктона к воздействию ионов ртути в зависимости от сезона. Известно, что устойчивость клеток водорослей к загрязнению может существенно изменяться в зависимости от состояния клеток в разных экологических условиях [17, 19]. Чувствительность фитопланктонного сообщества р. Москва к ионам ртути определяли по двум основным вышеописанным параметрам флуоресценции – это F_v/F_m и PI_{ABS} . Соли $HgCl_2$ значимо снижали квантовый выход F_v/F_m активного весеннего фитопланктона уже при концентрации $1 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Были определены дозы полуингибирования (IC_{50}) для параметров F_v/F_m и PI_{ABS} (рис. 3). Для параметра F_v/F_m у весеннего фитопланктона на станциях «Тушино» и «Воробьевы горы» 50% снижение происходило при концентрации 23.2 и

16.8 мкмоль · л⁻¹ HgCl₂ соответственно. Стоит отметить, что фитопланктон со ст. «Дзержинский» обладал меньшей устойчивостью к ионам ртути, чем фитопланктон с других станций, его IC_{50} для параметра F_V/F_M составляла 6.7 мкмоль · л⁻¹.

Индекс производительности ФС II PI_{ABS} является комбинированным параметром флуоресценции хлорофилла, и он часто является более чувствительным параметром к загрязнениям по сравнению с F_V/F_M [23, 24]. Для весеннего фитопланктона значимое снижение параметра PI_{ABS} при действии HgCl₂ у фитопланктона, отобранного в мае, наблюдали уже при концентрации 0.1 мкмоль · л⁻¹. Значение IC_{50} , вызывающее полуснижение индекса производительности ФС II, равнялось 0.37 мкмоль · л⁻¹ для станции «Дзержинский» и 0.47 и 1.1 мкмоль · л⁻¹ для станций «Воробьевы горы» и «Тушино» соответственно. Так же как и для параметра F_V/F_M статистически значимые отличия наблюдались между станциями «Тушино» и «Дзержинский» (рис. 3).

Летний фитопланктон, обладающий более низкой фотосинтетической активностью по сравнению с весенним, показывал и меньшую устойчивость к действию HgCl₂. Различия в чувствительности летнего фитопланктона между станциями были статистически незначимы (рис. 3). Максимальный квантовый выход фотохимии ФС II (F_V/F_M) существенно снижался уже при концентрации 0.1 мкмоль · л⁻¹ токсиканта. IC_{50} для параметра F_V/F_M наблюдалась при 0.30–0.43 мкмоль · л⁻¹ на всех станциях.

У летнего фитопланктона PI_{ABS} также оказался более чувствительным параметром по сравнению с F_V/F_M . Снижение на половину индекса производительности ФС II наблюдали при концентрации ртути 0.10–0.14 мкмоль · л⁻¹ для всех станций. Возможно, что повышение чувствительности к ионам ртути у менее фотосинтетически активного летнего фитопланктона р. Москва связано с действием неблагоприятных факторов, таких как повышенная солнечная инсоляция на фоне повышенной температуры в летние дни. Усиление токсического воздействия на культурах водорослей солей тяжелых металлов при интенсивном освещении в условиях светового стресса отмечалось ранее разными авторами [25–27]. Нами также было показано существенное повышение чувствительности водорослей к действию солей ртути при повышенном освещении [17].

ОБСУЖДЕНИЕ

Первичная продукция фитопланктона определяется функционированием сложноорганизованной системы фотосинтеза, включающей светособирающий пигментный комплекс, реакционные центры и электронтранспортную систему, где происходит первичное преобразование солнечной энергии с разложением воды и выделением O₂. Ранее в гидробиологии использовали параметр флуоресценции F_V/F_M — максимальный квантовый выход первичных фотохимических реакций в ФС II [15]. Он определяется как соотношение интенсивности флуоресценции при насыщающем фотосинтезе свете (F_M) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (F_0) (низкая интенсивность света). Параметр F_V/F_M представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма. В последнее время при работе с культурами водорослей активно развиваются методы быстрого измерения кинетики индукции флуоресценции, характеризующие электронный транспорт в ФС II и между фотосистемой II и фотосистемой I [20]. Применение этого современного биофизического подхода позволило выявить изменения в функционировании световых стадий фотосинтеза у фитопланктона в поверхностном слое на трех участках р. Москва, испытывающих различное влияние антропогенной нагрузки и при воздействии ионов ртути в разные сезоны.

Нами было показано, что в зимний период первичные реакции ФС II имеют крайне низкую активность. Возникновение благоприятных для фитопланктона условий в водоеме в весенний период сопровождается повышением эффективности функционирования ФС II и активизацией электрон-транспортных реакций, что, соответственно, вызывает значительное увеличение количества клеток.

Проведенный комплексный анализ параметров индукционных кривых флуоресценции хлорофилла свидетельствует, что у весеннего активного фитопланктона происходит увеличение основных параметров световых реакций фотосинтеза, таких как максимальный квантовый выход ФС II (F_V/F_M), эффективность транспорта электронов (Φ_{E0}) и индекса производительности ФС II (PI_{ABS}). Вместе с тем эти процессы сопровождаются низким уровнем диссипации поглощенной энергии в тепло (Φ_{D0}).

Ранее нами в 2009–2010 гг. было отмечено, что изменения параметров флуоресценции фитопланктона на трех участках р. Москва наблюдались раньше интенсивного роста водорослей [3].

Это закономерность появления активных клеток фитопланктона с высоким уровнем F_V/F_M в период, предшествующий увеличению биомассы, подтвердилась и в 2017 г. Таким образом, появление благоприятных условий в водоеме после зимнего периода сопровождается активацией реакционных центров ФС II, в которых происходит первичная конверсия света, и запуском электрон-транспортных реакций. Включение активных фотосинтетических процессов приводит к стимуляции роста количества фитопланктона (например, весеннее цветение в пресноводных водоемах) [8]. Это хорошо наблюдается и в модельных экспериментах при пересеве голодной азотдефицитной культуры микроводорослей на среду, обогащенную азотом [19].

Чрезвычайно важным является изменение устойчивости природных популяций водорослей к действию загрязняющих веществ, таких как тяжелые металлы в различные сезоны. Эксперименты по инкубации природного фитопланктона в присутствии хлорида ртути выявили различия в устойчивости к токсическому воздействию у фитопланктона с разных участков, а также большую чувствительность летнего фитопланктона по сравнению с весенним. При этом обнаружено, что наиболее чувствительным параметром индукции флуоресценции хлорофилла в этих токсикологических экспериментах является индекс производительности ФС II (PI_{ABS}).

Таким образом, описанный в настоящей работе комплекс параметров индукционных кривых флуоресценции хлорофилла позволяет проводить мониторинг изменений в энергозапасющих фотосинтетических процессах клеток фитопланктона в природных условиях и открывает возможность использования флуоресцентных методов для детекции и прогнозирования цветения водоемов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды» при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №20-04-00465а) и Российского научного фонда (грант №20-64-46018).

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. Доклады о состоянии окружающей среды в городе Москве за 2017 год. URL: [https://www.mos.ru/upload/documents/files/2931/Gosdoklad_last\(1\).pdf](https://www.mos.ru/upload/documents/files/2931/Gosdoklad_last(1).pdf)
2. Н. М. Попова, Санитарное состояние р. Москвы по многолетним гидрохимическим данным (Изд-во литературы по строительству, М., 1972).
3. И. В. Мошарова, В. В. Ильинский, Д. Н. Маторин и др., Микробиология **84** (6), 712 (2015).
4. P. G. Falkowski and J. A. Raven, *Aquatic photosynthesis* (Princeton University Press, Princeton, 2013).
5. N. Shchegolkova, K. Shurshin, S. Pogosyan, et al., *Water Science and Technology* **77** (6), 69 (2018).
6. В. Н. Гольцев, М. Х. Каладжи, М. А. Кузманова и др., *Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений* (Институт компьютерных исследований, М.–Ижевск, 2014).
7. Д. Н. Маторин, Н. П. Тимофеев, М. Л. Синдаловская и др., Биофизика **64** (6), 1057 (2019).
8. Д. Н. Маторин, Н. П. Тимофеев, Д. А. Тодоренко и др., Биофизика **65** (2), 331 (2020).
9. Ф. Ф. Протопопов, Д. Н. Маторин, Н. Х. Сейфуллина и др., Микробиология **84** (6), 725 (2015).
10. T. K. Antal, P. S. Venediktov, D. N. Matorin, et al., *Oceanologia* **43** (3), 291 (2001).
11. W. Brack and H. Frank, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **40** (1–2), 34 (1998).
12. M. K. Joshi and P. Mohanty, in *Chlorophyll a Fluorescence. A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004), pp. 637–661.
13. K. S. Kumar, H. U. Dahms, J. S. Lee, et al., *Ecotoxicology and Environmental Safety* **104**, 51 (2014).
14. S. A. Mosharov, V. M. Sergeeva, A. F. Sazhin, et al., *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **218**, 59 (2019).
15. U. Schreiber, in *Chlorophyll a fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004), pp. 279–319.
16. Д. Н. Маторин, В. А. Осипов и А. Б. Рубин, *Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты* (Альтрекс, М., 2012).
17. Д. Н. Маторин, В. А. Осипов, Н. Х. Сейфуллина и др., Микробиология **78** (3), 362 (2009).
18. D. N. Matorin, T. K. Antal, M. Ostrowska, et al., *Oceanologia* **46** (4), 519 (2004).
19. Д. Н. Маторин и А. Б. Рубин, *Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей* (ИКИ-РХД, М. – Ижевск, 2012).

20. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava, in *Chlorophyll a fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004), pp. 321–362.
21. Н. М. Шеголькова и Е. В. Венецианов, *Охрана загрязненной реки: интенсификация самоочищения и оптимизации водоотведения* (РАСХН, М., 2011).
22. D. Lazar, *Functional Plant Biol.* **33**, 9 (2006).
23. A. Stirbet, D. Lazar, J. Kromdijk, et al., *Photosynthesis* **56** (1), 86 (2018).
24. Д. Т. Габбасова, Д. Н. Маторин, И. В. Конюхов и др., *Микробиология* **86** (1), 62 (2017).
25. P. Janeau, D. Dewez, S. Matsui, et al., *Chemosphere* **45**, 589 (2001).
26. P. J. Ralph, R. A. Smith, C. M. O. Macinnis-Ng, et al., *Toxicol. Environ. Chem.* **89** (4), 589 (2007).
27. D. V. Vavilin, V. A. Polynov, D. N. Matorin, et al., *J. Plant Physiol.* **146**, 609 (1995).

Fluorescence of Phytoplankton Chlorophyll from the Moskva River in the Presence of Mercury Ions

F.F. Protopopov*, D.A. Todorenko**, I.N. Nikolaev*, A.A. Alekseev*,
L.B. Bratkovskaya**, and D.N. Matorin**

*Physico-Technical Institute, Ammosov North-Eastern Federal University, ul. Kulakovskogo 48, Yakutsk, 677013 Russia

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

This paper presents the results of the observational study carried out for monitoring three Moskva River sites with different pollution levels by using chlorophyll fluorescence parameters. The photosynthetic activity of phytoplankton along the river bed was diverse. The photochemical activity of the phytoplankton was higher in the relatively clean water of the river (the river entrance to the city) and lower in the polluted water (middle reaches of the river and out-of-city). The efficiency of the light reactions of photosynthesis in photosystem II (F_V/F_M , PI_{ABS}) for the phytoplankton was higher in the spring than in summer months. These processes were accompanied by a decrease in the dissipation of absorbed energy into heat (ϕ_{D_0}). Incubation of the phytoplankton from the Moskva River in the presence of mercury chloride salts was performed. It was found that addition of mercury chloride salts resulted in different sensitivity to the toxic effects of phytoplankton samples collected from different sites on the river as well as the lower resistance of phytoplankton to mercury in summer season compared to spring. The most sensitive parameter to the toxic effects of mercury was the photosystem II performance index (PI_{ABS}), which can be recommended for bioassay and biomonitoring the activity of photosynthetic reactions of phytoplankton in natural conditions.

Keywords: the Moskva River, mercury chloride, phytoplankton, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, monitoring of water pollution

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОСОМ, РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ИЗ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ПРИНИМАВШИХ НАНОЛИПОСОМАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

© 2021 г. Н.П. Пальмина, Н.Н. Сажина, Н.Г. Богданова, А.С. Антипова, Е.И. Мартиросова,
И.Г. Плащина, В.В. Каспаров, М.Г. Семёнова

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

E-mail: npalm@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 09.07.2021 г.

Принята к публикации 13.07.2021 г.

Изучены физико-химические свойства липидов важнейших органов мышей (печени и головного мозга) после длительного приема в течение трех месяцев нанолипосомальных комплексов, состоящих из различных вариаций следующих веществ: фосфатидилхолина сои, эфирного масла гвоздики, рыбьего жира и казеината натрия. Из суммарных липидов органов готовили липосомы и определяли их способность к инициированному окислению, структуру липидного бислоя в областях локализации спиновых зондов 5-доксил и 16-доксил-стеариновых кислот, размеры и заряд липосом. Установлено, что все изученные параметры значительно изменялись с возрастом животных: способность к окислению уменьшалась в липидах из обоих органов; микровязкость уменьшалась, а структурированность возрастала; размеры липосом из липидов печени увеличивались, а из липидов головного мозга — уменьшались; применение диет приводило к приближению исследуемых величин к уровню, характерному для молодых животных. Установлена корреляция окисляемости липидов и их микровязкости с изменением состава жирных кислот, а размеров липосом — с параметром упорядоченности поверхностных слоев липидов.

Ключевые слова: липосомы, способность липидов к окислению, структура мембран, диаметр и заряд липосом.

DOI: 10.31857/S0006302921050100

Для нормального функционирования организма чрезвычайно важно его обеспечение эссенциальными (незаменимыми) биологически активными липидами, такими как полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) омега-3 и омега-6. Они не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей в достаточном количестве и в оптимальном соотношении (омега-6 : омега-3 = 1 : 1 – 4 : 1) [1, 2]. Включение этих веществ в диету актуально для большинства населения и может быть осуществлено с помощью функциональных продуктов питания [3]. Серьезная проблема, с которой сталкиваются исследователи, заключается в том, что высокое содержание в ПНЖК ненасыщенных углеродных связей

увеличивает их окисляемость и, как следствие, накопление пероксидов и гидропероксидов, продуктов их разложения, обладающих токсичностью, а также летучих карбонильных продуктов, снижающих вкусовые качества продуктов. Для преодоления этих ограничений предлагается вводить ПНЖК в нужном соотношении в виде липосом с добавками природных антиоксидантов и инкапсулированием в белки или биополимеры [4, 5]. В результате комплекса исследований, выполненных *in vitro*, нами были получены липосомы на основе фосфатидилхолина (ФХ) или лизофосфатидилхолина, нагруженные ПНЖК в соответствующем отношении и содержащие растительные антиоксиданты (эфирное масло гвоздики (ЭМГ), кориандра, лимона; экстракты имбиря, черного перца, корицы, душистого перца), а также казеинат натрия (Каз-Na) и мальтодекстрины. Были изучены физико-химические свойства этих сложных липосом (размеры и форма, плотность, архитектура, заряд, микровяз-

Сокращения: ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты, ФХ — фосфатидилхолин сои, ЭМГ — эфирное масло гвоздики, Cas-Na — казеинат натрия, РЖ — рыбий жир, ПОЛ — перекисное окисление липидов, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, АОА — антиокислительная активность.

кость липидного бислоя; способность к окислению; термодинамические параметры) [6–9]; определена биодоступность инкапсулированных липидов в процессе ферментативного гидролиза комплексов в условиях их модельного переваривания в желудочно-кишечном тракте (ротовая полость, желудок, тонкий кишечник) *in vitro* [10]; установлены основные взаимосвязи между структурными, а также термодинамическими параметрами супрамолекулярных комплексов и их функциональными свойствами [7, 10, 11]. В экспериментах *in vivo* были получены подтверждения высказанным предположениям: наноконкомплекс действительно способствовали повышению содержания ПНЖК и антиоксидантов в органах и тканях мышей [12, 13]. Важным аспектом влияния этих наноконкомплекс на организм человека и животных является изменение физико-химических свойств липидов. Одной из моделей, используемых в исследованиях этих свойств, являются липосомы, реконструированные из суммарных липидов какого-либо из органов животных, подвергшихся тому или иному воздействию [14, 15]. Мы применили эту модель для изучения некоторых физико-химических характеристик липидов (способности к окислению, микровязкости и ригидности липидного бислоя, размеров и поверхностного заряда) из органов мышей, принимавших в течение длительного времени нанолипосомальные комплексы различного состава, что и составило цель нашей работы.

МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фосфатидилхолин фирмы Lipoid GmbH (Германия) следующего химического состава по данным производителя: фосфолипиды – 94% фосфатидилхолина, 0.6% фосфатидилэтаноламина, 3% лизофосфатидилхолина, 0.1% фосфатидилинозита; триглицериды – 2%; свободные жирные кислоты – 0.5%; α -токоферол – 0.15%. Использовали также казеинат натрия фирмы Sigma (Новая Зеландия); эфирное масло гвоздики фирмы Plant Lipids Ltd (Индия); рыбий жир (РЖ, концентрат омега-3 «Омега-3 дети», ООО «РУСКАПС», Москва), азо-инициатор 2,2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлорид (Fluka, Германия); органические растворители фирмы Merck (Германия).

Состав липосомальных наноконкомплексов. В экспериментах были использованы водные растворы шести видов липосомальных наноконкомплекс в качестве напитков, заменяющих воду в диете экспериментальных животных:

Диета 1. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 2.50 мг/мл).

Диета 2. Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ) (с концентрацией в растворе

[ФХ] = 2.50 мг/мл). Весовое отношение компонентов липосомального наноконкомплекс: ФХ : ЭМГ = 1 : 0.02.

Диета 3. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл), инкапсулированные казеинатом натрия (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 16.6 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомальном наноконкомплекс: ФХ : Каз-Na = 1 : 10.

Диета 4. Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ) ([ФХ] = 2.50 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 25.0 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомальном наноконкомплекс: ФХ : ЭМГ : Каз-Na = 1 : 0.02 : 10.

Диета 5. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира (с концентрацией в растворе [РЖ] = 1.66 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 33.3 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомальном наноконкомплекс: ФХ : РЖ : Каз-Na = 1 : 1 : 20.

Диета 6. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира (с концентрацией в растворе [РЖ] = 1.66 мг/мл) и ЭМГ (2% от веса ФХ + РЖ), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 33.3 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомальном наноконкомплекс: ФХ : РЖ : ЭМГ : Каз-Na = 1 : 1 : 0.02 : 20.

Приготовление липосом. Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ и/или РЖ готовили по следующей методике: в стерилизованные при 110°C (30 мин) стеклянные стаканчики помещали необходимые навески ФХ/ЭМГ/РЖ и добавляли в них расчетное количество бидистиллированной воды. Диспергировали ФХ/ЭМГ/РЖ в воде при помощи трехкратной механической гомогенизации, используя гомогенизатор (Heidolph, Германия), в течение 2 мин при 20000 об/мин. Полученную водную дисперсию ФХ/ЭМГ/РЖ дополнительно обрабатывали ультразвуком, используя ультразвуковой гомогенизатор VCX-130 (Sonics & Materials, США) в подобранном предварительно режиме: озвучивание в течение 5 мин при 40% мощности сигнала (отношение времени озвучивания к времени без озвучивания 30 : 30 с); такой режим озвучивания повторяли семикратно. При озвучивании образец охлаждали во льду. После этого проводили центрифугирование полученных водных растворов липосомных комплексов ФХ/ЭМГ/РЖ в стерилизованных (при 110°C, 30 мин) центрифужных пробирках в течение 30 мин при 4000 об/мин (1800 g) для удаления металлической стружки от ультразвукового зонда. Инкапсулирование белком (Каз-Na) приготовленных липосом (ФХ/ЭМГ/РЖ) проводили сме-

шиванием их растворов в стерилизованных (при 110°C, 30 мин) бутылочках для кормления с последующим встряхиванием (165 об/мин) в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) при 40°C в течение 1 ч. После этого повышали температуру в шейкер-инкубаторе до 63°C и пастеризовали все приготовленные растворы в течение 30 мин при продолжающемся встряхивании (165 об/мин).

Все приготовленные растворы липосомных наноконплексов готовили на двое суток из расчета их потребления одной мышью в объеме 7 мл ежедневно.

Животные и дизайн эксперимента. 50 мышей линии F1(C57blxDBA2\6) массой 18–20 г из вивария питомника «Столбовая» НЦБТ ФМБА РФ были разделены на восемь групп по шесть-семь мышей в каждой группе. Мышей содержали на диете в течение 92 суток. Группа 1 (7 животных) получала общевиварный рацион и была забита в первый день эксперимента. Группа 2 (6 животных) получала диету 1, группа 3 (6 животных) — диету 2, группа 4 (6 животных) — диету 3, группа 5 (6 животных) — диету 4, группа 6 (6 животных) — диету 5; группа 7 (6 животных) — диету 6; группу 8 (7 животных) содержали на общевиварном рационе все 92 суток эксперимента. Через 92 суток после начала приема различных диет животные были забиты методом декапитации, ткани печени и головного мозга были взяты для исследования.

Выделение липидов из печени и мозга. Экстракцию липидов из тканей печени и головного мозга проводили по методу Блайя и Дайера в модификации Кейтса [16, 17].

Приготовление липосом из липидов печени и мозга. Липосомы готовили из навесок суммарных липидов печени или мозга, полученных из экстрактов липидов после выпаривания растворителя в вакууме. Далее к сухой навеске известной массы добавляли фосфатный буферный раствор (рН 7.2, ионная сила 1 мМ) в объеме, необходимым для получения заданной концентрации суспензии липидов (1 или 3 мг/мл). Липосомы формировали с использованием ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonics & Materials, США) в течение 15 мин (в режиме 15 с × 15 с) при мощности 70 Вт. Для предохранения липосом от нагревания и окисления во время озвучивания сосуд с суспензией помещали в смесь воды со льдом. Для отделения примесей дисперсию липосом центрифугировали со скоростью 13000 об/мин при 4°C в течение 20 мин [8].

Окисление липосом. Инициированное окисление липосом проводили по методу [8, 18] в пробирках, термостатированных при физиологической (37°C) температуре. Для инициирования использовали водорастворимый азо-инициатор 2,2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлорид (с конечной концентрацией в растворе липосом

0.33 мМ). Степень развития перекисного окисления липидов (ПОЛ) контролировали спектрофотометрически при непрерывной регистрации во времени оптической плотности в области поглощения 234 нм, соответствующей максимуму поглощения для диеновых конъюгатов на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, Германия). На рис. 1 приведены характерные кинетические кривые окисления липосом (накопления диеновых конъюгатов) из липидов печени и мозга.

Метод динамического светорассеяния. Для определения размеров липосом использовали метод динамического светорассеяния. Измерения среднего диаметра D липосом проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного на липосомах под углом 173° лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм. Концентрация липидов в суспензии липосом составляла 0.3 мг/мл, температура 25°C, индекс полидисперсности варьировал в пределах 0.21–0.36. Для каждого размера D осуществлялась регистрация 5–10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями в каждом измерении, усреднение проводилось по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Для измерения ζ -потенциала липосом этот же прибор использовали в режиме регистрации электрофоретической подвижности частиц. Усреднение максимальных значений ζ -потенциала осуществляли по результатам трех повторных измерений, погрешность которых не превышала 10%.

Метод спиновых зондов. Для характеристики структурного состояния мембран липосом использовали метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Образец для измерений на ЭПР-спектрометре представлял собой 200 мкл суспензии липосом (концентрация липидов 3 мг/мл), к которому добавляли 1 мкл спиртового раствора парамагнитного зонда (концентрация зонда в спирте 10^{-4} М), из расчета 1 молекула зонда на 900–1000 молекул липида. Этот образец после инкубации с зондом в течение 15–20 мин при 4°C помещали в длинную, узкую с плоскопараллельными гранями кварцевую кювету высокой добротности, благодаря чему достигалась температурная однородность по всему объему кюветы. Термостатирование осуществляли с помощью термоприставки ER 4131 VT (Bruker, Германия). Точность термостатирования контролировали термопарой, помещенной в резонатор, она составила $\pm 0.05^\circ\text{C}$. Запись спектров при постоянной температуре 293 К осуществляли непрерывно: 10–15 спектров по 3–5 накоплений. Параметры, характеризующие структуру мембран, рассчитывали из спектров, полученных при температуре 293 К на ЭПР-спектрометре

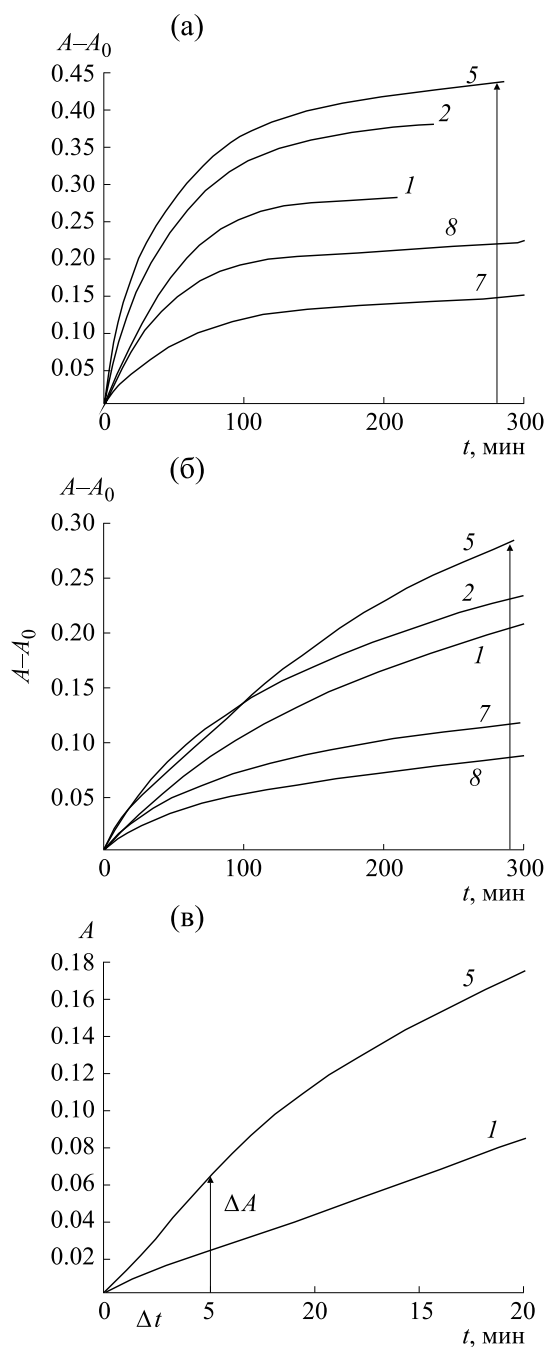


Рис. 1. Характерные кинетические кривые инициированного окисления (накопления диеновых конъюгатов) липосом из липидов печени (а) и мозга (б). Концентрация липосом 0.1 мг/мл, [AAPH] = 0.33 mM, цифры около кривых – номера групп мышей, $A-A_0$ – изменение оптической плотности в процессе окисления. Стрелками показано, как определялись максимальные значения $A-A_0$. (в) – Фрагмент рисунка (а) для демонстрации расчета V_{max} .

Bruker 200D (Bruker, Германия) методом спинного зонда [19], в качестве которого для изучения микровязкости глуболежащих областей липидного бислоя (~ 20 Å) использовали 16-докси-

лстеариновую кислоту (зонд С16). Микровязкость мембраны в области локализации зонда С16 оценивали по временам вращательной корреляции зонда τ_{C1} и τ_{C2} , которые определяли по формулам для быстрого анизотропного вращения радикалов [19]:

$$\tau_{c_1} = 6,5 \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10},$$

$$\tau_{c_2} = 6.65 \cdot \Delta H_+ \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10},$$

где ΔH_+ и ΔH_0 – ширины низкопольной и центральной компонент спектральной линии соответственно, а I_+ , I_0 и I_- – интенсивности низкопольной, центральной и высокопольной компонент спектра ЭПР (рис. 2а). Так как при всех воздействиях количественный эффект по отношению как к τ_{C1} , так и к τ_{C2} был абсолютно одинаковым, а величина τ_{C1}/τ_{C2} не изменялась, что говорит об отсутствии влияния исследуемых агентов на анизотропию вращения зонда С16, то в дальнейшем для сравнения использовали параметр τ_{C1} . Для оценки состояния липидов в поверхностных слоях липосом (~ 8 Å) использовали 5-доксилстеариновую кислоту (зонд С5). Спектры зонда С5 характеризовали параметром упорядоченности S , зависящим от амплитуды отклонения продольной оси жирнокислотной цепи зонда относительно среднего направления ориентации окружающих его липидов. Для расчета параметра S использовали уравнение $S = 1.66 \cdot (H_{//} - H_1)/(H_{//} + 2H_1)$ [19], где $2H_{//}$ – расстояние между низко- и высокопольными (внешними) экстремумами спектра, $2H_1$ – между внутренними экстремумами (рис. 2б). Расчет параметров τ и S по спектрам ЭПР проводили в полуавтоматическом режиме с помощью программы Origin 6.1 с использованием стандартных алгоритмов поиска экстремумов при заданном шаге дискретизации 0.05 Гс. В результате погрешность измерения расстояния между экстремумами в хорошо разрешенном спектре ЭПР не превышала 0.2 Гс, а суммарная ошибка вычисления отдельных значений τ и S по экспериментальным спектрам ЭПР зондов С16 и С5, полученным в результате трех-пяти накоплений, не превышала 0.03 нс и 0.002 соответственно.

Математическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Origin Pro 8. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна–Уитни.

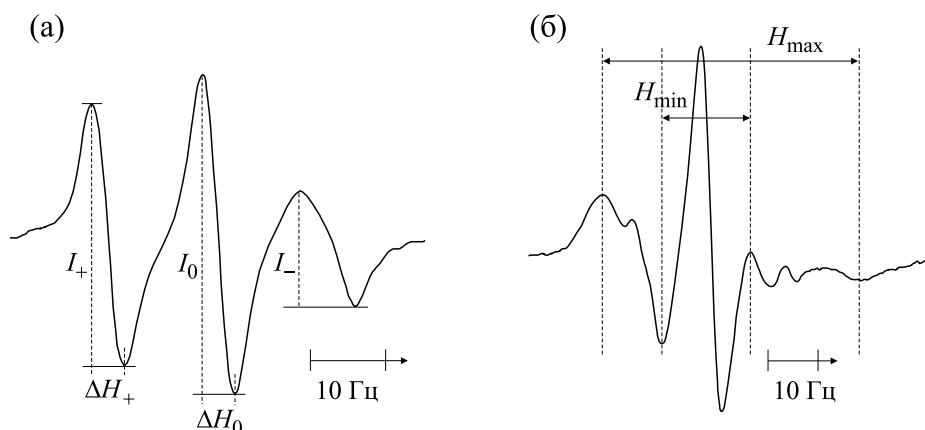


Рис. 2. ЭПР-спектры зондов C16 (а) и C5 (б) в липидном бислое липосом при температуре 293 К.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как указывалось выше, основными препятствиями на пути использования нанолипосомальных комплексов в качестве контейнеров для переноса ПНЖК в организм животных и человека является высокая способность липидов и самих ПНЖК к окислению. Поэтому в первую очередь нас интересовал вопрос о том, как длительное применение диет с липосомами различного состава влияет на способность к окислению липидов основных органов животных — печени и головного мозга. Для оценки этого параметра мы использовали модель инициированного окисления липосом, приготовленных из суммарных липидов этих органов. В качестве физико-химической характеристики данного процесса применяли величины максимальной скорости ($V_{\max}$) и максимальной величины содержания диеновых конъюгатов ($A - A_0$), которая достигалась при окислении (рис. 1а,б).

Так как максимальная скорость достигалась в начале окисления, ее определяли как $(\Delta A / \Delta t)$ на отрезке от 0 до 5 мин, где ΔA — приращение оптической плотности за это время (рис. 1в). Видно, что окисление липидов в липосомах из печени и мозга значительно отличается. Для липосом из липидов печени характерны более высокие значения скорости окисления липидов печени на начальном участке кривых (примерно до 100 мин) (рис. 1а). Затем скорость накопления диеновых конъюгатов уменьшается, в то время как у липосом из липидов головного мозга (рис. 1б) максимальная скорость окисления значительно меньше и снижается медленнее в течение окислительного процесса. Такой ход кривых можно объяснить различным соотношением в липидах печени и мозга поли-, моно- и ненасыщенных жирных кислот, имеющих на порядки различающиеся константы окисления [8]. Сравнительные диаграммы для $V_{\max}$ и $A - A_0$ всех групп мышей

представлены на рис. 3. Видно, что в липосомах, приготовленных из липидных экстрактов печени и головного мозга мышей разного возраста, при старении (группы 1 и 8 соответственно) происходит уменьшение и $V_{\max}$ и $A - A_0$, причем в липосомах из печени в большей степени меняется $V_{\max}$ — в 1.3 раза, а в липосомах из головного мозга — $A - A_0$ — в 1.76 раза. В группах 2, 3, 5 и 6 в липидах из обоих органов увеличиваются оба параметра по сравнению с возрастным контролем (группа 8). На общем фоне выделяется группа 7 животных, получавшая диету из липосом (ФХ + ЭМГ + РЖ + Саs—Na), для которой отмечено уменьшение и $V_{\max}$ и $A - A_0$ в липосомах из липидов печени и незначительные отклонения от контроля в липосомах из липидов головного мозга. Между параметрами $A - A_0$ и $V_{\max}$ для липосом обоого типа наблюдается хорошая прямолинейная зависимость (рис. 4, таблица), что, с одной стороны, хорошо объяснимо с точки зрения закономерностей ПОЛ в липосомах и мембранах [20–22], но с другой — несколько удивляет из-за весьма сложного состава субстрата окисления и присутствующих добавок. Также следует отметить тот факт, что изменения в закономерностях ПОЛ липосом из липидов печени и головного мозга при использовании липосомальных диет происходят синхронно: между исследуемыми параметрами ПОЛ ($V_{\max}$ печени и $V_{\max}$ головного мозга, $A - A_0$ печени и $A - A_0$ головного мозга) существует хорошая корреляция (рис. 4, таблица), что позволяет полагать наличие общей закономерности в устойчивости к окислительным процессам во всем организме животных.

Известно, что реакции ПОЛ регулируются такими параметрами, как степень ненасыщенности субстрата окисления [20, 21] и присутствием антиоксидантов [23, 24]. Так как ранее нами было установлено, что прием используемых диет ока-

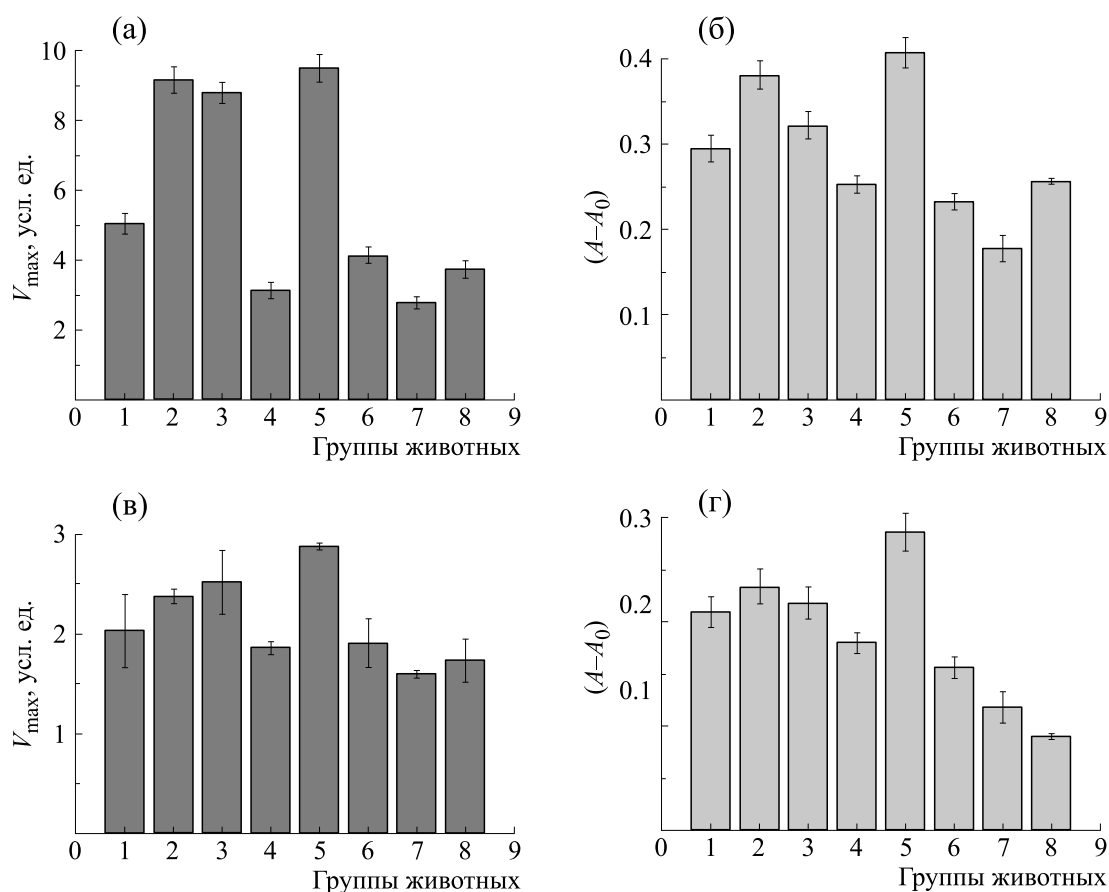


Рис. 3. Максимальные скорости окисления липидов (а, в) и максимальные уровни содержания диеновых конъюгатов (б, г) в липосомах из липидов печени (верхний ряд) и головного мозга (нижний ряд) мышей, принимавших наноконплексы липосом различного состава. По оси абсцисс — номера групп животных; по оси ординат — $V_{\max}$ в усл. ед. и разности $(A-A_0)$ в единицах оптической плотности.

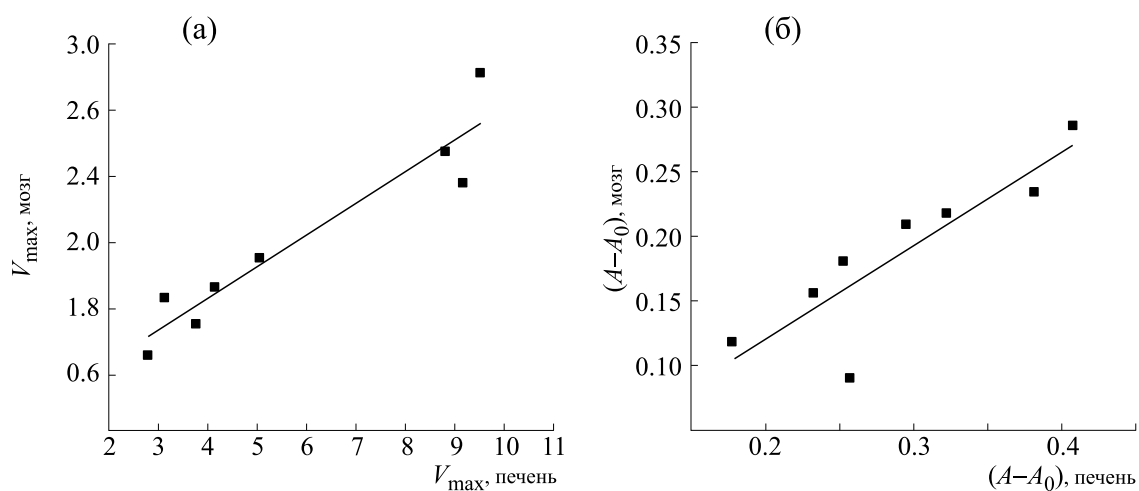


Рис. 4. Взаимосвязь максимальных скоростей окисления (а) и максимальных значений уровня гидроперекисей (б) в печени и головном мозге мышей, принимавших наноллипосомы различного состава.

Коэффициенты корреляции между различными физико-химическими характеристиками липосом из липидов печени и головного мозга мышей, содержащихся на нанолипосомальных диетах

Сочетания	R	p
Печень		
$A - A_0$ и $V_{\max}$	0.9267	<0.001
$V_{\max}$ и Σ ПНЖК	Нет зависимости	
$V_{\max}$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})$	0.6890	<0.05
$V_{\max}$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$	0.5850	<0.05
$A - A_0$ и Σ ПНЖК	Нет зависимости	
$A - A_0$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})$	0.6897	<0.05
$A - A_0$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$	0.6296	<0.05
$A - A_0$ и АОА	Нет зависимости	
$V_{\max}$ и АОА	Нет зависимости	
τ_{Cl} и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$	0.7615	<0.05
τ_{Cl} и АОА	0.5600	<0.05
S и АОА	0.3419	<0.1
Головной мозг		
$A - A_0$ и $V_{\max}$	0.9153	<0.001
$V_{\max}$ и Σ ПНЖК	0.7740	<0.05
$V_{\max}$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})$	0.8380	<0.05
$V_{\max}$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$	0.7525	<0.05
$A - A_0$ и Σ ПНЖК	0.5920	<0.1
$A - A_0$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})$	0.6584	<0.1
$A - A_0$ и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$	Нет зависимости	
$V_{\max}$ и АОА	Нет зависимости	
$A - A_0$ и АОА	Нет зависимости	
τ_{Cl} и $\Sigma(\text{ПНЖК}+\text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$	0.4950	<0.1
τ_{Cl} и АОА	0.5200	<0.1
S и АОА	Нет зависимости	
Печень и головной мозг		
$V_{\max}$ печени и $V_{\max}$ головного мозга	0.9485	<0.001
$A - A_0$ печени и $A - A_0$ мозга	0.8705	<0.001
τ_{Cl} печени и τ_{Cl} головного мозга	Нет зависимости	
S печени и S головной мозга	Нет зависимости	
τ_{Cl} печени и D	Нет зависимости	
τ_{Cl} головного мозга и D	Нет зависимости	
S печени и D	Нет зависимости	
S головного мозга и D	0.6116	<0.1
$(S \text{ печени} + S \text{ головного мозга})$ и D	0.5627	<0.05

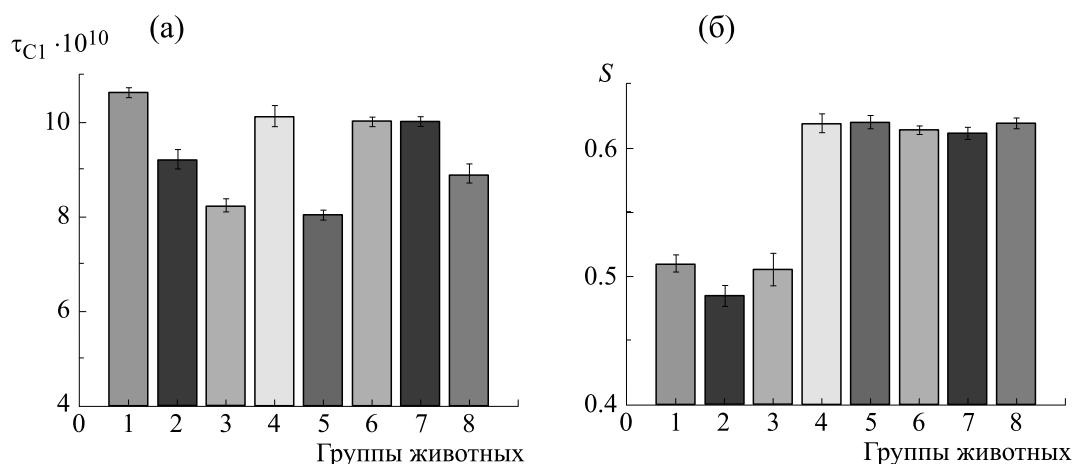


Рис. 5. Микровязкость глуболежащих слоев (а) и степень упорядоченности поверхностных слоев (б) липидов в липосомах из липидов печени мышей, содержащихся на различных липосомных диетах.

зывает влияние на эти характеристики [12, 13], мы использовали их для проведения ряда корреляций с результатами настоящей работы (таблица). Так как для модельных липосомальных систем относительно простого липидного и жирнокислотного состава высказано несколько положений о возможном вкладе различных показателей в процессы окисления: общей степени ненасыщенности липидов, доли полиненасыщенных жирных кислот, суммы поли- и мононенасыщенных жирных кислот ($\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$), отношения этой суммы к сумме насыщенных жирных кислот ($\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$) и т.д. [20–22], мы оценили степень корреляции $V_{\max}$ и $A - A_0$ для липосом из липидов печени и головного мозга с этими показателями, результаты представлены в таблице. Из них следует, что для липосом из липидов головного мозга наблюдается достаточно хорошая и статистически достоверная корреляция между $V_{\max}$ и $\Sigma\text{ПНЖК}$; $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$; $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$, в то время как для липосом из липидов печени она достоверна только для $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$ и $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$. Для параметра $A - A_0$ характерна достоверная корреляция с $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$ и в липосомах из липидов печени, и в липосомах из липидов головного мозга; с $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК}) -$ в липосомах из липидов печени и $\Sigma\text{ПНЖК}$ в липосомах из липидов мозга. Таким образом, можно сделать вывод о том, что наибольшая зависимость параметров, характеризующих ПОЛ в сложных системах переменного липидного состава, выявлена для величины $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$.

Между параметрами $V_{\max}$ и АОА, а также $A - A_0$ и АОА корреляция не обнаружена (таблица), данный результат можно объяснить тем, что наличие антиоксидантов главным образом влияет на пе-

риод индукции на кривых окисления, но не на его скорость [23, 24].

Одним из важных физико-химических показателей, связанных с регуляторными процессами ПОЛ в биологических мембранах, являются параметры микровязкости липидов, образующих структуру мембран [25, 26]. Поэтому мы в исследовании определяли микровязкость тех слоев липидов, где расположены жирнокислотные остатки липидов, используя в качестве зонда парамагнитный свободный радикал С16-доксилстеариновую кислоту, а также ригидность поверхностных слоев липидов, применяя в качестве зонда С5-доксилстеариновую кислоту. Полученные результаты для липосом из липидов печени представлены на рис. 5.

Из рис. 5а следует, что величина τ_{C1} , характеризующая микровязкость липидов, статистически достоверно ($p < 0.05$) уменьшается с увеличением возраста животных (группа 8 по сравнению с группой 1) в 1.19 раза; использование диет с липосомами из (ФХ+ЭМГ) и (ФХ+ЭМГ+Cas-Na) усиливает этот эффект, вызывая дополнительное снижение τ_{C1} еще на 8%. В группах 4, 6 и 7 τ_{C1} достоверно увеличивается по сравнению с контрольной группой 8 и приближается к значениям, характерным для молодых животных группы 1. Жесткость поверхностных слоев липидов в липосомах из суммарных липидов печени (параметр упорядоченности S) с возрастом статистически достоверно увеличивается в 1.25 раза; диеты, используемые в группах 4, 5, 6 и 7, не влияют на этот процесс, снижение этой величины до уровня нормы наблюдается только в группах 2 и 3. На рис. 6 приведены данные о микровязкости липидов и их упорядоченности в липосомах из липидов головного мозга различных групп животных. Следует отметить, что оба изучаемых параметра (τ_{C1} и S)

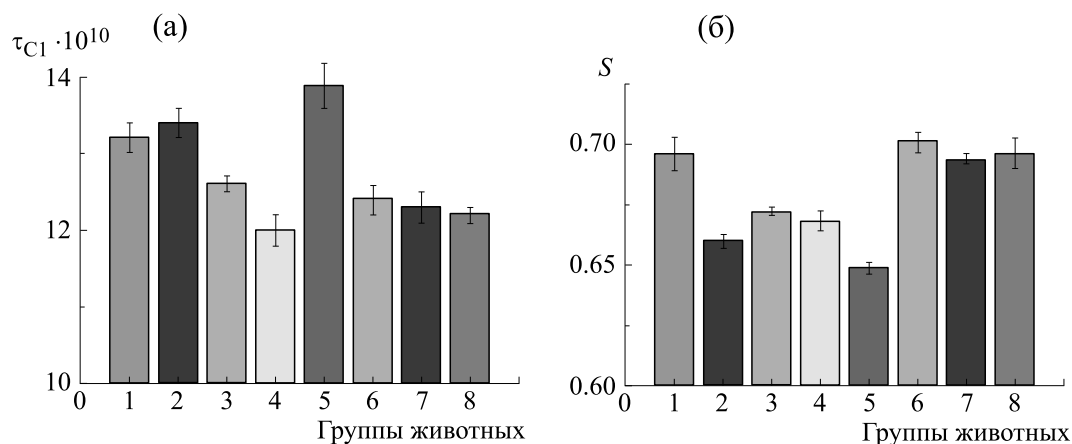


Рис. 6. Микровязкость глубоколежащих слоев (а) и степень упорядоченности поверхностных слоев (б) липидов в липосомах из липидов головного мозга мышей, содержащихся на различных липосомных диетах.

существенно превышают аналогичные характеристики для липосом из печени тех же животных: если в липосомах из липидов печени параметр τ_{C1} изменяется в пределах от 8×10^{-10} до 11×10^{-10} с, а S — от 0.45 до 0.6, то в липосомах из липидов головного мозга уровень этих изменений составляет $(12-14) \times 10^{-10}$ с и 0.65–0.75 соответственно. Это связано с относительно более высоким содержанием холестерина и более низким содержанием ПНЖК в липидах головного мозга по сравнению с липидами печени по отношению к суммарным липидам этих органов [27].

В липосомах из липидов головного мозга (рис. 6), так же как и в липосомах из липидов печени, с увеличением возраста животных наблюдается уменьшение параметра τ_{C1} в 1.1 раза, прием большинства диет приводил к увеличению этого параметра, наиболее достоверное изменение отмечено в группе 5, которая принимала диету (ФХ + ЭМГ + Cas-Na). Сопоставление изменений τ_{C1} и S в липосомах из липидов печени и головного мозга (таблица) говорит об отсутствии аналогии в изменении вязкостных параметров липидов этих органов после приема нанолипосомальных комплексов. Вязкостные характеристики липидов зависят от целого ряда параметров: степени ненасыщенности липидов, относительного содержания фосфолипидов и холестерина, отношений холестерин:общие липиды; холестерин:фосфолипиды; холестерин:сфингомиелин и т.д. [28–33]. При этом холестерин в зависимости от его концентрации и характера взаимодействия с ПНЖК и НЖК может играть двойственную роль — как увеличивать, так и уменьшать вязкость липидного бислоя [31–33]. Поскольку в наших экспериментах мы оценивали структурные изменения в липосомах, приготовленных из сложной смеси липидов, вполне объяснимо, что для каж-

дой конкретной группы животных трудно выделить какой-либо единственный параметр, вносящий определяющий вклад в величины τ_{C1} и S .

Известно, что микровязкость глубоко лежащих слоев липидов в биологических мембранах и липосомах во многом определяется составом жирных кислот липидов [28–30]. Так как использование предложенных нами диет было направлено именно на изменение этого состава, что и было установлено в нашей предыдущей работе [12], мы оценили степень корреляции между параметром τ_{C1} и различными общими характеристиками состава жирных кислот, результаты приведены в таблице. В липосомах из липидов печени была обнаружена достаточно хорошая и статистически достоверная ($p < 0.05$) корреляция между τ_{C1} и $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$; аналогичная, но менее достоверная ($p < 0.1$) зависимость между этими же величинами установлена и для липосом из головного мозга. Принимая во внимание тот факт, что выводы литературных источников о закономерностях зависимости микровязкости липидов в липосомах основываются на экспериментах, проведенных с использованием фосфолипидов достаточно простого состава [29, 31–33], а в экстрактах из органов мышей присутствует не только большое разнообразие фосфолипидов, но и нейтральные липиды, можно считать полученные нами корреляции вполне удовлетворительными.

Так как в системе регуляции ПОЛ микровязкость липидов тесно связана с уровнем их антиокислительной активности (АОА), а ранее нами было установлено, что все используемые нанолипосомальные комплексы влияли на суммарную АОА и печени, и головного мозга мышей [13], мы также использовали данные этой работы для корреляции с параметром τ_{C1} . Из таблицы следует,

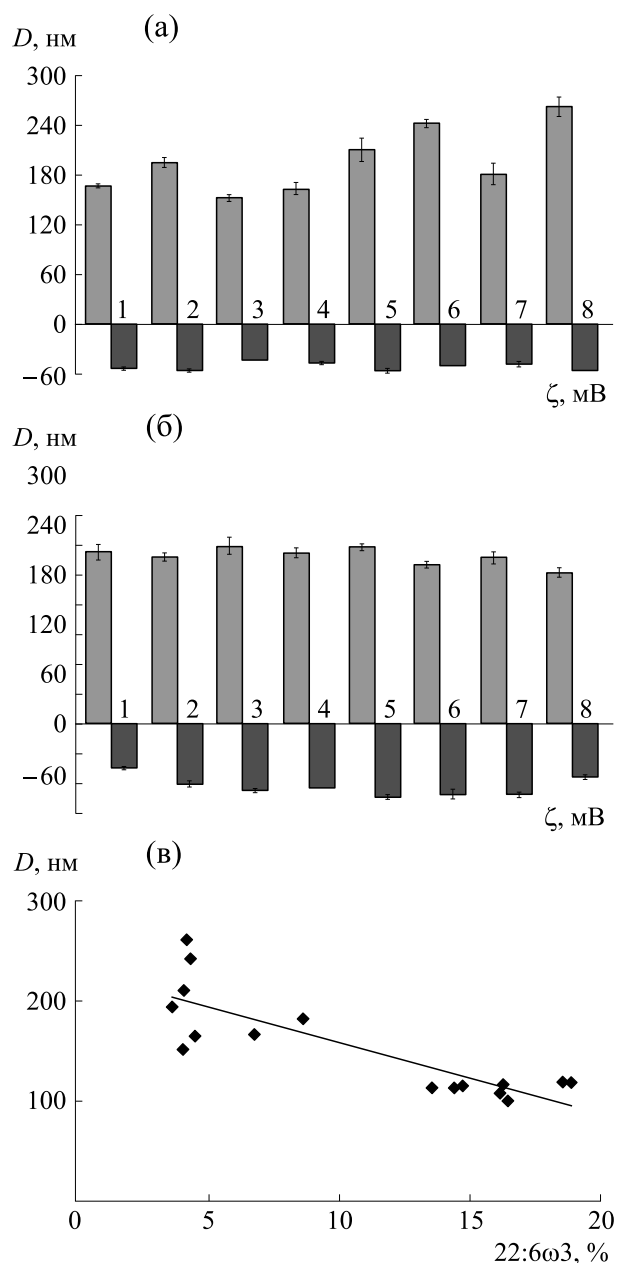


Рис. 7. Средний диаметр D и ζ -потенциал липосом из липидов печени (а) и головного мозга (б) мышей. Зависимость диаметра липосом от относительного содержания декозагексаеновой кислоты в жирных кислотах (в)..

что между τ_{C1} и AOA в липосомах и из липидов печени, и из головного мозга существует достоверная, хотя и не очень высокая корреляция. Так как в качестве антиоксиданта в наноконкомпексах было использовано ЭМГ, действующим компонентом которого является эвгенол, то мы можем сравнить его эффект на τ_{C1} в липосомах из ФХ сои *in vitro* и в нашем эксперименте. Ранее нами было установлено, что ЭМГ снижало τ_{C1} липосом

из ФХ сои [34]. Аналогичный эффект мы наблюдаем и в эксперименте *in vivo* (группы 2 и 3). Таким образом, данный антиоксидант одинаково действует на структуру липосом, и его эффект не зависит от степени сложности липидного состава. Интересно отметить, что, по-видимому, это свойство эвгенола не является типичным для антиоксидантов, так как ранее нами было установлено, что такие антиоксиданты, как фенозанкалия и α -токоферол, увеличивали τ_{C1} и в биологических мембранах, и в липосомах, приготовленных из их липидов [35–36]. Необходимо отметить и такой интересный факт, как значительное увеличение τ_{C1} в липосомах из липидов печени группы 5 и липосомах из липидов головного мозга групп 4, 6 и 7, в нанолипосомы которых входил Cas-Na. Такой же эффект этого белка был зафиксирован нами и в экспериментах *in vitro* при инкапсуляции липосом в белок [34]. Однако в эксперименте *in vivo* белок присутствовал только в тех липосомах, которые были включены в диету, но не в липидных экстрактах, из которых готовились липосомы, т.е. его влияние было опосредованным.

Параметр упорядоченности в поверхностных слоях липидов S статистически достоверно возрастает по мере старения мышей в липосомах из липидов печени (группа 8 по сравнению с группой 1) и не изменяется в липосомах из липидов головного мозга. Диеты, используемые в группах 2 и 3, существенно и достоверно снижают этот показатель и в липосомах из липидов печени, и в липосомах из липидов головного мозга и не меняют его в группах 6 и 7. Достаточно хорошей корреляции между S и AOA не обнаружено, хотя ее можно было бы ожидать, так как антиоксиданты как раз встраиваются в поверхностные слои липидов [37, 38]. Можно предположить, что в значительной степени в изменение и этой характеристики, и τ_{C1} может вносить и холестерин, содержание которого может изменяться при использовании нанолипосомальных диет, а влияние на структурные изменения в мембранах зависит от его концентрации [31, 32].

Важной характеристикой липосом являются их размеры и поверхностный заряд, которые существенно зависят как от их липидного состава [39, 41], так и от включенных в них антиоксидантов [40, 41]. Мы охарактеризовали липосомы, приготовленные из липидов органов мышей всех экспериментальных групп, по показателям гидродинамического диаметра липосом (D) и ζ -потенциалу. Результаты представлены на рис. 7а.

В первую очередь обращает на себя внимание тот факт, что липосомы, приготовленные из липидов головного мозга, весьма существенно (в 1.5–2.6 раза) меньше по размерам, чем липосомы из липидов печени. Вероятно, это связано с раз-

личным составом липидов в этих органах — липиды головного мозга содержат значительно больше холестерина и меньше ПНЖК [27], что приводит к более плотной и компактной структуре липосом и согласуется с нашими результатами о микровязкости и ригидности мембран из липидов головного мозга. При сопоставлении результатов о размерах липосом и структуре мембран нами было установлено, что между микровязкостью липидов и размерами липосом прямая взаимосвязь отсутствует, но она имеет место для жесткости мембран S и средним диаметром липосом вне зависимости от их происхождения (таблица). Абсолютная величина отрицательного ζ -потенциала (поверхностный заряд) липосом из липидов головного мозга на 25% выше, чем у липосом из липидов печени, что может быть связано с перераспределением отрицательно заряженных фосфолипидов на внешней и внутренней поверхностях липосом [39].

В работе [12] было установлено, что относительное содержание докозагексаеновой ПНЖК (22:6 ω 3) в жирных кислотах головного мозга мышей в два-три раза выше, чем в жирных кислотах липидов печени, при этом, как указывалось выше, липосомы из липидов головного мозга в 1.5–2.6 раза меньше по размерам; для диаметров липосом, приготовленных из липидов обоих органов, наблюдается хорошая обратная зависимость от относительного содержания докозагексаеновой кислоты в жирных кислотах (рис. 7в) с коэффициентом корреляции $R = 0.836$. Этот факт может свидетельствовать о значительном влиянии длинноцепочечной докозагексаеновой ПНЖК в формировании липосом.

Возрастные изменения приводят к тому, что гидродинамический диаметр липосом из липидов печени увеличивается в 1.7 раза, поверхностный заряд становится более отрицательным в 1.3 раза, в то время как в липосомах из липидов головного мозга гидродинамический диаметр уменьшается в 1.1 раза, а поверхностный заряд — увеличивается в 1.2 раза. Таким образом, возрастные изменения в печени и головном мозге идут в противоположных направлениях и в печени выражены более значительно. Все диеты приближали размеры и поверхностный заряд липосом к уровню, характерному для липосом из липидов органов молодых животных.

Подводя итоги работы, можно сделать следующие выводы: прием различных нанолипосомальных диет оказывает влияние на такие физико-химические свойства липидов печени и головного мозга, как их способность к окислению и микровязкость, причем изменения в окисляемости носят более однотипный характер по сравнению с изменениями в структурном состоянии липидов. Наибольшая зависимость параметров, характе-

ризующих ПОЛ и структурное состояние липидов в сложных системах переменного липидного состава, выявлена для величин $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$ и $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК}) / \Sigma \text{НЖК}$ соответственно; размеры липосом зависят от степени упорядоченности поверхностных липидов липосом. Физико-химические свойства липидов существенно изменяются с возрастом животных, прием нанолипосомальных диет корректирует эти изменения и приближает уровень исследуемых параметров к исходному состоянию, характерному для здоровых молодых животных, диета с липосомами состава (ФХ + ЭМГ + РЖ + Cas-Na) была наиболее эффективной и может быть рекомендована для практического применения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-16-00085). В рамках работ по госбюджетному финансированию проведены исследования по окислению липосом (Н.Н. Сажина), ЭПР-спектроскопические исследования (В.В. Каспаров), исследования методом светодинамического рассеяния (Н.Н. Сажина, И.Г. Плащина).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования с применением методов ЭПР-спектроскопии и светодинамического рассеяния проведены в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. C. Candela, L. L. M. Bermejo, and K. V. Loria, *Nutric. Hospital* **26**, 323 (2011).
2. В.И. Максимов, *Пища и дегенеративные болезни* (М., Миклош, 2004).
3. ГОСТ Р 55577-2013. *Продукты пищевые специализированные и функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности*.
4. M.G. Semenova and E. Dickinson, in *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions* (Brill, Leiden, Boston, 2010).
5. D. J. McClements, *Nanoparticle- and Microparticle-based delivery systems. Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds* (Taylor & Francis Group, London, New York, 2015).
6. M. G. Semenova, A. S. Antipova, D. V. Zelikina, et al., *Food Res. Int.* **88**, 70 (2016).
7. M. G. Semenova, D. V. Zelikina, A. S. Antipova, et al., *Food Hydrocolloids* **52**, 144 (2016).

8. Н. Н. Сажина, А. С. Антипова, М. Г. Семенова и Н. П. Пальмина, *Биоорганическая химия* **45**, 193 (2019).
9. Е. И. Мартиросова, М. Г. Семёнова, А. С. Антипова и др., *Хим. физика* **38** (12), 38 (2019).
10. М. Г. Семенова, А. С. Антипова, М. С. Анوخина, et al., *Food & Function* **3**, 271 (2012).
11. М. Г. Семенова, А. С. Антипова, Л. Е. Белякова, et al., *Food Hydrocolloids* **42**, 149 (2014).
12. Н. П. Пальмина, Т. А. Мишарина, Н. И. Крикунова и др., *Прикл. биохимия и микробиология* **57** (2), 179 (2021).
13. Н. Н. Сажина, М. Г. Семенова, А. С. Антипова и др., *Биофизика* **65** (4), 760 (2020).
14. L. Mainali, M. Raguz, W. J. O'Brien, and W. K. Subczynski, *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1432 (2013).
15. M. Raguz, J. Widomska, J. Dillon, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2380 (2009).
16. T. G. Blaigh and W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
17. М. Кейтс, *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов* (Мир, М., 1975).
18. E. Niki, *Methods Enzymol.* **186**, 100 (1990).
19. А. Н. Кузнецов, *Метод спинного зонда* (Наука, М., 1976).
20. I. Pinchuk and D. Lichtenberg, *Chem. Phys. Lipids* **178**, 63 (2014).
21. P. A. C. McPherson, A. Bole, K. A. Cruz, et al., *Chem. Phys. Lipids* **165**, 682 (2020).
22. C. Lee, J. Barnett, and P. D. Reven, *J. Lipid Res.* **39**, 1239 (1998).
23. Е. Б. Бурлакова и Н. Г. Храпова, *Успехи химии* **54** (9), 907 (1985).
24. E. Niki, *Biomed. J.* **37**, 106 (2014).
25. Е. Б. Бурлакова и Н. П. Пальмина, *Вестн. АМН СССР* **3**, 1 (1982).
26. E. B. Burlakova, N. P. Palmina, and E. L. Maltseva, in *Membrane Lipid Oxidation*, Ed. by C. Vigo-Perfley (CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1991), Vol. 3, pp. 209–238.
27. P. Subramanian, S. Mirunalini, S. R. Pandi-Perumal, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **571**, 116 (2007).
28. D. Chapman, in *Biological Membranes*, Ed. by D. Chapman (Acad. Press, Lond., 1982), Vol. 4, pp. 179–229.
29. D. Chapman and G. Benga, in *Biological Membranes*, Ed. by D. Chapman (Acad. Press, Lond., 1984), Vol. 5, 1–56 (1986).
30. M. Shinitzky, in *Physiology of Membrane Fluidity*, Ed. by M. Shinitzky (CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1984), Vol. 1, pp. 1–51.
31. P. J. Quinn and C. Wolf, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 33 (2009).
32. G. W. Feigenson, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 47 (2009).
33. S. R. Wassall and W. Stillwell, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 24 (2009).
34. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева, В. И. Бинюков и др., *Биофизика* **63** (1), 78 (2018).
35. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева и Т. Е. Часовская, *Биофизика* **59** (4), 704 (2014).
36. Т. Е. Часовская, Е. Л. Мальцева и Н. П. Пальмина, *Биофизика* **58** (1), 97 (2013).
37. В. В. Белов, Е. Л. Мальцева и Н. П. Пальмина, *Биофизика* **56** (2), 372 (2011).
38. Т. Е. Часовская, И. Г. Плащина и Н. П. Пальмина, *Докл. РАН* **449** (6), 673 (2013).
39. M. Mosca, A. Cerlie, and L. Ambrosone, *Chem. Phys. Lipids* **164**, 158 (2011).
40. S. Azouzi, H. Santuz, S. Vorandat, et al., *Biophys. J.* **112**, 1863 (2017).
41. Н. Н. Сажина, И. Г. Плащина, М. Г. Семенова и Н. П. Пальмина, *Коллоид. журн.* **82**, 89 (2020).

Physicochemical Properties of Liposomes Made from Lipids of Liver and Brain of Mice Receiving Nanolipid Complexes

N.P. Palmina, N.N. Sazhina, N.G. Bogdanova, A.S. Antipova, E.I. Martirosova, I. G. Plashchina, V.V. Kasparov, and M.G. Semenova

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

The physicochemical properties of lipids of the most important organs (liver and brain) of mice that received nanoliposomal complexes of different compositions in a long-term diet (3 months) were studied. The components of nanoliposomal complexes included: soy phosphatidylcholine, clove essential oil, fish oil and sodium caseinate. Liposomes were prepared by mixing lipids from the investigated organs and checked whether they were able to initiate oxidation. The structure of the lipid bilayer in regions of the localization of 5-doxyl and 16-doxyl stearic acids spin probes, and the size and charge of liposomes were also determined. It was found that all the studied parameters changed significantly with the age of the animals: lipids from both organs had a reduced capacity for oxidation; microviscosity decreased and cells enlarged; the size of liposomes from liver lipids increased while the size of liposomes from brain lipids decreased; after diet feeding, the studied values of mice were closer to those typical of young animals. Correlation was found between the rate of lipid oxidation and microviscosity upon changing fatty acid composition, and liposome size was correlated with the parameter showing how lipid layers arrange themselves over the membrane surface.

Keywords: liposomes, lipid oxidative capacity, membrane structure, diameter and charge of liposomes

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТЕ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

© 2021 г. О.В. Слатинская*, О.Г. Лунева*, Л.И. Деев*, П.И. Зарипов*, Г.В. Максимов*, **

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119892, Москва, Ленинские горы, 1/12

**Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049, Москва, Ленинский просп., 4

E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2021 г.

После доработки 11.03.2021 г.

Принята к публикации 15.03.2021 г.

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния исследовали изменения конформации гема и глобина гемоглобина при варьировании pO_2 в среде инкубации эритроцитов и гемоглобина. При изменении pO_2 , в спектрах комбинационного рассеяния гемоглобина в эритроците и в растворе наблюдаются изменения ряда характерных полос как в области $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания гема), так и в высокочастотной области спектра ($2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, валентные колебания аминокислот глобина). Установлено, что зависимость степени оксигенации гемоглобина (sO_2), рассчитанной из параметров спектра комбинационного рассеяния, характеризуется S-образной кривой только для гемоглобина в эритроците. Установлено, что различия в конформации гема при изменении pO_2 меняют его способность образовывать и комплексы с NO. При увеличении pO_2 изменения конформации гема гемоглобина в клетке сопровождаются увеличением вклада боковых $-\text{CH}_3$ -групп колебаний полуколец пиррола и групповых колебаний связей полуколец пиррола, а конформации глобина гемоглобина обусловлено увеличением вклада колебаний Н-метиновых групп и симметричных концевых метиленовых групп аминокислот.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, гемоглобин, эритроцит, pO_2 .

DOI: 10.31857/S0006302921050112

Известно, что связь между pH, CO_2 и сродством гемоглобина (Гб) к O_2 в эритроците описывается эффектом Бора: снижение pH в суспензии эритроцитов приводит к уменьшению сродства Гб к кислороду и увеличению P_{50} [1, 2]. Этот эффект характеризует усиление диссоциации Гб и O_2 в эритроците при увеличении $p\text{CO}_2$ до 40 мм рт. ст. (смесь растворенного газа (5%), бикарбоната (H^+ и HCO_3^- , 80–90%) и карбоната гемоглобина (5–13%). Как и O_2 , CO_2 легко диффундирует через мембрану эритроцита и переводится карбоангидразой в HCO_3^- и H^+ . Образующиеся ионы H^+ могут связываться с остатками гистидина в глобине, снижая его сродство к O_2 (Т-форма). Кроме того, снижение внутриклеточного pH стимулирует синтез 2,3-дифосфоглицерата, что дополнительно уменьшает сродство Гб к O_2 . HCO_3^- , об-

разующийся при активации карбоангидразы, переносится из эритроцитов в обмен на Cl^- белком полосы 3 (БП3). Координация между активностью карбоангидразы и БП3 осуществляется в мембране эритроцита: карбоангидраза связана с С-концевым доменом БП3, который обеспечивает транспорт $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$. Поскольку в каждом эритроците содержится около миллиона БП3, обмен происходит быстро и завершается на 90% в течение 0.4–0.5 с [3, 4].

В капиллярах легких Т-форма Гб (без связанного O_2) характеризуется высоким сродством к O_2 и связывание O_2 с Гб (R-форма) осуществляется благодаря конформационным изменениям Гб. Об этом свидетельствует и тот факт, что глобин, у которого аланин в «гемовом кармане» заменен на аспартат, обладает более низким сродством к O_2 , так как отрицательный заряд карбоксильной группы препятствует формированию комплекса «атом железа — супероксид-анион». Анализ структуры Гб свидетельствует о том, что в процес-

Сокращения: Гб — гемоглобин, БП3 — белок полосы 3, дГб — дезоксигемоглобин, КР — комбинационное рассеяние, оГб — оксигемоглобин.

се связывания O_2 существенную роль играют факторы, обусловленные как изменением длины связей Fe—N гема, так и ограничениями локализации O_2 в участке связывания [5].

Отметим, что у позвоночных способность Гб переносить O_2 регулируется дополнительно клеточными процессами: как за счет активности переносчиков ионов (например, Na^+/H^+ -обменник), контролирующим внутриклеточный pH и объем клеток [6–9], так и за счет обратимого связывания дезоксигемоглобина (дГб) эритроцита с компонентами цитоскелета (БПЗ) [10–12]. Ранее с помощью метода комбинационного рассеяния (КР) было установлено, что изменения конформации гема и глобина как в цельной крови и выделенных эритроцитах, так и, собственно, молекул гемоглобина могут быть различными в норме и при патологии [13]. Очевидно, что изменения конформации Гб в клетке обусловлены различным pO_2 (гипоксия). Однако исследований, свидетельствующих об изменениях конформации гема и глобина непосредственно в нативном эритроците при разном парциальном давлении кислорода в среде инкубации (pO_2), явно недостаточно [4, 6, 14–17].

Задачей данной работы было исследование изменений конформации Гб (гем и глобин) в эритроците и Гб в растворе при различном pO_2 .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила кровь здоровых доноров ($n = 10$, возраст 20–40 лет), которую отбирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) и хранили при 4°C. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20–50 Ед/мл крови). Фракцию эритроцитов получали с помощью центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин при 4°C (Laborfuge 400R, Heraeus, Германия). Осадок трижды отмывали в буфере (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 1 mM $MgSO_4$, 5 mM глюкозы (Sigma, США), pH 7.4). Суспензию эритроцитов ($Ht = 40\%$) хранили при 4°C и использовали в эксперименте в течение трех часов после выделения. Гемоглобин выделяли из эритроцитов при инкубации клеток в буфере (4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4) в соотношении 1:10 (гемолиз) с последующим удалением клеточных мембран центрифугированием в течение 10 мин при 6000 g и 4°C. Концентрацию гемоглобина (далее – раствор Гб) определяли спектрофотометрическим методом (длина волны 415 нм) с помощью спектрофотометра Hitachi 557 (Япония).

Изменение содержания кислорода в пробе проводили с помощью продувки газовой смесью

(смесь А: азот и 0.04% CO_2 (ООО «ПГС-сервис», Россия)) над средой инкубации с объектом исследования (объем пробы 2 мл ($Ht = 40\%$) в течение 20 мин) при постоянном перемешивании (при 18–21°C, скорость потока газовой смеси 0.1 л/мин) [17, 18]. При формировании смеси с требуемым парциальным давлением кислорода (смесь Б) внутри герметичного бокса проводили смешивание определенных долей смеси А и кислорода (pO_2 контролировали при помощи электрода KE-25 (Figaro Engineering Inc., Япония)). Все манипуляции при заполнении капилляров осуществляли в герметичном боксе при постоянной подаче газовой смеси Б с требуемым уровнем pO_2 . Для этого внутри герметичного бокса образец помещали в предварительно продутые в течение 2 мин смесью Б стеклянные капилляры (диаметр поперечного сечения 1 мм, ООО «Агат-Мед», Россия). Для нормализации избыточного давления смеси Б в боксе применяли воздушный клапан с порогом срабатывания около 1 атм. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов и Гб, приготовленные в тех же условиях, но вместо бескислородной газовой смеси А использовали воздух. После заполнения капилляры герметично запаивали и хранили при температуре 4°C не более 3 ч.

Используемые в работе параметры вытеснения кислорода позволяют получить пробы суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина в состоянии нормобарической гипоксии, поскольку после вытеснения O_2 в пробах увеличивалась доля дГб (определяли путем регистрации и анализа спектров КР, методику см. ниже).

Исследование конформации гема и глобина гемоглобина проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния. Спектры КР регистрировали с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне $1000–3000\text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 0.8 см^{-1} , регистратор — CCD-детектор с Пельтье-охлаждением до температуры –50°C (объектив 5× с апертурой 0.15, решетка 600 штр/мм), мощность лазера на образце составляла не более 3 мВт, длина волны возбуждения — 532 нм, время регистрации одного спектра — 10 с, количество накоплений сигнала — 3. Количество повторов для каждого эксперимента (образец при заданном парциальном давлении кислорода) — 12. Обработка спектров включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров в программе Origin2017 (OriginLab Corp., США).

Для оценки изменений конформации гема и глобина молекулы Гб использовали величины соотношений интенсивностей характерных полос спектра КР [18–23]:

1. I_{1375}/I_{1127} — вклад колебаний боковых $-\text{CH}_3$ -групп полуколец пиррола в гемопорфирине, выраженных при изменении конформации глобина в непосредственной близости от гема; соотношение характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец (изменение величины характеризует переход конформации Гб из Т-формы (дГб) в R-форму (оксигемоглобин, оГб). Как правило, чем выше данное отношение, тем выше вероятность нахождения гема в R-форме;

2. I_{1375}/I_{1172} — вклад ассиметричных и симметричных колебаний пиррольных колец в гемопорфирине; величина отношения зависит от воздействия на гем белкового окружения глобина, а также от изменений пирролов в геме;

3. $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ — вклад связей симметричных колебаний пиррольных колец (связи CaC_b , CaN и CaNCa) в молекулах дГб (1355 и 1580 см^{-1}) и Гб, связанного с лигандами (1375 см^{-1} и 1550 см^{-1}). Данное соотношение характеризует способность Гб выделять лиганды;

4. I_{1640}/I_{1375} — характеризует выраженность колебаний метиновых мостиков по отношению к симметричным колебаниям пиррольных колец гема;

5. I_{1580}/I_{1550} — вклад колебаний метиновых мостиков между пирролами в гемопорфирине, выраженных при деформации макроцикла (характеризует сродство Гб к лигандам, в частности к O_2);

6. I_{1618}/I_{1580} — вклад валентных колебаний (C_1C_2) винильных групп к CaSmH , колебаниям метиновых мостиков, характеризующие относительное число комплексов гемоглобина с NO (комплекс Гб- $\text{NO}(\text{I})$);

7. I_{2850}/I_{2880} — вклад симметричных колебаний метиленовых групп $-\text{CH}$ аминокислот глобина;

8. I_{2930}/I_{2850} — вклад колебаний симметричных концевых метиленовых групп аминокислот глобина;

9. I_{2880}/I_{2930} — вклад колебаний Н-метиновых групп аминокислот глобина.

В качестве маркера, свидетельствующего о полном вытеснении кислорода из пробы (увеличение доли дГб), использовали эффект отсутствия в КР-спектре полосы 1375 см^{-1} и появление полосы 1355 см^{-1} . Степень оксигенации эритроцитов ($s\text{O}_2$) рассчитывали из спектров КР по формуле: $s\text{O}_2 = 203x - 38$, где x — величина соотношения $I_{1585}/(I_{1585} + I_{1552})$ [23, 24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что при изменении $p\text{O}_2$ в спектрах КР Гб в эритроците и в растворе наблюдаются изменения ряда характерных полос как в области $1000\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$ (валентные колебания гема), так и в высокочастотной области спектра $2800\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$ (валентные колебания аминокислот глобина (рис. 1). При увеличении $p\text{O}_2$ (в диапазоне от 5.0 до 159.6 мм рт. ст.) в гемопорфирине Гб (как в клетке, так и в растворе) меняется амплитуда полос 1355 см^{-1} , 1375 см^{-1} , 1552 см^{-1} и 1640 см^{-1} КР спектра, а также выявлено смещение полосы 1620 см^{-1} КР-спектра к 1585 см^{-1} . Этот результат свидетельствует об изменениях конформации гема Гб при связывании O_2 (рис. 1а) [21, 22, 25]. В аналогичных условиях эксперимента выявлены изменения интенсивности полос в высокочастотной области КР-спектра $2800\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$ (2850 см^{-1} , 2880 см^{-1} и 2930 см^{-1}), свидетельствующие об изменениях конформации глобина Гб и сопровождающие связывание O_2 (рис. 1б). Установлено, что зависимость степени оксигенации Гб ($s\text{O}_2$), рассчитанной из параметров спектра КР (см. раздел «Материалы и методы»), характеризуется S-образной кривой только для гемоглобина в эритроците (рис. 1в).

Как отмечалось выше, соотношения интенсивности полос КР-спектра характеризуют вклад различных связей молекулы в изменение конформации Гб [13, 17, 19]. Из сравнения зависимости сатурации Гб O_2 от $p\text{O}_2$ в крови (рис. 2, точечная кривая [14]), с изменениями соотношения интенсивностей полос КР-спектра, характеризующими конформацию гема ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$), вклад боковых CH_3 -групп колебаний полуколец пиррола гема (I_{1375}/I_{1127}) и связей полуколец пиррола в геме (I_{1375}/I_{1172}), а также вклад валентных колебаний винильных групп гемопорфирина (I_{1550}/I_{1580}) следует, что конформация гема различна в области 0–15 мм рт. ст. («лаг-период»), в области 15–60 мм рт. ст. («линейная зависимость») и в области 70–120 мм рт. ст. («насыщение») (рис. 2а–г).

В области «линейной зависимости» конформация гема ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$) в эритроцитах и растворе Гб различны (рис. 2а): связывание O_2 гемом Гб в растворе происходит медленнее, чем связывание O_2 Гб в эритроците. Установлено, что в аналогичных условиях (в области 25–120 мм рт.ст.) вклад в изменение конформации гема Гб боковых $-\text{CH}_3$ -групп колебаний полуколец пиррола гема (рис. 2б) и групповых колебаний связей

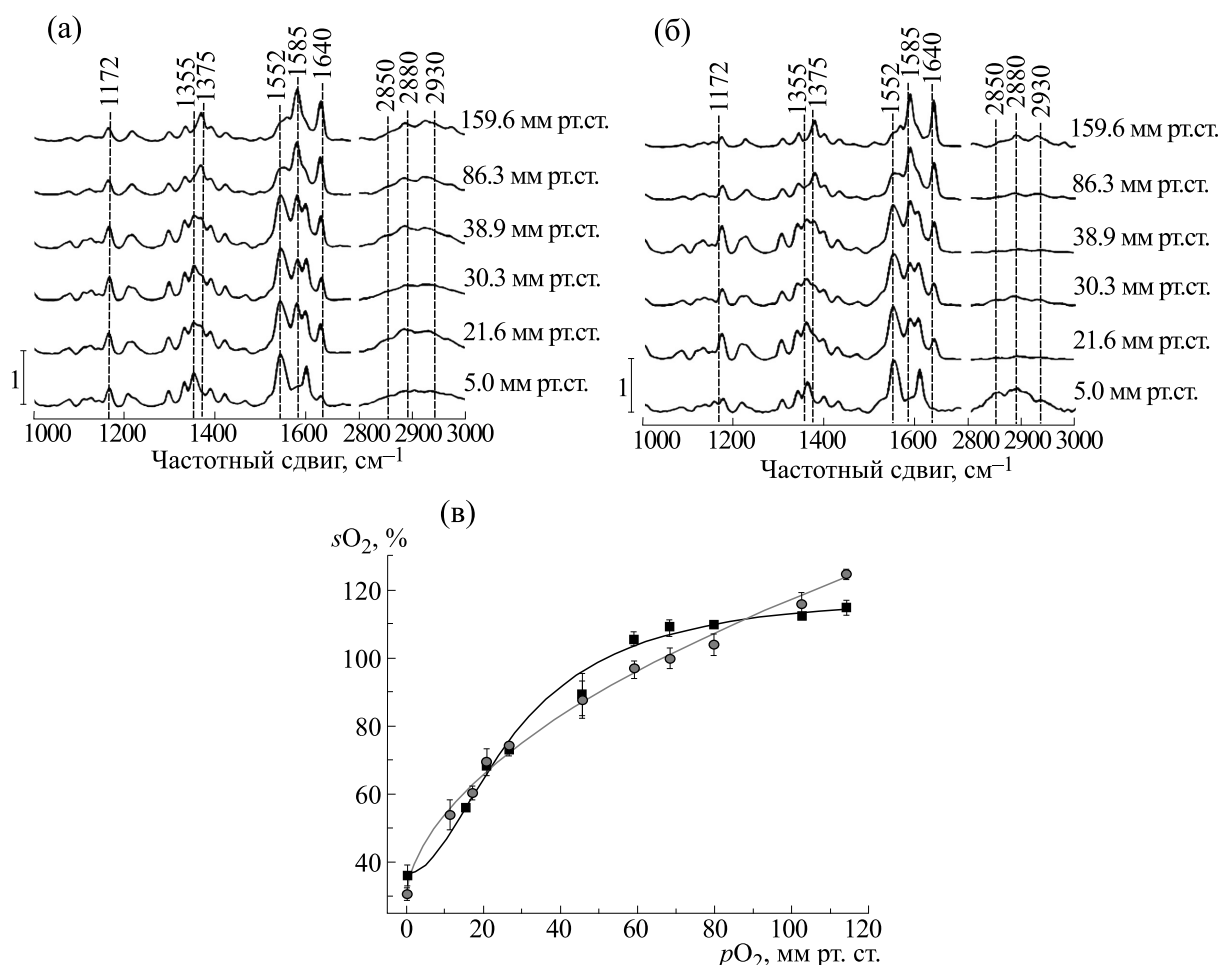


Рис. 1. Зависимости величины интенсивности КР эритроцитов (а) и раствора гемоглобина (б) от величины парциального давления кислорода (величина давления указана на рисунке в подписях к спектрам). Пики 1585 и 1640 cm^{-1} характеризуют колебания метиновых мостиков, пики 1335 и 1375 cm^{-1} — симметричные колебания пиррольных колец; пик 1127 cm^{-1} характеризует колебание метильных радикалов, пик 1172 cm^{-1} характеризует асимметричные колебания пиррольных колец. Спектры нормированы на величину максимума полос 1500–1600 cm^{-1} . (в) — Зависимость sO_2 от величины парциального давления кислорода: квадраты — суспензия эритроцитов, кружки — гемоглобин.

полуколец пиррола в геме более выражен для Гб в эритроците, чем для Гб в растворе (рис. 2в). При увеличении pO_2 до 60 мм рт. ст. вклад валентных колебаний винильных групп (I_{1550}/I_{1580}) в изменение конформации гема более выражен для Гб в клетке (рис. 2г).

В спектре КР гема выявлены полосы, изменение соотношения которых свидетельствует о различном сродстве к лигандам (в данном случае к O_2 (I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})) и сродству к NO (I_{1618}/I_{1580}). Установлено, что при увеличении pO_2 сродство Гб к лигандам и к NO меняется различно (рис. 3а,б). Так, конформация гема, характеризующая сродство к лигандам, снижается и меняется аналогично как для гема Гб в эритроците, так и для Гб в растворе (рис. 3а). Отметим, что

при увеличении pO_2 конформация гема, характеризующая сродство Гб к NO, меняется различно: уменьшается вклад колебаний (C_1C_2) винильных групп по сравнению с $CaSmH$ колебаниями метиновых мостиков (I_{1618}/I_{1580}) у Гб в клетке, и этот параметр увеличивается у Гб в растворе (рис. 3б). Этот результат свидетельствует о том, что различия в конформации гема при изменении pO_2 меняют его способность образовывать и комплексы с NO [26, 27].

В следующей серии экспериментов исследовали изменения конформации глобина (валентные колебания аминокислот глобина) при увеличении pO_2 . Регистрация КР в высокочастотной области спектра (2800–3000 cm^{-1}) свидетельствует о том, что вклад симметричных колебаний СН-ме-

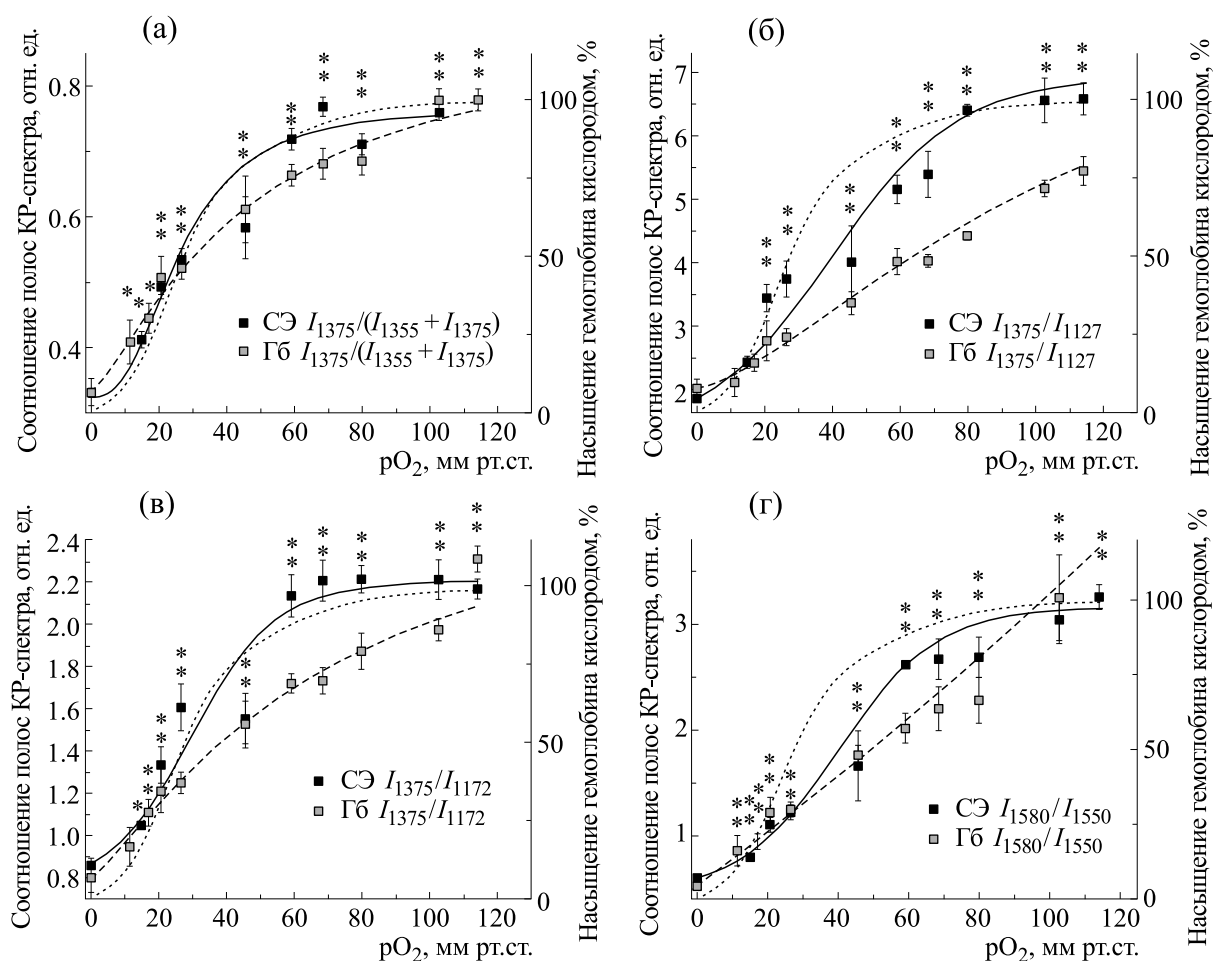


Рис. 2. Изменения величин соотношений интенсивностей полос КР-спектра в зависимости от pO_2 для суспензии эритроцитов (черные квадраты) и раствора Гб (Гб, серые квадраты): (а) — относительное число комплексов оГб, (б) — вклад боковых $-CH_3$ -групп колебаний полукольца пиррола гема, (в) — групповые колебания связей полукольца пиррола в геме, (г) — вклад валентных колебаний винильных групп гема. Точечные кривые — зависимости сатурации O_2 от pO_2 в крови [14]; * — статистически значимое различие от полностью дезоксигенированной формы Гб. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего.

тиленовых групп аминокислот (I_{2850}/I_{2880}) у Гб в эритроците не меняется и обратимо снижается у Гб в растворе, свидетельствуя, вероятно, об обратимых изменениях плотности упаковки аминокислот (рис. 3в). В аналогичных условиях вклад колебаний Н-метиновых групп аминокислот (I_{2880}/I_{2930}) Гб в растворе снижается, а в Гб эритроцитов выявлен максимум при 40–50 мм рт. ст. (рис. 3г). При увеличении pO_2 вклад симметричных концевых метиленовых групп аминокислот (I_{2930}/I_{2850}) глобина Гб в растворе не меняется, но возрастает у Гб в эритроците (рис. 3д). Возможно, в этих условиях (область «линейной зависимости») у глобина эритроцита происходит конформационный переход как за счет изменения упорядоченности, так и полярного окружения аминокислот белка (рис. 3г,д).

Итак, при изменении pO_2 конформация гема и глобина меняется различно при локализации Гб в растворе и в клетке. Известно, что у дГб двухвалентный атом железа находится в высокоспиновом, пятикоординированном состоянии и смещен от плоскости порфиринового макроцикла («куполообразная» форма). При связывании O_2 атом железа остается двухвалентным, но переходит в низкоспиновое, шестикоординированное состояние, при этом длина связи Fe–N уменьшается от 2.06 до 1.98 Å, а порфириновый макроцикл характеризуется «плоской» формой [28]. У оГб проксимальные гистидины смещены на 0.5–0.6 Å ближе к плоскостям макроцикла, чем в дГб. При потере связанного с атомом железа H_2O и восстановлении атома железа Гб до трехвалентного железа в R-форме Гб атом железа смещается от плоскости порфиринового макроцикла на

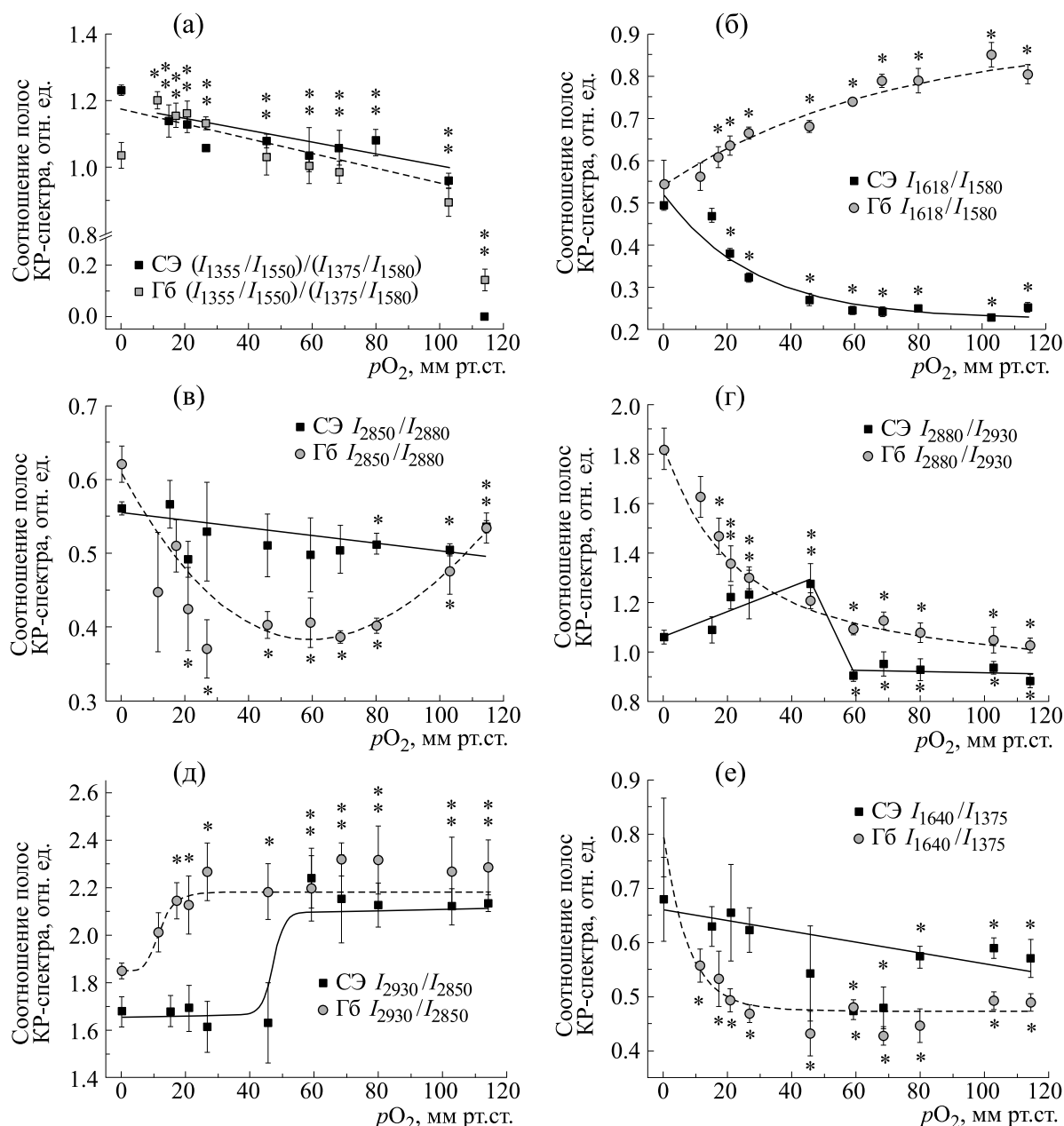


Рис. 3. (а) — Сродство Гб к лигандам (в первую очередь, к O_2); (б) — относительное число комплексов гемоглобина с $NO(I)$; (в) — отношение симметричных колебаний $-CH$ метиленовых групп аминокислот к несимметричным колебаниям; (г) — вклад колебаний N метиновых групп аминокислот, определяется конформационной подвижностью; (д) — отношение вклада колебаний симметричных концевых метиленовых групп к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот; (е) — колебания метиновых мостиков гема, соотношение интенсивности полос спектра КР I_{1640}/I_{1375} обратно пропорционально степени скручивания гема. * — Статистически значимое различие от полностью дезоксигенированной формы Гб. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего.

0.2 Å, и порфирины приобретают «куполообразную» форму. Нами установлено, что при связывании O_2 (область «линейной зависимости») конформация гема ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$) в эритроцитах и растворе Гб различны: связывание O_2 гемом Гб в растворе происходит менее выражено, чем связывание O_2 Гб в эритроците (рис. 2а). Установлено, что

вклад боковых $-CH_3$ -групп колебаний полуколец пиррола гема (рис. 2б) и групповые колебания связей полуколец пиррола в геме (рис. 2в) в изменении конформации гема Гб более выражены для Гб в эритроците, чем Гб в растворе.

Известно, что в цитохроме с гемы могут находиться в разных конформациях: «плоской, скру-

ченной, куполообразной, седловидной» и т.д. В цитохроме *c* «скрученная» конформация гема снижает эффективность переноса электронов [29]. Вероятно, гем находится в «скрученной» конформации, когда пиррольные кольца повернуты в разные стороны относительно оси Fe–N. Известно, что полоса 1640 см^{-1} спектра КР гема характеризует колебания метиновых мостиков гема: в «плоской» конформации вероятность колебаний метиновых мостиков велика, тогда как в «скрученной» конформации эти колебания затруднены; чем более выражен пик 1640 см^{-1} , тем в более «плоской» конформации находится гем [30]. В связи с этим соотношения интенсивности полос спектра КР I_{1640}/I_{1375} и I_{1172}/I_{1375} гема цитохрома *c* должны быть обратно пропорциональны степени «скручивания» гема и чем больше величина этих соотношений, тем в более «плоской» конформации находится гем. В наших экспериментах установлено, что при увеличении pO_2 переход от «плоской» конформации гема к «скрученной» конформации более выражен для Гб в растворе, чем для Гб в клетке (рис. 3е).

Отметим, что обнаруженные изменения конформации гема сопровождаются различиями в конформации глобина Гб как в клетке, так и в растворе. Известно, что при переходе из дГб в оГб конформационные изменения передаются глобину как за счет проксимальных гистидинов белка, так и прилегающих к ним аминокислотных остатков молекулы белка (G1-4, H18-21 и HCl-3) [31]. При связывании O_2 с атомом железа порфириновый макроцикл гема принимает плоскую форму и поворачивается по часовой стрелке на 10° , что меняет конформацию глобина за счет расположения ряда аминокислот (например, Leu FG3 и Val FG5). В Т-форме аминокислоты (например, Val) блокируют сайт связывания O_2 с атомом железа, а в R-форме это препятствие устраняется за счет сдвига спиралей D и E и сегмента CD. В Т-форме N- и C-концы глобина образуют водородные связи, а в R-форме эти водородные связи разорваны, концевые остатки более подвижны и их pK_{as} падает при увеличении pO_2 [28]. Нами установлено, что в клетке при увеличении pO_2 изменения конформации глобина Гб обусловлены увеличением вклада колебаний Н-метиновых групп аминокислот (рис. 3г) и симметричных концевых метиленовых групп (рис. 3д). В растворе при увеличении pO_2 изменения конформации глобина Гб обусловлены обратимым снижением вклада симметричных колебаний СН-метиленовых групп аминокислот (рис. 3в) и колебаниями Н-метиновых групп аминокислот Гб (рис. 3г).

По-видимому, конформация гема Гб, локализованного в цитоплазме (в отличие от Гб в раство-

ре), другая, что и способствует более эффективному перераспределению O_2 в «высококонцентрированном гемоглобиновом окружении» в цитоплазме [33–35]. Вероятно, изменение конформации гема является важным фактором эффективного переноса O_2 как между молекулами оГб и дГб при связывании Гб с БПЗ в плазматической мембране, так и при формировании олигомерных структур («кластеров») Гб в цитоплазме клетки, способствующих изменению конформации гема дГб и «эстафетной» передаче O_2 от оГб.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90073, для С.О.В.) и Российского научного фонда (грант № 19-79-30062, для М.Г.В.), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с этическим кодексом Всемирной медицинской ассоциации для экспериментов с участием человека и одобрено этическим комитетом биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Hilpert, R. G. Fleischmann, D. Kempe, et al., *Am. J. Physiol.* **205** (2), 337 (1963).
2. M. Berenbrink, *Respiratory Physiol. Neurobiol.* **154** (1–2), 165 (2006).
3. B. F. Verigo, *Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere* **51**, 321 (1892).
4. Ch. Bohr, K. Hasselbalch, and A. Krog, *Skand. Arch. Physiol.* **16**, 401 (1904).
5. M. F. Perutz, *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 327 (1979).
6. F. B. Jensen, *Acta Physiol. Scand.* **182** (3), 215 (2004).
7. M. I. Nikinmaa, *Physiol. Rev.* **72** (2), 301 (1992).
8. B. Berenbrink, M. Berenbrink, and Ch. Bridges, *J. Exp. Biol.* **192** (1), 253 (1994).
9. M. Berenbrink, P. Koldkjær, O. Kepp, et al., *Science* **307** (5716), 1752 (2005).
10. R. Motais, F. Garcia-Romeu, and F. Borgese, *J. Gen. Physiol.* **90** (2), 197 (1987).

11. P. Giardina, V. Aurilia, R. Cannio, et al., *Eur. J. Biochem.* **235** (3), 508 (1996).
12. N. Barvitenko, N. Adragna, and R. Weber, *Cell. Physiol. Biochem.* **15** (1–4), 1 (2005).
13. O. V. Slatinskaya, O. G. Luneva, and L. I. Deev, *Biophysics* **65** (2), 213 (2020).
14. J. T. Edsall, *J. Hist. Biol.* **5** (2), 205 (1972).
15. B. Wranne, R. D. Woodson, and J. C. Detter, *J. Appl. Physiol.* **32** (6), 749 (1972).
16. J. B. West, *Am. J. Physiol. — Lung Cell. Mol. Physiol.* **316** (4), 585, (2019).
17. C. Bohr and K. Hasselbalch, *Skand. Arch. Physiol.* **16**, 402 (1904).
18. S. V. Sidorenko, R. H. Ziganshin, O. G. Luneva, et al., *J. Proteomics* **184**, 25 (2018).
19. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., *Biophys. J.* **97** (12), 3206 (2009).
20. S. C. Goheen, L. J. Lis, O. Kucuk, et al., *J. Raman Spectroscopy* **24** (9), 275 (1993).
21. I. P. Torres Filho, J. Terner, R. N. Pittman, et al., *J. Appl. Physiol.* **104** (6), 1809 (2008).
22. B. R. Wood, L. Hammer, and D. McNaughton, *Vibrational Spectroscopy* **38** (1–2), 78 (2005).
23. O. G. Luneva, S. V. Sidorenko, O. O. Ponomarchuk, et al., *Cell. Physiol. Biochem.* **39** (1), 81 (2016).
24. B. R. Wood, P. Caspers, G. J. Puppels, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (5), 1691 (2007).
25. I. P. Torres Filho, J. Terner, R. N. Pittman, et al., *Am. J. Physiol. — Heart Circ. Physiol.* **289**, 488 (2005).
26. G. Chottard and D. Mansuy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77** (4), 1333 (1977).
27. A. Szabo and L. D. Barron, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (3), 660 (1975).
28. G. Louie, T. Tran, J. I. Englander, and S. W. Englander, *Mol. Biol.* **201**, 755 (1988).
29. Y. Sun, A. Benabbas, W. Zeng, et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111** (18), 6570 (2014).
30. R. V. Chertkova, N. A. Brazhe, T. V. Bryantseva, et al., *PLoS One* **12** (5), e0178280 (2017).
31. R. Liddington, Z. Derewenda, G. Dodson, and D. Harris *Nature* **331**, 725 (1988).
32. A. Klug, F. Kreuzer, and F. J. W. Roughton, *Physiol. Acta* **14**, 121 (1956).
33. R. Zander and H. Schmid-Schoenbien, *Respir. Physiol.* **19**, 279 (1973).
34. K. D. Vandegriff and J. S. Olson, *J. Biol. Chem.* **259**, 12609 (1984).
35. S. T. Bouwer, L. Hoofd, and F. Kreuzer, *Biochim. Biophys. Acta* **1338**, 127 (1997).

Investigation of Hemoglobin Conformation within Erythrocytes under Different Levels of the Partial Pressure of Oxygen

O.V. Slatinskaya*, O.G. Luneva*, L.I. Deev*, P.I. Zaripov*, and G.V. Maksimov*, **

*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119892 Russia

**National University of Science and Technology "MISiS", Leninskiy prosp. 4, Moscow, 119049 Russia

Through the use of Raman spectroscopy, changes in the conformation of heme and globin in hemoglobin in response to a change in the partial pressure of oxygen (pO_2) have been investigated in the incubation medium for erythrocytes and hemoglobin. Raman spectra of hemoglobin within erythrocytes in a solution showed that a number of characteristic bands in the range of 1000 to 1700 cm^{-1} (stretching vibrations from the heme group) and in the high frequency range of 2800 to 3000 cm^{-1} (stretching vibrations from globin amino acids) also change under different pO_2 levels. It was found that the hemoglobin-oxygen saturation (sO_2) curve obtained from Raman scattering data displays sigmoidal behavior only for hemoglobin within erythrocytes. It was shown that differences in the conformation of heme under different pO_2 levels affect the ability of hemoglobin to form complexes with NO. As pO_2 level increases, the conformational changes of hemoglobin heme in the cell are accompanied by increased contribution of lateral- CH_3 -group vibrations of semirings of pyrrole and group vibrations of bonds of semirings of pyrrole, while the conformation of hemoglobin globin is associated with increased contribution of vibrations from H-methine groups and symmetric terminal methylene groups of amino acids.

Keywords: Raman spectroscopy, hemoglobin, erythrocyte, partial pressure of oxygen

НЕПРОНИКАЮЩИЕ В КЛЕТКИ ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ СУРВИВИНА И HSP70/HSP90-ОРГАНИЗУЮЩЕГО БЕЛКА ИНГИБИРУЮТ HSP90-ЗАВИСИМУЮ МИГРАЦИЮ И ИНВАЗИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. В.С. Петренко, А.В. Снигирева, В.В. Врублевская, М.А. Жмурина, Ю.Ю. Скарга, О.С. Моренков

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

E-mail: morenkov_o@mail.ru

Поступила в редакцию 12.07.2021 г.

После доработки 19.07.2021 г.

Принята к публикации 21.07.2021 г.

Мембрано-ассоциированные и секретированные экстраклеточные белки теплового шока 90 (Hsp90) играют важную роль в миграции, инвазии и метастазировании опухолевых клеток и считаются перспективной терапевтической мишенью для создания противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. Ранее были идентифицированы пептидные фрагменты сурвивина (KHSSGCAFL) и Hsp70/Hsp90-организующего белка (KAYARIGNSYFK), которые обеспечивают связывание этих белков с внутриклеточным Hsp90. Мы исследовали влияние этих Hsp90-связывающих пептидов на миграцию и инвазию клеток фибросаркомы человека HT1080 и глиобластомы человека A-172. Непроницающие в клетки Hsp90-связывающие пептидные фрагменты сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка не проявляли цитотоксичности и антипролиферативной активности, в то время как проникающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды, дополнительно содержащие последовательность гомеодомена Antennapedia, были токсичны для клеток HT1080 и A-172. Непроницающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды незначительно снижали базальную (нестимулированную) миграцию и инвазию клеток, однако выражено ингибировали миграцию/инвазию клеток, стимулированную экстраклеточным Hsp90. Полученные результаты свидетельствуют, что непроницающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды способны ингибировать активность экстраклеточного Hsp90, что приводит к подавлению миграции и инвазии клеток. Такие пептиды обладают потенциалом для создания на их основе противоопухолевых препаратов антиметастатического действия.

Ключевые слова: экстраклеточный Hsp90, сурвивин, Hsp70/Hsp90-организующий белок, пептиды, миграция и инвазия клеток *in vitro*, метастазирование.

DOI: 10.31857/S0006302921050124

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является молекулярным шапероном, выполняющим важные внутриклеточные функции, связанные с контролем фолдинга, стабильности, активации и деградации белков-клиентов Hsp90 [1]. На сегодняшний день идентифицировано около 700 белков-клиентов Hsp90, многие из которых являются онкогенами [2, 3]. Ингибирование внутриклеточного Hsp90 в опухолевых клетках вызывает деграда-

цию его белков-клиентов, нарушение различных сигнальных путей и, как следствие, подавление роста раковых клеток и их гибель [2, 3]. В этой связи проникающие в клетки ингибиторы Hsp90 считаются перспективными препаратами для лечения рака и некоторые из них в настоящее время проходят клинические испытания [4].

Помимо внутриклеточной локализации Hsp90 также обнаруживается на поверхности нормальных и опухолевых клеток и секретруется опухолевыми клетками [5–10]. В опухолевых клетках секреция Hsp90 и его уровень на плазматической клеточной мембране повышены, что коррелирует со способностью клеток к диссеминации из первичной опухоли [5]. Установлено, что экстракле-

Сокращения: Hsp90 – белок теплового шока 90, eHsp90 – экстраклеточный белок теплового шока 90, Shp – пептидный фрагмент 79–87 аа сурвивина, TPR – пептидный фрагмент 301–312 аа Hsp70/Hsp90-организующего белка, Ant – пептид гомеодомена Antennapedia, ДМЕМ – среда Игла в модификации Дальбекко, ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка.

точный Hsp90 (eHsp90) стимулирует миграцию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток [5–12]. Он связывается с рецепторами клеточной поверхности (LRP1, HER2), что приводит к активации сигнальных путей, участвующих в миграции и инвазии клеток [7, 11, 12]. Кроме этого, eHsp90 способен функционировать как шаперон, связываясь с экстраклеточными мембрано-ассоциированными рецепторами, растворенными белками клеточного микроокружения (например, матриксными металлопротеиназами) и белками внеклеточного матрикса, тем самым регулируя их активность [6, 13, 14]. eHsp90 регулирует экспрессию белков, связанных с процессами миграции и инвазии клеток, например, матриксных металлопротеиназ и интегринов [15, 16], а также стимулирует образование миофибробластов (или миофибробласто-подобных опухолеассоциированных фибробластов), участвующих в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса и инвазии [16, 17].

Было показано, что непроницаемые для клеток ингибиторы Hsp90 – низкомолекулярные соединения, такие как DMAG-N-оксид (производное гелданамицина – ингибитора Hsp90) и STA-12-7191 (производное ганетеспиба – ингибитора Hsp90), иммобилизованный на гранулах агарозы гелданамицин, а также Hsp90-специфические антитела – связываются с экстраклеточным Hsp90 и замедляют миграцию клеток, инвазию и диссеминацию опухоли в организме животных [6–10, 13]. Гепарин, ингибирующий взаимодействие eHsp90 с гепарансульфат протеогликанами, расположенными на плазматической мембране, также снижает миграцию и инвазию опухолевых клеток [18, 19]. Поскольку миграция и инвазия опухолевых клеток являются ключевыми процессами метастазирования, подавление подвижности опухолевых клеток представляется перспективным подходом в борьбе с метастазированием. В этом контексте eHsp90 рассматривается как новая привлекательная химиотерапевтическая мишень для препаратов антиметастатического действия, подавляющих миграцию и инвазию раковых клеток.

Функционирование внутриклеточного Hsp90 осуществляется посредством взаимодействия с белками-клиентами, различными шаперонами и ко-шаперонами [1–3]. К настоящему времени идентифицированы пептидные фрагменты отдельных белков-клиентов Hsp90, шаперонов и ко-шаперонов, обеспечивающие взаимодействие этих белков с внутриклеточным Hsp90. Присоединение к таким пептидным фрагментам последовательностей CPP (cell-penetrating peptides), таких как ТАТ-пептид (фрагмент ТАТ HIV-1) или пенетратин (фрагмент гомеодомена *Antennapedia*), обеспечивает проникновение Hsp90-связывающих пептидов в клетки, что приводит к инги-

бированию взаимодействия Hsp90 с ко-шаперонами и/или белками-клиентами, последующей дестабилизации и деградации белков-клиентов Hsp90. Как следствие, такие проникающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды подавляют рост опухолевых клеток и индуцируют клеточную гибель. Например, в последовательности белка сурвивина, который активно экспрессируется во многих типах раковых клеток и участвует в регуляции митоза и подавлении запрограммированной гибели клеток [20], идентифицирован пептидный фрагмент KHSSGCAFL, названный Shepherdin [21]. Проницаемый для клеток вариант этого пептида связывается с внутриклеточным Hsp90 с высокой аффинностью и ингибирует его функционирование, что приводит к дестабилизации ряда внутриклеточных белков-клиентов Hsp90 и гибели клеток [21, 22].

Другим примером пептидомиметиков, подавляющих функционирование внутриклеточного Hsp90, является пептидный фрагмент KAYARIGNSYFK Hsp70/Hsp90-организующего белка, адаптерного белка, который обеспечивает сайты специфического связывания для Hsp90 и Hsp70, что критически необходимо для сборки шаперонной машины Hsp70/Hsp90 [23–25]. Hsp70/Hsp90-организующий белок содержит специфические TPR домены, состоящие из повторяющихся аминокислотных последовательностей; из них домен TPR2A распознает пять остатков на С-конце Hsp90 [23]. Проницаемый для клеток пептидный фрагмент домена TPR2A Hsp70/Hsp90-организующего белка препятствует ассоциации между Hsp90 и Hsp70/Hsp90-организующим белком, что приводит к гибели раковых клеток *in vitro* и в опухолях мышей [24, 25]. Мы предположили, что непроницаемые для клеток Hsp90-связывающие пептиды могут подавлять Hsp90-зависимую миграцию и инвазию клеток за счет связывания с мембрано-ассоциированным eHsp90 и/или свободным eHsp90 из межклеточного пространства и ингибирования их экстраклеточных функций. При этом ингибирование eHsp90 не будет сопровождаться подавлением функционирования внутриклеточного Hsp90. В данной работе мы продемонстрировали, что непроницаемые для клеток Hsp90-связывающие пептидные фрагменты сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка ингибируют миграцию и инвазию клеток фибросаркомы HT1080 и глиобластомы A-172 человека, зависимую от экстраклеточного Hsp90.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и реактивы. Общелабораторная пластиковая посуда и пластиковая посуда для культивирования клеток были производства компаний Greiner (Австрия) и Corning Life Sciences (США). Вставки в 24-луночные планшеты с по-

лиэтилентерефталатной мембраной (размер пор 8 мкм) были производства компании Greiner (Австрия). В работе использовали среду Игла в модификации Дальбекко (среду ДМЕМ) и эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС) производства HyClone (США). Растворы версена и трипсина были производства ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург, Россия). Остальные химические реактивы приобретали в компании Sigma-Aldrich (США).

Клеточные линии. В работе использовали клеточные линии фибросаркомы (HT1080) и глиобластомы (A-172) человека из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде ДМЕМ, содержащей 10% ЭБС и антибиотики (по 40 Ед. пенициллина, стрептомицина и гентамицина) (ДМЕМ-10% ЭБС).

Синтез пептидов и очистка белков. Пептиды синтезировали методом твердофазной химии, очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (чистота > 98%) и анализировали с помощью масс-спектрометрии. В работе использовали следующие пептиды: пептид, соответствующий последовательности сурвивина между Lys-79 и Leu-87 (KHSSGCAFL, Shepherdin (Shp)), и его скремблированный вариант (SKLACFSHG, scr-Shp); пептид, соответствующий последовательности TPR2A Hsp70/Hsp90-организующего белка между Lys-301 и Lys-312 (KAYARIGNSYFK, TPR) и его скремблированный вариант (SYKARNGAFIYK, scr-TPR). Для получения проницаемых для клеток пептидов к ним на N-конце добавляли фрагмент последовательности гомеодомена *Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK) и получали проникающие в клетки пептиды: RQIKIWFQNRRMKWKKKHSSGCAFL (Ant-Shp), RQIKIWFQNRRMKWKKSKLACFSHG (Ant-scr-Shp), RQIKIWFQNRRMKWKKKAYARIGNSYFK (Ant-TPR) и RQIKIWFQNRRMKWKKSYKARNGAFIYK (Ant-scr-TPR).

Очистка Hsp90 из мозга коров. Очистку нативного Hsp90 из мозга коров проводили, как описано ранее [26]. Мозг коров получали с местной бойни. Чистота очищенного нативного Hsp90 составляла 95–98%. В очищенном Hsp90 содержались две изоформы Hsp90 — Hsp90a и Hsp90b, в соотношении 9:1. Для экспериментов с культурами клеток очищенный нативный Hsp90 диализовали против среды ДМЕМ. Очищенный Hsp90 не проявлял цитотоксичности и антипролиферативной активности для клеток A-172 и HT1080 при концентрациях до 1.0 мг/мл.

Определение цитотоксичности и антипролиферативной активности пептидов. Синтетические пептиды растворяли в диметилсульфоксиде. Препараты пептидов разводили до необходимых концентраций в среде культивирования. Определе-

ние цитотоксичности и антипролиферативной активности проводили на клетках A-172 и HT1080 с использованием МТТ метода, как описано ранее [27]. IC_{50} рассчитывали как концентрацию пептида, вызывающую гибель 50% клеток за 72 ч.

Определение миграции и инвазии клеток *in vitro*. Эксперименты проводили с использованием вкладышей в 24-луночные планшеты с полиэтилентерефталатной мембраной (размер пор 8 мкм); для оценки инвазии клеток вкладыши с полиэтилентерефталатной мембраной обрабатывали коллагеном VI (Trevigen, США). Для анализа базальной (нестимулированной) миграции/инвазии клетки помещали во вкладыши в среде ДМЕМ с бычьим сывороточным альбумином в присутствии пептидов в разных концентрациях. В качестве хемоаттрактанта в нижнем резервуаре использовали ДМЕМ-5% ЭБС. Миграцию и инвазию клеток оценивали через 6 и 24 ч соответственно. Прошедшие через полиэтилентерефталатную мембрану клетки фиксировали метиловым спиртом, окрашивали красителем кристаллическим фиолетовым, лизировали и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм (OP_{595}) с использованием планшетного ридера iMark (Bio-Rad, США). Базальную миграцию/инвазию оценивали по OP_{595} клеток, мигрировавших через мембрану, за вычетом OP_{595} клеток, прошедших через мембрану в отсутствие хемотаксического градиента (спонтанная миграция/инвазия). Величину миграции контрольных клеток без пептидов принимали за 100%.

Оценку Hsp90-стимулированной миграции/инвазии проводили как описано выше, за исключением того, что в среду с клетками добавляли очищенный Hsp90 (50 мкг/мл) для стимуляции миграции. OP_{595} клеток, прошедших через мембрану, определяли, как описано выше. Для расчета Hsp90-индуцированной стимуляции миграции/инвазии OP_{595} спонтанно-мигрировавших клеток вычитали из значений OP_{595} клеток, прошедших через мембрану по хемотаксическому градиенту. После этого OP_{595} нестимулированных клеток вычитали из OP_{595} Hsp90-стимулированных клеток и разницу выражали в процентах относительно OP_{595} нестимулированных клеток. Hsp90-зависимую стимуляцию миграции/инвазии контрольных клеток без пептидов принимали за 100%.

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

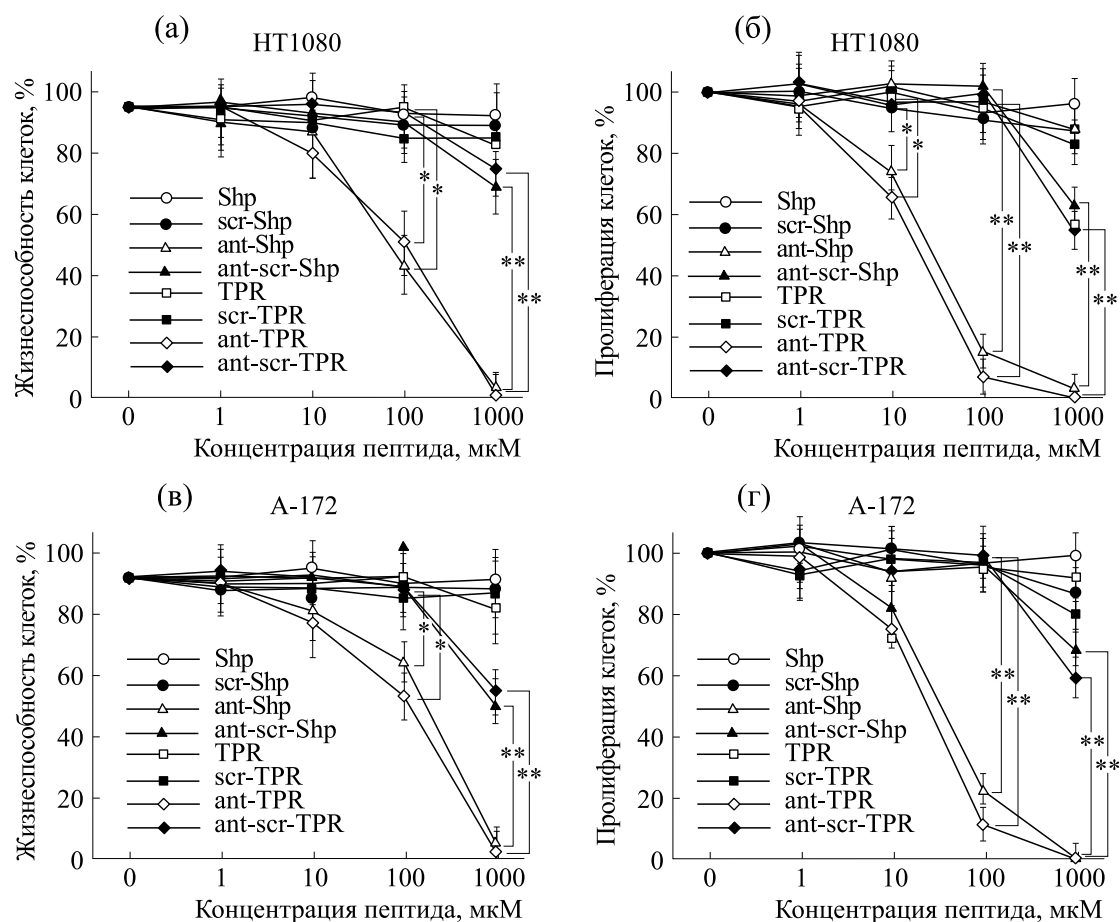


Рис. 1. Цитотоксическая (а, в) и антипролиферативная (б, г) активность Hsp90-связывающих пептидов. Клетки HT1080 и A-172 в состоянии полного монослоя (анализ цитотоксичности) или пролиферирующие клетки HT1080 и A-172 (антипролиферативный анализ) инкубировали в течение 72 ч в присутствии различных пептидов, разведенных в разных концентрациях в среде ДМЕМ-ЭБС. Относительное количество живых клеток определяли с использованием МТТ-метода, оптическую плотность при 550 нм (OP_{550}) выражали в процентах. OP_{550} в контрольных лунках без пептидов принимали за 100%. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ SD ($n = 4-5$). Звездочки указывают статистически достоверное отличие от контрольных клеток: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проницаемые для клеток пептиды Ant-Shp и Ant-TPR дозозависимым образом ингибировали рост клеток HT1080 и A-172 и оказывали цитотоксическое действие на клетки. Ant-Shp проявлял цитотоксическую (рис. 1а,в) и антипролиферативную (рис. 1б,г) активности против обеих клеточных линий с IC_{50} 80–130 мкМ и 30–50 мкМ соответственно. Ant-TPR также обнаруживал цитотоксическую (рис. 1а,в) и антипролиферативную (рис. 1б,г) активности против обеих клеточных линий с IC_{50} 90–110 мкМ и 40–70 мкМ соответственно. Проницаемые для клеток скремблированные пептиды Ant-scr-Shp и Ant-scr-TPR практически не влияли на жизнеспособность и пролиферацию клеток, что указывает на специфичность цитотоксического и антипролиферативного действия проникающих в клетки Hsp90-связывающих пептидных фрагментов Ant-

Shp и Ant-TPR. Непроницаемые для клеток пептиды Shp и TPR и их скремблированные варианты (scr-Shp и scr-TPR) были не токсичны для клеток и не снижали пролиферацию клеток при концентрациях до 1000 мкМ (рис. 1). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о цитотоксичности проникающих в клетки пептидных фрагментов сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка в отношении различных линий раковых клеток и об отсутствии цитотоксической активности непроницающих в клетки вариантов этих пептидов [21, 22, 24, 25].

Мы предположили, что непроницаемые для клеток пептиды Shp и TPR могут связываться с Hsp90, ассоциированным с клеточной поверхностью, и с Hsp90 в культуральной среде, что может привести к снижению миграции и/или инвазии клеток *in vitro*, поскольку оба пула экстраклеточного Hsp90 участвуют в клеточной подвижности [6–

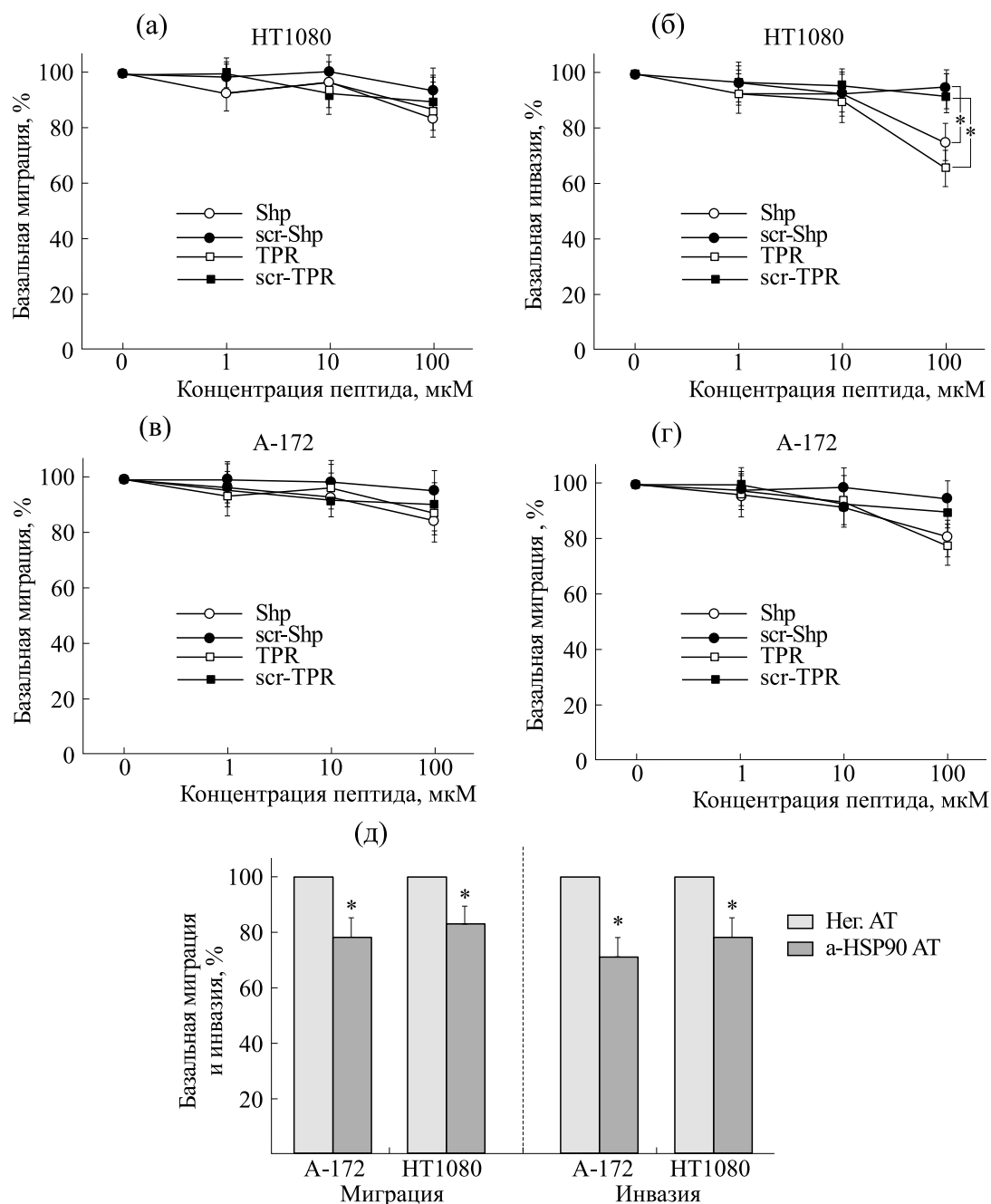


Рис. 2. Влияние непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на базальную миграцию и инвазию клеток HT1080 и A-172. Миграцию и инвазию клеток определяли в среде DMEM с бычьим сывороточным альбумином, содержащей пептиды в разных концентрациях (а–г) или поликлональные антитела против Hsp90 (100 мкг/мл) (д). Миграцию и инвазию контрольных клеток (без пептидов) принимали за 100%. Каждая точка представляет собой среднее значение SD ($n = 4-5$). Звездочки указывают на статистически достоверное отличие от контрольных клеток: * – $p < 0.05$.

15]. Принимая это во внимание, мы исследовали влияние непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на базальную (нестимулированную) миграцию и инвазию клеток (в отсутствие Hsp90 в культуральной среде) и на миграцию/инвазию клеток, стимулированную экстраклеточным нативным Hsp90. В среде DMEM с бычьим сыво-

роточным альбумином, которая практически не содержит факторов роста, оба непроницаемых для клеток пептида Shp и TPR в концентрациях 1–100 мкМ незначительно, но воспроизводимо снижали базальную миграцию обеих клеточных линий (рис. 2а,в), не более чем на 10–15%. Оба пептида вызывали более выраженное ингибирование ба-

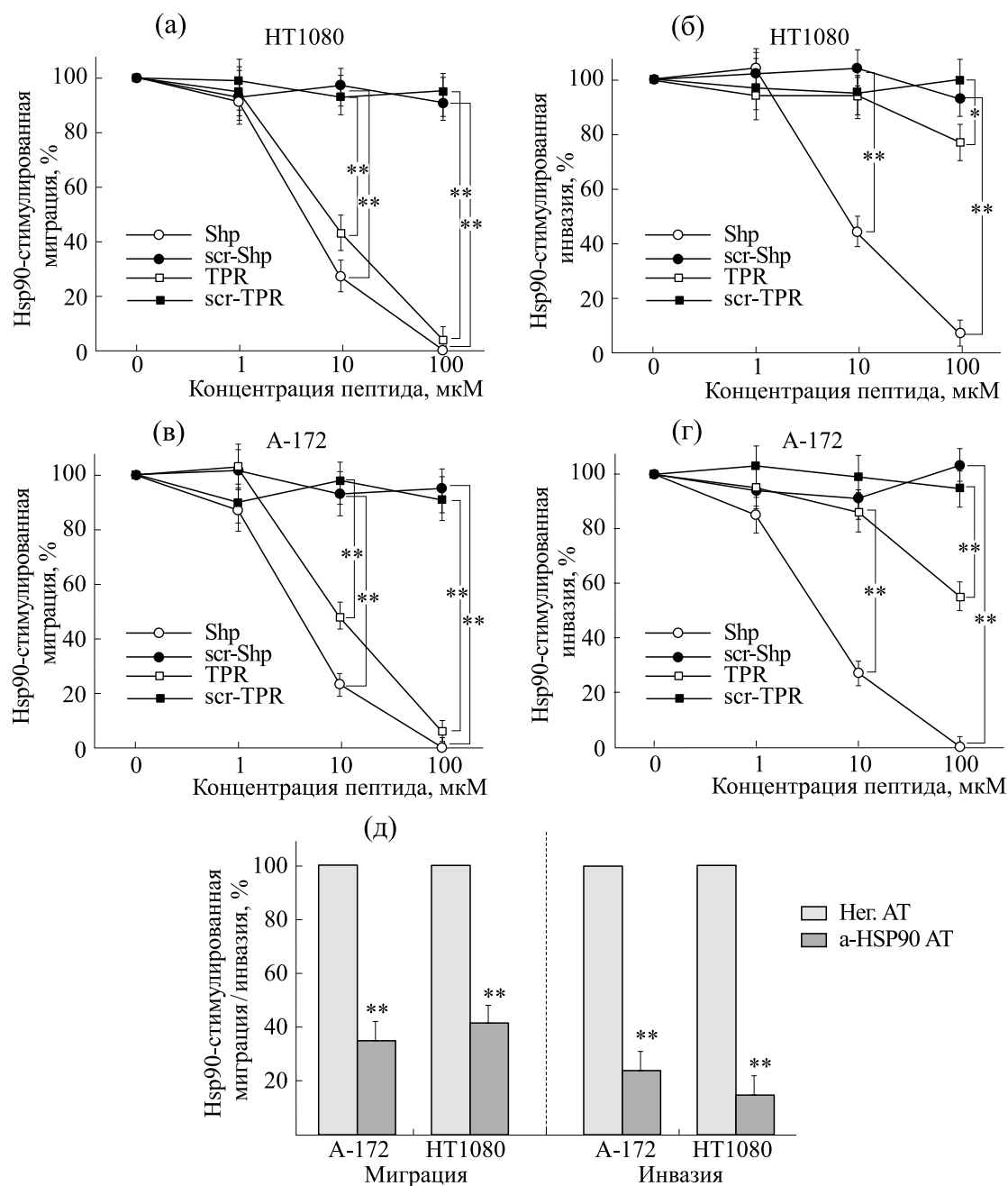


Рис. 3. Влияние непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток HT1080 и A-172. Пептиды в разных концентрациях (а–г) и поликлональные антитела против Hsp90 (100 мкг/мл) (д) добавляли в среду вместе с нативным Hsp90 (50 мкг/мл) и оценивали миграцию/инвазию клеток, стимулированную Hsp90. Hsp90-зависимую стимуляцию миграции и инвазии контрольных клеток (без пептидов) принимали за 100%. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ SD ($n = 4-5$). Звездочки указывают на статистически достоверное отличие от контрольных клеток: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

зальной инвазии клеток: в концентрации 100 мкМ пептиды Shp и TPR снижали базальную инвазию клеток HT1080 и A-172 на 20–30% (рис. 2б,г). Эффекты пептида Shp были более выражены, чем пептида TPR. Скремблированные непроницаемые для клеток аналоги пептидов не ингибировали базальную миграцию и инвазию клеток обеих кле-

точных линий, что указывает на специфичность эффектов пептидов на базальную (нестимулированную) инвазию клеток. В качестве контроля мы проанализировали ингибирование базальной миграции/инвазии клеток Hsp90-специфическими поликлональными антителами, полученными путем многократной иммунизации кроликов очи-

щенным нативным бычьим Hsp90. Уровень снижения базальной миграции/инвазии клеток Hsp90-специфическими поликлональными антителами (100 мкг/мл) также был не очень высок и составлял 20–30% (рис. 2д). Полученные данные свидетельствовали, что непроницаемые для клеток Hsp90-связывающие пептиды Shp и TPR оказывали определенное ингибирующее влияние на миграцию/инвазию клеток, зависящую от мембрано-ассоциированного экстраклеточного Hsp90.

Далее мы исследовали влияние непроницающих в клетки Hsp90-связывающих пептидов Shp и TPR на миграцию и инвазию клеток, стимулированную Hsp90. Для стимуляции миграции/инвазии клеток использовали очищенный нативный бычий Hsp90. Добавление нативного Hsp90 в среду стимулировало миграцию клеток глиобластомы А-172 и фибросаркомы HT1080 на 30–60% и инвазию обеих клеточных линий на 80–140% соответственно (данные не приведены), подтверждая заметную промотирующую активность нативного Hsp90 для опухолевых клеток, показанную нами ранее [9]. Hsp90-индуцированная стимуляция миграции/инвазии обеих клеточных линий дозо-зависимо снижалась в присутствии обоих непроницаемых для клеток пептидов Shp и TPR. Пептид Shp ингибировал индуцированную Hsp90 стимуляцию миграции и инвазии клеток с IC_{50} 3–8 мкМ для обеих клеточных линий; при этом пептид практически полностью подавлял стимуляцию миграции и инвазии клеток HT1080 и А-172 в концентрации 100 мкМ (рис. 3). Более того, миграция и инвазия клеток иногда снижались ниже нестимулированного контроля на 10–25%, что указывает на то, что пептиды ингибируют оба пула внеклеточного Hsp90 – мембрано-ассоциированный Hsp90 и растворенный в культуральной среде. Пептид TPR был менее эффективен в ингибировании Hsp90-индуцированной стимуляции миграции клеток HT1080 и А-172 (IC_{50} 10–12 мкМ) (рис. 3), однако в концентрации 100 мкМ пептид TPR также практически полностью ингибировал Hsp90-индуцированную стимуляцию миграции клеток обеих культур клеток. Пептид TPR был менее эффективен в подавлении Hsp90-индуцированной стимуляции инвазии клеток HT1080 и А-172 по сравнению с миграцией клеток (рис. 3). Скремблированные пептиды scr-Shp и scr-TPR не влияли на миграцию и инвазию клеток в присутствии нативного Hsp90 в среде, что указывает на специфичность эффектов непроницаемых для клеток пептидов Shp и TPR на подвижность клеток. Hsp90-специфические поликлональные антитела, используемые в качестве контроля, ингибировали стимулированную Hsp90 миграцию/инвазию обеих клеточных линий на 60–90% при концентрации 100 мкг/мл (рис. 3д), что указывает на высокую эффектив-

ность непроницаемых для клеток пептидов Hsp90 в ингибировании Hsp90-зависимой стимуляции подвижности клеток экстраклеточным Hsp90.

Таким образом, мы продемонстрировали, что два Hsp90-связывающих непроницаемых для клеток пептидных фрагмента сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка не обладают цитотоксичностью и антипролиферативной активностью в отношении клеток HT1080 и А-172, но подавляют миграцию и инвазию клеток *in vitro*: базальную миграцию/инвазию клеток, зависящую от мембрано-ассоциированного Hsp90, и миграцию/инвазию клеток, стимулированную свободным Hsp90. Механизмы, посредством которых пептиды ингибируют функционирование экстраклеточного Hsp90, неясны и требуют дальнейшего изучения. Гипотетическая модель действия непроницаемых и проницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на Hsp90-зависимую миграцию и инвазию клеток представлена на рис. 4. Связывание таких пептидов с мембрано-ассоциированным или свободным Hsp90 может нарушать взаимодействие Hsp90 с клеточными рецепторами (LRP1 и др.) и, следовательно, активацию сигнальных путей, определяющих клеточную подвижность [7–12, 15]. Взаимодействие пептидов с Hsp90 может приводить к стерическому ингибированию связывания свободного Hsp90 с рецепторами (например, LRP1) и/или клеточными гепарансульфатами, к диссоциации (десорбции) Hsp90, ассоциированных с рецепторами/гепарансульфатами на плазматической мембране. Нельзя также исключать, что присоединение пептидов к Hsp90 может нарушить его способность активировать клеточные рецепторы по неизвестному механизму, например, посредством изменения конформации Hsp90.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, показавших, что различные типы непроницаемых для клеток ингибиторов Hsp90 (Hsp90-специфичные антитела, DMAG-N-оксид, STA-12-7191, иммобилизованный на агарозных гранулах гелданамицин) снижают миграцию и инвазию клеток *in vitro* и диссеминацию опухолевых клеток у мышей [6–10, 13]. Результаты свидетельствуют, что непроницаемые для клеток пептиды, связывающиеся с Hsp90, обладают потенциалом для создания противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. Результаты также позволяют предположить, что проницаемые для клеток формы таких пептидов, дополнительно содержащие проникающие в клетки пептиды (пенетратин, ТАТ-пептид), которые обеспечивают проникновение Hsp90-связывающих пептидов в клетки, могут обладать двойной противоопухолевой активностью – прямым цитотоксическим действием за счет ингибирования функционирования внутриклеточного Hsp90 и подавлением мигра-

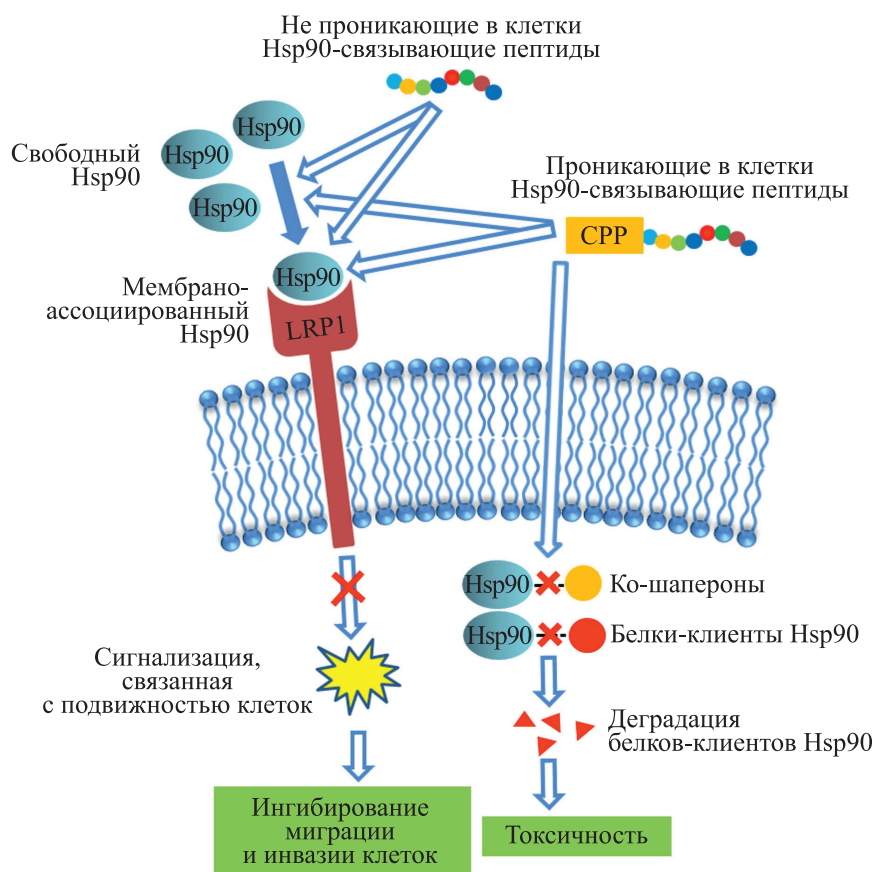


Рис. 4. Гипотетическая модель действия проникаемых и непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на миграцию и инвазию опухолевых клеток. Непроницаемые для клеток пептиды и проникаемые для клеток пептиды, содержащие проникающий в клетки пептид (CPP), связываются со свободным и/или мембрано-ассоциированным экстраклеточным Hsp90 и нарушают дальнейшую передачу сигналов, связанных с Hsp90-зависимой подвижностью клеток, что приводит к ингибированию их миграции и инвазии. В дополнение к этому проникаемые для клеток Hsp90-связывающие пептиды ингибируют взаимодействие внутриклеточного Hsp90 с белками-клиентами или ко-шаперонами, что приводит к торможению роста и гибели опухолевых клеток.

ции/инвазии опухолевых клеток через нарушение функционирования экстраклеточного Hsp90, ассоциированного с клеточной мембраной или находящегося в межклеточном пространстве в свободном виде.

ВЫВОДЫ

Пептидные фрагменты сурвивина (KHSS-GCAFL) и Hsp70/Hsp90-организующего белка (SYKARNGAFIYK) не проникают внутрь клеток и не обладают цитотоксической и антипролиферативной активностью. Пептиды незначительно снижали базальную (нестимулированную) миграцию и инвазию клеток фибросаркомы HT1080 и глиобластомы A-172 человека *in vitro*, но выражено ингибировали миграцию/инвазию клеток, стимулированную экстраклеточным Hsp90. Результаты свидетельствуют о потенциале Hsp90-связывающих пептидов для разработки противо-

опухолевых препаратов антиметастатического действия.

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. 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. P. Workman, Cancer Lett. **206**, 149 (2004).

4. J. Sanchez, T. R. Carter, M. S. Cohen, et al., *Curr. Cancer Drug Targets* **20** (4), 253 (2020).
5. B. Becker, G. Multhoff, B. Farkas, et al., *Experim. Dermatol.* **13**, 27 (2004).
6. B. K. Eustace, T. Sakurai, J. K. Stewart, et al., *Nat. Cell Biol.* **6**, 507 (2004).
7. M. Shevtsov M., Z. Balogi, W. Khachatryan, et al., *Cells* **9** (5), 1263 (2020).
8. K. Sidera, M. Gaitanou, D. Stellas, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 2031 (2008).
9. D. Stellas, A. El Hamidieh, and E. Patsavoudi, *BMC Cell Biol.* **11**, 51 (2010).
10. S. Tsutsumi, B. Scroggins, F. Koga, et al., *Oncogene* **27**, 2478 (2008).
11. J. McCready, D. S. Wong, J. A. Burlison, et al., *Cancers (Basel)* **6**, 1031 (2014).
12. C. F. Cheng, J. Fan, M. Fedesco, et al., *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3344 (2008).
13. A. L. Correia, H. Mori, E. I. Chen, et al., *Genes Dev.* **27**, 805 (2013).
14. M. C. Hunter, K. L. O'Hagan, A. Kenyon, et al., *PLoS One* **9**, e86842 (2014).
15. J. S. Chen, Y. M. Hsu, C. C. Chen, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 25458 (2010).
16. J. Bohonowych, M. Hance, K. Nolan, et al., *Prostate* **74**, 395 (2014).
17. M. Schafer and S. Werner, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 628 (2008).
18. A. Snigireva, V. Vrublevskaia, V. Afanasyev, et al., *Cell. Adh. Migr.* **9**, 460 (2015).
19. A. Snigireva, V. Vrublevskaia, Y. Skarga, et al., *Cell Stress Chaperones* **24**, 309 (2019).
20. S. P. Wheatley and D. C. Altieri, *J. Cell Sci.* **132** (7), jcs223826 (2019).
21. J. Plescia, W. Salz, F. Xia, et al., *Cancer Cell.* **17**, 457 (2005).
22. B. Gyurkocza, J. Plescia, C. M. Raskett, et al., *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1068 (2006).
23. J. Li, J. Soroka, and J. Buchner, *Biochim. Biophys. Acta* **3**, 624 (2012).
24. T. Horibe, M. Kohno, M. Haramoto, et al., *J. Transl. Med.* **9**, 8 (2011).
25. A. Ahsan, D. Ray, S. G. Ramanand, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 26879 (2013).
26. Y. Skarga, V. Vrublevskaia, Y. Evdokimovskaya, et al., *Biomed. Chromatogr.* **23**, 1208 (2009).
27. A. Lisov, V. Vrublevskaia, Z. Lisova, et al., *Viruses* **7** (10), 5343 (2015).

Cell-Impermeable Peptide Fragments of Survivin and Hsp70/Hsp90-Organizing Protein Inhibit the Hsp90-Dependent Migration and Invasion of Tumor Cells

V.S. Petrenko, A.V. Snigireva, V.V. Vrublevskaia, M.A. Zhmurina, Y.Y. Skarga, and O.S. Morenkov

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

Membrane-associated and secreted extracellular heat shock proteins 90 (Hsp90) have important role in the migration, invasion, and metastasis of tumor cells and are proposed as promising therapeutic target for the development of antimetastatic agents. In previous studies, peptide fragments of survivin (KHSSGCAFL) and Hsp70/Hsp90-organizing protein (KAYARIGNSYFK), that bind these proteins to the intracellular form of Hsp90 have been identified. In this study, we investigated the effects of the Hsp90-binding peptides on the migration and invasion of human fibrosarcoma HT1080 and glioblastoma A-172 cells. Cell-impermeable Hsp90-binding peptide fragments of survivin and Hsp70/Hsp90-organizing protein did not exert cytotoxic and antiproliferative activity against cells, while cell-permeable Hsp90-binding peptides which contain the Antennapedia homeodomain sequence were toxic for HT1080 and A-172 cells. Cell-impermeable Hsp90-binding peptides slightly decreased the basal (unstimulated) cell migration and invasion, although they strongly inhibited the migration/invasion of cells stimulated by extracellular Hsp90. The results demonstrated that cell-impermeable Hsp90-binding peptides are able to inhibit the activity of extracellular Hsp90, thereby leading to the suppression of the migration and invasion of cells. Such peptides have a potential for the development of antimetastatic drugs.

Keywords: extracellular Hsp90, survivin, Hsp70/Hsp90-organizing protein, peptides, cell migration and invasion in vitro, metastasis

ОПТИМИЗАЦИЯ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО СОСТАВА ИНКУБАЦИОННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ И ОБРАТИМОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СРЕЗОВ МОЗГА НЕГИБЕРНИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. А.А. Мокрушин

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

После доработки 01.12.2020 г.

Принята к публикации 03.12.2020 г.

Обнаружено, что после длительного криосохранения срезов мозга при -10°C активность *N*-метил-D-аспартат-зависимых механизмов (амплитуда *N*-метил-D-аспартат-потенциалов) блокировалась. Для восстановления активности *N*-метил-D-аспартат-зависимых механизмов после криосохранения/отогревания исследовали изменения внеклеточного (pH_o) инкубационного раствора. Обнаружено, что при интервалах pH_o 7.2–7.4 происходило ступенчатое закисление инкубационной среды до pH_o 6.5 ± 0.2 . При этом значении pH_o амплитуда *N*-метил-D-аспартат-потенциалов снижалась до 33%. Изменение инкубационной среды (гибридная буферная система, включающая карбонатный, фосфатный и трис-буфер) до pH_o 7.7 способствовало восстановлению амплитуды *N*-метил-D-аспартат-потенциалов до 84% по сравнению с исходными значениями (до криоконсервации). Таким образом, использование буферной системы с трис(гидроксиметил)аминометаном, а также увеличение pH_o до 7.7 были наиболее оптимальными условиями для восстановления активности *N*-метил-D-аспартат-зависимых механизмов при отогревании после длительного криосохранения.

Ключевые слова: срезы мозга, НМДА-потенциалы, криосохранение, буферные системы.

DOI: 10.31857/S0006302921050136

Исследование закономерностей и способов обратимого ингибирования жизнедеятельности клеток и органов млекопитающих после их криосохранения при низких температурах представляет особый как теоретический интерес, так и практическое значение для пересадки тканей, органов и создания криобанка трансплантатов [1].

В настоящее время в медицине и ветеринарии применяется низкотемпературное хранение одноклеточных клеток (ооциты, сперматозоиды, клетки крови и др.) с последующим восстановлением их биологических функций после отогревания и использования их в клинических условиях.

В России проблемы низкотемпературного криосохранения активно изучаются в Институте биофизики клетки РАН (Пушино Московской области). Одним из интересных направлений являются исследования под руководством Э.Н. Гаховой на целом мозге моллюска с сохра-

нением клеточной неоднородности и синаптических связей. Исследователи также изучали причины криоповреждения и способы криопротекции нервной ткани моллюска. Для этих целей было протестировано нейропротекторное действие пептида TSKY, выделенного из мозга зимнеспящих животных [2–4]. Несомненным достоинством этих работ являются результаты с использованием метода культуры *in vitro*, было показано, что нейроны, выделенные из оттаянного мозга моллюска, сохраняют способность формировать нейриты и образовывать нейрональные сети, аналогичные тем, что образуют нейроны моллюска, не прошедшие криоконсервацию. Эти данные позволяют изучать криосохранение нервной ткани незимнеспящих млекопитающих для создания криобанка.

Другие перспективные исследования криосохранения возбудимых тканей проводятся в том же институте в лаборатории Е.Е. Фесенко на миокарде крыс и изолированного сердца барана. Однако это направление связано с применением газовой среды, состоящей из смеси газов CO и O_2 , что принципиально отличается от жидких сред

Сокращения: АМПА — α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота, НМДА — *N*-метил-D-аспартат, ЛОТ — латеральный обонятельный тракт, ФП — фокальный потенциал.

криосохранения живых тканей. Для пролонгирования криосохранения миокарда крыс применяются нейропротекторы и антибиотики. Практическим достижением этих исследований является разработка камеры для гипотермического хранения сердца крыс и баранов. Полученные положительные результаты криосохранения миокарда обнадеживают [5].

Что касается длительной криоконсервации нервных тканей незимнеспящих млекопитающих, то надежные протоколы и методы для применения в терапии лечения заболеваний до сих пор детально не разработаны. По всей вероятности, это связано с гетерогенным клеточным составом нервной ткани (нейроны, глиальные клетки, синапсы), а также с отсутствием стандартных протоколов процесса замораживания/отогревания [6–8].

Большое значение в решении этой проблемы, на наш взгляд, имеет выбор экспериментальных моделей для изучения механизмов криосохранения нервной ткани млекопитающих. При разработке методов криоконсервации нервной ткани срезы мозга являются оптимальными экспериментальными объектами. Ранее проведенные нами эксперименты выявили некоторые закономерности влияния физических факторов, таких как скорость и глубина замораживания, на восстановление синаптической активности в срезах мозга [9]. В результате исследований было обнаружено, что при низких скоростях охлаждения срезов обонятельной коры мозга ($0.1\text{--}0.125^\circ\text{C}/\text{мин}$) до 16°C активности глутаматергических ионотропных АМПА- (α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота) и НМДА-зависимых (*N*-метил-D-аспартат) механизмов сохранялись [10].

В дальнейших исследованиях была выявлена различная резистентность АМПА и НМДА механизмов на замораживании/отогревании срезов мозга после длительного криосохранения при более глубокой температуре и длительности (-10°C , 30 суток). НМДА-зависимые процессы при этих условиях ингибировались и блокировались тогда, как АМПА механизмы сохранялись, что свидетельствует о значительных криоповреждениях НМДА механизмов [9, 11–13]. Это важно, поскольку НМДА-зависимые механизмы ключевые структуры возбуждающей глутаматергической медиаторной системы. Они являются адаптивными механизмами в мозге, участвуют в обучении, формировании следов памяти, а также при развитии различных нейропатологий (эпилепсия, ишемия, травма и др.) [14–17].

Таким образом, изучение особенностей криоповреждения НМДА-механизмов имеет исключительно важное значение для сохранения активности этих механизмов при криосохранении. Вы-

явленные закономерности модификаций НМДА-зависимых механизмов можно использовать для создания банка трансплантантов.

Традиционно для сохранения функционирования нервных структур используются различные криопротекторы. Однако они проявляют выраженные негативные эффекты на функционирование нейронов и синапсов. По этой причине мы отказались от их использования в настоящей работе.

Для выявления причины криоповреждения НМДА-механизмов были исследованы изменения pH_o инкубационной среды и было обнаружено снижение pH_o (закисление) инкубационной среды в процессе отогревания срезов. Была высказана гипотеза, что для уменьшения нарушений функционирования глутаматергических ионотропных НМДА-зависимых механизмов при криоконсервации необходимо оптимизировать характеристики pH_o инкубационного раствора. Справедливость этого предположения подтверждается результатами исследований, в которых было выявлено, что возбудимость нейронов в нормотермических условиях особенно чувствительна к изменениям внутриклеточного pH (pH_i) и внеклеточного pH (pH_o) [18–23]. Однако в экспериментах на срезах мозга наиболее надежно можно измерять влияние pH_o на функционирование нейронов и синапсов, в том числе на НМДА-зависимые механизмы.

Экспериментально установлено, что оптимальный диапазон pH_o инкубационной среды при нормотермических условиях (37°C) для длительного поддержания активностей нервных клеток и синапсов в срезах мозга составляет pH_o 7.2–7.4. При этих условиях активности глутаматергических ионотропных (АМПА и НМДА) механизмов сохранялись в течение 10–12 ч. Отклонения от этих показателей сопровождается нестабильностью активности этих механизмов в срезах мозга [15].

Цель настоящей работы заключалась в изучении эффектов гибридной буферной системы (карбонатный (NaHCO_3), фосфатный (KH_2PO_4) трис(гидроксиметил)аминометан ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) инкубационного раствора на восстановление электрогенеза НМДА-механизмов после длительной криоконсервации. Активности НМДА-механизмов определяли электрофизиологическими методами по величине амплитуд НМДА-потенциалов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на крысах—самцах линии Вистар массой 180–200 г из биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН («Коллекция лабораторных млекопитающих раз-

ной таксономической принадлежности»), поддержанной программой биоресурсных коллекций Минобрнауки России с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными European Communities Council Directive (86/609 ЕЕС). Опыты с животными проводили в соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1996 г.) и принципами этического кодекса Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (1996 г.).

Исследования проводили на тангенциальных срезах обонятельной коры толщиной 400–500 мкм [24], которые изготавливали из мозга крыс-самцов (29 животных). В результате проведенных исследований было установлено, что предельно допустимая толщина кортикальных срезов крыс при инкубации в атмосфере кислорода составляет в среднем 0.052 см (520 мкм), а при инкубации срезов в атмосфере воздуха и присутствии углекислого газа — 0.22 мм (220 мкм) [24]. Для изготовления срезов использовали станок Емельянова (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) [24]. Срезы преинкубировали в стеклянных виалах объемом 1 мл в аппарате Варбурга (модель ВА 01 10, Германия) при температуре 37°C с частотой качания 120/мин в течение 2 ч, что имитирует кровообращение в мозге. Инкубационная среда одного и того же состава в виалах со срезами менялась дважды (через 1 ч и 2 ч преинкубации) для устранения поврежденных клеток и их метаболитов.

Для приготовления инкубационных растворов была использована дистиллированная вода, которая хранилась в стеклянном сосуде темного цвета объемом 10 л. Непосредственно перед приготовлением раствора дистиллированную воду пропускали через колонку с ионообменным наполнителем, состоящим из катионита КУ–2–8 и анионита АВ–17–8 («Химреактив», Россия) для дополнительной очистки. Значение кислотности pH_0 7.0 этой воды сохранялось при 25–39°C.

На такой воде были приготовлены инкубационные растворы с буферными системами для предварительной инкубации срезов до замораживания, хранения и последующего отогревания до 37°C.

Искусственная церебральная жидкость для инкубации срезов была следующего состава (в мМ): NaCl — 124.0, KCl — 5.0, CaCl₂ — 2.6, KH₂PO₄ — 1.24, MgSO₄ — 1.2, NaHCO₃ — 3.0, глюкоза — 10.0, трис-HCl — 23.0, pH — 7.2–7.3. Инкубационный раствор в виалах со срезами и газовую атмосферу над раствором насыщали кислородом, углекислый газ не использовался.

После преинкубации срезы поочередно переносили в регистрирующую проточную камеру электрофизиологической установки [13, 15]. В ней активности НМДА-зависимых механизмов

определяли при регистрации этих потенциалов экстраклеточно стеклянными микроэлектродами сопротивлением 1–5 МОм, заполненными 1 М NaCl, в ответ на ортодромные электрические импульсы (прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 0.1–0.3 мА, частотой 0.003 Гц), генерируемые стимулятором ЭСУ-1 (Россия) латерального обонятельного тракта (ЛОТ). Индифферентный хлорсеребряный электрод находился в инкубационной камере. Для детекции НМДА-потенциалов использовали усилитель («НТО», Россия). Далее потенциалы оцифровывали при помощи аналого-цифрового устройства (Е 20–10, Россия) с частотой квантования 20 кГц и обрабатывали на компьютере с помощью специальной компьютерной программы «Анализ электрической активности нейронов» (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН).

Морфологические особенности обонятельной коры мозга хорошо различимы в световом микроскопе и позволяют стабильно повторять локализации раздражающего электрода в проксимальной части ЛОТ, а регистрирующего — в точке его изгиба. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что в этой точке находится фокус максимальной активности при погружении регистрирующего электрода на глубину 230–270 мкм от пиальной поверхности среза (рис. 1). Параметры электрической стимуляции ЛОТ (частота, интенсивность) для данного среза после криоконсервации были такие же, как и до замораживания.

Идентификацию отдельных компонентов фокального потенциала (ФП), регистрируемого в срезах обонятельной коры, проводили с использованием специфических блокаторов: для НМДА-рецепторов — *D*-2-амино-5-фосфоновалериата; для АМПА-рецепторов — 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-диона, с помощью методов, описанных в работах [15, 25, 26]. Вызванные ФП регистрировались в ответ на стимуляцию ЛОТ в контроле и во время инкубации срезов специфическими антагонистами АМПА- и НМДА-рецепторов. ФП является многокомпонентным потенциалом и состоит из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ, и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию глутаматергических ионотропных механизмов — АМПА- и НМДА-потенциалов (рис. 2). Для идентификации НМДА-потенциалов срезы инкубировали с *D*-2-амино-5-фосфоновалериатом (50 мМ). Для предотвращения блокады этих рецепторов ионами Mg²⁺ срезы инкубировали в среде с низкой концентрацией этих ионов (200 мМ) в течение 20 мин. Полученные результаты продемонстрировали редукцию позднего синаптического компонента ФП, что указывает на его активацию НМДА-рецепторами. Для выявления АМПА-

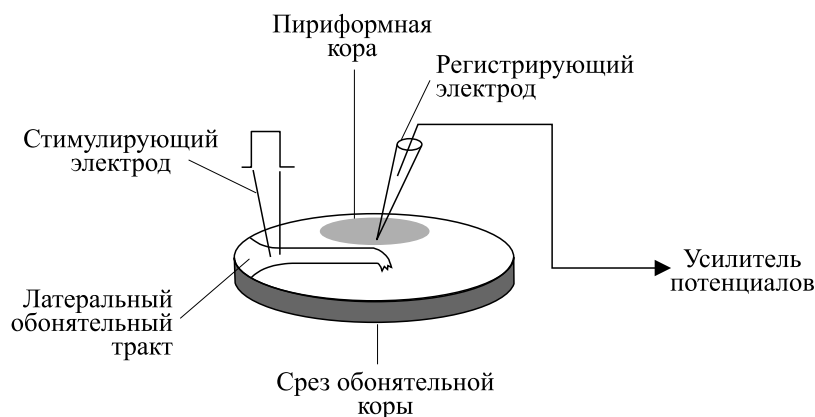


Рис. 1. Схема обонятельной коры среза мозга крысы, вид с пиальной поверхности.

компонента ФП срезы инкубировали с 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дионом (25 мкМ) в течение 20 мин. Такое воздействие блокировало ранний постсинаптический компонент, а также НМДА-компонент, сохранялся только пресинаптический компонент (рис. 2). Таким образом, проведенная фармакологическая идентификация синаптических компонентов ФП свидетельствует, что ранний АМПА-потенциал отражает активацию АМПА-, а поздний — НМДА-рецепторов (рис. 2). Учитывая проведенные исследования, было выявлено, что максимальная амплитуда НМДА регистрировалась в фиксированной точке (8 мс) от артефакта стимуляции (рис. 2).

Криопротекторы в процессе криосохранения срезов не применялись.

Химические реактивы для приготовления искусственной цереброспинальной жидкости представлены фирмой «Химреактив» (Россия).

Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием непараметрического параметра (*U*-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни). Уровень статистической значимости был $p \leq 0.05$.

Протокол криосохранения срезов заключался в следующем. Инкубационную среду с вышеописанным ионным составом готовили на гибридной буферной системе: карбонатный буфер (NaHCO_3), фосфатный буфер (KH_2PO_4) и трис(гидроксиметил)аминометан ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$). Исходные значения pH_0 среды для преинкубации срезов до замораживания составляли 7.2—7.3 при 37°C. Активность глутаматергических ионотропных механизмов (АМПА- и НМДА-механизмов) при этой температуре и pH_0 была оптимальной.

Срезы в проточной камере перфузировали со скоростью 2 мл/мин. В них до замораживания регистрировали амплитуды НМДА-потенциалов при 37°C в течение 20 мин. Полученные значения

амплитуд НМДА-потенциалов рассматривали как контрольные перед замораживанием. Было выявлено, что применение более частой стимуляции вызывает в срезах частотно-зависимые изменения амплитуд ответов, особенно НМДА-потенциалов, что не представляется оптимальным для длительного криосохранения.

Затем срезы градуально замораживали до -10°C при медленной скорости ($0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$) и сохраняли при температуре -10°C в морозильнике термостата «ThermoStat plus» (Eppendorf, Герма-

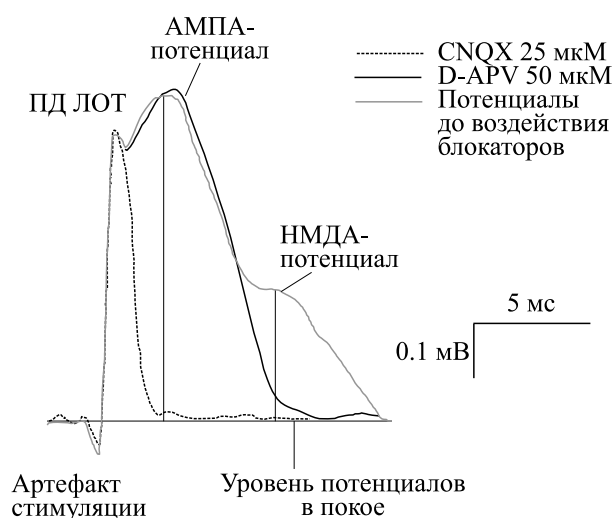


Рис. 2. Фармакологическая идентификация пре- и постсинаптических компонентов факельных потенциалов, вызываемых электрической стимуляцией латерального обонятельного тракта (ЛОТ). Представлены усредненные ФП в инкубационной среде до воздействия блокаторов ($n = 11$), ФП при воздействии блокатора АМПА-рецепторов 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-диона ($n = 10$) и ФП при воздействии блокатора НМДА-рецепторов D-2-амино-5-фосфоновалериата в среде с пониженным содержанием Mg^{2+} (200 мкМ) ($n = 7$). Вертикальные серые линии — измерение амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов.

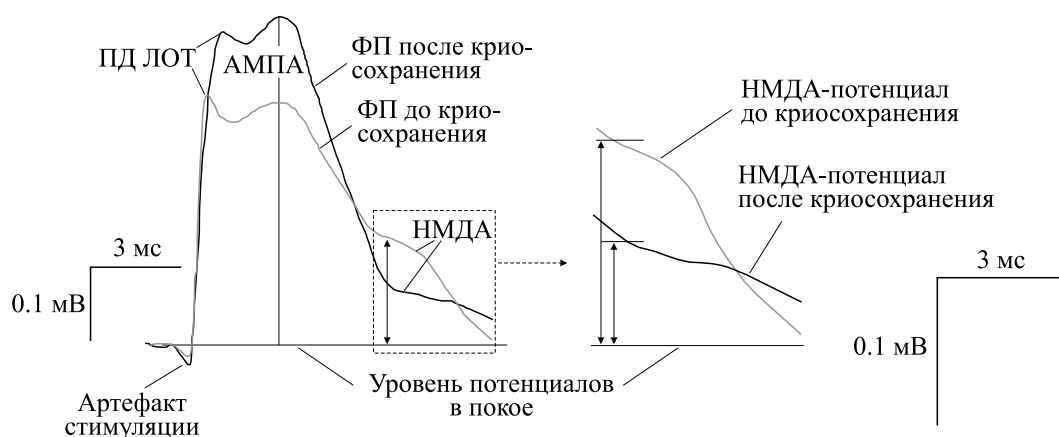


Рис. 3. Потенциалы, регистрируемые в срезах обонятельной коры мозга до и после криосохранения (30 суток при -10°C). Компоненты потенциалов: артефакт стимуляции; потенциал действия ЛОТ отражает активацию проводящих волокон ЛОТ; АМПА- и НМДА-потенциалы соответственно. Вертикальная серая стрелка — измерение амплитуд НМДА-потенциалов во временной точке 8 мс от артефакта стимуляции. На врезке справа показаны в увеличенном масштабе амплитуды НМДА-потенциалов до и после криосохранения. Вертикальные стрелки — измерение амплитуд НМДА-потенциалов до и после криосохранения.

ния). Через 30 суток криосохранения срезы отогревали до 37°C и в них вновь регистрировали амплитуды НМДА-потенциалов. При обработке результатов экспериментов амплитуды НМДА-потенциалов определяли по отношению к контрольным значениям и выражали в процентах.

Измерение pH_0 инкубационной среды осуществляли с применением рН-метра Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США). Значения pH_0 определяли с точностью до 0.1. Температуру инкубационной среды со срезом до замораживания при регистрации НМДА потенциалов до криосохранения измеряли с помощью терморегулятора «ПИД ТРМ12» (Россия). Термодатчик находится рядом с регистрирующей камерой, но изолирован тонкой стенкой от среза, чтобы не вызывать негативные воздействия на активность нейронов срезов. Чувствительность рН-метра проверяли по стандартным титрам для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии (Россия): калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) — натрий фосфорнокислый двухзамещенный (Na_2HPO_4), pH 6.86 при 25°C ; натрий тетраборнокислый ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), pH 9.18 при 25°C . В этих диапазонах pH проводили точную настройку рН-метра.

Измерение кислотно-основного баланса внутри клеток (pH_i) срезов мозга с использованием микродатчиков или специфических красителей не применялось, поскольку их использование вызывало необратимые изменения амплитуд НМДА-потенциалов.

Определение pH_0 и НМДА-потенциалов после криосохранения проводили в параллельных опытах. Это связано с тем, что одновременное из-

мерение этих параметров на срезах приводило к неконтролируемому искажению данных pH_0 и НМДА-потенциалов.

После отогревания срезы перфузировали инкубационной средой такого же состава, что и до замораживания. Это необходимо, чтобы морфологически сохранить структуры срезов. Инкубационные растворы со срезами продували кислородом, углекислый газ не использовали. Осадков в виде нерастворимых солей не выявлено. Специального контроля ионного состава среды не проводили. Необходимость использования среды, в которой был заморожен срез при отогревании, заключается в том, чтобы не вызывать механических повреждений структур среза, находящихся сначала в твердой фазе среды — во льду, а при отогревании в жидкой фазе — в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3 представлены типичные профили экстраклеточных потенциалов, регистрируемых после криосохранения и последующего отогревания до 37°C . Анализируя изменения амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов до и после криосохранения, следует отметить разнонаправленные модификации активности глутаматергических ионотропных механизмов. Так, амплитуда АМПА-потенциалов увеличивалась по сравнению со значением амплитуд до криосохранения: до замораживания 290 мкВ, после отогревания — 410 мкВ, $p \leq 0.05$, $U = 7$, $n = 12$. Напротив, амплитуда НМДА-потенциалов уменьшалась после криосохранения и отогревания до нормотермических значений: до замораживания 157 мкВ, по-

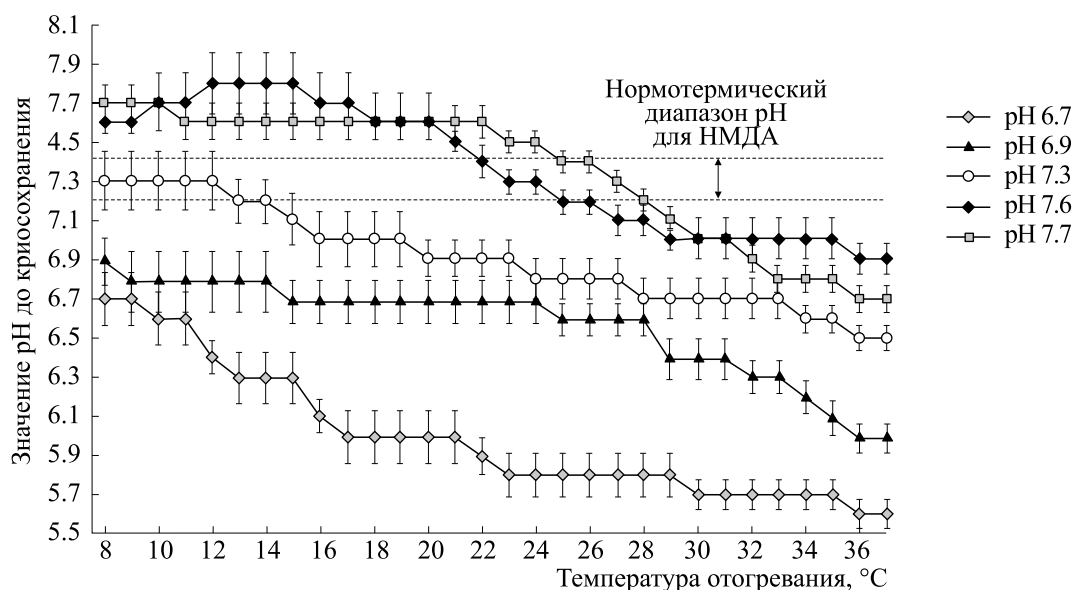


Рис. 4. Изменения pH_0 инкубационной среды с различными значениями pH_0 до криосохранения (30 суток при $-10^{\circ}C$) в процессе отогревания до $37^{\circ}C$. Измерения pH_0 проводили с интервалом $1^{\circ}C$. Горизонтальные пунктирные линии — оптимальный нормотермический диапазон для активности НМДА-зависимых механизмов; $n = 5$ (pH_0 6.7); $n = 7$ (pH_0 6.9); $n = 12$ (pH_0 7.3); $n = 9$ (pH_0 7.6); $n = 5$ (pH_0 7.7). Различия данных выявляли с использованием непараметрического U -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, $p \leq 0.05$.

сле отогревания — 94 мкВ , $p \leq 0.05$, $U = 7$, $n = 12$ (рис. 3).

Полученные результаты соответствуют данным, полученным ранее по криосохранению с различными длительностями и последующим отогреванием до нормотермических значений. Было обнаружено, что после длительного криосохранения срезов мозга амплитуды АМПА-потенциалов увеличивались, тогда как амплитуды НМДА-потенциалов снижались до минимальных значений или блокировались [11, 13].

Для поиска ответа на вопрос о причине снижения активности НМДА-механизмов были проведены исследования изменений показателей кислотно-щелочного баланса инкубационного раствора после криосохранения. Было обнаружено, что после длительного криосохранения и последующего отогревания происходит закисление инкубационной среды и высказано предположение, что такое изменение в инкубационной среде приводит к уменьшению активности НМДА-механизмов.

В связи с этой гипотезой было изучено влияние на сохранение и восстановление активности НМДА-зависимых механизмов после криосохранения (30 суток) инкубационного раствора с гибридной буферной системой (карбонатный буфер — фосфатный буфер — трис(гидроксиметил)аминометан). В такой буферной системе трис играет ключевую роль в длительном поддержании кислотно-щелочного равновесия в срезах мозга.

Для восстановления активности НМДА-механизмов после криосохранения было проведено изучение модификаций кислотно-щелочных характеристик трис-буфера в инкубационной среде (рис. 4).

При использовании инкубационных растворов трис-буфера были выявлены определенные закономерности изменения pH_0 инкубационной среды при отогревании в зависимости от различных исходных pH_0 до криосохранения. Было обнаружено, что при pH_0 7.3, традиционно используемом для сохранения активности НМДА-механизмов при инкубации срезов мозга [15], происходит ступенчатое закисление pH_0 до значения 6.5. Отметим, что при этих значениях pH_0 амплитуда НМДА-потенциалов снижалась до 33%: до замораживания — pH_0 7.3, НМДА-потенциал 140 мкВ *vice versa* при отогревании — pH_0 6.5, НМДА-потенциал 46 мкВ ; $p \geq 0.05$, $U = 11$, $n = 12$. При pH_0 6.9 и 6.7 закисление среды в процессе отогревания происходит более интенсивно, как и блокирование активности НМДА-механизмов (рис. 4).

При pH_0 7.6 и 7.7 в процессе отогревания также происходит закисление pH_0 среды до величин 6.7 и 6.9 соответственно, но этот процесс более медленный.

Следует отметить факт, что в процессе отогревания инкубационной среды в диапазоне темпе-

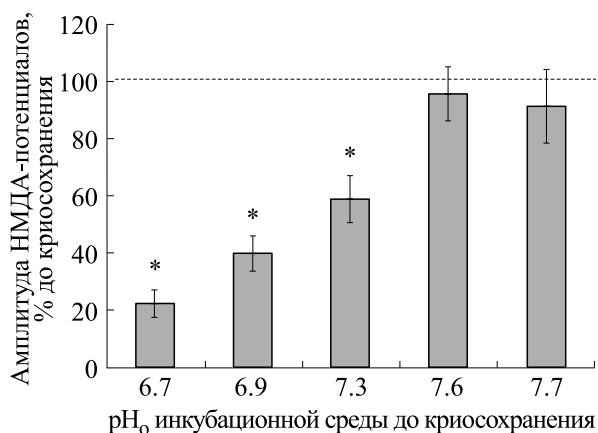


Рис. 5. Изменения амплитуды НМДА-потенциалов при отогревании до 37°C после криосохранения (30 сут при -10°C) в зависимости от различных pH₀. По оси абсцисс – pH₀ до криосохранения, по оси ординат – амплитуда НМДА-потенциалов при отогревании, в % к значениям до криосохранения; $n = 5$ (pH₀ 6.7); $n = 7$ (pH₀ 6.9); $n = 12$ (pH₀ 7.3); $n = 9$ (pH₀ 7.6); $n = 5$ (pH₀ 7.7). Различия данных выявляли с использованием непараметрического U -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, $p \leq 0.05$.

ратур 22–28°C при pH₀ 7.6 и 7.7 активности НМДА-механизмов находятся в нормотермическом диапазоне этих рецепторных механизмов (рис. 5).

Далее было исследовано влияние значения pH₀ 7.7 инкубационного раствора после отогревания. Последовательность приемов при проведении этих экспериментов заключалась в следующем. При плавном охлаждении инкубационной среды и достижении 20°C ее состав менялся на другой, в котором солевой состав был тот же, но

pH₀ был 7.7. Такое изменение pH₀ инкубационной среды до замораживания сопровождалось восстановлением амплитуд НМДА-потенциалов до 84% по сравнению с исходными значениями: после отогревания – при pH₀ 7.7 и температуре 37°C НМДА-потенциал 80 мкВ *vice versa* в контрольных условиях – при pH₀ 7.3 и температуре 37°C НМДА-потенциал 95 мкВ; $p \geq 0.05$, $U = 12$, $n = 14$.

Анализ данных, представленных на рис. 6, показывает, что амплитуды НМДА-потенциалов модифицируются S-образно. В интервалах температур 6–12°C инкубационная среда защелачивалась до pH₀ 7.9. При достижении интервалов температур 13–25°C происходило ступенчатое снижение до pH₀ 7.4. Нормотермический диапазон (pH₀ 7.2–7.4) для оптимальной активности НМДА-механизмов сохранялся при отогревании при интервалах температур 25–34°C (рис. 6). При дальнейшем отогревании до 37°C развивалось закисление инкубационной среды до pH₀ 7.1. Однако снижение pH₀ инкубационной среды не влияло на амплитуды НМДА-потенциалов: при pH₀ 7.1 и температуре 37°C НМДА-потенциал равнялся 85 мкВ *vice versa* в контрольных условиях – pH₀ 7.3 и температуре 37°C – НМДА-потенциал составлял 98 мкВ; $p \geq 0.05$, $U = 10$, $n = 12$. Такие изменения НМДА-потенциалов представлены на рис. 7. Следовательно, применение трис-буфера с pH₀ 7.7 при замораживании/отогревании способствует сохранению активности НМДА-механизмов.

Обращает на себя внимание факт, что изменения pH₀ инкубационного раствора после криосо-

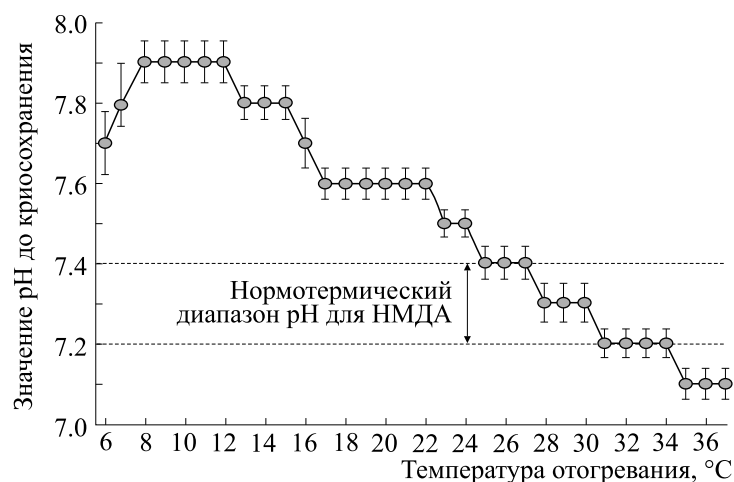


Рис. 6. Изменения pH₀ инкубационной среды при pH₀ (7.7) в зависимости от температуры при отогревании после криосохранения при -10°C; $n = 14$ для каждой точки. Различия данных в процессе отогревания по сравнению с температурной точкой 6°C выявляли с использованием непараметрического U -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, $p \leq 0.05$.

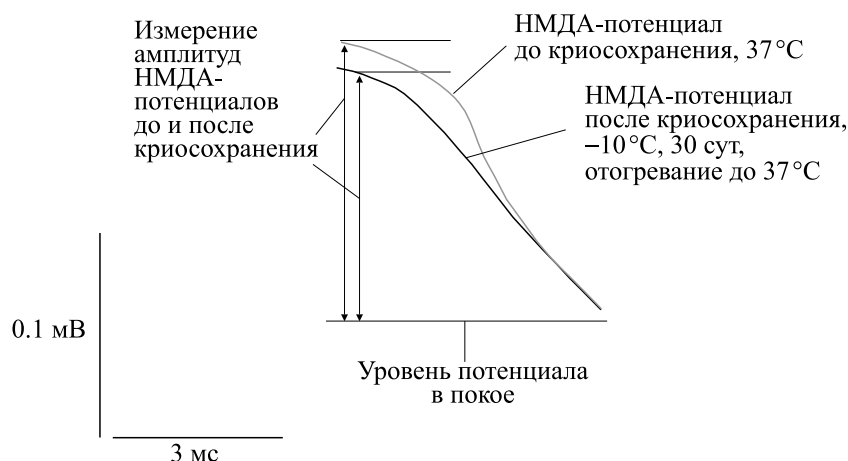


Рис. 7. Изменения НМДА-потенциалов при отогревании после криосохранения (pH_0 инкубационной среды 7.7, 37°C. НМДА-потенциалы представлены в увеличенном масштабе).

хранения происходит ступенчато, что может способствовать сохранению НМДА-механизмов при отогревании.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, проведенные исследования влияния pH_0 инкубационной среды с гибридной буферной системой (карбонатный, фосфатный и трис-буфер) на сохранение и восстановление активности глутаматергических ионотропных НМДА-зависимых механизмов оказались оптимальными для их восстановления после длительного криосохранения срезов. Наряду с использованием гибридной буферной системы восстановлению активности НМДА-механизмов способствовала замена инкубационной среды в процессе замораживания. Солевой состав не менялся, но pH_0 увеличивался до 7.7. Такое изменение pH_0 сопровождалось восстановлением амплитуды НМДА-потенциалов до 84% по сравнению с исходными значениями. Таким образом, использование гибридной буферной системы и увеличение pH_0 инкубационной среды до 7.7 были наиболее оптимальными условиями для восстановления активности НМДА-зависимых механизмов при отогревании после длительного криосохранения (-10°C , 30 суток).

Следует отметить, что в работах, связанных с клеточными культурами, в том числе срезами мозга, применяются другие буферные системы. Так, широко используется буферная система на основе HEPES, который представляет собой цвиттерионный органический буферный агент. HEPES используется главным образом потому, что лучше поддерживает физиологическую величину pH_0 , несмотря на изменения концентрации диоксида углерода (вырабатываемом при кле-

точном дыхании) по сравнению с карбонатным буфером. Положительной характеристикой HEPES является уменьшение диссоциации воды при понижении температуры, что дает основание использовать его при низких температурах. Однако существенным негативным эффектом HEPES является его фототоксичность, когда под воздействием света образуется перекись водорода, которая негативно влияет на функционирование нейронов и синапсов [27–29].

Карбонатная и фосфатная буферные системы также применяются для инкубации срезов мозга. Однако следует отметить, что солевые растворы с карбонатным буфером нестабильны по показателям pH_0 и, как было обнаружено в наших исследованиях, отрицательно влияют на активность НМДА-зависимых механизмов, что выражалось в непредсказуемых изменениях их амплитудных значений как в нормотермических условиях, так и, что особенно важно, после криосохранения срезов мозга.

Что касается фосфатного буфера, то он, в отличие от карбонатного буфера, более стабилен, однако его буферная емкость при понижении температуры инкубационного раствора снижается. Из-за этого использование карбонатного буфера при криосохранении срезов является неоптимальным.

Учитывая ограничения свойств в поддержании кислотно-щелочного равновесия в наших исследованиях, мы применили гибридную буферную систему (карбонатный, фосфатный и трис-буфер) для длительной инкубации срезов мозга и устойчивой регистрации активностей НМДА-механизмов [15]. Трис является эффективным в качестве буфера в широком диапазоне pH_0 от 7.0 до 9.2. Отличительной чертой трис-буфера является то, что значение pK_a уменьшается

приблизительно на 0.03 при снижении температуры на 1°C [30, 31]. Отметим, что диапазон pH_o 7.0–9.0 соответствует физиологическим значениям pH_o для большинства организмов. Такие характеристики трис-буфера делают его оптимальным буфером не только в биохимии и молекулярной биологии, но и для криосохранения нервной ткани в нейробиологии [32–34].

В результате проведенных исследований были выявлены определенные закономерности применения трис-буфера в инкубационном растворе. Происходили изменения pH_o инкубационной среды при отогревании в зависимости от pH_o до криосохранения срезов. Было обнаружено, что при pH_o 7.3, традиционно используемом для сохранения активности НМДА-механизмов в срезах мозга [15], происходило ступенчатое закисление pH_o до значения 6.5. При таком сдвиге pH_o инкубационной среды в процессе отогревания амплитуда НМДА-потенциалов снижалась по сравнению со значениями амплитуд до криосохранения. Мы предположили, что в процессе криосохранения (замораживания/оттаивания) срезов происходит изменение кислотно-щелочного баланса в сторону закисления инкубационной среды. Такой сдвиг pH_o приводит к нарушению функционирования НМДА-зависимых механизмов, что проявляется при отогревании. Для того чтобы избежать такие негативные изменения, нами был использован прием изменения pH_o в процессе замораживания при 20°C до pH_o , равного 7.7. Такой прием был основан на наших предыдущих данных о том, что в диапазоне температур 20–24°C в процессе замораживания срезов они перестают быть чувствительными к гипоксии и другим цитотоксичным воздействиям [13]. Эти данные позволили предположить, что изменения pH_o не повлияют на сохранение активности НМДА-механизмов в процессе криосохранения и последующего отогревания, что и было подтверждено в настоящей работе. Очевидно, такой сдвиг pH_o инкубационной среды протектирует НМДА-зависимые механизмы от негативных влияний процесса криосохранения.

ВЫВОДЫ

Таким образом, использование гибридной буферной системы и увеличение pH_o до 7.7 оптимальны для восстановления активности НМДА-зависимых механизмов при отогревании после длительного криосохранения (–10°C, 30 суток).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность Г.П. Смирновой за помощь при проведении экспериментов

и С.Е. Боровикову за техническую помощь в наладке и обслуживания электрофизиологической установки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 65.2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет 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. J. Ichikawa, R.X. Yamada, and R. Muramatsu, *J. Pharmacol. Sci.* **104**, 387 (2007).
2. Н. А. Ивличева, Автореферат дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2013).
3. Н. А. Ивличева, Е. В. Дмитриева, М. А. Костенко и Э. Н. Гахова, *Биофизика* **49** (4), 710 (2004).
4. Н. А. Ивличева, И. А. Чистопольский, Л. И. Крамарова и Э. Н. Гахова, *Биол. мембраны* **31** (5), 342 (2014).
5. Е. Е. Фесенко (мл.), Е. Л. Гагаринский, А. С. Авенин и др., *Биофизика* **65** (4), 780 (2020).
6. C. B. Morris, *Methods Mol. Biol.* **368**, 227 (2007).
7. S. J. Paynter, *Brain Res. Bull.* **75**, 1 (2008).
8. X.-H. Ma, Y. Shi, and Y. Hou, *Cryobiology*. **60**, 184 (2010).
9. A. A. Mokrushin, *CryoLetters* **36** (6), 367 (2015).
10. A. A. Mokrushin, L. I. Pavlinova, and S. E. Borovikov, *J. Therm. Biol.* **44**, 5 (2014).
11. А. А. Мокрушин и Л. И. Павлинова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **161** (1), 36 (2016).
12. А. А. Мокрушин и С. Е. Боровиков, *Молекуляр. медицина* **15** (2), 14 (2017).
13. А. А. Мокрушин, *Изв. РАН. Сер. биол.* № 1, 67 (2020).
14. E. D. Kanter and L. B. Haberly, *Brain Res.* **525**, 175 (1990).
15. А. А. Мокрушин, Дис. ... д-ра биол. наук (Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, СПб., 1997).
16. T. V. P. Bliss and G. L. Collingridge, *Nature* **361**, 31 (1993).
17. T. P. Obrenovitch and J. Urenjak, *Progr. Neurobiol.* **51**, 39 (1997).

18. S. F. Traynelis and S. D. Cull-Candy, *Nature* **345** (6273), 347 (1990).
19. J. W. McDonald, T. Bhattacharyya, and S. L. Sensi, *J. Neurosci.* **18** (16), 6290 (1998).
20. Y. Buskila, P. Breen, and J. Tapson, *Sci. Rep.* **4**, 5309 (2014).
21. V. A. Ruffin, A. I. Salameh, and W. F. Boron, *Front. Physiol.* **5** (43), 1 (2014).
22. F. Pischcedda, C. Montani, and J. Obergasteiger, *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 81 (2018).
23. U. Bonnet, D. Bingmann, and E. J. Speckmann, *Brain Res.* **1710**, 146 (2019).
24. М. И. Митюшов, Н. А. Емельянов, А. А. Мокрушин и др., *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрхимического исследования* (Наука, Л., 1986).
25. W. H. Hoffman and L. J. Haberly, *Neurosci.* **9** (1), 206 (1989).
26. M. W. Jung, J. Larson, and G. Lynch, *Exp. Brain Res.* **82** (5), 451 (1990).
27. J. L. Lepe-Zuniga, J. S. Zigler, and I. Gery, *J. Immunol. Methods* **103** (1), 145 (1987).
28. A. Penna, D. S. Wang, and J. Yu, *Neurosci.* **34** (32), 10624 (2014).
29. A. K. Chauhan and N. S. Magoski, *J. Neurosci.* **1**, 1460 (2019).
30. A. A. El-Harakany, F. M. Abdel Halima, and A. O. Barakat, *J. Electroanal. Chem.* **162** (1–2), 285 (1984).
31. C. A. Vega, R. A. Butler, and B. Perez, *J. Chem. Eng. Data* **30**, 376 (1985).
32. B. S. Markofsky and B. Sheldon, *Nitro Compounds, Aliphatic in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (New York, 2000).
33. Z. Ghalanbor, N. Ghaemi, and S. A. Marashi, *Prot. Peptide Lett.* **15** (2), 212 (2008).
34. D. Rohanová, D. Horkavcová, and L. Paidere, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **106** (1), 143 (2018).

Optimization of the Acidic-Alkaline Composition of the Incubation Medium for a Long-Term and Reversible Cryopreservation of Brain Slices of Non-Hibernating Animals

A.A. Mokrushin

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

It was found that the activity of the NMDA receptors (bursts of action potentials) was blocked after long-term cryostorage of brain slices at -10°C . To reactivate the NMDA receptors after cryostorage/thawing, alterations in extracellular pH (pH_o) of the incubation medium were studied. It was found that in the pH_o range (7.2–7.4), a stepwise decrease in pH until $\text{pH}_o 6.5 \pm 0.2$ was reached led to acidification of the incubation medium. As a result, NMDA receptor current amplitude decreased to 33%. The use of a hybrid buffer system (carbonate, phosphate, and Tris buffer, $\text{pH}_o 7.7$) prompted reactivation of NMDA receptors. Such a change in pH_o was accompanied by an increase in NMDA spike amplitude up to 84% compared to the initial amplitude (before cryostorage). Thus, the use of the hybrid buffer system and an increase in the pH_o level up to 7.7 were the most optimal conditions for reactivation of NMDA receptors during thawing after prolonged cryopreservation.

Keywords: brain slices, NMDA receptors, cryopreservation, buffer systems

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ДАВЛЕНИЯ ГАЗОВЫХ СМЕСЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ МОНООКСИД УГЛЕРОДА, КИСЛОРОД И АРГОН, НА СОХРАННОСТЬ ТКАНЕЙ СЕРДЦА КРЫСЫ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ

© 2021 г. А.Е. Гурин, Е.Л. Гагаринский, Е.Е. Фесенко (мл.)

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

E-mail: gurinae@pbcras.ru

Поступила в редакцию 25.01.2021 г.

После доработки 12.07.2021 г.

Принята к публикации 08.07.2021 г.

Проведена оценка влияния различных уровней давления газовой смеси монооксида углерода и кислорода на сохранность ткани сердца крысы при пролонгированной гипотермической (4°C) газовой консервации с продолжительностью хранения образцов в течение 24, 36 и 48 ч. При 24-часовой консервации снижение давления газовой смеси CO/O_2 (в соотношении 1:1) с 6.5 до 1.5 атм привело к появлению инфарктных зон ($17.74 \pm 3.5\%$ от всей площади образца) и нарушению сократительной функции желудочков. При этом показатели сохранности сердца после хранения под давлением 3.5 и 6.5 атм достоверно не различались. При 36- и 48-часовой консервации выявлено преимущество давления величиной 6.5 атм по сравнению с давлением 3.5 атм. Уровни инфарктной зоны после 48 ч консервации составили $33.65 \pm 11.96\%$ и $61.92 \pm 6.38\%$ соответственно. Поисковое введение в газовую смесь аргона ($\text{CO:O}_2:\text{Ar} = 2:2:1$) для синергического увеличения уровня органопротекции в экспериментах по консервации сердца под давлением 3.5 атм не выявило значимого улучшения показателя сохранности сердечной ткани. Рассмотрены потенциальные механизмы защитного действия смеси монооксида углерода и кислорода в условиях гипотермической консервации.

Ключевые слова: монооксид углерода, кислород, аргон, сердце, консервация, гипотермия.

DOI: 10.31857/S0006302921050148

Трансплантация органов для многих людей остается единственно возможной процедурой для продления жизни и улучшения ее качества. Несмотря на то что в настоящий момент в мире ежегодно выполняется порядка 154000 трансплантаций [1] (из них в России — порядка 2400 трансплантаций [2]), число пациентов в листах ожидания в четыре-пять раз превосходит число проводимых операций. Сердце является органом, имеющим наименьшее время хранения при использовании стандартных методов статической холодовой консервации (4–6 ч), в отличие от печени (12 ч) и почки (24 ч). Столь малый срок хранения сердца накладывает существенные ограничения на возможность забора данного органа в населенных пунктах, удаленных от крупных медицинских центров, выполняющих пересадки органов. Учитывая, что число таких центров в России ограничено, часть ценного донорского ресурса безвозвратно теряется.

С целью пролонгации сроков гипотермического хранения трансплантатов в последние годы активно развивается направление использования

такого тканевого газового мессенджера, как монооксид углерода (СО). Последний легко проникает через клеточную мембрану, обладает высокой скоростью диффузии в тканях как при физиологических температурах, так и при гипотермии и обладает широким спектром биологических эффектов [3]. В частности, эндогенный СО играет существенную роль в регулировании сосудистого тонуса, функции тромбоцитов и эндотелиальных клеток, апоптоза. Значительное количество доклинических данных указывает на то, что экзогенно введенный СО способен уменьшить ишемически-реперфузионное повреждение, связанное с консервацией и последующей трансплантацией органов [4, 5]. В отдельное направление можно выделить сочетанное использование для консервации органов высоких концентраций монооксида углерода и кислорода. В серии работ на моделях сердца крысы и кролика продемонстрировано существенное преимущество газовой консервации под давлением 4–7 атм [6–10] по критерию предельных сроков консервации (24–72 ч) по сравнению со статической холодовой консервацией в консервирующих раство-

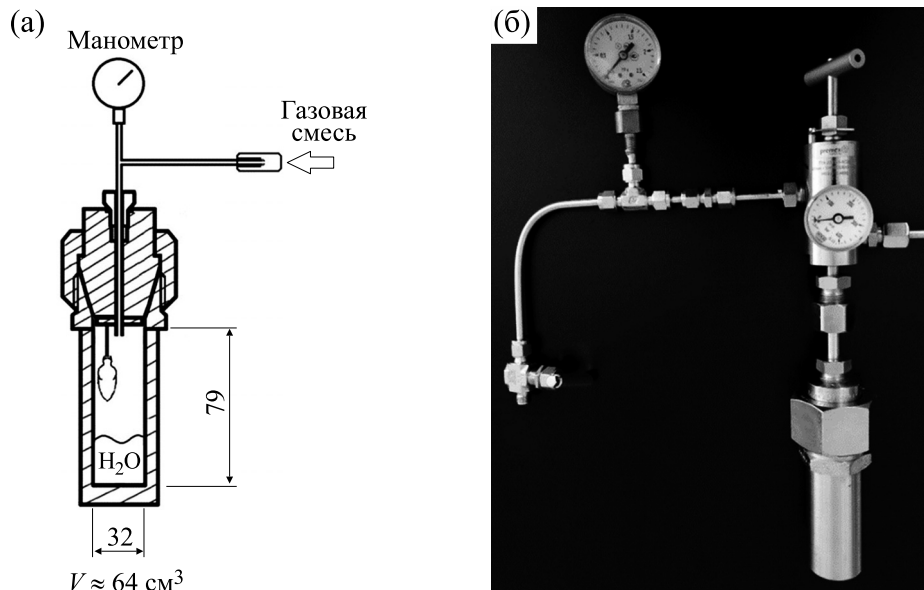


Рис. 1. Камера на основе химического реактора Vivor для гипотермической консервации сердца крысы под давлением газовой смеси: (а) — схема работы, (б) — фотографическое изображение камеры.

рах Кустодиола и Виаспана (4–6 ч). В нашей лаборатории впервые газовая консервация смесью CO и O₂ под давлением 6 атм была успешно использована для сердца барана (масса животных 30–40 кг) [11]. Полученные результаты на модели сердца крупного лабораторного животного подтвердили перспективность данного подхода для пролонгации хранения сердца человека.

Вместе с тем используемые сегодня режимы газовой консервации, вероятно, не являются оптимальными. Так, в работе [12] приводятся экспериментальные данные, указывающие на то, что снижение давление до 3.5 атм может улучшить сохранность тканей сердца при консервации. Одной из целей настоящей работы являлась проверка влияния величины давления газовой смеси в процессе консервации на сохранность тканей сердца крысы.

Другой целью являлась оценка перспектив введения в газовую смесь иных газов с органопротекторными свойствами, в частности аргона, для синергического усиления защитного действия. В отношении данного газа накоплен значительный объем данных, свидетельствующих о его способности оказывать анестезирующие (при давлениях выше 10 атм) и нейропротекторные эффекты, а также снижать зону поражения при инсультах и инфарктах миокарда [13–15]. Консервация почек в аргонсодержащем растворе продемонстрировала преимущества по сравнению с контролем по критериям восстановления диуреза, клиренса креатинина и др. [16, 17]. Аналогичные исследования проводятся и в отношении трансплантации легких [15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 230 ± 25 г ($n = 57$).

После наркотизации крыс смесью, состоящей из 80 мкл препарата «Золетил 100» и 20 мкл препарата «Ксила», животных фиксировали на столике и проводили продольную срединную лапаротомию. Далее в нижнюю полую вену вводили раствор гепарина объемом 1 мл из расчета 50 МЕ/мл. Спустя 5 мин проводили продольную срединную стернотомию и выделяли сердце с частью аорты длиной не менее 1 см. Сердце помещали в охлажденный до 4°C раствор Тироде, вводили в аорту канюлю и фиксировали ее лигатурой. Далее сердце вместе с канюлей помещали в подготовленную для последующей консервации камеру.

Экспериментальную газовую смесь готовили путем смешивания отдельных компонентов в кислородном баллоне объемом 5 л. С помощью газовой магистрали, состоящей из манометра, кранов регуляции подачи газа и крана сброса избыточного давления, последовательно нагнетали до требуемого давления каждый из компонентов смеси (O₂, CO, Ar). В работе использовали газы чистотой не менее 4.0. Все работы с CO проводили в присутствии детекторов угарного газа.

Камеру на основе химического реактора Vivor (Premex, Швейцария) (материал — сталь, см. рис. 1) предварительно охлаждали до температуры 4°C. Для поддержания влажности в камере во время консервации на дно камеры наливали дистиллированную воду до уровня в 1 см. После по-

мещения сердца в камеру проводили продувку последней экспериментальной газовой смесью, с целью вытеснения воздуха. Далее камеру плотно закрывали и нагнетали газовую смесь до достижения требуемого избыточного давления. Камеру помещали в емкость, наполненную водой (4°C) для стабилизации температуры и убирали на хранение в холодильник (4°C). После хранения камеру извлекали из холодильника и проводили дегазацию в течение 15 мин, плавно в ручном режиме сбрасывая давление до атмосферного. Все работы с газом выполняли под вытяжной системой.

В рамках исследования был проведен анализ следующих групп:

1. Группа «Контроль» (6 крыс) — нативное сердце, не подвергавшееся хранению.

2. Группа «Кустодиол» (12 крыс) — хранение в консервирующем растворе Кустодиола при 4°C. Время хранения: 24, 36 и 48 часов.

3. Группа «6.5 АТМ» (12 крыс) — хранение под давлением газовой смеси 6.5 атм, состоящей из СО и О₂ в соотношении 1/1 при 4°C. Время хранения: 24, 36 и 48 часов.

4. Группа «3.5 АТМ» (12 крыс) — хранение под давлением газовой смеси 3.5 атм, состоящей из СО и О₂ в соотношении 1:1 при 4°C. Время хранения: 24, 36 и 48 часов.

5. Группа «1.5 АТМ» (6 крыс) — хранение под давлением газовой смеси 1.5 атм, состоящей из СО и О₂ в соотношении 1:1 при 4°C. Время хранения — 24 часа.

6. Группа «Ar 3.5 АТМ» (9 крыс) — хранение под давлением газовой смеси 3.5 атм, состоящей из СО, О₂ и аргона в соотношении 2:2:1 при 4°C. Время хранения: 24, 36 и 48 часов.

Сердца крыс после консервации подключали к установке ретроградной перфузии по Лангендорфу. Перфузию осуществляли оксигенированным раствором Тироде (37°C) со скоростью 8 ± 2 мл/мин.

Функциональную активность сердца оценивали по максимальному времени работы желудочков сердца на перфузионном стенде до полной остановки сокращений и показателю частоты сердечных сокращений, регистрируемому каждые 15 мин.

Зоны (или очаги) инфаркта миокарда определяли с помощью окрашивания тканей сердца хлоридом трифенилтетразолия. Сердце после консервации реперфузировали на установке для перфузии по Лангендорфу; далее, после 15 мин работы снимали со стенда и охлаждали в течение 2 ч при температуре -10°C; затем получали срезы сердца толщиной 2 мм. Полученные срезы выдерживали в 1%-м растворе хлорида трифенилтетразолия в фосфатном буфере при 37°C в течение

20 мин. Затем помещали срезы в 10%-й формалин на 20 мин для усиления контраста между окрашенными и неокрашенными участками сердечной ткани. Фото срезов получали при помощи стереомикроскопа Leica MZ16A (Leica Microsystems, Германия). Зоны инфаркта в образцах ткани сердца измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ (разработчик W. Rasband) и выражали в процентах от общей площади исследуемого образца.

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, США); данные выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Значимость различий определяли с использованием *U*-критерия Манна-Уитни. Значения с $p < 0.05$ считали статистически значимыми. Также статистическую обработку проводили с использованием линейного регрессионного анализа с построением 95%-го доверительного интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка сохранности изолированного сердца крысы после 24-часовой консервации при различных давлениях газовой смеси СО/О₂. Анализ пяти экспериментальных групп — контрольной с нулевым временем хранения, группы «Кустодиол», хранившейся в стандартном консервирующем растворе Кустодиола 24 ч и трех опытных групп с временем хранения 24 ч под давлением газовой смеси 6.5, 3.5 и 1.5 атм — показал, что общее время работы органа после помещения на стенд и проведения ретроградной перфузии оксигенированным раствором Тироде в группах «Контроль», «6.5 АТМ» и «3.5 АТМ» составило 245 ± 62 , 340 ± 34 и 280 ± 60 мин соответственно. Сократительную активность сердца регистрировали по работе желудочков до их полной остановки (рис. 2а). Показатели частоты сердечных сокращений в контрольной и опытных группах «6.5 АТМ» и «3.5 АТМ» не имели достоверных различий, составив 140 ± 27 уд/мин, 117 ± 40 уд/мин и 153 ± 23 уд/мин соответственно (рис. 2б). В группе «1.5 АТМ» не наблюдалось выраженной сократительной активности желудочков. Сокращения фиксировали только в области предсердий. В группе «Кустодиол» сокращения отсутствовали. Сердце выглядело сжатым, цвет тканей визуально был темнее, чем в контрольной и опытных группах.

Анализ инфарктных зон миокарда в группах «6.5 АТМ» и «3.5 АТМ» практически не выявил пораженных участков (группа «6.5 АТМ» — $2.75 \pm 0.5\%$ и группа «3.5 АТМ» — $1.17 \pm 0.3\%$). В группах «Кустодиол» и «1.5 АТМ», напротив, были отмечены инфарктные зоны, составившие

$60.36 \pm 8.76\%$ и $17.74 \pm 3.5\%$ соответственно (рис. 2в).

Оценка сохранности изолированного сердца крысы при пролонгированной до 48 ч гипотермической консервации под давлением 3.5 и 6.5 атм газовой смеси CO/O₂. Для оценки влияния давления газовой смеси на сохранность тканей сердца мы пролонгировали сроки гипотермической консервации, составившие 24, 36 и 48 ч (с шагом 12 ч). Оценку сохранности тканей сердца проводили только методом окрашивания трифенилтетразолия хлоридом.

Анализ трех экспериментальных групп — «Кустодиол», «6.5 АТМ» и «3.5 АТМ» выявил следующее (рис. 3): в группах «6.5 АТМ» и «3.5 АТМ» при 24-часовом хранении доля инфарктных зон была минимальной, составив $2.75 \pm 0.5\%$ и $1.17 \pm 0.3\%$ соответственно. В группе «Кустодиол», напротив, были отмечены обширные инфарктные зоны на уровне $60.36 \pm 8.76\%$.

После 36 ч консервации показатель повреждения тканей сердца в группе «6.5 АТМ» почти не изменился, составив $1.15 \pm 0.62\%$, а в группе «3.5 АТМ» резко возрос до $68.76 \pm 16.30\%$. Уровень инфарктных зон в группе «Кустодиол» фиксировали на уровне $69.53 \pm 15.09\%$.

При продлении срока консервации до 48 ч наблюдали значительные инфарктные зоны во всех экспериментальных группах: $33.65 \pm 11.96\%$ в группе «6.5 АТМ», $61.92 \pm 6.38\%$ в группе «3.5 АТМ» и $75.27 \pm 12.29\%$ в группе «Кустодиол».

Влияние аргона в составе газовой смеси CO/O₂ на сохранность изолированного сердца крысы в условиях пролонгированной гипотермической консервации. Основываясь на данных об органопротекторных свойствах инертного газа аргона, мы провели сравнительный анализ сохранности тканей сердца при гипотермической консервации под давлением смесей CO/O₂ и CO/O₂/Ar. Соотношение газов в смеси CO/O₂ составило 1:1, в смеси CO/O₂/Ar — 2:2:1; рабочее давление составило 3.5 атм.

Анализ экспериментальных групп «3.5 АТМ» и «Ar 3.5 АТМ» выявил следующее: в группах «3.5 АТМ» и «Ar 3.5 АТМ» при 24-часовом хранении доля инфарктных зон достоверно различалась, составив $1.17 \pm 0.3\%$ и $22.93 \pm 6.08\%$ соответственно (рис. 4).

При продлении срока консервации до 36 и 48 ч наблюдали значительные инфарктные зоны во всех экспериментальных группах: $68.76 \pm 16.30\%$ и $61.92 \pm 6.38\%$ в группе «3.5 АТМ», $47.91 \pm 7.51\%$ и $59.18 \pm 16.34\%$ в группе «Ar 3.5 АТМ». Однако достоверные различия между этими группами не были отмечены.

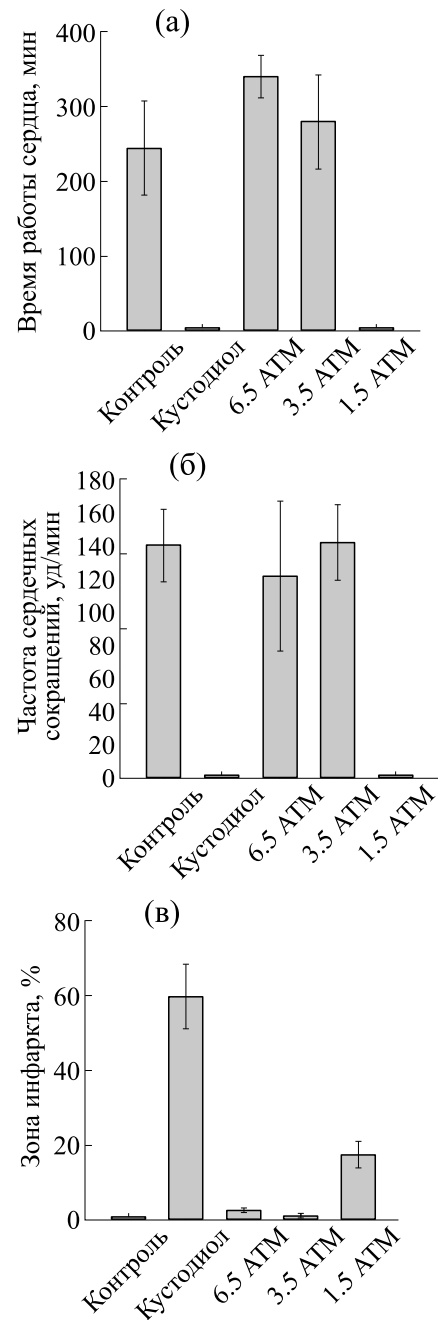


Рис. 2. Анализ сохранности изолированного сердца крысы после 24-часовой консервации при 4°C в группах ($n = 3$) «Кустодиол» — хранение в растворе Кустодиола, «6.5 АТМ», «3.5 АТМ» и «1.5 АТМ» — хранение под давлением 6.5, 3.5 и 1.5 атм газовой смеси CO/O₂. «Контроль» ($n = 3$) — нативное сердце, не подвергнутое процедуре консервации. (а) — Максимальное время работы желудочков сердца до их полной остановки, (б) — частота сердечных сокращений, (в) — площадь инфарктных зон сердца при окрашивании трифенилтетразолия хлоридом. Данные представлены в виде «среднее $\pm$ стандартное отклонение».

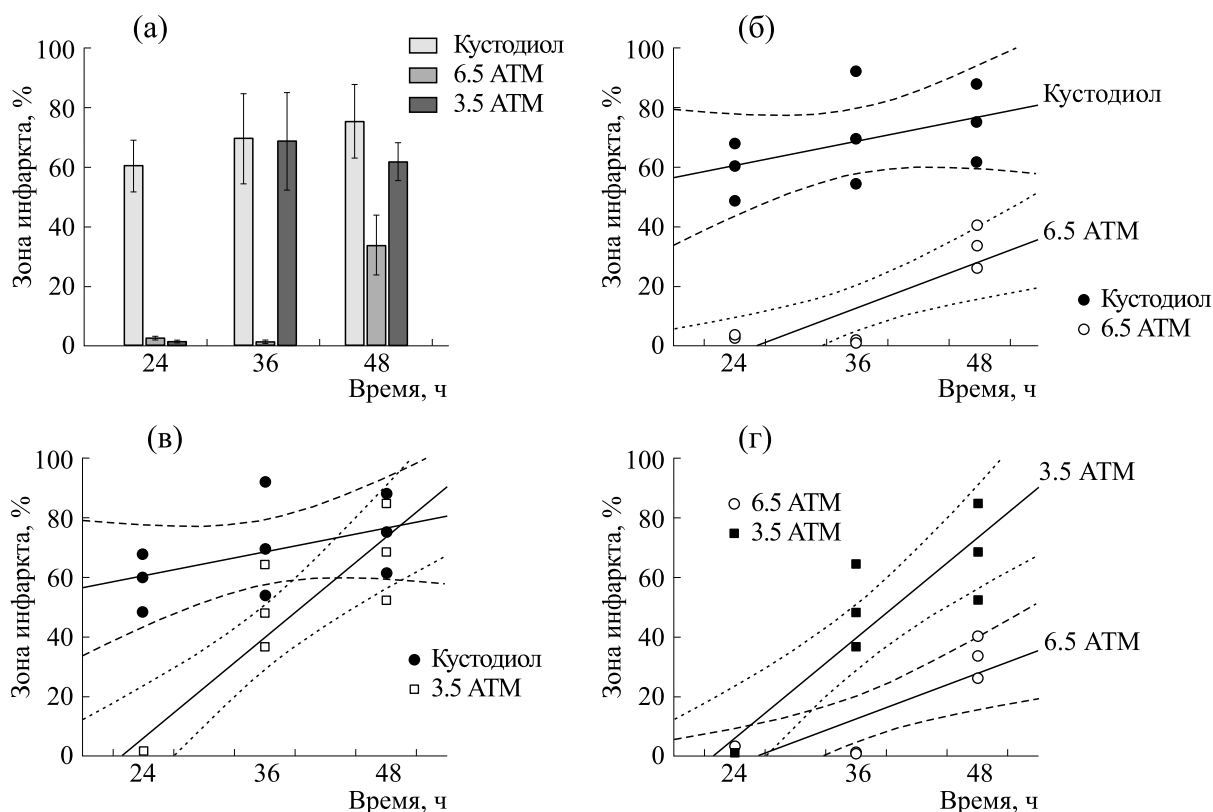


Рис. 3. Анализ сохранности изолированного сердца крысы после 24, 36 и 48 ч консервации при 4°C в группах ($n = 3$) «Кустодиол» — хранение в растворе Кустодиола, «6.5 ATM» и «3.5 ATM» — хранение под давлением 6.5 и 3.5 атм газовой смеси CO/O_2 . (а) — Площадь зоны инфаркта, данные представлены в виде «среднее $\pm$ стандартное отклонение»; (б) — регрессионный анализ групп «Кустодиол» и «6.5 ATM»; (в) — регрессионный анализ групп «Кустодиол» и «3.5 ATM»; (г) — регрессионный анализ групп «6.5 ATM» и «3.5 ATM». Для построенных линий регрессии указан 95%-й доверительный интервал.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время число исследований, подтверждающих перспективность применения монооксида углерода как защитного агента для гипотермической консервации различных органов и прежде всего сердца, увеличивается [18–20]. Можно выделить два основных направления исследований: первое направление связано с изучением протективных эффектов низких концентраций CO , близких к эндогенным уровням этого газа, обеспечиваемым работой клеточных гемоксигеназ; второе направление предусматривает сочетанное использование высокого давления (до 7 атм) газовых смесей монооксида углерода и кислорода, что обеспечивает сохранность сердечной ткани при гипотермическом хранении от 24 до 72 ч (для сердца) [6–12]. Достижимые сроки хранения при втором подходе в разы превышают 4–6 ч, обеспечиваемые стандартной статической холодовой консервацией. Раскрытие механизмов защитного действия, обеспечиваемого сочетанным применением этих двух газов, каждый из которых обладает широким спектром возможных

мишеней на уровне клетки, представляет собой нетривиальную задачу. С учетом этого замечания значительную ценность представляет эмпирический подбор оптимальных условий для достижения наибольшего защитного эффекта, по критериям состава и уровня давления газовой смеси. Такой подход помимо практической пользы позволит сузить направление поисков механизмов, лежащих в основе рассматриваемого феномена.

В нашем исследовании показано, что при гипотермической газовой консервации в течение 24 ч понижение уровня давления газовой смеси CO/O_2 1:1 с 6.5 до 1.5 атм привело к появлению инфарктных зон и нарушению сократительной функции желудочков. При этом показатели сердец, которые хранили под давлением 3.5 и 6.5 атм, достоверно не различались. Таким образом, уровень давления 3.5 атм был признан пороговым, ниже которого не имеет смысла опускаться в дальнейших экспериментах. Отрицательные данные, полученные при хранении сердца в консервирующем растворе Кустодиола, были ожидаемы с учетом того, что данные сроки хранения в четы-

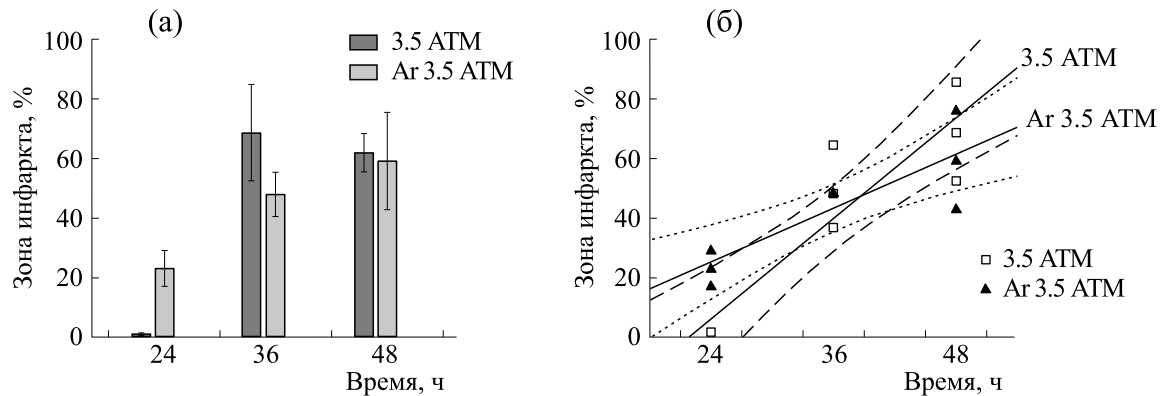


Рис. 4. Анализ сохранности изолированного сердца крысы после 24, 36 и 48 ч консервации при 4°C в группах ($n = 3$) «3.5 ATM» — хранение под давлением 3.5 атм газовой смеси CO/O₂ (1:1) и «Ar 3.5 ATM» — хранение под давлением 3.5 атм газовой смеси CO/O₂/Ar (2:2:1). (а) — Площадь зоны инфаркта, данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; (б) — регрессионный анализ групп «3.5 ATM» и «Ar 3.5 ATM». Для построенных линий регрессии указан 95%-й доверительный интервал.

ре раза превышают допустимые для данного раствора.

Мы изначально предполагали, что уровень инфарктной зоны при пролонгации гипотермического хранения с 24 до 36 и 48 ч также окажется сходным в условиях давления 3.5 и 6.5 атм. Однако результаты оказались иными. Уровень инфарктной зоны при 36-часовой консервации под избыточным давлением 6.5 атм был приближен к показателям интактного контроля, тогда как под давлением 3.5 атм — резко возрос до показателей группы «Кустодиол». Из этого можно сделать вывод, что при пролонгации времени хранения с одновременным понижением избыточного давления до 3.5 атм органопротекторные свойства газовой смеси снижаются. При увеличении срока хранения до 48 ч наблюдали увеличение площади инфарктной зоны в группе «6.5 ATM» до 20–40% от всей площади образца, а также одинаково высокий уровень повреждений — 50–70% в группах «Кустодиол» и «3.5 ATM». Полученный результат отличается от данных, приведенных в работе [12], где было показано незначительное преимущество аналогичной смеси под давлением 3.5 атм при 48-часовом хранении по сравнению с давлением 7 атм. Различия в результатах могут быть обусловлены применением разных методик постановки консервации (промывка сердца, камера, время дегазации и др.) и/или способом анализа сохранности сердец (гетеротопическая трансплантация). Для окончательной верификации оптимальных значений давления могут потребоваться дополнительные исследования на большей выборке.

Следует отметить, что поисковое введение в газовую смесь аргона для увеличения уровня органопротекции [14, 15] в экспериментах по консервации сердца под давлением 3.5 атм не выяви-

ло значимых улучшений сохранности сердечной ткани. Однако это может быть обусловлено как низким уровнем положительного влияния самого аргона, так и снижением количеств ключевых компонентов смеси — монооксида углерода и кислорода — ниже оптимального уровня. Для окончательного исключения аргона как перспективного компонента консервирующих газовых смесей запланированы эксперименты под повышенным давлением.

Обсуждая перспективы применения газовых смесей в области трансплантации органов, нельзя не затронуть потенциальные механизмы сочетанного действия CO и O₂, ведь раскрытие этих механизмов в перспективе позволит «проектировать» оптимальные условия консервации. Основными молекулярными мишенями высоких концентраций CO вероятнее всего являются металлосодержащие (железо, медь, цинк и др.) белки. Железо — самый распространенный элемент переходных металлов в организме, и содержится в гемоглобине (66%), миоглобине (3%), гемсодержащих ферментах (0.1%), накоплениях в виде внутриклеточного ферритина (30%) и внеклеточного трансферрина (0.1%) [21]. Гемсодержащие ферменты играют решающую роль в регулировании клеточной функции и включают каталазу, циклооксигеназу, цитохром *c*, цитохром P450, цитохром-*c*-оксидазу, гуанилатциклазу, НАДФН-оксидазу, NO-синтазы и ряд других ферментов. Показано, что монооксид углерода ингибирует цитохром-*c*-оксидазу [22] и цитохром *c* [23]. Было показано, что прогрессирующее ингибирование активности цитохром-*c*-оксидазы повышенным воздействием концентраций CO может привести к общему снижению функции дыхательной цепи митохондрий [24]. Таким образом, функция CO *in vivo* может быть опосредована связыванием с гемсодер-

жащими ферментами. При этом в условиях, когда орган отмыт от крови и лишен пула гемоглобина, связывание с последними может протекать эффективнее. Ключевыми органеллами клетки, на которые воздействует СО, являются митохондрии [25], так как значительная часть гемосодержащих ферментов сосредоточена именно там. Также косвенное наблюдение говорит о том, что защитное действие СО лучше реализуется в тканях с высоким содержанием митохондрий. Так, количественное содержание белковых комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий снижается в ряду сердце > почки > легкие [26]. Для цитохром-с-оксидазы количественное содержание в этих тканях составляет соответственно 90, 60 и 30% от максимального. При этом отмеченное увеличение предельных сроков консервации с использованием газовой смеси СО и О₂ оказалось максимальным для сердца и менее выраженным для почек [27] или печени (данные не опубликованы). Связывание и ингибирование ряда ключевых митохондриальных ферментов монооксидом углерода теоретически должно приводить к снижению энергетической функции митохондрий и падению продукции АТФ.

Кислород, с другой стороны, является важнейшим элементом биоэнергетики клетки. Митохондрии принято называть внутриклеточными «энергетическими станциями», так как их функцией является извлечение энергии из органических соединений (субстратов) и кислорода, который их окисляет. Нужно подчеркнуть, что энергия извлекается не только из субстратов, но и непосредственно из кислорода, который, присоединяя протоны и электроны, дает в итоге воду с высвобождением заметной энергии [28]. При анаэробных процессах высвобождается гораздо меньше энергии, чем при аэробных. Перфузия органов газообразным кислородом (персуфляция) как метод снижения повреждений при тепловой и холодовой ишемии имеет длительную историю [29]. Недавно Университетом Ньюкасла был представлен прототип аппарата, использующего метод кислородной персуфляции для сохранения жизнеспособности трансплантатов [30]. Таким образом, можно предположить два разнонаправленных действия, оказываемых смесью газов на клеточное дыхание, что в итоге приводит к поддержанию определенного предположительно сниженного, но стабильного уровня аэробного метаболизма в процессе консервации. Поддержание последнего не дает клеткам переключиться на анаэробный тип дыхания, сопровождающийся накоплением молочной кислоты, снижением продукции АТФ и далее каскадом гипоксических нарушений. В недавней работе [10] было показано, что уровень АТФ в тканях сердца, подвергнутых 24-часовой газовой консервации смесью СО/О₂ ($\approx 1.5 \times 10^{-5}$ ммоль/г), превышает уровень АТФ контрольной группы

сердец, хранившейся в консервирующем растворе Виаспана ($\approx 5.0 \times 10^{-6}$ ммоль/г), и не уступает показателям интактного контроля. В то же время анализ метаболической карты выявил накопление молочной кислоты в контроле (Виаспан) по сравнению с опытом. В целом в работе делается вывод о сохранении тканями в процессе газовой консервации аэробного метаболизма, продукции АТФ и снижении окислительного стресса. В рамках сформулированной гипотезы, снижение эффективности консервации при понижении давления может быть связано с расходом кислорода в процессе консервации и постепенным изменением соотношения газов в смеси. Мы планируем проверить это предположение в ближайшем будущем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90132/20 от 18 августа 2020 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 2010/63/EU.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Global Observatory on Donation and Transplantation*. URL: <http://www.transplant-observatory.org>
2. С. В. Готье и С. М. Хомяков, Вестн. трансплантологии и искусственных органов **22** (2), 8 (2020).
3. Е. Г. Старикова, Дис. ... докт. мед. наук (Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 2014).
4. S. Ozaki, I. Kawase, H. Yamashita, et al., *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **12** (4), 550 (2011).
5. C. Steiger, J. Wollborn, M. Gutmann, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **97**, 96 (2015).
6. A. Nakao, J. S. Neto, S. Kanno, et al., *Am. J. Transplant.* **5** (2), 282 (2005).
7. N. Hatayama, M. Naito, S. Hirai, et al., *Cell Transplant.* **21** (2), 609 (2012).
8. N. Hatayama, M. Inubushi, M. Naito, et al., *Sci. Rep.* **6**, 32120 (2016).
9. C. Suzuki, N. Hatayama, T. Ogawa, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **21** (22), 8858 (2020).
10. P. Y. Zhou, Z. Zhang, Y. L. Guo, et al., *Transplant. Proc.* **47** (9), 2746 (2015).
11. Е. Е. Фесенко, Е. Л. Гагаринский, А. С. Аверин и др. *Биофизика* **65** (4), 1 (2020).

12. N. Hatayama, S. Hirai, K. Fukushige, et al., *Sci. Rep.* **9** (1), 7480 (2019).
13. D. S. Nowrangi, J. Tang, and J. H. Zhang, *Med. Gas Res.* **4** (1), 3 (2014).
14. S. G. Nair, *Ann. Card. Anaesth.* **22** (2), 111 (2019).
15. F. Nespoli, S. Redaelli, L. Ruggeri, et al., *Ann. Card. Anaesth.* **22**, 122 (2019).
16. Y. Irani, J. L. Pype, A. R. Martin, et al., *Nephron Extra* **1** (1), 272 (2011).
17. A. Faure, L. Bruzzese, J. G. Steinberg, et al., *J. Transl. Med.* **14**, 40 (2016).
18. A. Nakao and Y. Toyoda, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13** (6), 827 (2012).
19. S. Ozaki, I. Kawase, H. Yamashita, et al., *Circ. J.* **79** (7), 1504 (2015).
20. V. L. Mahan, *Med. Gas Res.* **10** (1), 37 (2020).
21. K. S. Ozaki, S. Kimura, and N. Murase, *Transplant. Rev.* **26** (2), 125 (2012).
22. B. S. Zuckerbraun, B. Y. Chin, M. Bilban, et al., *FASEB J.* **21**, 1099 (2007).
23. T. Leemann, P. Bonnabry, and P. Dayer, *Life Sci.* **54**, 95 (1994).
24. J. R. Alonso, F. Cardellach, and S. López, *Pharmacology & Toxicology* **93**, 142 (2003).
25. A. S. Almeida, C. Figueiredo-Pereira, and H. L. Vieira, *Front. Physiol.* **6**, 33 (2015).
26. K. L. McLaughlin, J. T. Hagen, H. S. Coalson, et al., *Sci. Rep.* **10**, 17599 (2020).
27. T. Abe, K. Yazawa, M. Fujino, et al., *Lab. Invest.* **97** (4), 468 (2017).
28. Н. Л. Векшин, *Биофизика митохондрий («Фотон-Век», Пушино, 2019).*
29. T. M. Suszynski, M. D. Rizzari, W. E. Scott, et al., *J. Cardiothorac. Surg.* **8**, 105 (2013).
30. *Novel organ preservation device to reduce transplant waiting list.* URL: <https://www.ncl.ac.uk/press/articles/latest/2020/08/scubatxorganpreservationdevice/>

Effects of Pressures of Gas Mixtures Containing Carbon Monoxide, Oxygen and Argon on the Preservation of Rat Heart Tissues in Hypothermic Conditions

A.E. Gurin, E.L. Gagarinsky, and E.E. Fesenko (Jr.)

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

The effects of different pressures of carbon monoxide-oxygen gas mixtures on the preservation of the rat heart tissue after prolonged hypothermia throughout 24-, 36- and 48-hour storage period at 4°C were evaluated. During 24-hour storage, a decrease in the pressure of the CO/O₂ gas mixture (1:1) from 6.5 to 1.5 atm resulted in the appearance of infarct zones ($17.74 \pm 3.5\%$ of the sample mass), and impaired ventricular contractile function. At the same time, preservation rates of hearts stored at 3.5 and 6.5 atm did not differ significantly. During 36- and 48-hour storage, it was found that a pressure of 6.5 atm had a predominant effect over that of 3.5 atm. After 48-hour storage, the infarct sizes were $33.65 \pm 11.96\%$ and $61.92 \pm 6.38\%$, respectively. The exploratory introduction of argon into the CO/O₂ gas mixture (the CO/O₂/Ar ratio = 2:2:1) aimed to synergistically increase the level of myocardial protection in experimental studies at 3.5 atm did not significantly improve cardiac tissue preservation. The potential mechanisms of the protective action of the mixture of carbon monoxide and oxygen in hypothermic conditions were considered.

Keywords: carbon monoxide, oxygen, argon, heart, preservation, hypothermia

ВЛИЯНИЕ ГИБЕРНАЦИИ НА МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ НЕОКОРТЕКСА ЯКУТСКОГО СУСЛИКА *Spermophilus undulatus*

© 2021 г. Л.Н. Маркевич, О.В. Быкова, А.А. Лахина, И.К. Коломийцева

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

E-mail: lnmarkevich@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2020 г.

После доработки 09.11.2020 г.

Принята к публикации 18.07.2021 г.

Показано влияние гибернации на количество индивидуальных фосфолипидов и нейтральных липидов, а также состояний оцепенения (спящие суслики) и выхода из него (зимние активные суслики) на синтез липидов в ткани неокортекса. Обнаружено снижение количества жирных кислот и диглицеридов в неокортексе активных сусликов по сравнению с летними. Включение метки в ткань и липиды неокортекса у пробудившихся сусликов было уменьшено на 25%, что объясняется снижением концентрации ^{14}C -ацетата за счет использования ацетата в процессе дыхания у пробудившихся сусликов. Липиды неокортекса суслика *Spermophilus undulatus* принимают участие в адаптации к гипобиозу путем роста количества общей фракции фосфолипидов и модификации фосфолипидного состава с увеличением долей фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола и фосфатидилсерина.

Ключевые слова: якутский суслик *Spermophilus undulatus*, гибернация, неокортекс, липиды.

DOI: 10.31857/S000630292105015X

Некоторые виды млекопитающих переживают неблагоприятные условия окружающей среды (холод, отсутствие пищи) впадением в естественное гипометаболическое состояние — естественный гипобиоз (зимнюю спячку) — в форме баута гибернации с последующим самостоятельным восстановлением жизнедеятельности [1]. Гибернация — зимняя спячка млекопитающих — рассматривается как фенотипическая адаптация метаболизма к низким температурам, за счет которой происходит существование при резком снижении обмена веществом и энергией с окружающей средой [2]. Зимней спячке предшествует перестройка энергетического метаболизма, важным звеном которой является переход на использование липидов взамен углеводов в качестве энергетического субстрата, в основном свободных жирных кислот и их метаболитов, образующихся за счет липолиза триглицеридов [3]. Важным адаптационным приспособлением у зимоспящих животных служит развивающаяся в прегибнационном периоде гиперфагия, приводящая к накоплению запасов жирных кислот в виде триглицеридов в жировых депо — в белом и

буrom жире; жирные кислоты и моноглицериды освобождаются из триглицеридов под действием активированных липаз [4]. Головной мозг — главный регулирующий орган гибернации у зимоспящих млекопитающих, и переход к гибернации контролируется центральной нервной системой с включением эндокринных систем и внутриклеточной регуляции [5, 6]. Кора головного мозга млекопитающих обладает собственными системами синтеза основных липидов и в то же время снабжается липидами плазмы крови, которая является источником питательных веществ для клеток всех органов и тканей [7, 8]. У якутского суслика *Spermophilus undulatus* в гибернационный период, состоящий из чередования длительного сна (баут спячки) и короткого пребывания в активном состоянии (интербаут), во время сна интенсивность потребления кислорода снижается почти в 100 раз, а температура тела падает до -2°C , возвращаясь к 37°C при пробуждении [9]. Показано, что фенотипическая адаптация млекопитающих к экстремальным условиям среды обитания проявляется в специфических изменениях липидного обмена [10, 11]. Определены глубокие изменения липидов в органеллах клеток печени при гибернации якутского суслика *S. undulatus* [12].

Сокращения: ФХ — фосфатидилхолин, ФС — фосфатидилсерин, ФИ — фосфатидилинозитол, МГ — моноглицериды, ОФФЛ — общая фракция фосфолипидов, ОФЛ — общая фракция липидов.

Сведения о влиянии гибернации на метаболизм липидов мозга млекопитающих немногочисленны. Показано, что в неокортексе суслика *S. undulatus* состояние оцепенения (спячка) сопровождалось падением количества холестерина в гомогенате ткани и в микросомальной фракции неокортекса; отмечалось повышенное количество фосфатидилхолина у гибернирующих животных и высокий уровень сфингомиелина — у летних [13]. Отсутствуют сведения о влиянии гибернации на ферменты синтеза жирных кислот и холестерина, а также ацилирование фосфолипидов и глицеридов в нервной ткани. Представляет интерес исследование синтеза липидов неокортекса гибернирующих животных, способных переносить высокие концентрации жирных кислот в крови в течение почти полугодового периода зимней спячки [14]. Ацетил-КоА используется для синтеза холестерина и жирных кислот, и экзогенный ацетат является прямым предшественником синтеза этих липидов. При исследовании включения меченого по ^{14}C ацетата в липиды гомогената неокортекса можно получить данные о влиянии состояний оцепенения и выхода из него животных в ходе гибернации на активность лимитирующих ферментов синтеза холестерина — оксиметилглутарил-КоА-редуктазы, а также синтеза жирных кислот и ацилтрансфераз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелых длиннохвостных сусликов *Spermophilus undulatus* массой 400–800 г отлавливали летом в районе г. Якутска. Условия отлова, содержания и мониторинг состояния сусликов описаны ранее [13, 15]. Эксперименты проводили с двумя группами зимних сусликов: первая группа — зимние спящие, находящиеся в состоянии спячки (оцепенения, декабрь–февраль), которых декапитировали в середине гибернационного баута при температуре тела от 1 до 7°C (средняя температура тела 4.2°C), вторая группа — активные животные (зимние суслики после выхода из оцепенения). Активных животных использовали между баутами спячки, их забивали через 4 ч после пробуждения при температуре тела 37°C. Третью группу составляли летние суслики, взятые в июне–июле и находящиеся в состоянии нормотермии. Сусликов декапитировали согласно принятым в Учреждении РАН Институте биофизики клетки РАН правилам [16].

Кору больших полушарий головного мозга суслика *S. undulatus* быстро извлекали, взвешивали и гомогенизировали в 10 объемах среды инкубации, содержащей 0.32 М сахарозы, 0.01 М трис- HCl , 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭДТА, pH 7.4, все операции проводили при 4°C. Аликвоты гомогената отбирали на определение количества белка, экс-

тракцию и хроматографию липидов, а также на определение содержания нейтральных липидов и фосфолипидов до инкубирования. Радиоактивный предшественник синтеза липидов ткани ^{14}C -ацетат натрия с удельной активностью 1.8 ГБк/моль добавляли в гомогенат в концентрации 0.74 МБк/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, периодически осторожно встряхивая. После отмывания гомогената от невключенной радиоактивной метки немеченым ацетатом натрия определяли динамику ее включения в жирнокислотные цепи различных классов липидов за время инкубации. Все процедуры по экстракции липидов, тонкослойной хроматографии нейтральных липидов и фосфолипидов, определению количества белка и липидов до включения ^{14}C -ацетата в гомогенат неокортекса и после инкубации проводили по ранее описанным методам [17, 18]. Индивидуальные липиды после элюирования с силикагелевых хроматограмм перерастворяли в определенном объеме хлороформа–метанола. Часть липидного экстракта использовали для определения количества липидов, отбирали аликвоты для измерения общей и удельной радиоактивности. Подсчет радиоактивности выполняли на сцинтиляционном счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция). Общую радиоактивность рассчитывали в имп/мин на 1 мг белка, удельную радиоактивность — в имп/мин на 1 мкг липида. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (Tukey Test). Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние состояний оцепенения и активности гибернирующих якутских сусликов *Spermophilus undulatus* на содержание фосфолипидов и нейтральных липидов в ткани неокортекса по сравнению с количеством у летних животных представлено в табл. 1. При сравнении данных результатов с полученными ранее [13, 19] отмечаются незначительные отличия по количеству общих и индивидуальных фосфолипидов в неокортексе зимних сусликов по сравнению с летними. По нашим данным, в зимний период у спящих и активных сусликов по сравнению с летними гибернация сопровождается ростом содержания фосфолипидов в общей фракции (ОФФЛ) в 1.3 раза, фосфатидилхолина (ФХ) — в два раза, фосфатидилсерина (ФС) — в полтора раза, фосфатидилинозитола (ФИ) — в полтора–два раза. Содержание фосфатидилэтаноламина, сфингомиелина и кардиолипина в ткани неокортекса у гибернирующих сусликов не изменяется по сравнению с летними животными. Количество лизофосфатидилхолина снижено у спящих и активных сусликов по отношению к летним на 40 и 50% соответ-

Таблица 1. Количество липидов в неокортексе якутских сусликов *S. undulatus* в летний и зимний периоды

Липиды	Летние суслики, температура тела 37°C	Зимние суслики	
		Спящие, температура тела 4°C	Активные, температура тела 37°C
Общие фосфолипиды	417.2 ± 18.2	550.3 ± 37.0*	462.3 ± 25.0
Сфингомиелин	56.4 ± 7.1	45.8 ± 7.0	43.4 ± 6.1
Фосфатидилхолин	100.8 ± 14.2	217.1 ± 15.5*	187.5 ± 8.3*
Фосфатидилсерин	53.6 ± 3.1	86.8 ± 4.0*	78.3 ± 10.1*
Фосфатидилинозитол	14.4 ± 1.2	28.4 ± 4.0*	23.8 ± 1.0*
Кардиолипид	15.6 ± 1.9	10.9 ± 2.6	13.7 ± 2.7
Фосфатидилэтаноламин	138.3 ± 9.7	156.4 ± 10.3	135.3 ± 17.0
Лизофосфатидилхолин	27.6 ± 4.1	16.9 ± 2.6*	12.6 ± 2.9*
Холестерин	139.5 ± 10.6	111.5 ± 6.3*	156.4 ± 13.0*#
Жирные кислоты	38.8 ± 6.6	24.5 ± 4.6	15.6 ± 2.9*
Моноглицериды	10.6 ± 1.6	14.1 ± 0.5#	9.8 ± 1.8
Диглицериды	10.4 ± 1.3	8.4 ± 2.0	6.1 ± 0.9*
Триглицериды	28.4 ± 2.5	38.6 ± 3.3	27.6 ± 2.5
Холестерин/фосфолипиды, М/М	0.63 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.68 ± 0.06
Белок, мг на 1 г ткани	63.1 ± 1.3	80.4 ± 4.3*	77.6 ± 1.1*

Примечание. Количество липидов указано в мкг липида на мг белка), $n = 4$. * — Отличие от летних сусликов достоверно, $p < 0.05$; # — отличие от спящих зимних сусликов достоверно, $p < 0.05$.

ственно. По нашим данным, при гибернации у зимних сусликов по отношению к летним количество ФХ, ФИ и ФС увеличено, количество сфингомиелина, кардиолипина и фосфатидилэтаноламина такое же, как и у летних, количество лизофосфатидилхолина существенно снижено. Этот эффект, возможно, связан с изменением метаболизма липидов неокортекса в связи с активацией функций при пробуждении. Фосфолипидный состав неокортекса гибернирующих сусликов также изменен по сравнению с летними и характеризуется подавляющим преобладанием количества ФХ — (40 моль% от суммы фосфолипидов), возрастанием долей ФХ, ФС, ФИ в полтора-два раза, уменьшением долей лизофосфатидилхолина и сфингомиелина в два раза; доли фосфатидилэтаноламина и кардиолипина не изменились (табл. 2). Можно полагать, что фосфолипиды неокортекса суслика *Spermophilus undulatus* принимают участие в адаптации к гипобиозу путем изменения фосфолипидного состава. У зимних животных (спящих и активных) в неокортексе наблюдаются противоположные изменения содержания нейтральных липидов (табл. 1). Количество холестерина, в соответствии с данными работы [13], уменьшается на 30% у сусликов при

спячке, повышаясь при переходе животных в активное состояние. Количество жирных кислот и диглицеридов в неокортексе активных сусликов по сравнению с летними достоверно (в 2.5 раза) уменьшено. Содержание моноглицеридов и триглицеридов незначительно повышается в неокортексе у спящих сусликов, у активных остается на уровне летних. Можно предположить, что рост количества ФХ, ФС, ФИ и снижение содержания жирных кислот и диглицеридов входит в систему адаптации фосфолипидов неокортекса к существованию животного в условиях гибернации как повреждающего воздействия.

В период бодрствования, продолжающегося в течение 24–48 ч, в тканях суслика показана активация ферментов новообразования глюкозы [20]. Использование глицерола для синтеза моно- и триглицеридов у активных сусликов может быть снижено. Возможно, моно- и триглицериды накапливаются в неокортексе спящих сусликов, принимая участие в гибернационном бауэте.

Интенсивность образования липидов оценивали по количеству включенной в ткань и липиды неокортекса суслика *S. undulatus* радиоактивной метки (^{14}C -ацетат) после инкубации проб *in vitro*

Таблица 2. Влияние гибернации на фосфолипидный состав неокортекса якутских сусликов *S. undulatus* в летний и зимний периоды

Фосфолипиды	Летние суслики, температура тела 37°C	Зимние суслики	
		Спящие, температура тела 4°C	Активные, температура тела 37°C
Лизофосфатидилхолин	6.6 ± 1.0	3.1 ± 0.6*	2.9 ± 0.6*
Сфингомиелин	13.5 ± 3.0	8.3 ± 1.3	10.6 ± 1.5
Фосфатидилхолин	21.1 ± 3.4	41.2 ± 3.0*	43.4 ± 5.0*
Фосфатидилсерин	12.8 ± 0.7	15.8 ± 2.3*	18.2 ± 2.7*
Фосфатидилинозитол	3.4 ± 0.5	5.2 ± 0.7*	5.6 ± 0.2*
Кардиолипид	3.7 ± 0.5	2.0 ± 0.4	3.2 ± 0.6
Фосфатидилэтаноламин	33.1 ± 3.6	28.4 ± 1.8	31.1 ± 3.6

Примечание. Количество фосфолипидов указано в моль% фосфолипида по отношению к общим фосфолипидам, $n = 4$. * — Отличие от летних сусликов достоверно, $p < 0.05$.

(табл. 3). Включение метки в ткань неокортекса у спящих сусликов увеличено на 40% по сравнению с активными. Основная часть меченого ацетата включилась в общую фракцию липидов (ОФЛ) неокортекса, включение метки в общую фракцию фосфолипидов у спящих сусликов увеличено на 45%. Уровень включения метки в общие липиды (ОФЛ) и общую фракцию фосфолипидов (ОФФЛ) был выше у спящих животных. Включение метки в ткань и липиды неокортекса у пробудившихся сусликов было уменьшено на 25%, что объясняется снижением концентрации ^{14}C -ацетата за счет использования ацетата в процессе дыхания у пробудившихся сусликов.

Меченые жирные кислоты включаются в фосфолипиды путем реакций ацилирования. Модификация жирнокислотных участков фосфолипидов играет большую роль в функциональной активности целой молекулы [21].

Показано, что в зимний период количество холестерина в неокортексе спящих сусликов уменьшилось, удельная радиоактивность не отличалась достоверно у спящих и активных животных (табл. 1 и 4). Этот феномен представляет особый

интерес для анализа состояния регуляции сигнальных систем при гибернации. Регуляция синтеза холестерина осуществляется холестерином — конечным продуктом синтеза — по принципу обратной связи через холестеролзависимые ферменты и переносчиков в эндоплазматическом ретикулуме и в аппарате Гольджи с участием транскрипционных факторов, индуцирующих в ядре образование мРНК для синтеза лимитирующего фермента синтеза холестерина оксиметилглутарилредуктазы и ферментов ее катаболизма [22]. Из анализа результатов следует, что уменьшение количества холестерина в неокортексе спящих сусликов, показанное ранее [13], не вызывает активации синтеза холестерина и, следовательно, не индуцирует образование оксиметилглутарилредуктазы. Фенотипическая адаптация млекопитающих к гипобиозу в условиях зимней спячки включает в себя подавление индукции лимитирующего фермента синтеза холестерина — оксиметилглутарилредуктазы — в неокортексе. Таким образом, в неокортексе регуляторные связи метаболизма холестерина включены в адаптацию млекопитающих к действию экстремальных условий

Таблица 3. Включение ^{14}C -ацетата в ткань неокортекса, а также в общую фракцию липидов и фосфолипидов неокортекса суслика *S. undulatus* в зимний период

Состояние животных	Радиоактивность, имп/мг белка		
	Ткань неокортекса	ОФЛ	ОФФЛ
Спящие	6721.0 ± 530.4*	2579.6 ± 315.9*	1711.0 ± 149.2*
Активные	4656.0 ± 600.2	1577.2 ± 71.3	1171.4 ± 93.4

Примечание. * — Отличие от активных сусликов достоверно, $p < 0.05$; $n = 4$.

Таблица 4. Удельная радиоактивность липидов неокортекса спящих и активных якутских сусликов *S. undulatus*

Липиды	Удельная радиоактивность, имп/мин/мкг липида	
	Спящие суслики	Активные суслики
Лизофосфатидилхолин	$6.8 \pm 0.5^*$	3.0 ± 0.3
Сфингомиелин	2.4 ± 0.1	2.7 ± 0.2
Фосфатидилхолин	1.5 ± 0.3	1.1 ± 0.4
Фосфатидилсерин	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.1
Фосфатидилинозитол	3.8 ± 0.9	2.3 ± 0.1
Фосфатидилэтаноламин	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2
Кардиолипид	4.9 ± 3.5	1.5 ± 1.2
ОФЛ	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.2
Холестерин	0.3 ± 0.03	1.0 ± 0.08
Свободные жирные кислоты	1.8 ± 1.3	1.7 ± 1.0
Диглицериды	3.0 ± 0.6	2.0 ± 0.1
Моноглицериды	$7.8 \pm 0.4^*$	5.6 ± 0.2
Триглицериды	2.5 ± 1.8	1.6 ± 1.0

Примечание. Количество фосфолипидов указано в моль% фосфолипида по отношению к общим фосфолипидам, $n = 4$. * — Отличие от летних сусликов достоверно, $p < 0.05$.

окружающей среды. Удельная радиоактивность по ^{14}C -ацетату была выше у лизофосфатидилхолина и моноглицеридов (табл. 4). Лизофосфатидилхолин служит промежуточным звеном образования фосфатидной кислоты — ключевого интермедиата синтеза фосфолипидов. Большую часть моноглицеридов мозга представляет арахиданоилглицерид [23]. Увеличение удельной радиоактивности лизофосфатидилхолина и моноглицеридов у спящих сусликов подтверждает представление о специфической активации ферментов ацилирования глицеридов при оцепенении в ходе гибернации млекопитающих.

ВЫВОДЫ

Получены данные о влиянии гибернации на количество индивидуальных фосфолипидов и нейтральных липидов и состояний оцепенения (спящие суслики) и выхода из него (активные) на синтез липидов в ткани неокортекса якутского суслика *S. undulatus*. Показано снижение количества жирных кислот и диглицеридов в гомогенате неокортекса активных сусликов по сравнению с летними. Включение радиоактивной метки (^{14}C -ацетата) в ткань неокортекса у спящих сусликов увеличено на 40% по сравнению с активными. Основная часть меченого ацетата включилась в общую фракцию липидов (ОФЛ) неокортекса, включение в общую фракцию фосфолипидов у

спящих сусликов увеличено на 45%. Уровень включения в общие липиды (ОФЛ) и общую фракцию фосфолипидов (ОФФЛ) был выше у спящих животных. Включение в ткань и липиды неокортекса у пробудившихся сусликов было уменьшено на 25%, что объясняется снижением концентрации ^{14}C -ацетата за счет использования ацетата в процессе дыхания у пробудившихся сусликов. Липиды неокортекса суслика *Spermophilus undulatus* принимают участие в адаптации к гипобиозу путем роста количества ОФФЛ и модификации фосфолипидного состава с увеличением долей ФХ, ФИ и ФС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность заведующей лабораторией механизмов природных гипометаболических состояний ИБК РАН к.б.н. Н.М. Захаровой за предоставление тканей неокортекса якутских сусликов *S. undulatus*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями институтской комиссии по этике и Европейской конвенции по защи-

те позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. К. Коломийцева, Биохимия **12**, 1604 (2011).
2. C. P. Lyman, J. S. Willis, A. Malan, and L. C. H. Wang, *Hibernation and torpor in mammals and birds* (Acad. Press, N.-Y., 1987).
3. J. Dark, Annu. Rev. Nutr. **25**, 469 (2005).
4. Л. Н. Медведев и Е. И. Елсукова, *Буря жировая ткань: молекулярно-клеточные основы регулируемого термогенеза* (Изд-во «Амальгама», Красноярск, 2002).
5. N. Mrosovsk, *Hibernation and hypothalamus* (Appleton, New-York, 1971).
6. K. L. Drew, C. L. Buck, B. M. Barnes, et al., J. Neurochem. **102**, 1713 (2007).
7. G. J. van der Vusse, Drug Metab. Pharmacokinet. **24** (4), 300 (2009).
8. J. E. Vance, R. B. Camnerot, and D. E. Vance, Biochem. Biophys. Acta **1448**, 84 (2000).
9. А. И. Ануфриев и И. С. Васильев, *Особенности терморегуляции у длиннохвостого суслика в разные периоды жизни и адаптации животных к холоду* (Наука, Новосибирск, 1990).
10. R. C. Aloia and I. K. Raison, Biochim. Biophys. Acta. **988**, 23 (1989).
11. J. R. Hazel, Annu. Rev. Physiol. **57**, 19 (1995).
12. И. К. Коломийцева, Н. И. Перепелкина и Е. Е. Фесенко, Докл. РАН **448** (3), 844 (2013).
13. И. К. Коломийцева, Н. И. Перепелкина, И. В. Патрушев и др., Биохимия **68**, 954 (2003).
14. L. Elaine, Physiol. Genomics **43**, 799 (2011).
15. I. K. Kolomiitseva, N. I. Perepelkina, A. D. Zharikova, and V. I. Popov, Comp. Biochem. Physiol. B **151**, 386 (2008).
16. А. А. Кудрявцева, *Регламентация работы с лабораторными животными* (ОНТИ АН СССР, Пушино, 1983).
17. И. К. Коломийцева, Л. Н. Маркевич, Д. А. Игнатьев и др., Биохимия **75** (9), 1265 (2010).
18. Т. П. Кулагина, И. К. Коломийцева и Ю. С. Казначеев. Биохимия **55** (11), 1962 (1990).
19. И. К. Kolomiitseva, L. N. Markevich, N. I. Perepelkina, et al., in *Hypothermia: prevention, recognition and treatment*, Ed. by J. I. V. Delgado and V. G. F. Garza (Nova Sci. Publ., N.Y., 2012), pp. 1–42.
20. C. J. Green, J. T. Brosman, B. J. Fuller, et al., Comp. Biochem. Physiol. B **79**, 167 (1984).
21. C. Osman, D. R. Voelker, and T. Langer, J. Cell Biol. **192**, 7 (2011).
22. J. L. Goldstein, R. A. DeBose-Boyd, and M. S. Brown, Cell **124**, 35 (2006).
23. T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **215**, 89 (1995).

The Influence of Hibernation on Lipid Metabolism in the Neocortex of Yakutian Ground Squirrel *Spermophilus undulatus*

L.N. Markevich, O.V. Bykova, A.A. Lakhina, and I.K. Kolomiitseva

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

The effect of hibernation on the number of individual phospholipids and neutral lipids, as well as the effect of entry to (ground squirrels are torpid) and exit from hibernation (ground squirrels are active during the winter) on the synthesis of lipids in the neocortex tissue of *S. undulatus* are investigated. It was found that the neocortex of winter active ground squirrels showed a decrease in the fatty acid level and the diglyceride content as compared to that of summer animals. The inclusion of the label in the neocortex tissue and lipids in awakened ground squirrels was reduced by 25%, that could be explained by a decrease in the concentration of ^{14}C -acetate due to the use of acetate during respiration in awakened ground squirrels. Lipids of the neocortex of the ground squirrel *S. undulatus* participate in adaptation to hypobiosis by increasing the amount of the total fraction of phospholipids and modifying the phospholipid composition, with an increase in the proportion of phosphatidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidylinositol.

Keywords: Yakutian ground squirrel *Spermophilus undulatus*, hibernation, neocortex, lipids

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПОЛИАКРИЛАТОВ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2021 г. Л.А. Островская*, Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, Н.В. Блюхтерова*,
М.М. Фомина*, В.А. Рыкова*, Ю.А. Хоченкова**, 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 МЗ РФ,
115478, Москва, Каширское шоссе, 24

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

Поступила в редакцию 22.06.2021 г.

После доработки 22.06.2021 г.

Принята к публикации 29.06.2021 г.

Проведено сравнительное изучение противоопухолевой и цитотоксической активности двух полимерных соединений на основе полиакриловой кислоты, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил). Препараты эффективно ингибируют развитие солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755) и обладают выраженным цитотоксическим эффектом в отношении клеток опухоли человека (культура клеток MCF-7). Коэффициент торможения роста опухолей мышей колеблется в пределах от 55 до 90% по сравнению с контролем. Показатель цитотоксического эффекта $ИК_{50}$ составляет 25 мкг/мл и 100 мкг/мл для аргакрила и аурумакрила соответственно. Чувствительность к препаратам клеток опухолей животных *in vivo* и клеток опухоли человека *in vitro* зависит от природы металла в комплексном полимерном соединении.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), полиакрилат серебра (аргакрил), противоопухолевая активность, цитотоксический эффект, солидные опухоли мышей, культура клеток опухоли человека.

DOI: 10.31857/S0006302921050161

Изучение в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов металлоорганических соединений и, в частности, структур, содержащих благородные металлы, признано одним из весьма перспективных направлений исследований в области биомедицинской химии, экспериментальной и клинической онкологии [1–3].

Характерные химические свойства этих соединений, обусловленные наличием иона металла, определяют их особый фармакологический профиль и механизмы действия. Особый интерес металлсодержащие вещества вызывают в связи с тем, что мишени, на которые направлено их действие и механизмы его реализации, отличают эти соединения от известных, клинически апробированных лекарственных средств [4, 5].

В последние годы особое внимание уделяется исследованию металлоценов, содержащих золото. Показано, что золотосодержащие комплексы обладают высокой цитотоксической активностью в отношении ряда стабильных клеточных линий опухолей человека *in vitro*, а также значи-

мой противоопухолевой активностью в отношении опухолей животных *in vivo* [6–8].

Ранее нами была обнаружена противоопухолевую активность полимерных соединений на основе полиакриловой кислоты, содержащих благородные металлы (золото и серебро) [9–16].

В продолжение этого направления исследований мы провели сравнительное изучение противоопухолевой и цитотоксической активности двух соединений – полиакрилата золота (аурумакрил) и полиакрилата серебра (аргакрил), результаты которого представлены в данной работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Исследовавшиеся полиметаллоакрилаты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов (8 масс. %). Аурумакрил – неполная золотая соль полиакриловой кислоты, отвечает общей формуле $(-CH_2-CHCOOH-)_n$ $(MCH_2CHCOO AuCl_3H-)_m$; аргакрил – неполная

серебряная соль полиакриловой кислоты, отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. Инфракрасные спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} соответственно. Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде [11, 12]. В условиях *in vivo* препараты применяли в виде водных растворов внутрибрюшинно многократно, ежедневно, начиная со следующих суток после перевивки опухоли в следующих суточных дозах: аурумакрил – 20 мг/кг, аргакрил – 2 и 6 мг/кг. Оценка цитотоксического эффекта препаратов *in vitro* проведена при их концентрациях в диапазоне от 0.0019 до 2.0 мг/мл.

Лабораторные животные. Эксперименты проведены на инбредных линейных мышах BDF₁ – гибридах первого поколения $f_1(\text{C}_{57}\text{Bl}/6 \times \text{DBA}_2)$, а также мышах линии Balb/c, массой 18–20 г (разведение питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России»).

Модели опухолей животных. В качестве опухолевых тест-систем служили перевиваемые солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис и аденокарцинома Са-755 (мыши BDF₁), аденокарцинома Акатол (мыши Balb/c). Перевивку опухолей осуществляли в соответствии со стандартной методикой под кожу правого бока мышей измельченными фрагментами опухолевой ткани, содержащейся в 0.3 мл физиологического раствора хлористого натрия [17].

Оценка противоопухолевого эффекта *in vivo*. Показателями ростингибирующего эффекта препаратов служили различия в кинетике роста опухолей и средней продолжительности жизни у леченых (Т) и контрольных (С) животных. Коэффициент торможения роста опухоли (*TPO*, %) определялся из соотношения $TPO = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T – средняя масса опухолей мышей в группах контрольных и леченых животных. Изменение средней продолжительности жизни (Δt , %) определялось как $\Delta t = (t_C - t_T)/t_C$, где t_C и t_T – средняя продолжительность жизни мышей

в группах контрольных и леченых животных [12, 17].

Оценка цитотоксического эффекта *in vitro*. Для сравнительной оценки цитотоксического эффекта аурумакрила и аргакрила в отношении клеток опухолей человека использована клеточная культура рецептор-положительной карциномы молочной железы линии MCF-7, полученная из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Цитотоксичность препаратов оценивали путем определения доли выживших по сравнению с контролем клеток с использованием стандартного МТТ-теста, основанного на сравнительном спектрофотометрическом определении оптической плотности раствора формазана в группах клеток, подвергавшихся воздействию препарата, и в контроле, в соответствии с ранее описанной методикой [18].

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакетов компьютерных программ Statistica 6.0 и Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из двенадцати индивидуальных измерений для каждого экспериментального животного и из четырех индивидуальных измерений для культивируемых клеток. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия признаются достоверными при условии, что вычисленные значения *t* превышают значения критерия Стьюдента $t_{0.1}$ для определенных уровней значимости ($p \leq 0.01$) при заданном числе степеней свободы *f* [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противоопухолевая активность препаратов *in vivo*. Противоопухолевая активность аргакрила и аурумакрила установлена на моделях солидных опухолей мышей – карциноме легких Льюис, аденокарциноме Акатол и аденокарциноме Са-755 – при ежедневном многократном внутрибрюшинном введении препаратов.

Отметим, что аурумакрил применяли в суточной дозе 20 мг/кг, в то время как аргакрил использовали в большинстве опытов в дозе 2 мг/кг,

Таблица 1. Острая токсичность полиакрилатов благородных металлов

Препарат	Максимально-переносимая доза, мг/кг	Срединная летальная доза, мг/кг
Аргакрил	20	30
Аурумакрил	100	150

Примечание. Мыши BDF₁, введение однократно, внутрибрюшинно.

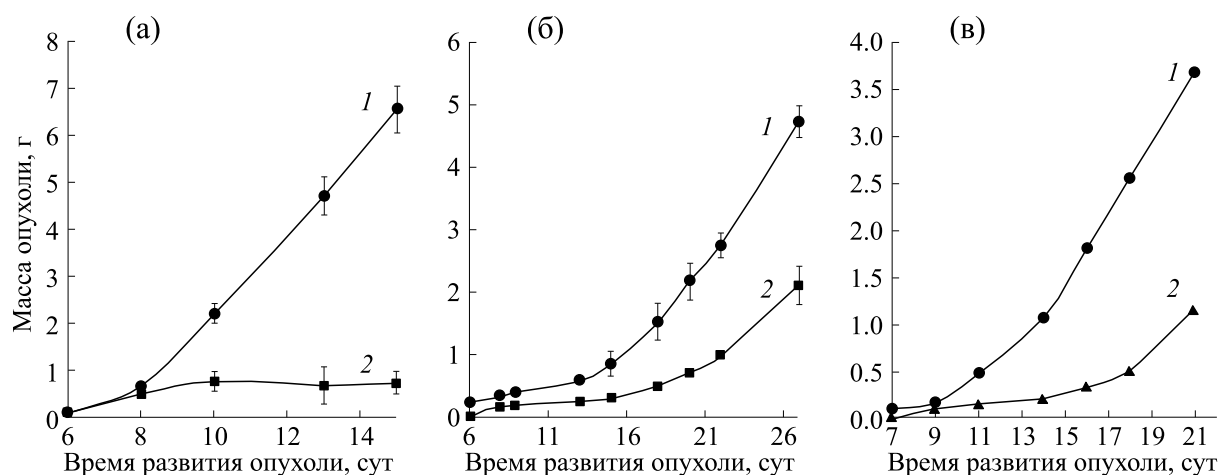


Рис. 1. Противоопухолевая активность аргакрила на моделях карциномы легких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б) и аденокарциномы Са-755 (в): 1 – контроль; 2 – аргакрил, 2 мг/кг/сут, внутривенно, с первых по пятые сутки после перевивки опухоли (Са-755 – 6 мг/кг/сут, с первых по девятые сутки).

что объясняется значительно более высокой токсичностью препарата, содержащего серебро, по сравнению с препаратом золота. Как видно из представленных в табл. 1 данных, максимально переносимая доза и срединная летальная доза аурумакрила в пять раз превышают соответствующие дозы для аргакрила (табл. 1).

Было показано, что аргакрил эффективно тормозит развитие карциномы легких Льюис (90%) и аденокарциномы Са-755 (70%), проявляя несколько меньшую активность в отношении опухоли Акатол (55%) (рис. 1, табл. 2).

Аурумакрил тормозит развитие всех трех изученных солидных опухолей мышей на 80–90% (рис. 2, табл. 2).

При этом средняя продолжительность жизни животных под влиянием аргакрила увеличивается на 46% (карцинома легких Льюис), а под влиянием аурумакрила – на 31% (аденокарцинома Са-755) по сравнению с контролем (табл. 3).

Как видно из представленных данных, оба препарата, содержащих как серебро, так и золото, проявляют существенный противоопухолевый эффект в отношении солидных опухолей мышей.

Цитотоксический эффект препаратов *in vitro*. Влияние аргакрила и аурумакрила на выживаемость клеток MCF-7 в зависимости от концентрации препаратов характеризуют данные, представленные на рис. 3 и в табл. 4.

Как видно из представленных данных, оба изученных препарата обладают дозозависимым

Таблица 2. Противоопухолевая активность полиакрилатов благородных металлов на моделях солидных опухолей мышей

Штамм опухоли	Доза, мг/кг/сут, и режим введения	Время оценки эффекта, сут	Средняя масса опухоли, г		Коэффициент торможения роста опухоли, %
			леченые животные	контрольные животные	
Аргакрил					
Карцинома Льюис	2 (1 – 5 сут)	15	0.7 ± 0.1	6.5 ± 0.4	90
Акатол	2 (1 – 5 сут)	27	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.6	55
Са-755	6 (1 – 9 сут)	21	3.8 ± 0.3	1.2 ± 0.2	70
Аурумакрил					
Карцинома Льюис	20 (1 – 5 сут)	21	0.8 ± 0.1	3.8 ± 0.5	80
Акатол	20 (1 – 5 сут)	27	0.5 ± 0.1	4.7 ± 0.6	90
Са-755	20 (1 – 5 сут)	15	1.2 ± 0.2	5.2 ± 0.5	77

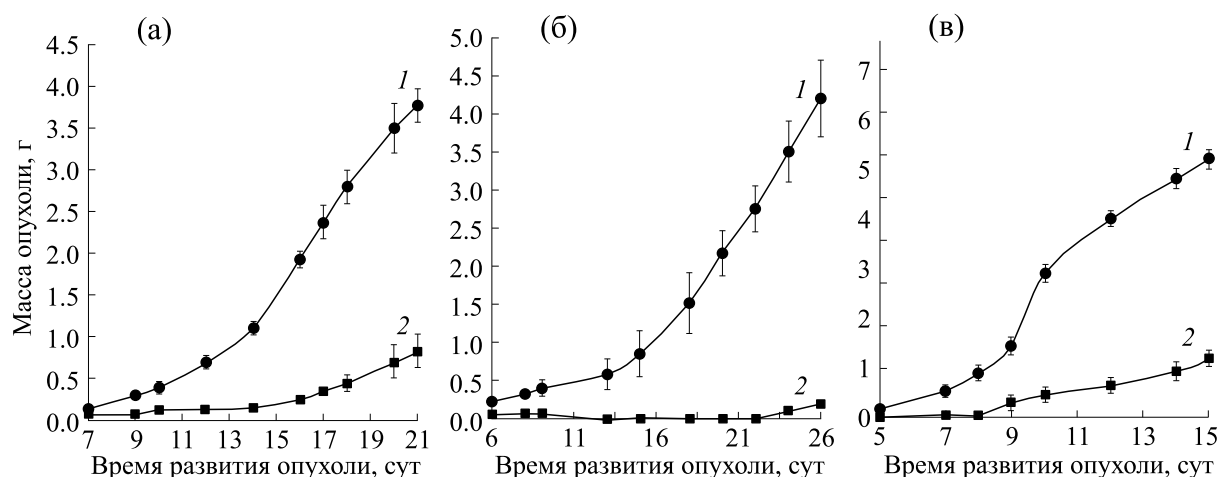


Рис. 2. Противоопухолевая активность аурумакирила на моделях карциномы легких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б), аденокарциномы Са-755 (в): 1 – контроль; 2 – аурумакирил, 20 мг/кг/сут, внутривентриально, с первых пяти суток после перевивки опухоли.

цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата и природы металла, содержащегося в полимере.

Аргакрил и аурумакирил вызывают практически полную гибель опухолевых клеток (94–96%) при воздействии в максимальной концентрации 2 мг/мл (рис. 3, табл. 4).

Однако в целом концентрационные зависимости, характеризующие цитотоксическое действие препаратов, имеют весьма существенные количественные различия, что находит свое отражение в разнице между расчетными значениями концентрации вещества, вызывающей гибель 50% опухолевых клеток ($ИК_{50}$) для аргакрила и аурумакирила. Так, значения $ИК_{50}$ составляют 0.025 мг/мл (25 мкг/мл) и 0.100 мг/мл (100 мкг/мл) для аргакрила и аурумакирила соответственно (рис. 3, табл. 4).

В соответствии с приведенными значениями показателя $ИК_{50}$ — общепринятого критерия оценки цитотоксичности веществ — аргакрил об-

ладает в четыре раза более высоким цитотоксическим эффектом в отношении клеток рака молочной железы MCF-7, чем аурумакирил.

Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что, несмотря на обнаруженные количественные различия в цитотоксическом эффекте аргакрила и аурумакирила, оба изученных препарата обладают выраженной способностью оказывать летальное действие на клетки опухоли человека.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что полиакрилаты, содержащие как золото, так и серебро, обладают существенной противоопухолевой активностью в отношении солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755) *in vivo* и выраженным цитотоксическим эффектом в отношении клеток опухоли человека (культура клеток MCF-7) *in vitro*.

Таблица 3. Влияние препаратов аргакрил и аурумакирил на продолжительность жизни животных с солидными опухолями

Штамм опухоли	Препарат	Доза, мг/кг/сут, и режим введения	Средняя продолжительность жизни животных, сут		Увеличение средней продолжительности жизни мышей, %
			леченые животные	контрольные животные	
Карцинома Льюис	Аргакрил	2 (1 – 5 сут)	34.5 ± 4.6	25.0 ± 2.8	46
Са-755	Аурумакирил	20 (1 – 5 сут)	35.2 ± 6.8	26.8 ± 7.2	31

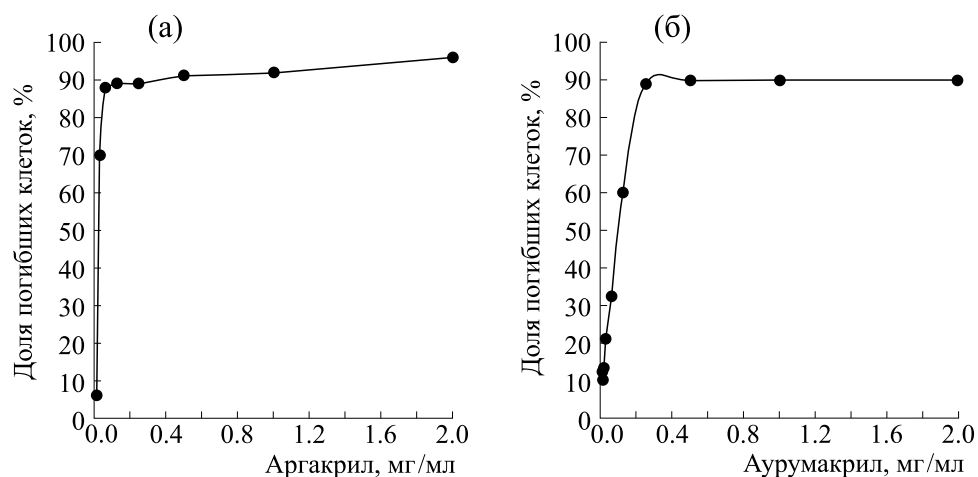


Рис. 3. Изменение доли погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аргакрила (а) и аурумакрила (б).

Таблица 4. Выживаемость и гибель клеток опухоли человека под влиянием полиакрилатов серебра и золота (культура клеток MCF-7)

Концентрация препарата, мг/мл	Показатель оптической плотности формазана	Показатель цитотоксического эффекта	
		Выжившие клетки, %	Погибшие клетки, %
Аргакрил ($ID_{50} = 0.025$ мг/мл)			
0.0039	1.384 ± 0.032	97	3
0.0078	1.368 ± 0.041	96	4
0.0156	1.347 ± 0.065	94	6
0.0312	0.426 ± 0.039	30	70
0.0625	0.178 ± 0.015	12	88
0.1250	0.159 ± 0.003	11	89
0.2500	0.152 ± 0.003	11	89
0.5000	0.132 ± 0.002	9	91
1.0000	0.108 ± 0.001	8	92
2.0000	0.064 ± 0.005	4	96
Контроль	1.430 ± 0.015	100	0
Аурумакрил $ID_{50} = 0.100$ мг/мл)			
0.0019	1.370 ± 0.084	87	13
0.0039	1.369 ± 0.050	87	13
0.0078	1.408 ± 0.022	89	11
0.0156	1.363 ± 0.038	86	14
0.0312	1.226 ± 0.048	78	22
0.0625	1.039 ± 0.037	66	34
0.1250	0.581 ± 0.055	37	63
0.2500	0.113 ± 0.024	7	93
0.1250	0.581 ± 0.055	37	63
0.5000	0.090 ± 0.002	6	94
1.0000	0.088 ± 0.002	6	94
2.0000	0.097 ± 0.002	6	94
Контроль	1.576 ± 0.073	100	0

Вместе с тем следует отметить, что природа металла оказывает определенное влияние на биологические эффекты этих препаратов.

Полиакрилат серебра обладает в пять раз более высокой токсичностью по сравнению с полиакрилатом золота.

Аурумакрилу, вызывающему торможение роста всех трех изученных штаммов опухолей на 80–90%, свойственен несколько более широкий спектр действия по сравнению с аргакрилом, который проявляет меньшую активность в отношении одной из опухолей — аденокарциномы Акатол, ингибируя ее развитие не более чем на 55%.

Аргакрил обладает в четыре раза более высоким цитотоксическим эффектом, чем аурумакрил в отношении клеток рака молочной железы MCF-7.

На основании полученных данных можно полагать, что природа содержащегося в полимере металла оказывает влияние на чувствительность опухолевых клеток различного генеза к изучавшимся препаратам.

В этой связи уместно отметить, что ранее нами была установлена дифференциальная чувствительность различных клеточных культур опухолей человека к аурумакрилу [16].

Учитывая обнаруженный значительный цитотоксический эффект аргакрила в отношении клеток культуры MCF-7, представляется целесообразным изучить в дальнейшем действие препарата на расширенной выборке клеточных культур опухолей человека.

Рассматривая механизм действия металлополиакрилатов, отметим, что полимерные комплексы, которые содержат в своем составе ионогенные группы и наночастицы металла, способны к комплементарным конформационным превращениям и кооперативному связыванию, а также к невалентным взаимодействиям с биологическими объектами. Эти свойства определяют возможный широкий спектр фармакологической активности полимерных композитов, содержащих наночастицы благородных металлов, в том числе в качестве потенциальных лекарственных препаратов [19].

Известно, что содержащие благородные металлы полиакрилаты обладают значительной гемостатической активностью, обусловленной высокой специфичностью их взаимодействия с молекулой альбумина крови с образованием интерполимерного комплекса [19].

Эффективность взаимодействия наночастиц с макромолекулой в физиологических условиях определяется не только присутствием в полимере определенных функциональных групп, но и их реакциями с поверхностными атомами наночастиц, зависящими от природы металла в качестве

доноров электронов. Серебро и золото, как известно, имеют разные потенциалы ионизации и энергии сродства к электрону, следовательно, и разные электроотрицательности. При этом наночастицы серебра, в отличие от наночастиц золота, весьма реакционноспособны.

Экспериментальные исследования нанокompозитов на основе золота и серебра в качестве гемостатиков показали, что в условиях *in vivo* природа металлов определяет кинетическую устойчивость комплексов. Так, полимер, который содержит химически инертный атом золота, обладающего низкой аффинностью к кислороду, проявляет большую гемостатическую активность по сравнению с полимером, содержащим более реакционноспособные наночастицы серебра [19].

Ранее нами было проведено весьма детальное экспериментальное исследование полиакрилата золота (аурумакрил) в качестве потенциального противоопухолевого препарата, рассмотрены существующие представления о механизме противоопухолевого действия золотосодержащих комплексных соединений [4, 5, 9–16].

Полученные ранее и в представленной работе данные о противоопухолевом и цитогенетическом эффекте полиакрилатов золота (аурумакрил) и серебра (аргакрил), наряду с вышеизложенными соображениями о роли природы металла в биологической активности полимерных композитов, содержащих наночастицы благородных металлов, свидетельствуют о перспективности дальнейших целенаправленных исследований в указанной области.

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. В. Н. Бабин, Ю. А. Белоусов, В. И. Борисов и др., Изв. РАН. Сер. хим. **63** (11), 2405 (2014).
2. Д. Б. Корман, *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
3. A. Markowska, B. Kospzak, K. Jaszczyńska-Nowinka, et al., *Comtemp. Oncol. (Pozn.)* **19**, 271 (2015).
4. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии* **64** (6), 697 (2018).

5. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика* **64** (3), 552 (2019).
6. P. I. Da Silva Maia, V. M. Deflon, and U. Abram, *Future Med. Chem.* **6**, 1515 (2014).
7. C. Nardon, N. Pettenuzza, and D. Fregona, *Curr. Med. Chem.* **23**, 3374 (2016).
8. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, et al., *Med. Res. Rev.* **30** (3), 550 (2010).
9. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Therapy* **1** (2), 59 (2010).
10. L. A. Ostrovskaya, D. B. Korman, and N. V. Bluhterova, *Biointerface Res. Appl. Chem.* **4** (4), 816 (2014).
11. М. Г. Воронков, К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая и др., Патент РФ № 2372091, Бюл. изобретений, № 31 (2009).
12. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **59** (4), 785 (2014).
13. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Изв. РАН. Сер. хим.* **66** (12), 2333 (2017).
14. Л. А. Островская, А. К. Грехова, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **62** (3), 598 (2017).
15. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика* **38** (12), 64 (2019).
16. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Рос. биотерапевтич. журн.* **19** (4), 74 (2020).
17. 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.
18. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., *Биофизика* **64** (6), 1138 (2019).
19. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и др., *Изв. РАН. Сер. хим.* **66** (12), 2314 (2017).

Antitumor and Cytotoxic Effects of Polyacrilates of Noble Metals

L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, E.I. Nekrasova*, N.V. Bluhterova*, M.M. Fomina*, V.A. Rikova*, U.A. Hochenkova, and K.A. Abzaeva*****

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

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

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

In this study, we compared the antitumor and cytotoxic activities of polyacrylic acid-based two polymer compounds containing aurum (aurumacryl) and argentum (argacryl). The tested products effectively inhibit the growth of some solid tumors in mice (Lewis lung carcinoma, Acatol adenocarcinoma, Ca-755 adenocarcinoma) and exert a pronounced cytotoxic activity against human tumor cells (MCF-7 cell culture). The coefficient of the murine tumor growth inhibition varies between 55 and 90% as compared to control. The index of the cytotoxic effect, IC_{50} , is 25 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$ for argacryl and aurumacryl, respectively. Sensitivity of animal tumor cells in vivo and human tumor cells in vitro to the tested products depends on the nature of the metal in the complex polymer compound.

Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), argentum polyacrylate (argacryl), antitumor activity, cytotoxic effect, murine solid tumors, human tumor cell culture

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОРАЖЕНИИ ПОЧКИ

© 2021 г. А.Е. Гордеева*, Э.А. Курганова**, В.И. Новоселов*

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

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

E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.07.2021 г.

После доработки 27.07.2021 г.

Принята к публикации 02.08.2021 г.

Окислительный стресс, вызванный ишемически-реперфузионным поражением почек, может играть ключевую роль в дисфункции печени. Для снижения поражения печени и почек при ренальной ишемически-реперфузионной травме в работе использовали экзогенный фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6, который способен восстанавливать широкий спектр гидропероксидов и является участником во внутриклеточной и межклеточной передаче сигналов. Крыс подвергали ишемическому поражению почек в течение 45 мин с одновременной левосторонней нефрэктомией и обследовали через 24 и 48 ч реперфузии. Пероксиредоксин 6 вводили внутривенно за 15 мин до ишемии. Повреждение почечной и печеночной тканей определяли гистологическими методами, для оценки функциональности органов измеряли концентрации креатинина, мочевины, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в крови. Реперфузия привела к увеличению концентраций креатинина, мочевины, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в плазме; нарушению архитектуры почечных нефронов и развитию выраженной сосудистой реакции в печени с очагами дегенеративных изменений. Использование экзогенного пероксиредоксина 6 привело к снижению поражения ренальной и печеночной тканей и нормализации уровня почечных и печеночных метаболитов. Таким образом, пероксиредоксин 6 проявляет как нефро-протекторный эффект при ренальной ишемии-реперфузии, так и уменьшает морфофункциональное повреждение отдаленных органов, в частности печени.

Ключевые слова: пероксиредоксины, ишемия-реперфузия, почки, печень.

DOI: 10.31857/S0006302921050173

С проблемой ишемически-реперфузионного (И-Р) поражения почки связаны многие клинические случаи, при этом поражение почек может приводить к дисфункции и повреждению отдаленных органов: кишечника, печени, сердца, легких и др. [1]. В частности, при остром поражении почек нарушение функций печени является часто встречаемой проблемой [1–6]. Такая ситуация происходит вследствие наличия между почками и печенью многоуровневых связей, которые опосредованы нейрогенным путем, эндокринными и метаболическими факторами, уремическими и печеночными токсинами [7]. Поражение печени развивается в послеоперационном периоде при ишемическом поражении почек, после тяжелого

кардиогенного шока, crush-синдроме, тяжелой ожоговой болезни и др. [1, 7].

В настоящее время считается, что ключевую роль в развитии дегенеративных изменений в почках при И-Р-поражении играет мощный окислительный стресс, возникающий в нефроцитах при восстановлении кровотока, а бесконтрольное производство активных форм кислорода (АФК) на фоне сниженной антиоксидантной защиты — основной фактор, запускающий повреждение клеток и тканей при И-Р [10]. На фоне мощного окислительного стресса при И-Р-поражении почек происходит увеличение провоспалительных цитокинов (TNF- α и IL-6), активация апоптоза. Окислительный стресс и воспаление при И-Р-поражении почек в свою очередь оказывают влияние на дисфункцию отдаленных органов, в частности печени [1–5]. В печени при И-Р-поражении почки отмечается снижение активно-

Сокращения: И-Р — ишемически-реперфузионный, АФК — активные формы кислорода, Ргх6 — пероксиредоксин 6, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза.

сти антиоксидантных ферментов уже через 2 ч после восстановления кровотока в почке, рост активности ксантиоксидазы и миелопероксидазы [3, 4], повышение уровня провоспалительных цитокинов, активация каспазы-3, увеличение проницаемости сосудов, инфильтрация нейтрофилов и Т-лимфоцитов, которые являются источниками АФК [2, 3, 5, 6, 8]. Развитию патологических процессов в печени способствует также накопление индоксилсульфата, который активизирует НАДФ-оксидазу [11]. Наблюдаются дегенеративные изменения гепатоцитов, а в дальнейшем проявление апоптоза и некроза печеночных клеток [2]. При И-Р-поражении почек отмечается также повышение уровня активности печеночных трансаминаз в крови, что указывает на поражение клеток печени и нарушение ее функций [3].

Так как окислительный стресс играет ключевую роль в патогенезе ренального И-Р-поражения, для снижения поражения печеночной ткани ряд исследователей используют в качестве гепатопротекторов экзогенные антиоксидантные вещества [3, 6]. В настоящей работе в качестве протектора печеночной ткани от повышенного уровня АФК при ренальном И-Р-поражении был выбран мощный антиоксидант — фермент пероксиредоксин 6 (Ргх6). Ргх6 представляет собой уникальный полифункциональный фермент, выполняющий ключевую защитную антиоксидантную функцию в клетке. Ргх6 наряду с пероксидазной активностью обладает пероксинитритредуктазной и фосфолипазной активностями и участвует во внутриклеточной сигнализации клетки [12]. Ранее было показано, что экзогенный Ргх6 был эффективен для повышения антиоксидантного статуса в ткани при свободно-радикальных патологиях разных органов, в том числе при И-Р-поражении почек [13–18]. В то же время данные, описывающие полиорганный протекторный эффект пероксиредоксинов при свободно-радикальных патологиях, в научной литературе не встречаются. В настоящей работе было проведено исследование нефро- и гепатопротекторного эффекта экзогенного пероксиредоксина 6 при ренальной ишемии-реперфузии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы крысы-самцы линии Wistar (масса тела 230 г), которых содержали в условиях вивария Института биофизики клетки РАН.

Рекомбинантный человеческий Ргх6 был получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН по ранее описанной методике [19].

Модель ишемически-реперфузионного поражения почки. В работе была использована воспроиз-

водимая модель И-Р-поражения правой почки крысы с предварительной левосторонней нефроэктомией. Крысу наркотизировали внутривенным введением следующей смеси растворов: 0.5 мл 3.5% Золетила® 100 (Virbac Sante Animale, Франция) и 0.1 мл Рометара (Bioveta, Чехия). Нефроэктомия включала изоляцию левой почки от общей сосудистой сети на уровне 0.7–1.0 см от ворот почки с ее последующим удалением. После удаления почки брюшная полость была защищена хирургической стерильной нитью Policon Poliamide (Tonzos 95, Болгария). И-Р-поражение правой почки было осуществлено наложением зажима на сосудистую ножку почки, на уровне 0.7–1.0 см от ворот почки, для полного блокирования притока/оттока крови. Через 45 мин зажим был удален с почечной ножки. По окончании ишемии брюшная полость была защищена хирургической стерильной нитью Policon Poliamide. Реперфузионный период после снятия зажима составил 24 и 48 ч. После окончания операции на весь реперфузионный период крысы были помещены в отдельные клетки, с доступом к корму и воде. Печень не подвергалась никаким манипуляциям. Для выявления эффектов Ргх6 крысам через хвостовую вену за 15 мин до ишемии вводили 2 мл физиологического раствора, содержащего Ргх6 из расчета 10 мг/кг массы животного. В качестве контроля были использованы животные с левосторонней нефроэктомией и без ишемии-реперфузии правой почки. Животные были разделены на три экспериментальные группы: 1) контрольная группа (крысы с одной здоровой почкой), 2) ишемия (45 мин) — реперфузия 48 ч без лечения, 3) ишемия (45 мин) — реперфузия 48 ч с внутривенным введением белка-антиоксиданта Ргх6 (1 мг/мл). Число животных в каждой группе равнялось семи.

Гистологический анализ тканей. Для проведения морфологических исследований образцы почек и печени помещали в 10%-й забуференный формалин. После проведения обезвоживания ткань заключали в парафин. Парафиновые срезы получали на микротоме производства Thermo Electron Corp. (США) и окрашивали гематоксилин-эозином (VITROSTAIN, «Biovitrum», Россия). Толщина среза — 3 мкм. Микроскопический анализ срезов проводили на микроскопе DM 6000 (Leica, Германия) с цифровой камерой Leica DFC 490.

Биохимический анализ крови был проведен для определения показателей почечных и печеночных метаболитов у экспериментальных животных. Анализ включал в себя измерение концентрации мочевины, креатинина, а также активности печеночных ферментов — аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в цельной крови с использованием

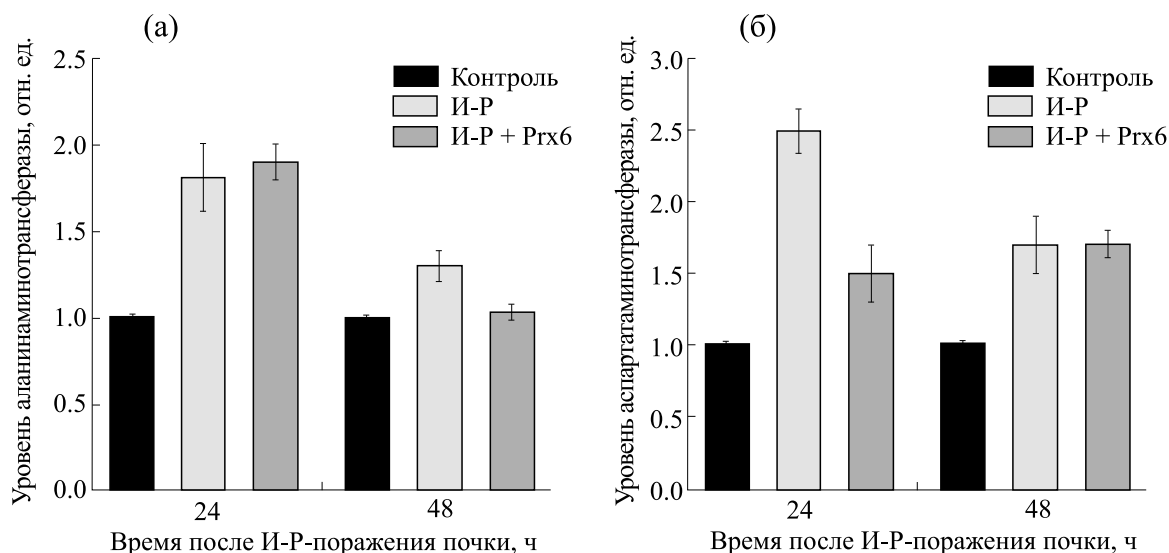


Рис. 1. Активность аланинаминотрансферазы (а) и аспартатаминотрансферазы (б) в крови животных через 24 и 48 ч после И-Р-поражения правой почки с одновременной нефрэктомией левой почки. $N = 7$; контроль принят за единицу.

экспресс-анализатора Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария).

Статистические методы. Статистический анализ выполняли с использованием программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Результаты выражали как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Значения с $P < 0.05$ принимали статистически достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние пероксиредоксина 6 на функциональность почек и печени при ренальном И-Р-поражении. Для оценки функциональности почек и печени в цельной крови экспериментальных животных была определена концентрация печеночных и почечных метаболитов через 24 и 48 ч после 45-минутной ишемии правой почки.

Динамика показателей печеночных метаболитов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы представлена на рис. 1. И-Р-поражение почки приводит к росту активности печеночных метаболитов в крови через 24 ч реперфузии в 2.0 и 2.5 раза соответственно. При использовании Prx6 при реперфузии не наблюдается снижения активности АЛТ, напротив, активность АСТ снижается в 1.6 раза в этот период. Через 48 ч реперфузии наблюдается снижение активности АСТ и АЛТ по сравнению с первыми сутками, однако показатели этих метаболитов остаются выше контрольных в 1.5 раза. При использовании Prx6 активность АЛТ соответствует контролю, активность АСТ не изменяется по сравнению с первыми сутками. Абсолютные значения

активности печеночных ферментов в крови животных представлены в табл. 1.

Динамика показателей почечных метаболитов мочевины и креатинина представлена на рис. 2. И-Р-поражение почки приводит к росту концентрации мочевины и креатинина в крови через 24 ч реперфузии в 3.8 и 2.0 раза соответственно. При использовании Prx6 при реперфузии наблюдается снижения концентрации мочевины в 2.0 раза. Предварительное введение Prx6 выводит концентрацию мочевины на уровень контрольных значений через 48 ч реперфузии, при И-Р-поражении концентрация мочевины остается высокой. В группе с Prx6 не происходит увеличения концентрации креатинина относительно контрольных значений как через 24 ч, так и через 48 ч. Абсолютные значения концентрации почечных метаболитов в крови животных представлены в табл. 1.

Влияние Prx6 на морфологию почечной и печеночной ткани при ренальном И-Р-поражении. Для подтверждения развития поражения почечной ткани при ренальной ишемии-реперфузии был проведен гистологический анализ. На рис. 3 представлена морфология почечной ткани. Левосторонняя нефрэктомия без последующей ишемии не приводит к визуальному изменению архитектуры почечной паренхимы. Нефроны и их отделы — почечное тельце и почечные канальцы — без повреждений (рис. 3). Эпителий проксимальных канальцев с четко выраженной щеточной каемкой. В мозговом слое просветы извитых и тонких канальцев без изменений и свободны от гомогенных масс (рис. 3б). Ишемия-реперфузия правой почки с предварительной левосторонней

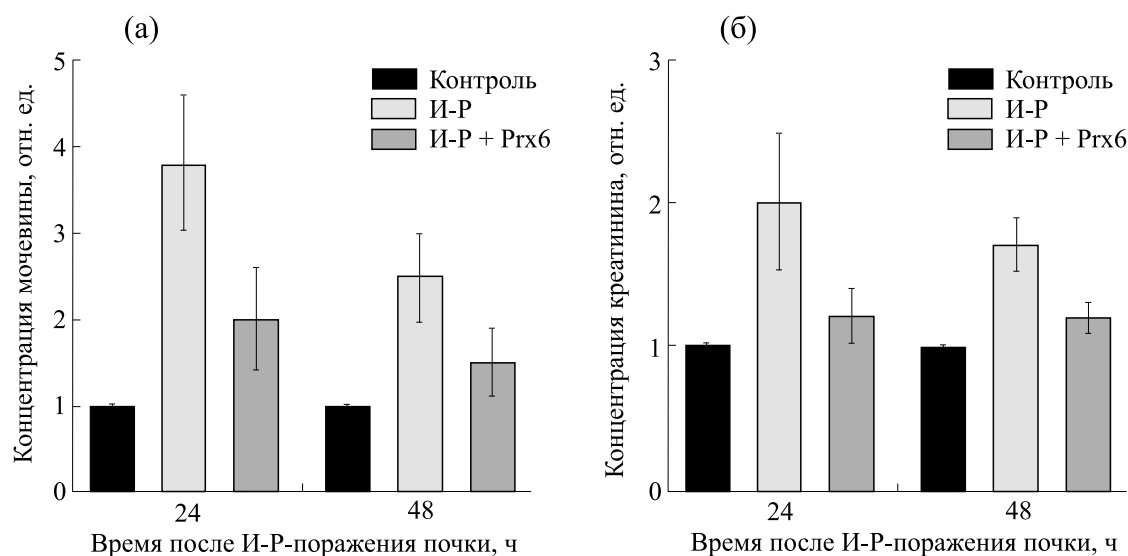
Таблица 1. Активность печеночных ферментов и концентрация почечных метаболитов в крови животных (абсолютные значения)

	Контроль	И-Р	И-Р + Prx6
Активность аланинаминотрансферазы в крови, Ед/л			
24 ч	44 ± 8	81 ± 11	84 ± 7
48 ч	45 ± 10	63 ± 3	47 ± 7
Активность аспартатаминотрансферазы в крови, Ед/л			
24 ч	116 ± 25	284 ± 33	172 ± 7
48 ч	114 ± 20	202 ± 33	200 ± 27
Концентрация мочевины в крови, мг/дл			
24 ч	54.8 ± 1.2	210 ± 44	117 ± 36
48 ч	53.6 ± 1.2	135 ± 29	87 ± 25
Концентрация креатинина в крови, мг/дл			
24 ч	0.50 ± 0.05	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1
48 ч	0.50 ± 0.05	0.85 ± 0.10	0.58 ± 0.10

нефроэктомией приводит к поражению почечной ткани. Поражение клубочков затрагивает капсулу Шумлянско-Боумана, отмечено расширение мочевого пространства. В эпителии канальцев, особенно в проксимальных, обнаружены очаги гидропической дистрофии разной степени выраженности вплоть до баллонной. Клетки эпителия, находящиеся в состоянии некроза, отличаются отсутствием щеточной каемки. Отмечена десквамация клеток канальцевого эпителия. В просветах канальца — бледно-розовые слабо-зер-

нистые массы (рис. 3в). Поражение канальцев мозгового вещества диффузное, отмечается десквамация эпителиоцитов. Тонкие канальцы истончены, расширены и заполнены гомогенным содержимым (рис. 3г).

Введение белка-антиоксиданта Prx6 перед ишемией почки приводит к сохранению морфологии ренальной ткани при И-Р-поражении. Через 48 ч реперфузии отмечается снижение поражения паренхимы почки и сохранение целостности структурных компонентов нефрона по

**Рис. 2.** Показатели мочевины (а) и креатинина (б) в крови животных через 24 и 48 ч после И-Р-поражения правой почки с одновременной нефроэктомией левой почки. N = 7; контроль принят за единицу.

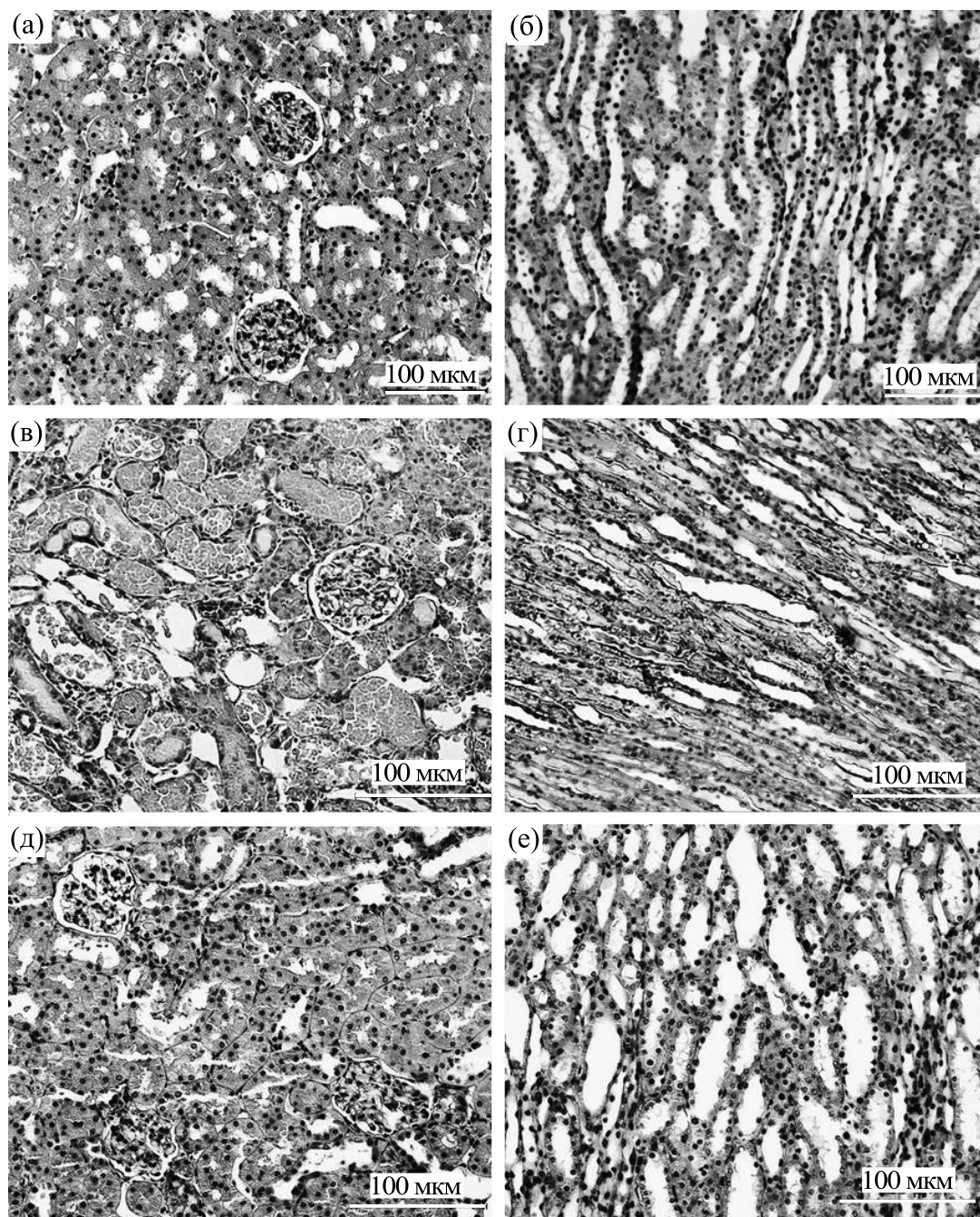


Рис. 3. Паренхима почек: (а) и (б) — контрольная группа; (в) и (г) — ишемия 45 мин, реперфузия 48 ч; (д) и (е) — ишемия (45 мин)/реперфузия (48 ч), раствор белка-антиоксиданта Prx6 (1 мг/мл) вводили внутривенно за 15 мин до ишемии. (а), (в), (д) — Кортикальный слой паренхимы; (б), (г), (е) — мозговой слой паренхимы. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$.

сравнению с группой без лечения. В эпителии почечных канальцев, преимущественно в проксимальных канальцах, обнаружены очаги гидропической дистрофии. Баллонная дистрофия не отмечена. Большинство извитых проксимальных канальцев имеют сохраненную структуру и содержат неизменный каемчатый эпителий, од-

нако иногда встречаются очаговые поражения эпителия с утратой ядра и уменьшением щеточный каемки. Можно отметить некроз отдельных эпителиоцитов почечных канальцев (рис. 3д). Структурные нарушения тонкого канальца не отмечены, просветы не расширены. Однако местами отмечается десквамация отдельных эпителио-

Таблица 2. Суммарные результаты гистологического анализа почечной ткани после И-Р-поражения

Морфологические признаки поражения [20]	Контроль	И-Р	И-Р + Ргхб
Структурные нарушения клубочка	—	—	—
Сегментарные поражения клубочков	—	+	—
Гидротопическая дистрофия эпителия извитых канальцев	—	+	±
Баллонная дистрофия эпителия извитых канальцев	—	+	—
Поражение эпителиоцитов извитых канальцев	—	+	±
Структурные нарушения тонкого канальца	—	—	—
Поражение эпителиоцитов тонких канальцев	—	+	±
Скопление в просветах извитых и тонких канальцев гомогенного содержимого	—	+	±
Нарушение реологических свойств крови	—	±	±
Отек интерстиция	—	±	±

Примечание. Гистологические изменения оценивали по степени выраженности признаков поражения: «—» — отсутствие признаков поражения; «±» — слабо выраженные поражения; «+» — ярко выраженные признаки поражения.

цитов почечных канальцев, а также скопление гомогенного содержимого (рис. 3е). В табл. 2 представлены суммарные результаты гистологического анализа почечной ткани после И-Р-поражения.

И-Р-поражение почки приводит к повреждению тканей печени (рис. 4). В норме паренхима печени образована гепатоцитами, которые формируют печеночные дольки. В центре дольки находится вена, к которой сходятся синусоидные капилляры. Между долками располагается портальная зона, включающая печеночную триаду: междольковую вену, междольковую артерию и желчный проток (рис. 4а).

Через 48 ч реперфузии почки в печени отмечается выраженная сосудистая реакция: полнокровие центральных вен дольки и вен портальных трактов, очагово-диффузное полнокровие и расширение синусоидных капилляров с эритростазами. Наблюдается отек соединительной ткани, сопровождающей триады, с выраженной диффузной инфильтрацией лейкоцитов и нейтрофилов. Отмечена гидропическая дистрофия и некроз гепатоцитов перипортальной зоны. Желчные протоки — без изменений (рис. 4б). Введение белка-антиоксиданта Ргхб перед ишемией почки приводит к сохранению морфологии печеночной ткани при ренальном И-Р-поражении. Отмечается отсутствие выраженной сосудистой реакции. Можно встретить единичные сосуды в состоянии вазодилатации. Также отмечено снижение очагов кровенаполнения синусоидных капилляров. Соединительная ткань, сопровождающая триады, — со слабой очаговой лейкоцитарной инфильтрацией. Гидропическая дистрофия перипорталь-

ных гепатоцитов носит очаговый характер. Мелкоочаговые некрозы в пределах дольки. Желчные протоки — без изменений (рис. 4в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании впервые был продемонстрирован полиорганный протекторный эффект экзогенного пероксиеродоксина 6 при свободно-радикальных патологиях. Ренальное И-Р-поражение почки нарушает морфофункциональное состояние печени [2–6, 8]. Среди механизмов поражения печени при ишемии-реперфузии почек особое место занимает окислительный стресс, который является триггером для многих внутриклеточных процессов [3–6, 8]. Индукция И-Р-поражения почек приводит к увеличению циркулирующих провоспалительных цитокинов (TNF- α и IL-6), которые напрямую вызывают дисфункцию печени, и опосредуют повышение проницаемости кровеносных сосудов в печеночной ткани и приток нейтрофилов и Т-лимфоцитов [2]. Одновременно в печени при ренальном И-Р-поражении отмечается рост активности источников АФК — ксантиноксидазы, миелопероксидазы, НАДФ-оксидазы, циклооксигеназы, NO, особенно на начальном этапе реперфузии, и снижение активности антиоксидантных ферментов [3–6, 8, 21]. Исследователи отмечают, что дисфункция печени, которая отражена в увеличении активности плазменных трансаминаз, развивается в первые часы реперфузии [2, 5, 6].

Исходя из этого, принципиальным моментом для протекции печени при ренальном И-Р-поражении является нейтрализация окислительного

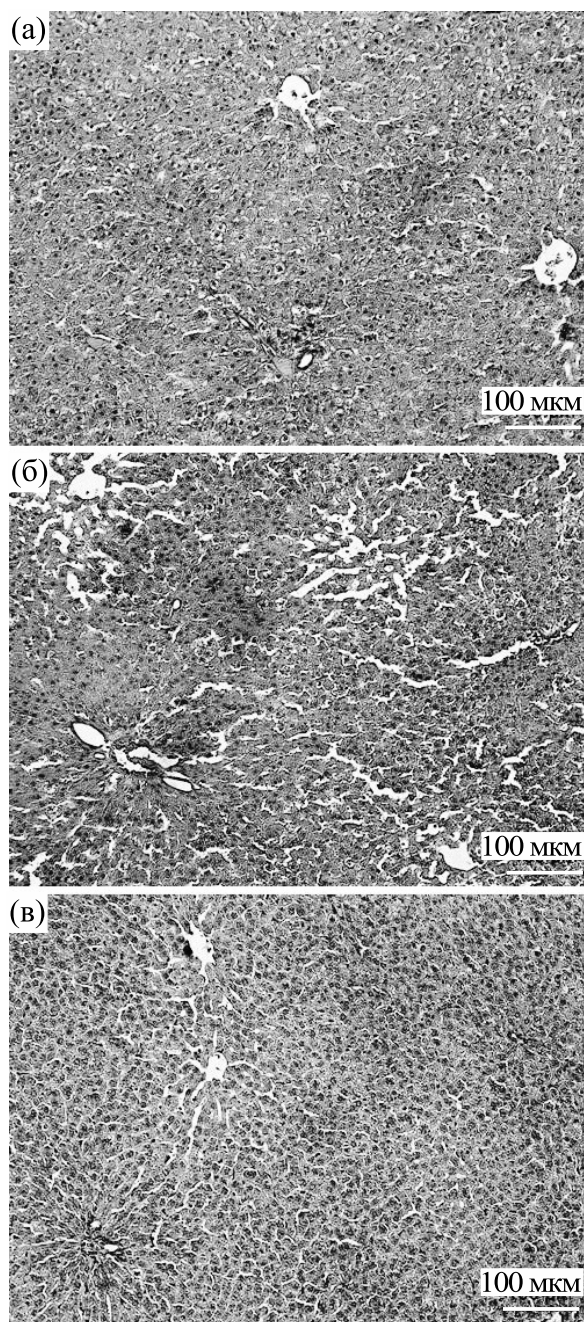


Рис. 4. Паренхима печени: (а) — контрольная группа; (б) — ишемия 45 мин, реперфузия 48 ч; (в) — ишемия (45 мин)/реперфузия (48 ч), раствор белка-антиоксиданта Prx6 (1 мг/мл) вводили внутривенно за 15 мин до ишемии. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$.

стресса и гиперпродукции АФК в печени на начальных этапах реперфузии почки. Для нейтрализации окислительного стресса и гиперпродукции АФК при И-Р-поражении почки используют экзогенные антиоксидантные вещества. Так, внутрибрюшинное введение мелатонина привело к снижению в печени уровня перекисного окис-

ления липидов, активности ксантиноксидазы и миелопероксидазы [3]. Инфузия восстановленного глутатиона до ишемии почек улучшила архитектуру печени и была связана со снижением уровня перекисного окисления липидов печени и сывороточных аланин-трансаминаз [6].

В настоящей работе в качестве протектора печеночной ткани от повышенного уровня АФК при ренальной ишемии-реперфузии был выбран мощный антиоксидант — фермент пероксиредоксин 6. Протекторный эффект экзогенного Prx6 в условиях И-Р-поражения связан в первую очередь с его антиоксидантной активностью, а также участием в сигнально-регуляторных путях в клетке [12, 19]. Для оценки гепатопротекторного действия Prx6 использовали модель И-Р-поражения почки с одновременной нефроэктомией у крыс. В качестве контроля использовали животных, которым была проведена только нефроэктомия. Нефроэктомия вызывает кратковременное повышение концентраций мочевины и креатинина в крови (до 5 ч) и не приводит к повреждению структурных элементов нефрона сохранившейся почки [3].

Prx6 вводили внутривенно за 15 мин до 45-минутной ишемии. Было показано, что И-Р-травма единственной почки приводит к поражению структур ренальной и печеночной тканей. В ренальной ткани отмечено повреждение структур нефрона коркового и мозгового вещества и гидropическая дистрофия эпителия разной степени выраженности. Преимущественное поражение эпителия проксимальных каналов связано с активными метаболическими процессами и насыщенностью цитоплазмы эпителиоцитов митохондриями. В связи с поражением капиллярной сети в мозговом веществе происходит нарушение водно-электролитного обмена, что приводит к скоплению гомогенного содержимого в канальцах. Морфологические нарушения почечной паренхимы отражены в увеличении концентрации маркеров фильтрационной способности почек — мочевины и креатинина. Более высокие уровни этих метаболитов наблюдаются через 24 ч реперфузии, чем через 48 ч, что коррелирует с данными других авторов [9, 14, 18].

При И-Р-поражении почки наблюдаются признаки повреждений в печеночной паренхиме. Через 48 ч реперфузии ишемизированной почки в печени можно отметить выраженную сосудистую реакцию, гидropическую дистрофию и некроз гепатоцитов перипортальной зоны. Поражение гепатоцитов печени при И-Р-поражении почки приводит к увеличению активности АЛТ и АСТ в крови через 24 ч реперфузии, что коррелирует с данными других авторов [2, 3, 6, 9]. Через 48 ч реперфузии концентрация этих метаболитов остается на высоком уровне. Рост активности пече-

ночных ферментов в крови прямо указывает на повреждение клеток печени [1]. На мышинной модели И-Р-поражения почки было показано, что уже через 5 ч после ренальной ишемии в печени отмечались дегенеративные изменения и лейкоцитарная инфильтрация. Тяжесть повреждений в печени возрастала через 24 ч и коррелировала с ростом АЛТ в плазме [2].

Внутривенное введение Rgx6 перед ишемией почки приводит к сохранению морфологии ренальной и печеночной ткани при И-Р-поражении почки. Отмечено отсутствие структурных нарушений почечного тельца и канальцев. Дистрофические изменения эпителия носят очаговый характер. Снижение уровня поражения ишемизированной ренальной ткани отражается в нормализации концентраций мочевины и креатинина в крови через 24 и 48 ч реперфузии, что коррелирует с данными других авторов [14, 18].

Кроме того, внутривенное введение Rgx6 перед ишемией почки приводит к сохранению морфологии печеночной ткани. Через 48 ч реперфузии в печени отсутствует сосудистая реакция, а дистрофия гепатоцитов перипортальной зоны носит очаговый характер. Минимизация поражения печеночной паренхимы отражается в уменьшении активности трансаминаз АЛТ и АСТ в крови через 24 и 48 ч реперфузии. Полученные данные напрямую указывают на гепатопротекторный эффект экзогенного Rgx6 при И-Р-поражении почки.

Таким образом, введение Rgx6 до И-Р-повреждения почки обеспечивает сохранение морфологических и физиологических параметров не только ренальной, но и печеночной тканей. Эти данные указывают на полиорганный протекторный эффект экзогенного пероксиредоксина 6 при И-Р-поражении. Мы полагаем, что применение Rgx6 может быть эффективным подходом к профилактике не только И-Р-повреждений, но и вызванного этой травмой поражения отдаленных органов. Возможность практического применения рекомбинантного Rgx6 в данном аспекте требует дополнительных исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Микрофотографии, представленные в публикации, были получены с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ФИЦ ПНЦ БИ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей» Основным документом, регламентирующим проведение настоящего исследования, являлось «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» №57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Lane, J. J. Dixon., I. MacPhee, et al., *Nephrol. Dial. Transplant.* **28** (17), 1634 (2013).
2. S. W. Park, S. W. C Chen, M. Kim, et al., *Lab. Invest.* **91**, 63 (2011).
3. E. Fadillioglu, Z. Kurcer, H. Parlakpinar, et al., *Arch. Pharm. Res.* **31** (6), 705 (2008).
4. M. H. Emre, H. Erdogan, and E. Fadillioglu, *Gen. Physiol. Biophys.* **25**, 195 (2006).
5. Y. Shang, S. M. Hewage, Ch. U. B. Wijerathne, et al., *Front. Med. (Lausanne)* **7**, 201 (2020).
6. F. Golab, M. Kadkhodae, M. Zahmatkesh, et al., *Kidney Int.* **8**, 783 (2009).
7. А. Ю. Николаев, Эффективная фармакотерапия **44**, 22 (2013).
8. M. Serteser, T. Koken, A. Kahraman, et al. *FACS J. Surg. Res.* **107**, 234 (2002).
9. H. Najafi, M. Z. Yarijani, S. Changizi-Ashtiyani, et al., *PLoS One* **12** (11), (2017).
10. E. Y. Plotnikov, A. V. Kazachenko, M. Y. Vyssokikh, et al., *Kidney Int.* **72** (12), 1493 (2007).
11. Б. Г. Лукичев, О. Ю. Подгаецкая, А. В. Карунная и др., *Нефрология* **18** (1), 25 (2014).
12. A. B. Fisher, *J. Lipid Res.* **59** (7), 1132 (2018).
13. A. E. Gordeeva, A. A. Temnov, A. A. Charnagalov, et al., *Dig. Dis. Sci.* **60**, 3610 (2015).
14. O. A. Palutina, M. G. Sharapov, A. A. Temnov, et al., *Bul. Exp. Biol. Med.* **160**, 322 (2015).
15. В. И. Новоселов, В. К. Равин, М. Г. Шарапов и др., *Биофизика* **56** (5), 873 (2011).
16. A. G. Volkova, M. G. Sharapov, V. K. Ravin, et al., *Russ. Pulmonol.* **6** (2), 84 (2017).
17. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko, et al., *Free Radic. Res.* **51** (2), 148 (2017).
18. R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.* **378** (2), 319 (2019).
19. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and S. V. Gudkov, *Antioxidants (Basel)* **8** (1), 15 (2019).
20. В. В. Кунгурова, С. В. Хасанянова и Е. И. Филиппенкова, *Проблемы экспертизы в медицине* **12**, 47 (2012).
21. M. Matsuyama, R. Yoshimura, T. Hase, et al., *Transplant. Proc.* **37**, 370 (2005).

Hepatoprotective Effect of Peroxiredoxin 6 in Ischemia-Reperfusion Kidney Injury**A.E. Gordeeva*, E.A. Kurganova**, and V.I. Novoselov*****Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia****Pushchino State Natural Science Institute, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Oxidative stress caused by ischemia-reperfusion kidney damage may play a key role in liver dysfunction. To lower the degree of liver and kidney damage in renal ischemia-reperfusion injury, we have used the exogenous antioxidant enzyme peroxiredoxin 6, which is capable of reducing a wide range of hydroperoxides and involved in intracellular and intercellular signal transmission. Rats were subjected to ischemic renal injury for 45 minutes with simultaneous left-sided nephrectomy and examined at 24 and 48 hours after reperfusion. Peroxiredoxin 6 was administered intravenously 15 minutes before ischemia. Damage to the renal and hepatic tissues was determined by histological methods; the concentrations of creatinine, urea, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in the blood were measured to assess organ functions. Reperfusion resulted in increased plasma concentrations of creatinine, urea, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase; architecture violation of the renal nephrons and the development of a pronounced vascular reaction in the liver with foci of degenerative changes. The use of exogenous peroxiredoxin 6 led to a decrease in the damage to the renal and hepatic tissues and to the normalization of the level of renal and hepatic metabolites. Thus, peroxiredoxin 6 exhibits both a nephro-protective effect in renal ischemia-reperfusion and reduces morphological and functional damage to distant organs, in particular, the liver.

Keywords: peroxiredoxins, ischemia – reperfusion, kidneys, liver

КОСТНАЯ СИСТЕМА – ЕЩЕ ОДНО ДЕПО ИЗОТОПОВ ЙОДА

© 2021 г. Н.П. Лысенко, Л.В. Рогожина, Л.А. Ромодин, И.И. Ковалев

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

E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 10.04.2021 г.

После доработки 13.05.2021 г.

Принята к публикации 18.05.2021 г.

Гамма-спектрометрическим методом показано, что при поступлении в организм крыс радиоактивного изотопа ^{125}I он активно накапливается не только в щитовидной железе, но и в костях. Уровень активности ^{125}I в костной ткани оказался вполне сравнимым с таковой по ^{90}Sr , для которого костная ткань является критической. Несмотря на то что удельная радиоактивность ^{125}I в костях существенно ниже, чем в щитовидной железе, гораздо большая масса костного аппарата обуславливает высокий уровень облучения красного костного мозга. При авариях на объектах атомной промышленности вместе с ^{125}I в атмосферу попадает и ^{131}I , который является не только γ -излучателем, но и жестким β -излучателем – ведущим дозообразующим радионуклидом в первый послеаварийный период. В связи с этим результаты, полученные по ^{125}I , вполне сопоставимы с ^{131}I в силу идентичности характера их распределения в организме животных и человека.

Ключевые слова: распределение йода, крысы, гамма-спектрометрия, инкорпорированное облучение, ионизирующее излучение.

DOI: 10.31857/S0006302921050185

Восприимчивость костной системы к действию ионизирующей радиации двояка: красный костный мозг является одним из наиболее чувствительных органов. Морфологически регистрируемые изменения в нем наблюдаются уже при поглощенной дозе излучения, равной 0.25 Гр [1, 2], в то время как по данным авторов работы [3] сама по себе костная ткань резистентна к радиации и относится к группе низкочувствительных органов и тканей. Известно, что кости являются критическим органом для изотопов стронция, проявляющего антагонистические свойства относительно кальция [4–6]. Поэтому при радиационных авариях, подобных той, что произошла на Чернобыльской атомной электростанции в 1986 г., контрмеры по снижению негативных последствий для опорно-двигательной системы разрабатывались в свете недопущения накопления в костях стронция [7]. В то же время в ранние сроки после радиационных аварий основными дозообразующими радионуклидами являются изотопы йода, для которых критическим органом является щитовидная железа [8–10].

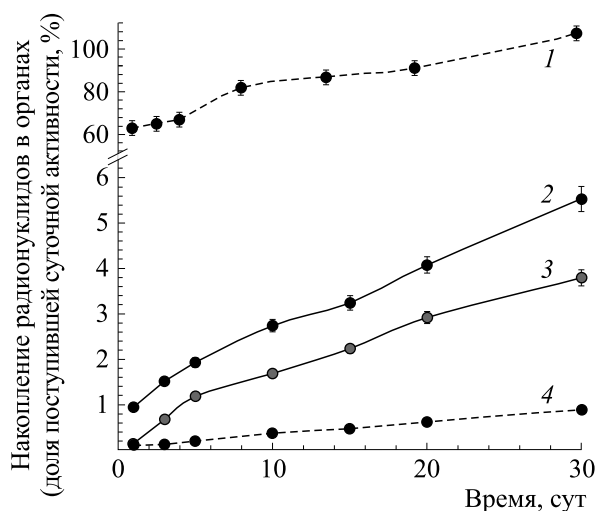
В настоящей работе нами методом гамма-спектрометрии на экспериментальной модели (крысы *Rattus norvegicus* линии *Wistar*) было показано, что ^{125}I накапливается не только в щитовид-

ной железе, но и значительно откладывается в костной системе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальной модели были использованы крысы *Rattus norvegicus* линии *Wistar* массой 190–200 г в количестве 35 особей. С целью поступления одинаковой радиоактивности каждой крысе дважды в сутки (утром и вечером) скармливали сухарики из пшеничного хлеба, пропитанные раствором, содержащим ^{90}Sr активностью 377.5 Бк/г в виде $^{90}\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ и ^{125}I активностью 2533.5 Бк/г в виде Na^{125}I . Суммарная радиоактивность сухарика составляла 2911 Бк. Суммарное суточное поступление радионуклидов в организм крысы составило: ^{90}Sr – 755 Бк/крысу, ^{125}I – 5067 Бк/крысу. Суточная активность, поступающая с кормом, составляла 5822 Бк/крысу.

Несмотря на то что среди изотопов йода, выпавших в результате радиоактивных выбросов при авариях на объектах радиационной промышленности, основную долю составляет ^{131}I [11], нами был использован ^{125}I в силу того, что он имеет больший период полураспада (60 суток против



Накопление йода в органах крыс в сравнении с накоплением стронция в костях: 1 — накопление ^{125}I в щитовидной железе, 2 — накопление ^{90}Sr в костях, 3 — накопление ^{125}I в костях, 4 — накопление ^{125}I в мышцах.

8.3 суток у ^{131}I [12]), что облегчает его использование в научных исследованиях. Кроме того, ^{125}I является мягким γ -излучателем, более безопасным для исследователей и причиняющим меньшие страдания лабораторным животным (требование Директивы 2010/63/EU о правах лабораторных животных), чем ^{131}I — жесткий γ - и β -излучатель [11]. Что же касается адекватности результатов исследования, то они полностью переносимы на ^{131}I в силу идентичности характера распределения ^{125}I и ^{131}I в организме животных и человека [7, 11].

Для оценки содержания радионуклидов стронция и йода в организме крыс проводили эвтаназию лабораторных животных с использованием CO_2 -камеры. Эвтаназии подвергали по пять крыс из исследуемой группы через 1, 3, 5, 10, 15, 20 и 30 суток после начала эксперимента. Далее животных препарировали и брали для исследований: 1) костную ткань как критическую для ^{90}Sr [4, 8]; 2) мышцы, составляющие основную массу животного; 3) щитовидную железу как критический орган для изотопов йода [8]. Для измерения удельной активности нативные образцы тканей и органов взвешивали и помещали в пластиковые пробирки. Измерение активности ^{125}I в щитовидной железе, мышечной ткани и костях проводили на гамма-счетчике «Мультигамма 1261» (LKB, Швеция) с фирменным программным обеспечением. Удельную бета-активность в костной ткани определяли методом бета-спектрометрического анализа с применением Радиоспектрометрического комплекса с программным обеспечением

«Прогресс-320» (ООО НПП «Доза», Россия). В качестве исследуемого образца для бета-спектрометрического измерения удельной радиоактивности мы брали бедренные кости, по две от каждой особи. По каждой группе проводили физическое усреднение. Для приготовления счетных образцов использовали метод сухой минерализации. Метод основан на полном разложении органических веществ путем термической обработки пробы и состоит из высушивания, обугливания и озоления.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гамма-спектрометрические исследования активности ^{125}I показали, что в щитовидной железе как критическом органе накапливается наибольшее количество данного радионуклида (рис. 1), в то время как ^{90}Sr максимально накапливается в костной ткани, что полностью соответствует литературным данным [7–9].

Вместе с этим отмечены довольно существенные значения активности йода в костной ткани, причем более высокие по сравнению с мышечной во все сроки исследования. Динамика накопления ^{125}I в костной ткани повторяет таковую для ^{90}Sr , но на более низком уровне (рис. 1).

Из данных, представленных на рис. 1, следует, что костную систему можно вполне считать депо для изотопов не только стронция, но и йода: кривая накопления йода в костях повторяет таковую для стронция, а значения процентной доли активности от суточного поступления в костях для ^{125}I не сильно отличаются от таковых для ^{90}Sr , значительно превосходя это значение для ^{125}I в мышцах. При этом необходимо отметить, что процентная доля накопления йода в костях более чем в десять раз ниже по сравнению с щитовидной железой. Тем не менее полученные данные свидетельствуют о том, что накопление изотопа йода в костях значительно. Это необходимо учитывать при разработке контрмер для защиты опорно-двигательного аппарата в случае радиационных загрязнений местности. С этой целью следует проводить профилактические и терапевтические мероприятия не только по снижению поступления радиоактивного стронция в костную ткань, но и радиоактивных изотопов йода.

Несмотря на то что удельная активность по ^{125}I в щитовидной железе существенно выше, чем в костях, накопление в них йода весьма значительно ввиду гораздо большей массы костного аппарата в сравнении с массой щитовидной железы. В связи с этим, общая радиоактивность йода в костях значительно превышает таковую в щитовидной железе, что обуславливает необходимость корректировки

расчета доз внутреннего облучения, в особенности — для красного костного мозга.

Поскольку ^{131}I является не только γ -, но и β -излучателем и составляет существенную долю в аварийных выпадениях, необходимо уточнение дозы облучения как по γ -, так и по β -излучению. Данные по накоплению ^{125}I в костях и щитовидной железе валидны для ^{131}I , так как изотопы одного элемента абсолютно одинаково распределяются в организме [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования достоверно установлен значительный уровень накопления ^{125}I в костном аппарате крыс, вполне сравнимый с таковым для ^{90}Sr , для которого костный аппарат является критическим. И хотя уровень удельной активности ^{125}I в костях был существенно ниже, чем в щитовидной железе, считающейся критическим органом для изотопов йода, костный аппарат также можно вполне считать критическим для радиоактивного йода. Если при этом учитывать факт, что масса костей в организме существенно выше, чем масса щитовидной железы, получаем довольно высокий уровень общей активности ^{125}I в костях. Существенное накопление радиоактивного йода в костях означает ощутимый риск для красного костного мозга, особо чувствительного к действию ионизирующего излучения. Данный вывод делает необходимой корректировку при расчете доз облучения красного костного мозга, а также — профилактики и терапии радиационных поражений, вызванных внутренним облучением.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. С. Тиганов, в сб. «Матер. I Всесоюз. науч. конф. молодых ученых по с.-х. радиологии» (Обнинск, 1983).
2. P. Feyer, O. Titlbach, and F. Hoffman, *Folia Haemat (DDR)* **116** (3–4), 87 (1989).
3. Б. Б. Мороз и С. П. Гроздов, *Мед. радиология* **5** (2), 46 (1960).
4. И. Я. Василенко и О. И. Василенко, *Энергия: экономика, техника, экология* **4**, 26 (2002).
5. В. Ф. Журавлёв, *Токсикология радиоактивных веществ* (Энергоатомиздат, М., 1990).
6. Ю. И. Москалёв, *Радиобиология инкорпорированных радионуклидов* (Энергоатомиздат, М., 1989).
7. В. С. Калистратова, И. К. Беляев, Е. С. Жорова и др., *Радиобиология инкорпорированных радионуклидов* (ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, М., 2016).
8. J. Zhou, G. Cheng, H. Pang, et al., *Bosnian J. Basic Med. Sci.* **18** (4), 305 (2018).
9. R. Samadi, B. Shafiei, F. Azizi, and A. Ghasemi, *Cell J.* **19** (2), 184 (2017).
10. S. Feitelberg, P. E. Kaunitz, L. R. Wasserman, and S. B. Yohalem, *Am. J. Med. Sci.* **216**, 129 (1948).
11. Б. Н. Анненков, А. В. Егоров и Р. Г. Ильязов, *Радиационные аварии и ликвидация их последствий в агрофосфере* («ФЭН», АН РТ, Казань, 2004).
12. В. А. Бударков, В. А. Киршин и А. Е. Антоненко, *Радиобиологический справочник* (Ураджай, Мн., 1992).

Skeletal System as an Additional Storage System for Iodine Isotopes

N.P. Lysenko, L.V. Rogozhina, L.A. Romodin, and I.I. Kovalev

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

Using the gamma-spectrometric method, we found that the radioactive isotope ^{125}I , entering the body of rats, actively accumulated not only in the thyroid gland, but also in the bones. The ^{125}I activity level in bone tissue was quite comparable to that of ^{90}Sr , for which bone tissue is critical. Although the specific radioactivity of ^{125}I in bones is significantly lower than in the thyroid gland, great mass of bone tissue in the skeleton underlies a high level of radiation to the red bone marrow. From nuclear power facilities, along with an accidental release of ^{125}I , ^{131}I , which is not only a gamma but also a beta emitter, a leading radionuclide in dose formation during the first days after the accident, also releases to the environment. In this regard, the results obtained for ^{125}I are quite comparable to data on ^{131}I in terms of identical nature of their distribution in animals and humans.

Keywords: iodine distribution, rats, gamma-ray spectrometry, incorporated irradiation, ionizing radiation

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛГОРИТМОВ ОЦЕНКИ ДВИЖЕНИЯ ЦЕНТРА МАСС ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СТАБИЛОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

© 2021 г. П.А. Кручинин, М.А. Подопряхин, И.Д. Бекеров

Механико-математический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: pkruch@mech.math.msu.su, podoprakhin.maxim@gmail.com, omert14@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.12.2020 г.

После доработки 07.07.2021 г.

Принята к публикации 08.07.2021 г.

Сравниваются подходы к определению горизонтальных координат центра масс, применимые для стабиланализаторов, измерениями которых являются только вертикальные составляющие усилий. Первый из этих подходов использует информацию не только о начальном положении и скорости центра масс, но и о его финальном состоянии. Второй связан с использованием предположения об отсутствии неустойчивых составляющих в движении и использует методы частотной фильтрации. Известные алгоритмы модифицированы для решения задачи в условиях совершения человеком достаточно интенсивных движений. Рассмотренные модифицированные алгоритмы сравнивались для записей движений обследуемых, выполнявших на стабиланализаторе пробу со ступенчатым отклонением. Одновременно система видеокамер использовалась для определения координат маркера, закрепленного приближенно на высоте центра масс. Продемонстрирована работоспособность всех модифицированных алгоритмов. Отмечено, что погрешность метода оценивания, использующего двойную фильтрацию в прямом и обратном времени, оказалась меньше, чем у других процедур.

Ключевые слова: стабилометрия, постурология, центр масс, центр давления, некорректная задача, регуляризация.

DOI: 10.31857/S0006302921050197

В современной медицине широкое распространение получил простой и дешевый метод стабиланализаторных исследований. Их проводят с использованием стабиланализатора — измерительного комплекса, предназначенного для регистрации, обработки и анализа перемещения центра давления при стоянии человека на плоскости опоры. Эти показания используют для выявления двигательного-координационных нарушений и их реабилитации. Удержание равновесия при стоянии является динамическим процессом, в ходе которого перемещения центра давления могут заметно отличаться от проекции центра масс на плоскость опоры. Различие этих точек порождает задачу оценивания проекции центра масс на плоскость опоры по показаниям стабиланализатора. Решение этой задачи востребовано в современных исследованиях (см., например, работы [1–9]). При этом в ряде случаев (например, в работах [7, 9]) в качестве оценки движения центра масс используют медленную (<0.5 Гц) составляющую движений центра давления. Такой подход приемлем в задачах анализа движений человека

при поддержании вертикальной позы, но требует уточнений при совершении более интенсивных движений.

Задача определения положения центра масс по показаниям силовой платформы при ходьбе на временах порядка секунды достаточно успешно решалась в результате простого численного интегрирования [10, 11]. При удержании человеком равновесия в основной позе требуется решение этой задачи для более продолжительных временных интервалов порядка десятков секунд или даже минут. Задачу необходимо решать с привлечением математической модели движения человека. Обычно в качестве такой модели используется модель перевернутого маятника. Однако даже использование простейшей модели приводит к постановке математически некорректной задачи: для ее решения приходится интегрировать численно дифференциальное уравнение перевернутого маятника, решение которого неустойчиво. В этом случае имеет место экспоненциальное нарастание ошибки оценивания и для парирования

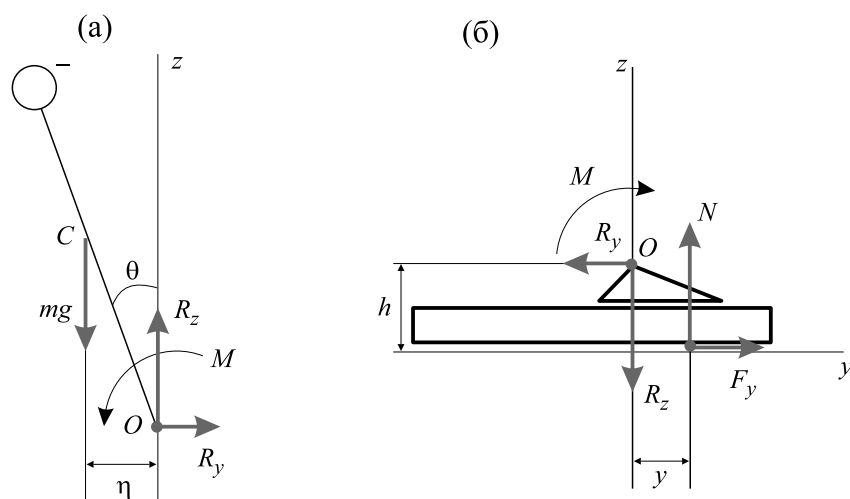


Рис. 1. Модель движений человека в сагиттальной плоскости. Показаны силы, действующие на модель стержня, имитирующего тело человека (а), и на систему «стопы ног – платформа стабилоанализатора» (б).

погрешности необходимо привлекать дополнительную информацию.

При использовании многокомпонентных силовых платформ используется способ коррекции результатов численного интегрирования при равенстве нулю проекций реакции опоры на одну из горизонтальных осей [12–14]. Этот способ получил название «zero-point-to-zero-point integration». В соответствии с теоремой о движении центра масс в момент времени, когда горизонтальная составляющая реакции опоры равна нулю, центр масс и центр давления лежат на одной отвесной линии. В работах [12] и [14] предлагается использовать для восстановления движения центра масс интервалы между моментами с нулевой величиной горизонтальной составляющей реакции опоры. Тогда определение координат центра масс сводится к решению краевой задачи.

Сравнение методов оценки положения центра масс с использованием различных наборов измерительной информации проведено в работе [13]. На практике часто используются простые силовые платформы (стабилоанализаторы), у которых измерение горизонтальных усилий отсутствует. Сравнение же различных модификаций алгоритмов определения положения центра масс для таких систем не проводилось.

Известные методы определения положения центра масс, применимые для стабилоанализаторов, измерениями которых являются только вертикальные составляющие усилий, разделим по виду применяемой дополнительной информации:

1. Используется информация не только о начальном положении и скорости центра масс, но и о конечном положении и скорости (см., например, работу [8]). Подобные приемы могут использоваться на этапах модифицированных алгоритмов

«zero-point-to-zero-point integration», когда измерения горизонтальных сил не используются [14].

2. Используется предположение об отсутствии экспоненциальных составляющих в движении в решении уравнений движения системы. Тогда задача сводится к анализу «установившихся» решений [1, 13, 15–17].

Соответствующие алгоритмы известны в литературе и достаточно успешно используются при анализе удержания человеком вертикальной позы. Использование подобных алгоритмов в задачах с интенсивным движением в окрестности вертикальной позы, таких как проба со ступенчатым воздействием [18], в литературе не обсуждалось. Между тем применяемые алгоритмы требуют некоторой модификации.

Рассмотрим подробно алгоритмы, основанные на упомянутых выше способах регуляризации задачи. Эти алгоритмы опираются на модель движения человека в виде перевернутого маятника.

МОДЕЛЬ ДВИЖЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Для моделирования движения человека воспользуемся традиционными моделями перевернутого маятника, подробно описанными в работах [19, 20]. Рассмотрим малые колебания человека в окрестности основной позы, когда его тело расположено вблизи вертикали, а ноги находятся примерно на ширине плеч. Рассмотрим для определенности модель движения человека в сагиттальной плоскости.

Для описания колебаний человека примем традиционную модель перевернутого маятника, изображенную на рис. 1. Предполагаем, что тело человека в ходе теста допустимо моделировать

недеформируемым стержнем массы m , закрепленным шарнирно в точке O — проекции центров голеностопных суставов. Центр масс стержня расположен в точке C , удаленной от точки O на расстояние l_s . Момент инерции стержня относительно фронтальной оси, проходящей через точку O , равен J . Отклонение стержня от вертикали опишем углом θ . Через M_s обозначим момент, создаваемый мышцами в голеностопном суставе, приложенный, как показано на рис. 1. Будем считать, что стопа неподвижна относительно платформы. Уравнения движения для малых значений угла θ и скорости его изменения запишем в следующем виде:

$$J\ddot{\theta} = mgl_s\theta + M_s, \quad (1)$$

где g — ускорение свободного падения. Соотношения для момента M_s получим на основании условий равновесия системы «платформа—стопа», выразив в соответствии с работой [20] проекцию реакции опоры F на сагиттальную ось из теоремы о движении центра масс:

$$M_s = Ny + Fh = Ny - ml_s h\ddot{\theta}, \quad (2)$$

где N — нормальная реакция опоры, y — сагиттальная координата центра давления, отсчитываемая от оси голеностопного сустава, а h — расстояние от точки O до плоскости, образованной чувствительными элементами платформы.

Используем соотношения (1) и (2) для записи следующего уравнения:

$$T^2 l_s \ddot{\theta} = l_s \theta + y.$$

Здесь учитывается, что при малых колебаниях можно приближенно считать, что $N = mg$, и принято обозначение $T^2 = \frac{J + ml_s h}{mgl_s}$. Учитывая, что для малых движений, при которых угол наклона не превышает нескольких градусов, для координаты центра масс верно равенство $\eta = -l_s \theta$, получим дифференциальное уравнение, связывающее координаты центра масс η и центра давления y :

$$T^2 \ddot{\eta} = \eta - y. \quad (3)$$

Это уравнение может быть использовано для отыскания координаты центра масс в результате решения задачи Коши при начальных условиях

$$\eta(0) = \eta_0, \quad \dot{\eta}(0) = v_0$$

Отметим, что уравнение (3) не меняет вид при изменении начала отсчета координат и может применяться непосредственно к показаниям стабиллоанализатора независимо от выбранного начала отсчета.

Уравнение (3) имеет два действительных корня: $\lambda_1 = -1/T$ и $\lambda_2 = 1/T$. Его решение имеет следующий вид:

$$\eta = C_1 e^{-\frac{t}{T}} + C_2 e^{\frac{t}{T}} + \eta_{\text{чн}}. \quad (4)$$

Константы C_1 и C_2 определяются начальными условиями η_0 и v_0 , а $\eta_{\text{чн}}$ — частное решение неоднородного уравнения (3). В общем случае $C_2 \neq 0$ и соответствующее слагаемое экспоненциально нарастает. Таким образом, ошибки в задании начальных условий, погрешности модели и стабиллометрических измерений будут приводить к катастрофическому нарастанию ошибки оценки на временах $t > T \approx 0.5$ с. Как отмечалось выше, компенсации этой погрешности можно добиться двумя способами: добавлением информации о финальных условиях или использованием информации о том, что момент в голеностопном суставе обеспечивает устойчивость движения человека и компенсирует соответствующие неустойчивые слагаемые.

АЛГОРИТМ ПРИВЕДЕНИЯ К КРАЕВОЙ ЗАДАЧЕ

Предложение использовать в качестве начального и конечного моменты времени t_0 и t_f , при которых равна нулю проекция горизонтальной составляющей реакции опоры, высказано в работе [12]. При отсутствии измерений горизонтальных составляющих реакции опоры воспользуемся предположением о том, что при спокойном стоянии средние значения этих составляющих равны нулю либо пренебрежимо малы, как это сделано в работе [8]. Тогда средние значения координат центра давления и центра масс будут совпадать, а средняя скорость движения центра давления будет равна нулю. Для реализации алгоритма потребуем проводить обследование с интенсивным движением следующим образом: перед выполнением движения обследуемый находится в основной стойке в течение интервала времени $[t_0, t_p]$ и не совершает интенсивных движений; затем совершается движение, после него в течение интервала времени $[t_s, t_f]$ проводится запись движений человека, стоящего спокойно и не совершающего интенсивных движений. Средние значения координат центра масс и центра давления на интервалах времени спокойного стояния совпадают, а средние скорости их изменения равны нулю. В соответствии с этим вместо краевых условий используем следующие соотношения:

$$\begin{aligned} \int_{t_0}^{t_p} \eta(t_1) dt_1 &= \int_{t_0}^{t_p} y(t_1) dt_1; \\ \int_{t_s}^{t_f} \eta(t_1) dt_1 &= \int_{t_s}^{t_f} y(t_1) dt_1; \\ \eta(t_p) - \eta(t_0) &= 0; \quad \eta(t_f) - \eta(t_s) = 0. \end{aligned} \quad (5)$$

За оценки положения центра масс принимаются решения системы (3), (5). Для дискретизированной задачи при наличии N измерений координат центра давления получим $(N + 2)$ уравнений, решение которых будем получать методом наименьших квадратов [21].

АЛГОРИТМЫ ФИЛЬТРАЦИИ

Для использования предположения об отсутствии экспоненциальных составляющих, порожденных решением однородного уравнения, запишем передаточную функцию, соответствующую уравнению (3):

$$G(s) = -\frac{1}{T^2 s^2 - 1}. \quad (6)$$

Рассмотрим Фурье-образы $N(\omega)$ и $Y(\omega)$ функций $\eta(t)$ и $y(t)$. В силу уравнения (3) эти функции связаны между собой соотношением.

$$N(\omega) = G(i\omega)Y(\omega). \quad (7)$$

В этом случае последовательность операций «преобразование Фурье показаний стабилизатора $\rightarrow$ умножение на передаточную функцию $\rightarrow$ обратное преобразование Фурье» позволяет получить искомую оценку. Тем не менее прямое применение этого алгоритма, изложенного в работах [6, 13], приводит к значимым погрешностям оценивания вблизи границ интервала $[t_0, t_f]$. Эта погрешность не связана с видом (4) решения однородной системы. Она объясняется тем, что применение преобразования Фурье на интервале времени $[t_0, t_f]$ предполагает периодическое продолжение исследуемой функции на всю числовую ось. В этом случае, если $y(t_0) \neq y(t_f)$, продолженная функция в точках t_0 и t_f имеет разрыв первого рода. Описание этого разрыва порождает высокочастотные составляющие, которые искажаются при применении преобразования (7). При исследовании спокойного стояния разрыв граничных условий незначителен и ошибки малы. При анализе ступенчатых движений ошибка становится соизмеримой с величиной полезного сигнала. Компенсировать такую погрешность можно двумя способами.

Удаление линейного дрейфа. Представим функцию $y(t)$ в виде суммы

$$y(t) = a(t - t_0) + b + \delta(t), \quad (8)$$

где

$$a = \frac{y(t_f) - y(t_0)}{t_f - t_0}; \quad b = y(t_0). \quad (9)$$

Оценка координаты центра масс в этом случае может быть представлена в виде

$$\tilde{\eta} = a(t - t_0) + b + \chi(t). \quad (10)$$

В силу уравнения (3) Фурье-образы функций χ и δ связаны также уравнением вида (7) с передаточной функцией $G(s)$ из (6). Тогда оценка величины χ по известной δ с помощью описанной выше процедуры будет лишена описанного недостатка, так как $\delta(t_0) = \delta(t_f)$.

Алгоритм построения оценки $\tilde{\eta}$ координаты центра масс будет иметь следующий вид

1. Вычисляем константы a и b по формулам (9) и функцию $\delta(t)$ из уравнения (8).

2. Вычисляем Фурье-образ $Y(\omega)$ от функции $\delta(t)$.

3. Вычисляем $N(\omega)$ в соответствии с уравнением (7).

4. Используя обратное преобразование Фурье вычисляем $\chi(t)$ как преобраз $N(\omega)$.

5. Оценку $\tilde{\eta}$ координаты центра масс получаем по формуле (10).

Фильтрация в прямом и обратном времени. Для обоснования этого алгоритма представим передаточную функцию $G(s)$ в виде произведения

$$G(s) = -G_1(s)G_2(s),$$

$$\text{где } G_1(s) = \frac{1}{Ts - 1} \text{ и } G_2(s) = \frac{1}{Ts + 1}.$$

Передаточной функции $G_2(s)$ соответствует уравнение устойчивого фильтра:

$$T\dot{x} + x = -y, \quad (11)$$

а передаточной функции $G_1(s)$ соответствует

уравнение неустойчивого фильтра

$$T\dot{\eta} - \eta = x. \quad (12)$$

Фильтр (12) имеет единственный положительный корень и устойчив в обратном времени. В итоге процедура сводится к последовательной фильтрации показаний стабилизатора фильтром (11) в прямом времени и последующей фильтрации (12) в обратном времени.

Оба алгоритма практически эквивалентны и требуют достаточно сложных вычислений. Вычисления алгоритма двойной фильтрации проще, но применение алгоритма преобразований Фурье может оказаться предпочтительней в случае, когда требуется дополнительная обработка результатов, например, вычисления ускорения центра масс или момента в голеностопном суставе. В этом случае операцию численного дифференцирования можно обойти, переписав передаточную функцию $G(s)$. Объем вычислений при этом увеличится несущественно, и его одновременно можно дополнять частотной фильтрацией.

Этот алгоритм, в отличие от приведения к краевой задаче, не требует интервалов спокойного стояния в начале и конце записи и поэтому может использоваться при обработках любых обследо-

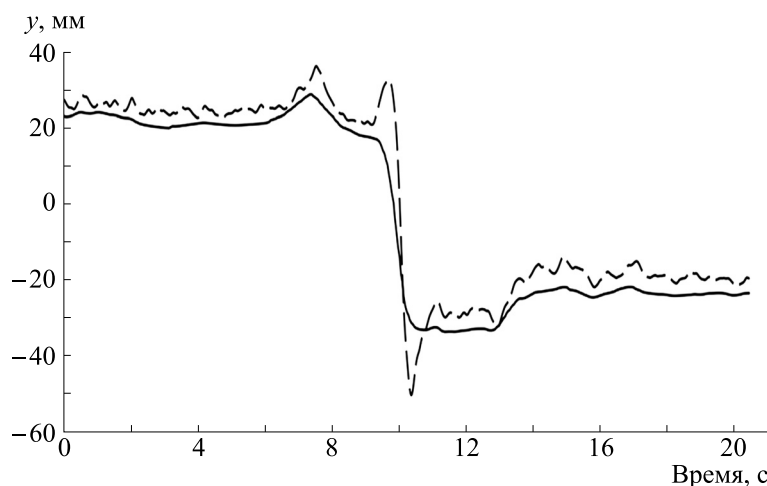


Рис. 2. Пример показаний измерительных систем на интервале возвратного движения. Сплошной линией показана сагиттальная координата маркера системы видеоанализа на поясе обследуемого, пунктирной — показания стабилоанализатора.

ваний, в ходе которых человек не совершал значимых изменений позы.

ПРОВЕДЕНИЕ ПРОБ ДЛЯ СРАВНЕНИЯ АЛГОРИТМОВ

Для сравнения погрешностей алгоритмов в лаборатории математического обеспечения имитационных динамических систем механико-математического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова проведены записи движений четырех лиц мужского пола различной комплекции в возрасте от 20 до 60 лет, выполнявших на стабилоанализаторе «Стабилан 2-01» (ЗАО ОКБ «РИТМ», Таганрог) пробу со ступенчатым отклонением в соответствии с работой [18]. Одновременно система видеокамер ARTtrack и программа захвата изображений использовались для определения координат маркера, закрепленного на поясе человека, приблизительно на высоте центра масс.

Проба состояла в следующем. Испытуемый стоял на платформе стабилоанализатора. В ходе теста он должен быстро изменить положение туловища в сагиттальной плоскости за счет изменения угла в голеностопном суставе на произвольный угол порядка $2-3^\circ$, значительно меньший, чем максимально возможное отклонение. Через 15 с человек по команде совершает обратное движение. Такой цикл каждый обследуемый повторял десятикратно. Для синхронизации показаний измерительных комплексов в начале обследования человек совершал удар стопой по поверхности стабилметрической платформы. Вся серия движений повторялась с закрытыми глазами. Длительность записей для одного обследуемого составляла около 10 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНЕНИЯ АЛГОРИТМОВ

На основании данных, полученных из обследования, по приведенным алгоритмам вычисляли координаты центра масс. Расчеты проводили для следующих значений переменных: высоту центра масс l_s над голеностопом в основной стойке считали равной половине роста, J принимали равным моменту инерции стержня длины $2l_s$.

Величину h принимали равной $h = 0.1$ м. Такое приближение принимали намеренно, в соответствии с возможностями получения быстрых грубых оценок в ходе обследований.

Для сравнения алгоритмов исходные записи были поделены на 20-секундные интервалы. Рассматривали два типа временных интервалов: интервалы, на которых человек находился в «состоянии покоя» (не совершал интенсивных движений), и интервалы, на которых человек совершал активное движение (наклон вперед или возвращение в исходную позицию). Для каждого обследуемого в итоге было выбрано по 20 интервалов спокойного стояния и 20 интервалов интенсивного движения. Характерный вид показаний измерительных систем при активном движении показан на рис. 2.

На рис. 3 приведен характерный вид оценок, полученных с использованием описанных алгоритмов. Продолжительность интервалов $[t_0, t_p]$ и $[t_s, t_f]$ при решении краевой задачи принимали равной 5 с. Более наглядное представление о характере ошибок оценивания дает рис. 4, на котором приведены разности оценок координат центра масс и координат маркера системы видеоанализа.

В таблице приведены среднеквадратичные значения разностей оценок сагиттальных коор-

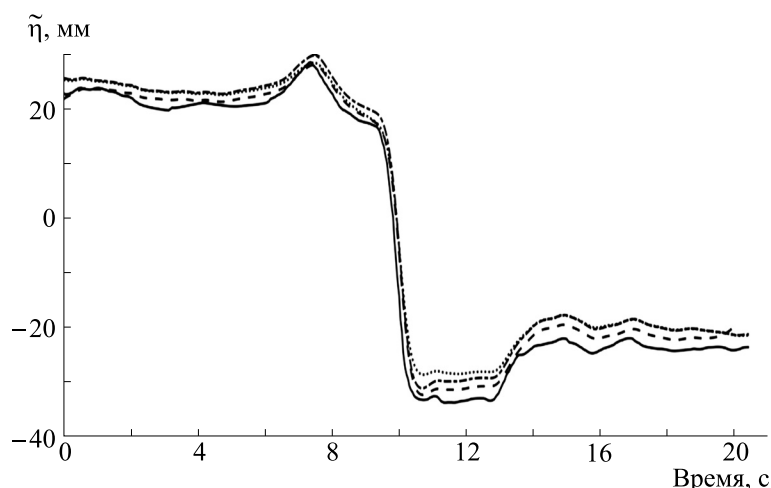


Рис. 3. Оценки сагиттальных координат центра масс на интервалах активного движения. Сплошной линией показана сагиттальная координата маркера системы видеоанализа на поясе обследуемого, штриховой — решение переопределенной краевой задачи, штрихпунктирной — результат применения двух фильтров, пунктирной — результат применения преобразования Фурье.

динат центра масс и координат маркера системы видеоанализа, рассчитанные на интервалах спокойного стояния и интервалах активного движения. Для спокойного стояния эти значения достигают величин порядка 1 мм. Для участков движения эти разности возрастают более чем в два раза. Максимальные значения в отдельных случаях достигали 25% от амплитуды движения, однако такие большие величины могли быть вызваны погрешностями синхронизации измерений, порожденными нестабильностью временных отсчетов системы видеоанализа.

Алгоритм решения краевой задачи в предложенном варианте склонен к повышенным по-

грешностям на концах интервала. Этот эффект связан с присутствием в решении неустойчивых составляющих, но, возможно, может быть подавлен в результате добавления в решение весовых коэффициентов и уточнения краевых условий.

Следует отметить, что погрешность метода оценивания, использующего двойную фильтрацию в прямом и обратном времени, меньше, чем у двух других процедур, однако эта разница может оказаться соизмеримой с погрешностями, порожденными ошибками в задании параметров системы (момента инерции и высоты центра масс над голеностопом).

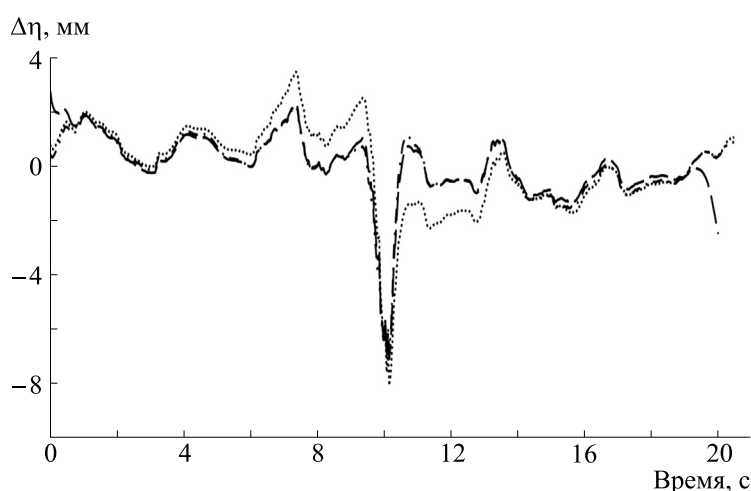


Рис. 4. Погрешности оценки сагиттальных координат центра масс на интервалах активного движения. Штриховой линией показана погрешность решения переопределенной краевой задачи, пунктирной — применения преобразования Фурье, штрихпунктирной — применения двух фильтров.

Средние квадратичные значения разностей оценок координат центра масс и маркера системы видеоанализа

Испытуемые	Разности оценок координат центра масс и маркера системы видеоанализа, мм		
	Фурье-анализ	Двойная фильтрация	Краевая задача
Спокойное стояние			
П1	0.73	0.65	0.80
П2	0.99	0.82	0.93
П3	1.00	0.85	1.15
П4	0.93	0.83	0.93
Общее	0.91	0.79	0.95
Активное движение			
П1	1.31	1.14	1.26
П2	1.56	1.45	1.83
П3	2.39	1.70	2.06
П4	2.13	1.51	1.90
Общее	1.85	1.45	1.76

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Публикация подготовлена в рамках реализации Программы создания и развития научного центра мирового уровня «Сверхзвук» на 2020–2025 годы при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (распоряжение Правительства РФ от 24 октября 2020 г. № 2744-р).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. У всех участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. A. Winter, A. E. Patla, F. Prince, et al., J. Neurophysiol. **80** (3), 1211 (1998).
2. P. G. Morasso, G. Spada, and R. Capra, Human Mov. Sci. **18**, 759 ((1999).
3. V. M. Zatsiorsky and M. Duarte, Motor Control **4**, 185 (2000).
4. E. A. F. Ihlen, N. Skjæret, and B. Vereijken, J. Biomech. **46** (3), 484 (2013).
5. L. E. Cofre Lizama, M. A. G. M. Pijnappels, and G. S. Faber, PLoS One **9** (12), e110757 (2014).
6. B. Gagey, O. Bourdeaux, and P.-M. Gagey, MTP & Rehab. J. **13**, 264. (2015).
7. Г. В. Кожина, Ю. С. Левик, А. К. Попов и Б. Н. Сметанин, Физиология человека **43** (5), 70 (2017).
8. П. А. Кручинин, К. А. Троицкий и Н. В. Холмогорова. Инженерный журнал: наука и инновации **2** (74), (2018). DOI: 10.18698/2308-6033-2018-2-1728
9. Г. В. Кожина, Ю. С. Левик, А. К. Попов и Б. Н. Сметанин, Физиология человека **45** (6), 66 (2019).
10. T. Shimba, J. Biomechanics **17**, 53 (1984).
11. L. Tesio, P. Civaschi, and L. Tessari, Am. J. Phys. Med. **64** (2), 57 (1985).
12. V. Zatsiorsky and D. King, J. Biomechanics **31**, 161 (1998).
13. D. Lafond, M. Duarte, and F. Prince, J. Biomechanics **37**, 1421 (2004).
14. M. A. Jaffrey, PhD Thesis (Victoria University, Melbourne, Australia, 2008).
15. B. J. Benda, P. O. Riley, and D. E. Krebs, IEEE Trans. Rehabilitation Eng. **2**, 3 (1994).
16. O. Caron, B. Faure, and Y. Breniere, J. Biomechanics **30**, 1169 (1997).
17. O. Caron, T. Gélât, P. Rougier, and J.-P. Blanchi, J. Appl. Biomechanics **16**, 234 (2000).
18. П. А. Кручинин, Биофизика **64** (6), 1010 (2019).
19. В. С. Гурфинкель, Я. М. Коц и М. Л. Шик, Регуляция позы человека (Наука, М., 1965).
20. П. А. Кручинин. Рос. журн. биомеханики **18** (2), 184 (2014).
21. Ч. Лоусон и Р. Хенсон, Численное решение задач методом наименьших квадратов (Наука. М., 1986).

A Comparative Analysis of Algorithms for Center of Mass Estimation Based on Force Plate Data

P.A. Kruchinin, M.A. Podoprikin, and I.D. Bekerov

Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119992 Russia

Methods for the center of mass horizontal coordinate estimation which are based on the force plate data are compared. Only the centre of pressure measurements and weight are used. Such problem is mathematically incorrect and requires regularization. The first method uses initial position and velocity of center of mass, but also its terminal state estimation. The second method is associated, with the assumption unstable components in motion are absence, and uses low-pass filtering. The known algorithms have been modified to solve the problem under conditions of intense body tilt. The considered algorithms force plate data processing are modified for subjects making a «test with a stepwise disturbance». At the same time, a system of video cameras was used to determine the coordinates of a marker fixed approximately at the center of mass height. The performance ability of modified algorithms has been demonstrated. It was noted that the estimation error of the method using double filtering in forward and reverse time was less than in other algorithms.

Keywords: force plate data, postural sway, center of mass, center of pressure, incorrect problem, regularization

К ВОПРОСУ О САМООРГАНИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ НАСЕЛЕНИЯ ЗЕМЛИ

© 2021 г. С.О. Гладков

*Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет),
125993, Москва, Волоколамское шоссе, 4*

E-mail: sglad51@mail.ru

Поступила в редакцию 21.12.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята к публикации 26.01.2021 г.

Предложена новая математическая модель из тематики задач «хищник–жертва». Строго аналитически дан вывод системы нелинейных дифференциальных уравнений, качественно правильно описывающих динамику поверхностной концентрации населения Земли с учетом основных факторов «обрезания», влияющих на ее пространственно-временную эволюцию. С помощью предложенной модели показано, что вначале численность населения Земли имеет тенденцию к возрастанию, а затем, в силу открытости системы, после достижения максимума, начинает убывать. Этот факт подтвержден строгим математическим и численным расчетом.

Ключевые слова: самоорганизация и саморегуляция, модель «хищник–жертва», нелинейная динамика, концентрация популяций.

DOI: 10.31857/S0006302921050203

Задача, о которой пойдет речь, относится к общим проблемам теоретической биофизики, главная тенденция которых имеет ярко выраженное направление к области математических проблем, характеризующих вполне понятной терминологией «хищник–жертва».

Подобный тип задач изучается уже примерно в течение двух столетий, и одними из самых первых работ в этом направлении по праву считаются работы Г. Ферхюльста [1–3], в которых было предложено модельное описание эволюционного развития определенного класса индивидов. В рамках этой модели были учтены как естественный прирост популяции, так и ее естественная убыль из-за гибели вследствие вероятной встречи с хищниками.

К подобного рода проблемам относится и задача, связанная с выяснением характерной динамики развития численности населения Земли в условиях учета разнообразных естественных и искусственных факторов, обрезающих демографический рост нашей популяции. К ним можно отнести, например, такие понятия, как интеллектуальный фактор, учитывающий развитие науки, техники и технологий и приведший к «зеленой революции» и к «индустриальному птицеводству», а также социально-биологический фактор, породивший демографический переход, а именно быстрое снижение рождаемости в индустри-

альном обществе до уровня простого замещения поколений. Кроме того, не стоит сбрасывать со счетов и гендерный фактор, обуславливающий рост частично бесплодного процента людей в человеческой популяции, связанный с психическими заболеваниями и ослаблением интеллекта, вызываемыми чисто искусственным путем. Отмеченные факторы напрямую связаны с мыслительным процессом, но не инстинктивным, как у животных. К примеру, если взять гендерный фактор, внесенный в сознание человечества искусственно или иначе, насильственно, то в этом плане он никак уже не может считаться естественным.

Главной целью настоящего сообщения является доказательство того, что рост человечества является саморегулируемым и самоорганизованным (пренебрегая интеллектуально создаваемыми насильственными факторами и исключая также инопланетное вмешательство) процессом, который диктуется лишь условиями хаоса, естественными при развитии любой биологической системы (см. Приложение).

Здесь необходимо понимать, что Земля представляет собой уникальный объект для изучения развития популяций в экологически открытой и эволюционирующей по своим законам системе, которая изначально была организована таким образом, что в процессе многовековой эволюции на

ней постепенно стала появляться биологическая жизнь. В этой связи вполне прозрачным, на наш взгляд, является такое понятие, как эволюционное развитие человечества в результате естественного размножения. Поэтому сразу же возникает и вопрос: а почему рост человечества должен длиться до бесконечности? Ответ кроется в другом встречном вопросе, а почему никого не беспокоит, например, факт того, что, скажем, популяция волков не может расти до бесконечности? Совершенно понятно, что человек, вмешиваясь в Природу, сам начинает их уничтожение, однако, это действие вполне равносильно такому понятию, как насилие. В этой связи становится абсолютно понятным, что если пустить развитие все тех же волков на самотек, не вмешиваясь в их жизнь, то их популяция, достигнув определенного порога, дальше расти не будет. Связано же это будет с тем, что даже при их миграции в другие места, где более благоприятные условия, они не смогут выжить, поскольку и на новом месте будет действовать естественный, подчеркнем (а не насильственный благодаря кому-то), «обрезающий фактор». Переселение на следующее новое место обитания не улучшит ситуацию, а приведет к тому же эффекту, но только с еще большей скоростью ухода из нее ввиду сильно возросшей их численности. То есть, в конце концов, они начнут уничтожать себя сами, что является вполне логичным, например, для такой популяции, как крысы. Совершенно понятно, что уменьшение их популяции будет происходить ровно до такого критического уровня, пока их количество не выйдет на ту предельную концентрацию, которая позволит им балансировать на грани жизни и смерти, т.е. выживать. Этот абстрактный пример представляет собой идеальную полностью замкнутую и изолированную биологическую систему. В реальности, однако, идеальных систем не бывает, а потому любая биосистема является открытой, поскольку помимо волков существует и масса других животных и организмов, которые также размножаются и которые могли бы служить им, например, пищей. Ясно поэтому, что сколько бы организмов на Земле мы не рассматривали, у каждого из них имеются свои естественные враги, регулирующие численность собственной популяции. То же самое относится и к человеку как относительно разумному примату. В процессе своего размножения, способствующего перенаселенности численности любой популяции, с необходимостью происходит объективное включение каких-либо естественных, подчеркиваем, а не искусственных факторов, «обрезающих» их размножение.

Заметим также, что, помимо уже упомянутых чуть выше искусственных факторов (интеллектуальный или гендерный), к ним следует добавить и вполне объективные факторы, например, такие,

как, скажем, оживание различных дремавших до определенного момента времени микроорганизмов и вирусов, замороженных в арктических льдах и оттаявших благодаря потеплению климата Земли.

Если придерживаться несостоятельной (как сейчас говорится) теории Т. Мальтуса, в которой основным «тормозящим» фактором роста численности населения считалось ограниченное количество пищи, то надо заметить, что в те времена — в XVIII веке — это предположение было основано на утверждении, что народонаселение растет в геометрической прогрессии, а прирост пищи — в арифметической. Действительно, с этим можно было бы согласиться, но только с существенной поправкой, что речь об этом шла в эпоху сильно отсталого в плане интеллектуального развития малообразованного общества. Придерживаясь современного уровня развития сельскохозяйственной науки, можно абсолютно уверенно утверждать, что вполне реально добиться, чтобы количество произведенной пищи могло также расти в геометрической прогрессии, пропорционально росту народонаселения. Другое дело, что для этого необходимо сильно напрягаться, что не всем по вкусу, и куда проще ввести искусственно обрезающие рост популяций факторы в виде, например, гендерных.

В этой связи еще раз подчеркну, что в Приложении строго математически обоснована общая биологическая модель, придерживаясь которой, в частных случаях получаются и уравнение Вольтерра—Лотки, и Ферхюльста, и наша система уравнений (1), исследованию которой и посвящена настоящая статья.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ. ОСНОВНЫЕ УРАВНЕНИЯ

Когда речь идет о классической задаче Ферхюльста, в нее закладывается лишь простейшая формулировка модели без учета таких понятий, как, например, естественная или принудительная (по неосторожности) гибель хищников [4, 5], а также неоднородности распределения их численности по территории парка и множества других также вполне объективных естественных факторов.

В более сложной задаче, которая была сформулирована Вольтерра и Лоткой [6, 7], авторами был учтен ряд новых физических параметров, качественно влияющих на поведение всей системы в целом и, в частности, изменение концентрации самих хищников.

Более общая теория была предложена в уже совсем свежей в этом направлении чисто математической статье [8], где авторы привели подробный анализ обобщенного уравнения Вольтерра—Лот-

ки (см. также работы близкого направления [9–27]) и доказали ряд теорем, связанных с этим вопросом.

Далее мы приведем подробное исследование хаотического роста народонаселения Земли, рассматривая его на языке только двух параметров — плотности популяции n и обрезającego их роста фактора m , используя уже другую математическую модель в отличие от двух упомянутых. При этом если придерживаться современного представления о факторах сдерживания скорости роста популяций, и ввести в обрезающий фактор помимо пищевого дефицита все искусственные (т.е. гендерные и техногенные), то такой параметр будет иметь максимально возможное значение. Именно поэтому далее мы будем рассматривать только нижнюю границу этого параметра, считая, что его роль сводится только к пищевому фактору. Как увидим, даже это минимальное значение позволяет утверждать, что в силу хаотического поведения энтропии общества в целом будет иметь место и условие максимума численности населения, которое, благодаря объективным законам теории хаоса, затем неминуемо начнет спадать. Этот спад, подчеркнем, будет продиктован уменьшением энтропии, связанным с перенаселенностью, включающим естественные факторы обрезания ее численности, о которых человечество пока может даже и не догадываться.

Прежде, чем приступить к формальной стороне, касающейся строгого анализа обозначенной выше проблемы, необходимо остановиться на некоторых основных понятиях и определениях, без которых все нижеследующее изложение может оказаться малопонятным.

Будем предполагать, что распределение населения по поверхности Земли имеет однородный и равномерный характер. При этом, как кажется вполне очевидным, подобное предположение никак не должно повлиять на суть решаемой задачи. Помимо этого, будем также считать, что скорость роста численности населения α представляет собой вполне естественный природный фактор. Обрезающий фактор, роль которого мы отводим жертве, мы обозначим буквой m .

Пусть скорость убывания параметра m характеризуется некоторой постоянной величиной γ , а безразмерный параметр λ обозначает долю ее характерной убыли, в определение которой мы включим всевозможные субъективные и объективные факторы, влияющие на нее. Тогда системе динамических уравнений, описывающих естественное эволюционное развитие численности населения, можно записать в следующем вполне понятном с качественной точки зрения виде (подробности вывода см. в Приложении):

$$\begin{cases} \dot{n} = \alpha n - \frac{\beta(t)}{m} n^2, \\ \dot{m} = -\gamma m n + \lambda \varepsilon m^{\lambda+1}, \end{cases} \quad (1)$$

где $\beta(t)$ — непрерывно меняющийся от времени параметр. Он имеет вероятностный смысл и является «тормозящим» рост популяций фактором (наподобие похожего слагаемого в уравнении Ферхюльста, где этот коэффициент считался постоянным). Обрезающий фактор в знаменателе верхнего уравнения этой системы также введен не случайно. Чисто качественно он ведет к тому, что при его резком уменьшении должно произойти и резкое уменьшение численности населения. Что касается последнего (но не по значению) параметра ε , то он характеризует собой медленную скорость возможного увеличения обрезającego фактора.

Под сказанным подразумевается следующее. Достигнув определенного максимального значения, численность населения начнет свое стремительное убывание из-за начинающегося уменьшения глобальной энтропии, а именно благодаря включению обрезających факторов. Например, это может быть извержение вулкана Йеллоустон или, скажем, сдвиг литосферных плит, который породит цунами высотой в несколько десятков метров, сметающий целые континенты, еще космическое излучение, а также множество других более мелких природных катаклизмов, включающихся по мере эволюции самой Земли, свойственных любой открытой системе.

Но вот что интересно. Как бы человек не пытался навредить Природе, что является неоспоримым и объективно доказанным фактором (кстати, также способствующим уменьшению численности населения), регулирование популяции Земли является неотъемлемым элементом существования самой нашей Планеты. Подобное утверждение базируется на невозможности нарушения основного закона эволюции, связанного с хаотическим ростом глобальной энтропии и стремлении системы к хаосу, фактически означающее гибель всего живого. Отмеченный факт бесспорно приведет к изменению климатических условий, приводящих, в свою очередь, и к иному локальному перераспределению введенного нами параметра m .

Например, какие-то континенты могут уйти под воду, где-то активируются вулканы, что может породить, например, нашествие летучих мышей, а вместе с ними и каких-то эпидемий, что в целом и приведет, причем естественным образом, к уменьшению численности народонаселения. Формально это и заложено в коэффициенте $\beta(t)$ системы уравнений (1), а также в коэффициенте ε .

Подобные факторы продиктованы и вполне объективной эволюцией глобальной энтропии S

(она составляет порядка 16 миллиардов лет, пока будет иметь место вращение Земли вокруг своей оси, связанное с неостывшим пока ядром), обусловленной принципом самоорганизации нашего макромира.

Соответствующие уравнения, которые можно представить в виде (1), нетрудно получить из необходимого и достаточного (при решении синергетических проблем) условия существования экстремума некоторого функционала $\Phi\{m, n\}$, исходя из равенства $\Phi = 0$ (похожий принцип был использован, например, в работах [28, 29]).

АНАЛИЗ УРАВНЕНИЙ (1)

Вернемся теперь к формальному анализу уравнений (1) и введем следующие безразмерные концентрации:

$$x = \frac{n}{n_0}, \quad y = \frac{m}{m_0}, \quad (2)$$

где n_0 и m_0 — средние значения концентраций индивидов и обрезающего фактора соответственно.

Что касается концентрации n_0 , ее можно определить естественным образом, как $n_0 = N/S$, где $N = 7000000000$ — современное население Земли, $S = S_0/6$ — площадь поверхности суши, где $S_0 = 4\pi R^2$ — площадь поверхности Земли, R — ее радиус. Что касается конкретной величины среднего значения обрезающего рост народонаселения фактора m_0 , то чисто условно его можно ввести в виде некоторой средней наименьшей величины, позволяющей человечеству выжить. Это наименьшее значение мы будем характеризовать в виде дроби $m_0 = M/N$, где под параметром M мы будем подразумевать только количество общей пищи на Земле, опустив такие важнейшие факторы, как гендерный фактор и индустриальный. Подобное введение нам кажется вполне объективным, поскольку при таком описании мы получим оправданно реальную картину, описывающую взаимодействие обоих параметров n и m при условии, что значение m — наименьшее. Это просто означает, что всегда можно сделать корректировку условия $m_0 < m$, перейдя к искусственно увеличенному значению m . Именно в рамках такого представления, если исходить из разумных предположений чисто феноменологически, считая, например, что суточная норма потребления пищи (минимальное значение m), позволяющая выжить, определяется минимальным значением $m_0 = 1$ кг/сутки.

В итоге систему уравнений (1) можно записать следующим образом:

$$\begin{cases} \dot{x} = \alpha x - \frac{\beta(t)}{y} x^2, \\ \dot{y} = -\gamma xy + \lambda \epsilon y^{\lambda+1}. \end{cases} \quad (3)$$

В том случае, если мы хотим учесть неоднородность распределения параметров x и y по поверхности Земли, уравнения (3) следует переписать с учетом неоднородности концентраций в виде

$$\begin{cases} \dot{x} = D_1 \Delta x + \alpha x - \frac{\beta(t)}{y} x^2, \\ \dot{y} = D_2 \Delta y - \gamma xy + \lambda \epsilon y^{\lambda+1}. \end{cases} \quad (4)$$

где коэффициенты $D_{1,2}$ обладают по своему смыслу размерностью коэффициентов диффузии, а в представлении популяций просто учитывают ее миграцию, Δ_2 — двухмерный оператор Лапласа, который на сферической поверхности с фиксированным радиусом R и в сферической системе координат имеет обычный вид

$$\Delta_2 = \frac{1}{R^2} \left[\frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} \right], \quad (5)$$

где θ и φ по своему смыслу представляют собой соответственно азимутальный и полярный углы, которые можно «привязать» к параллелям и меридианам Земли, а центр сферической системы координат поместить в ее центре.

Найдем вначале стационарное решение системы уравнений (3) в однородном случае, считая, что $D_1 = D_2 = 0$, а

$$\beta(t) = \beta = \text{const}. \quad (6)$$

В результате приходим к следующей системе нелинейных алгебраических уравнений:

$$\begin{cases} \alpha \bar{x} - \frac{\beta}{\bar{y}} \bar{x}^2 = 0, \\ \gamma \bar{x} \bar{y} - \lambda \epsilon \bar{y}^{\lambda+1} = 0. \end{cases} \quad (7)$$

Отсюда получаем, что

$$\begin{cases} \bar{x} = \frac{\alpha}{\beta} \bar{y} = \left(\frac{\beta}{\alpha} \right)^{\frac{\lambda}{1-\lambda}} \left(\frac{\lambda \epsilon}{\gamma} \right)^{\frac{1}{1-\lambda}}, \\ \bar{y} = \left(\frac{\lambda \epsilon \beta}{\alpha \gamma} \right)^{\frac{1}{1-\lambda}}. \end{cases} \quad (8)$$

Чтобы численно оценить обе эти величины, мы можем, исходя из разумных предположений, задать все входящие в решение (6) параметры. Действительно, поскольку по своему смыслу все они малы (эта малость диктуется малостью безразмерных концентраций численности населения x и наименьшей доли обрезающего фактора y благодаря огромной площади поверхности Земли), то, как видно из уравнений (3), если исходить

из соображений размерности, вполне можно считать, что $\alpha = m_0/t_0$, $\beta = n_0/t_0$, $\gamma = n_0/t_1$.

Стоит заметить, что за единицу времени здесь удобно выбрать не традиционные секунды, как это обычно делается в физических задачах, а сутки. Полагая поэтому, что $\alpha = 10^{-2}$ кг/км²·сут, $\beta = 10^{-5}$ кг/км²·сут, $\gamma = 10^{-6}$ кг/км² сут, $\lambda = 10^{-2}$, $\epsilon = 10^{-2}$ (СИ, км, сут), найдем

$$\bar{x} \approx 10^2, \bar{y} = 0,1. \quad (9)$$

В пересчете на размерные величины отсюда получаются такие вполне реальные предельные значения:

$$\bar{n} \approx 10^2 n_0 \left(\frac{1}{\text{км}^2} \right), \bar{m} = 10^2 m_0 \frac{\text{кг}}{\text{км}^2 \text{ сут}}. \quad (10)$$

Поскольку радиус Земли $R \approx 6400$ км, то для средней плотности населения получаем

$$n_0 = N/S = 2,5 \cdot 10^2 \text{ км}^{-2}. \quad (11)$$

В настоящее время это составляет примерно 250 человек на квадратный километр, что и позволило нам спрогнозировать выбор приведенных выше численных значений параметров. Подставляя величину (11) в выражение (10), находим, что предельно допустимая средняя плотность населения на квадратный километр может составлять 25000 человек.

Поскольку же полная поверхность суши Земли есть $S_0 = \frac{S}{6} = \frac{2\pi}{3} R^2 \approx 8 \cdot 10^7 \text{ км}^2$, то, согласно выражению (10), для наименьшего значения обрезающего фактора мы приходим к следующей предельной оценке

$$\mu = \bar{m} S = 8 \cdot 10^9 m_0 \frac{\text{кг}}{\text{сут}}. \quad (12)$$

Для предельного же количества населения Земли найдем, согласно выражению (10):

$$\bar{N} = \bar{x} S = 8 \cdot 10^{11} \text{ человек}. \quad (13)$$

Вполне разумным нам кажется предположение, что $m_0 = 2,5$.

Поделив выражение (12) на выражение (13), получим

$$q = \frac{\mu}{\bar{N}} = 2,5 \cdot 10^{-2} \frac{\text{кг}}{\text{сут} \times \text{чел}}, \quad (14)$$

Приведенная цифра говорит о том, что для предельной численности населения Земли в 800 миллиардов человек суточная норма потребления еды (а точнее, фактор обрезания, измеряемый в граммах), имеющая значение в 25 г, фактически означает вымирание.

Это значит, что если придерживаться критерия жизни, когда доля потребления должна составлять ограничение в виде среднего значения

$$\bar{q} = 1 \frac{\text{кг}}{\text{сут} \times \text{чел}}, \quad (15)$$

то приходим к той предельной цифре численности, которая допустима и составляет, очевидно, величину

$$N_{\text{пред}} = 2 \cdot 10^{10} \text{ человек}. \quad (16)$$

Предельное число (16) указывает, что на каждом квадратном километре вполне комфортно может проживать примерно 750 человек.

И еще: согласно официальной статистике [30] каждые сутки на Земле рождается в среднем 433382 ребенка, а умирает естественным путем или суммарно погибает примерно 150000 человек.

Как видим, разность прироста народонаселения не так велика, а потому достичь значения в 20 миллиардов человек реально можно примерно через 120 лет. Совершенно понятно, что за такой промежуток времени ввиду непредсказуемости человеческой психики и общих законов Природы может произойти все что угодно.

Что же касается описания временного хода событий, которые находятся в полном соответствии с приведенными выше величинами (11)–(16), то нам следует вернуться к общим однородным уравнениям (3) и для случаев, когда $\beta(t) = \beta = \text{const}$ и $\beta = \beta(t)$ (эту зависимость мы конкретизируем), провести численное интегрирование полученной системы уравнений.

ЧИСЛЕННОЕ РЕШЕНИЕ УРАВНЕНИЙ (1)

В первом случае, когда $\beta(t) = \beta = \text{const}$, зависимость $y(x)$ показана на рис. 1.

Во втором случае, если выбрать, например, рост функции в виде степенного закона $\beta(t) = \beta_0 t^k$, где константы β_0 и k мы задаем, зависимость $y(x)$ при $k = 1$ показана на рис. 2.

Как видно из рис. 1 и 2, поведение популяции и обрезающий фактор меняются во времени довольно хаотическим образом, что вполне естественно, поскольку равномерность развития каких-либо событий нельзя уложить в рамки теории хаоса, когда речь заходит о таком сложном понятии, как изменение энтропии (см. Приложение).

Главный вывод из всего того, что было сейчас нами изложено, заключается в том, что нет ни малейших оснований и повода вмешиваться в естественный ход развития жизни на Земле и пытаться предпринять какие-либо шаги с целью принудительного регулирования роста народонаселения на нашей планете.

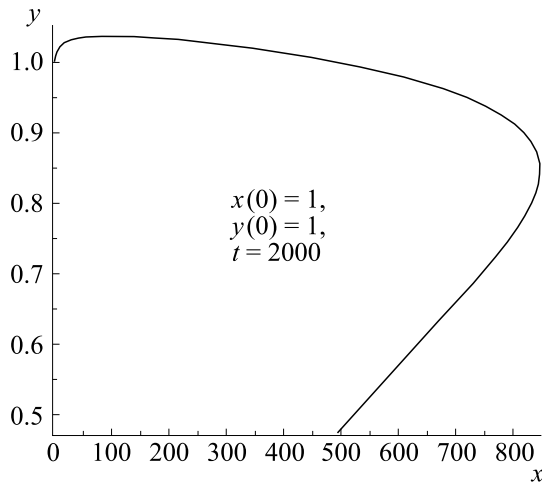


Рис. 1. Эволюция численности населения $x(y)$ при условии, что вероятность действия обрезающего фактора β постоянна.

Как видно из обоих рисунков, численность популяции в зависимости от обрезающего фактора вначале ведет к ее росту, а впоследствии всегда будет сопровождаться ее спадом, что изначально уже и было заложено в общие свойства энтропии.

ЛИНЕАРИЗАЦИЯ УРАВНЕНИЙ (3)

Следуя общим принципам теории обыкновенных дифференциальных уравнений [31], легко провести линеаризацию системы уравнений (3) вблизи стационарной точки $M_0 = M(\bar{x}, \bar{y})$. В результате получаем следующие линейные уравнения

$$\begin{cases} \dot{x} = -\alpha(x - \bar{x}) + \frac{\alpha^2}{\beta}(y - \bar{y}), \\ \dot{y} = -\gamma\bar{y}(x - \bar{x}) + \lambda\gamma\bar{x}(y - \bar{y}). \end{cases} \quad (17)$$

Решение системы (17) элементарно находится, в результате мы получаем

$$\begin{cases} x = \bar{x} + C_1 e^{k_1 t} + C_2 e^{k_2 t}, \\ y = \bar{y} + \frac{\beta}{\alpha^2} \left[C_1 \left(\alpha + \frac{\beta k_1}{\alpha^2} \right) e^{k_1 t} + C_2 \left(\alpha + \frac{\beta k_2}{\alpha^2} \right) e^{k_2 t} \right], \end{cases} \quad (18)$$

где корни характеристического уравнения есть

$$k_{1,2} = \frac{\lambda\gamma\bar{x} - \alpha}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{\lambda\gamma\bar{x} - \alpha}{2} \right)^2 - \alpha\gamma\bar{x}(1 - \lambda)}. \quad (19)$$

Как видно из уравнения (19), при различных соотношениях между входящими в ответ параметрами, решение системы (18) может представлять собой узлы, седловые точки, а также аттракторы и репеллеры.

При этом последние могут возникать только в том случае, если подкоренное выражение в урав-

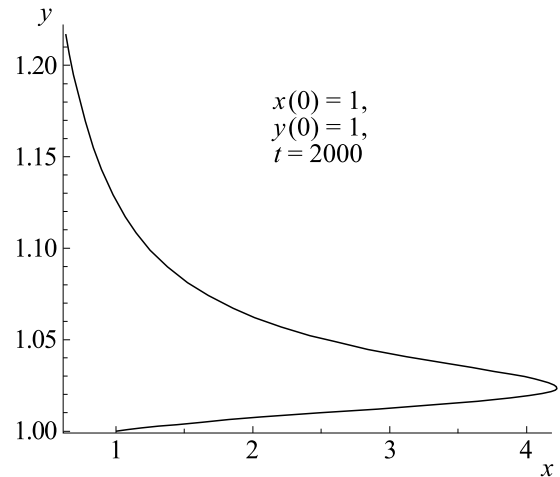


Рис. 2. Эволюционное развитие численности населения при условии, что вероятность изменения обрезающего фактора β убывает со временем по гиперболическому закону.

нении (19) отрицательно. В результате это приводит к притягивающей спирали (аттрактор) или отталкивающей (репеллер).

В соответствии с общими постулатами синергетики эволюция области фазового пространства ω описывается уравнением $\dot{\omega} = \omega \operatorname{div} \mathbf{v}$, где $\mathbf{v}$ — обобщенная скорость, определяемая как вектор с компонентами $\mathbf{v} = (\dot{x}, \dot{y})$.

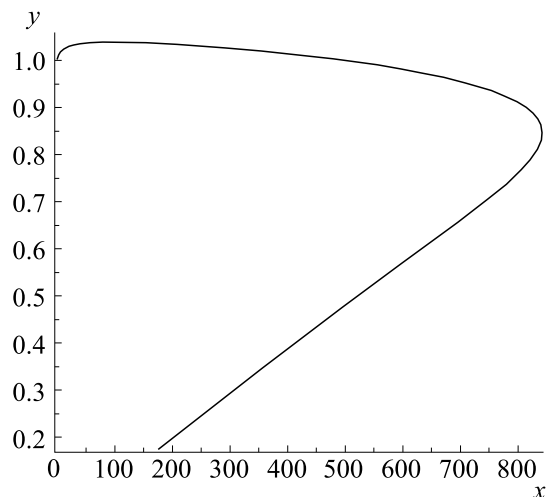


Рис. 3. Эволюция численности населения $x(y)$ согласно уравнениям (П10) при условии, что вероятность действия обрезающего фактора β постоянна. Здесь анализ проведен для начальных условий $x(0) = 1$, $y(0) = 1$, и до момента времени $t = 8000$. Пренебрежение двумя последними слагаемыми в нижнем уравнении системы (П10) вообще не влияет на поведение зависимости $x(y)$ и приводит к укороченной системе уравнений (1), которая и была исследована в статье.

Из системы уравнений (17) видно, что $\text{div} v = \lambda \gamma \bar{x} - \alpha$. Это означает, что при $\alpha > \lambda \gamma \bar{x}$ область фазовой плоскости $\omega = \Delta x \Delta y$ сжимается и представляет собой типичное притягивающее множество, которое является устойчивым и не будет реагировать ни на какие внешние малые возмущения типа техногенных или гендерных, которые просто ускоряют уменьшение численности населения, не влияя качественно на ее естественное поведение в целом (см. рис. 1 и 2 и уравнения (1) и (П9)).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как было показано выше, именно благодаря хаотическому характеру развития общества его глобальная энтропия должна вести себя подобающим образом в соответствии с общими законами эволюции, неотъемлемыми от природы самой Земли. Поскольку $\dot{S} \sim \dot{n}$, то при приближении энтропии к стационарной точке она приближается к максимуму, как и численность населения. При уходе от равновесия энтропия начнет убывать, «захватывая» за собой и n . В статье это было строго математически доказано с помощью численного решения полученных уравнений, описывающих естественный ход развития народонаселения Земли. Все это возможно лишь благодаря открытости нашей биологической системы и объективному (подчеркиваю) ходу ее развития. Это становится вполне понятным, если вспомнить основные принципы теории детерминированного хаоса, когда система на каком-то промежутке времени ведет себя хаотическим образом, а затем под влиянием некоторых вполне определенных факторов «скатывается» в локальную область стационарной точки. Затем история повторяется. Точно по таким же законам должны вести себя абсолютно все популяции Земли, в том числе и человеческая.

Итак,

1) Предложена вполне объективная биологическая модель из серии задач по теме «хищник—жертва»;

2) Проведен аналитический и численный анализ полученных феноменологическим путем уравнений, которые показали, что эволюция численности населения при минимальном значении обрезającego параметра должна иметь естественный неравномерный и хаотический характер развития (см. рис. 1, 2);

3) Показано, что предельно допустимое значение численности населения Земли может составить примерно 20 миллиардов человек, а затем таким же вполне естественным образом начнет спадать.

ПРИЛОЖЕНИЕ

С целью подтверждения корректности уравнений (1) мы воспользуемся общей методикой вывода основных физических уравнений, в которых будут учтены некоторые специфические особенности эволюционного развития биосистем. С этой целью удобно воспользоваться приемом, который основан на использовании закона сохранения полной мощности исследуемой системы и был успешно применен при решении ряда задач (см., например, работы [32–37]). По некоторой аналогии с механическими задачами мы рассмотрим задачу из серии задач «хищник—жертва» на языке энергетической и диссипативной функций, которые для биофизических проблем следует воспринимать, конечно, не в буквальном смысле, а чисто условно. Как известно [38], кинетическую энергию гидродинамического потока

можно представить в виде $\varepsilon = \frac{1}{2} \int_V \rho v^2 dV$, где ρ —

плотность, а v — скорость жидкости. В рассматриваемой нами модели нельзя ввести энергию популяций, однако записать прототип энергии, как в гидродинамике, мы имеем полное право, введя в рассмотрение некоторую квадратичную форму по концентрации индивидов n и обрезającego фактора m . Обозначая ее, как и в физических задачах через E , с очевидностью можно записать, что

$$E = \frac{1}{2} \int_{\Sigma} [C_1(m)n^2 + C_2(n)m^2] d\sigma, \quad (\text{П1})$$

где $C_1(n)$ и $C_2(m)$ — две существенно положительные функции от соответствующих аргументов, Σ — поверхность Земли, а $d\sigma$ — ее элемент поверхности.

Что касается диссипативной функции $\dot{Q}$, то по своему смыслу она представляет собой производство энтропии в единицу времени [39] и в любых физических процессах является величиной существенно положительной.

В случае биологических систем этот принцип следует применять с осторожностью, исходя из объективного фактора того, что процесс изменения количества популяций носит хаотический характер, а потому в случае открытой системы производство энтропии в единицу времени $\dot{S}$ не может все время оставаться существенно положительной величиной, поскольку на определенных промежутках времени должна подчиняться двум взаимоисключающим друг друга условиям: $\dot{S} > 0$ и $\dot{S} < 0$.

Это означает, что диссипативную функцию для формального описания любого скалярного хаоса мы имеем право представить в виде следую-

щей условно положительной комбинации (см. работу [34]):

$$\dot{S} \sim \dot{Q} = \int_{\Sigma} [\Gamma_1(n, m)m^2 - \Gamma_2(n, m)n^2 + \Gamma_3n^3 + \Gamma_4nm^2 + \Gamma_5mn^2] d\sigma, \quad (\text{П2})$$

где $\Gamma_{1,2}(n, m)$ — функции от концентраций n и m , имеющих соответственно смысл обобщенного декремента и инкремента, а $\Gamma_{3,4,5}(n, m)$ — в общем случае также функции от n и m , но при этом любого знака. Кроме того всегда $n > 0$ и $m > 0$. Тот факт, что в определениях (П1) и (П2) фигурирует довольно много свободных параметров, не должно вызывать особого удивления, поскольку все они в предельных частных случаях либо выражаются друг через друга, либо оказываются равными нулю.

Согласно общему принципу получения любых уравнений динамики, мы имеем право исходить из условия $\dot{E} + \dot{Q} = 0$ (примерами того являются, например, уравнения Навье–Стокса и любые уравнения механики, в которых диссипативная

функция существенно положительна), что с очевидностью указывает на автоматическое выполнение условия экстремума и для функций, выбранных в виде (П1) и (П2), но уже для открытых систем. Понятно, что в результате мы должны прийти к уравнениям, описывающим экстремальное распределение обоих интересующих нас параметров (см. ниже).

Действительно, дифференцируя (П1) по времени, находим

$$\dot{E} = \frac{1}{2} \int_{\Sigma} [C'_1 \dot{m}n^2 + 2C_1 n\dot{n} + C'_2 \dot{n}m^2 + 2C_2 m\dot{n}] d\sigma, \quad (\text{П3})$$

где $C'_1 = \frac{dC_1}{dm}$, $C'_2 = \frac{dC_2}{dm}$.

Складывая (П2) и (П3), будем иметь

$$\int_{\Sigma} \left[\frac{1}{2} C'_1 \dot{m}n^2 + C_1 n\dot{n} + \frac{1}{2} C'_2 \dot{n}m^2 + C_2 m\dot{n} + \Gamma_1(n, m)m^2 - \Gamma_2(n, m)n^2 + \Gamma_3n^3 + \Gamma_4nm^2 + \Gamma_5mn^2 \right] d\sigma = 0.$$

Группируя здесь слагаемые с n и m , получаем в подинтегральной функции сумму двух выражений:

$$n \left[C_1 \dot{n} + \frac{1}{2} C'_1 \dot{m}n + \Gamma_3 n^2 - \Gamma_2(n, m)n + \frac{1}{2} \Gamma_4 m^2 + \frac{1}{2} \Gamma_5 mn \right] + m \left[C_2 \dot{m} + \Gamma_1(n, m)m + \frac{1}{2} C'_2 \dot{n}m + \frac{1}{2} \Gamma_4 nm + \frac{1}{2} \Gamma_5 n^2 \right].$$

Пользуясь независимостью параметров n и m , полагаем каждое из них по отдельности равным

нулю и находим интересующую нас систему уравнений:

$$\begin{cases} C_1 \dot{n} + \frac{1}{2} C'_1 \dot{m}n + \Gamma_3 n^2 - \Gamma_2 n + \frac{1}{2} \Gamma_4 m^2 + \frac{1}{2} \Gamma_5 mn = 0, \\ C_2 \dot{m} + \frac{1}{2} C'_2 \dot{n}m + \Gamma_1 m + \frac{1}{2} \Gamma_4 nm + \frac{1}{2} \Gamma_5 n^2 = 0. \end{cases} \quad (\text{П4})$$

Перепишем эти уравнения в виде

$$\begin{cases} \dot{n} + \frac{C'_1}{2C_1} \dot{m}n = -\frac{1}{C_1} \left(\Gamma_3 n^2 - \Gamma_2 n + \frac{1}{2} \Gamma_4 m^2 + \frac{1}{2} \Gamma_5 mn \right) = \varphi_1(n, m), \\ \dot{m} + \frac{1}{2C_2} C'_2 \dot{n}m = -\frac{1}{C_2} \left(\Gamma_1 m + \frac{1}{2} \Gamma_4 nm + \frac{1}{2} \Gamma_5 n^2 \right) = \varphi_2(n, m). \end{cases} \quad (\text{П5})$$

Если решить эту линейную относительно производных $\dot{n}$ и $\dot{m}$ систему, то получим

$$\begin{cases} \dot{m} + \frac{1}{C_2 - \frac{C_1' C_2'}{4C_1 mn}} \left[\Gamma_1 m + \frac{1}{2} \left(\frac{C_2'}{C_1} \Gamma_2 + \Gamma_4 \right) mn + \frac{\Gamma_5}{2} n^2 - \frac{C_2'}{4C_1} \Gamma_4 m^3 - \frac{C_2'}{2C_1} \Gamma_3 mn^2 - \frac{C_2'}{4C_1} \Gamma_5 nm^2 \right] = 0, \\ \dot{n} + \frac{1}{C_1 - \frac{C_1' C_2'}{4C_2 mn}} \left[-\Gamma_2 n + \Gamma_3 n^2 + \frac{\Gamma_4}{2} m^2 + \frac{1}{2} \left(\Gamma_5 - \frac{C_1'}{C_2} \Gamma_1 \right) nm - \frac{C_1' \Gamma_4}{4C_2} mn^2 - \frac{C_1' \Gamma_5}{4C_2} n^3 \right] = 0. \end{cases} \quad (\text{П6})$$

Из общей системы уравнений (П6) сразу же видно, что при $m = 0$ и $\Gamma_5 = 0$ мы приходим к уравнению Ферхюльста: $\dot{n} = \alpha n - \beta n^2$. При других соотношениях мы приходим к обобщенной системе уравнений Вольтерра–Лотка.

Полагая в уравнениях (П6) $C_2(n, m) = \text{const}$ и опуская все кубические слагаемые по n и m , а также вводя для удобства явные зависимости от n и m , будем иметь

$$\begin{cases} \dot{m} + \frac{1}{C_2} \left(\Gamma_1(n, m) m + \frac{\Gamma_4(n, m)}{2} mn + \frac{\Gamma_5(n, m)}{2} n^2 \right) = 0, \\ \dot{n} + \frac{1}{C_1(n, m)} \left[-\Gamma_2(n, m) n + \Gamma_3(n, m) n^2 + \frac{\Gamma_4(n, m)}{2} m^2 + \frac{1}{2} \left(\Gamma_5(n, m) - \frac{C_1'}{C_2} \Gamma_1(n, m) \right) nm \right] = 0. \end{cases} \quad (\text{П7})$$

Исследуемый нами случай отвечает условиям $C_1(n, m) = C_1 m$, $\Gamma_1(n, m) = \Gamma_1 m$, $\Gamma_2(n, m) = \Gamma_2 m$, $\Gamma_3(n, m) = \Gamma_3 = \text{const}$, $\Gamma_4 = \text{const}$, $\Gamma_5 = 0$.

В результате из уравнений (П7) следует, что

$$\begin{cases} \dot{n} + \left[-\frac{\Gamma_2}{C_1} n + \frac{\Gamma_3}{C_1 m} n^2 + \frac{\Gamma_4}{2C_1} m - \frac{C_1}{2C_2} \Gamma_1(m) nm \right] = 0, \\ \dot{m} + \frac{1}{C_2} \left(\Gamma_1(m) m + \frac{\Gamma_4}{2} mn \right) = 0. \end{cases} \quad (\text{П8})$$

Чтобы привязаться к параметрам уравнений (1), считаем коэффициент Γ_1 отрицательным и полагаем, что:

$$\alpha = \frac{\Gamma_2}{C_1}, \quad \beta(t) = \frac{\Gamma_3(t)}{C_1}, \quad \gamma = \frac{\Gamma_4}{2C_2}, \quad \frac{\Gamma_1(m)}{C_2} = -\lambda \varepsilon m^\lambda.$$

В результате из (П8) следует:

$$\begin{cases} \dot{n} = \alpha n - \frac{\beta(t)}{m} n^2 - \gamma \frac{C_2}{C_1} m - \frac{\lambda \varepsilon}{2} nm^{1+\lambda}, \\ \dot{m} = -\gamma mn + \lambda \varepsilon m^{1+\lambda}. \end{cases} \quad (\text{П9})$$

Из сравнения уравнений (П9) с уравнениями (1) видно, что в верхнем уравнении (П9) в правой части присутствуют два дополнительных слагаемых в отличие от уравнений (1), в которых их нет. Казалось бы, этот момент может послужить сильным поводом для критики всей работы. Однако торопиться не будем. Как видно из (П9), эти слагаемые входят с правильными знаками, и если положить здесь $C_1 = C_2$ и воспользоваться численными значениями параметров, приведенными выше ($\alpha = 10^{-2}$ кг/км² сут, $\beta = 10^{-5}$ кг/км² сут,

$\gamma = 10^{-6}$ кг/км² сут, $\lambda = 10^{-2}$, $\varepsilon = 10^{-2}$ (СИ, км, сут)), то система (П9) примет вполне конкретный вид

$$\begin{cases} \dot{x} = -10^{-6} xy + 10^{-4} x^{1.01}, \\ \dot{y} = 10^{-2} y - \frac{10^{-5}}{x} y^2 - 10^{-6} x - 0,5 \cdot 10^{-4} yx^{1.01}. \end{cases} \quad (\text{П10})$$

Результат численного интегрирования уравнений (П10) проиллюстрирован на рис. 3. Из его сравнения с рис. 1 и 2 мы видим их замечательное сходство.

Таким образом, у нас имеется корректная и вполне обоснованная (правда, укороченная по сравнению с уравнениями (П9)), система уравнений (1), моделирующая эволюционное развитие человеческой популяции с учетом обрезающего ее развитие фактора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P.-F. Verhulst, *Corresp. Math. Phys.* **10**, 113 (1838).

2. P.-F. Verhulst, *Nouv. Mém. Acad. R. Sci. B.—Lett. Brux.* **18**, 1 (1845).
3. P.-F. Verhulst, *Mém. Acad. R. Sci. Lett. B.—Arts Belg.* **20**, 142 (1847).
4. Yu. Loskutov and A. S. Mihailov, *Introduction to Synergetic* (Science, Moscow, 1990).
5. H. Haken, *Synergetics. Introduction and advanced topics* (Springer, 2004).
6. A. J. Lotka, *Elements of Physical Biology* (Williams & Wilkins, Baltimore, 1925).
7. V. Volterra, *Mem. Accad. Lince* **6**, 31 (1926).
8. M. A. Safi, Incidence Function. *Mathematics* **7**, 350 (2019).
9. С. П. Капица, *Успехи физ. наук* **166**, 63 (1996).
10. J. Medlock and M. Kot, *Math. Biosci.* **184**, 201 (2003).
11. T. Fujimoto and R. R. Ranade, *Electron. J. Lin. Algebra* **11**, 59 (2004).
12. С. П. Капица, *Успехи физ. наук* **180**, 1337 (2010).
13. J. Macías-Díaz and A. A. Puri, *Appl. Numer. Math.* **60**, 934 (2010).
14. N. K. Martin, P. Vickerman, and M. Hickman, *J. Theor. Biol.* **274**, 58 (2011).
15. J. E. Macías-Díaz, *Comput. Phys. Commun.* **182**, 2471 (2011).
16. J. E. Macías-Díaz and A. Puri, *Appl. Math. Comput.* **218**, 5829 (2012).
17. J. E. Macías-Díaz, R. Landry, and A. Puri, *Int. J. Comput. Math.* **91**, 2199 (2014).
18. P. E. Parham, J. Waddock, G. K. Christophides, et al., *Philosoph. Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sci.* **370**, 20130551 (2015).
19. Q. Cheng, Q. Jing, R. C. Spear, et al., *PLoS Neglected Tropic. Dis.* **10**, e0004417 (2016).
20. A. P. Lemos-Paião, C. J. Silva, and D. F. Torres, *J. Comput. Appl. Math.* **318**, 168 (2017).
21. F. Agosto, S. Bewick, and W. Fagan, *Ecol. Complexity* **29**, 61 (2017).
22. Г. Р. Иваницкий, *Успехи физ. наук* **187**, 757 (2017).
23. M. Parsamanesh and M. Erfanian, *Chaos, Solitons & Fractals* **117**, 192 (2018).
24. N. Ahmed, N. Shahid, Z. Iqbal, et al., *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* **8** (4), 67 (2018).
25. Г. Р. Иваницкий, *Успехи физ. наук* **188**, 965 (2018).
26. R. Nistal, M. De la Sen, S. Alonso-Quesada, and A. Ibeas, *Mathematics* **7**, 18 (2019).
27. N. Ahmed, M. Rafiq, M. Rehman, et al., *AIP Advances* **9**, 015205 (2019).
28. S. O. Gladkov, *Reports Physics RAS* **48** (8), 405 (2003).
29. S. O. Gladkov, *Technic. Phys. Lett.* **309** (9), 735 (2004).
30. <https://www.countrymeters.info/ru>
31. D. K. Arrowsmith and C. M. Place, *Ordinary Differential Equations: a Qualitative Approach with Applications* (Chapman and Hall, Lond., N. Y., 1982).
32. S. O. Gladkov, *Reports Physics RAS* **49** (2), 82 (2004).
33. S. O. Gladkov and E. F. Medvedev, *Glass Phys. Chem.* **32** (3), 346 (2006).
34. S. O. Gladkov, *Technic. Phys.* **53**, 952 (2008).
35. S. O. Gladkov and S. B. Bogdanova, *Int. J. Mechanics* **9** (11), 909 (2015).
36. S. O. Gladkov and S. B. Bogdanova, *Technic. Phys.* **61**, 157 (2016).
37. S. O. Gladkov, *WSEAS Trans. Appl. Theor. Mechanics* **15**, 24 (2020).
38. Л. Д. Ландау и Е. М. Лифшиц, *Теоретическая физика, Т. 6. Гидродинамика* (Наука, М., 1988).
39. Л. Д. Ландау и Е. М. Лифшиц, *Теоретическая физика, Т. 5. Статистическая физика* (Наука, М., 1982).

On the Question of Self-Organization of Processes of Changing the Population on the Earth

S.O. Gladkov

Moscow Aviation Institute (National Research University), Volokolamskoe shosse 4, Moscow, 125993 Russia

A new mathematical model based on the predator-prey interactions has been proposed. Strictly analytical solution has been found for a system of nonlinear differential equations describing accurately the dynamics of a population concentration on Earth's land surface, taking into account the main factors of "cut-off" influencing its spatio-temporal evolution. With the help of the proposed model, it is shown that the population of the Earth tends to increase, and then, due to a system's permeability, after reaching the maximum, the population growth rate begins to decline. This observation is confirmed by rigorous mathematical and numerical calculations.

Keywords: self-organization and self-regulation, "predator-prey" model, nonlinear dynamics, population concentration

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЖИЗНИ В КОНТЕКСТЕ НЕЖИВОЙ ПРИРОДЫ

© 2021 г. М.В. Фридман*, В.А. Намиот**

**Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, 119333, Москва, ул. Губкина, 3*

E-mail: articlesmarina@gmail.com

***НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобелевича, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2*

E-mail: vnamiot@gmail.com

Поступила в редакцию 13.08.2021 г.

После доработки 13.08.2021 г.

Принята к публикации 16.08.2021 г.

Проблемы, связанные с природой жизни и способностью живого эволюционировать, в настоящее время привлекают внимание широкого круга ученых. Общее происхождение всех живых организмов делает затруднительным для биологов дать существенное определение жизни. Возможно, использование понятийного аппарата других наук способно разорвать этот логический круг. Тем не менее, биология может многое сказать о таких необычных и парадоксальных особенностях живого, как его специфическая устойчивость (способность к воспроизводству) и изменчивость. Чтобы описать, как такие явления могут быть возможны, может потребоваться разработка новых физических идей и моделей.

Ключевые слова: жизнь, эволюция, размножение, биология, физика.

DOI: 10.31857/S0006302921050215

В последние годы вновь возник интерес к такой, казалось бы, уже давно и многократно обсужденной теме, как проблемы жизни, макроэволюции и образования новых видов. Это связано со многими обстоятельствами, из которых особо можно выделить, пожалуй, два. Во-первых, это связано с развитием биоинформатики, как экспериментальной, так и теоретической, которое имеет место в последние годы. Во-вторых, эти проблемы стали вызывать интерес у представителей других наук, таких как физика и математика, традиционно имевших в основном дело с неживой природой. Разумеется, как это иногда бывает у неопитов, некоторые из них полагали (и до сих пор еще полагают), что стоит только применить уже имеющиеся в их распоряжении модели, разработанные, вообще говоря, для совсем других задач, с которыми уже сталкивалась физика, как все эти «вечные» проблемы биологии будут тут же решены. Конечно, это далеко не так. Скорее, ситуация здесь даже обратная. Именно: эти биологические проблемы могли бы помочь выявить в традиционной физике нечто новое, оставшееся ранее непонятым или незамеченным. А уже потом, после того, как с этим разберется физика, уже можно будет применить полученные знания и для решения тех проблем, о которых здесь идет речь. Поэтому мы полагаем, что для начала имеет смысл обсудить все те проблемы, о которых мы

здесь упоминаем, как они выглядят с точки зрения биологов.

Жизнь на разных уровнях организации является объектом изучения биологов. Однако даже в работах, посвященных возможным сценариям происхождения жизни, весьма редко можно встретить детальное обсуждение того, какого должно быть определение жизни и живого. Причины этого понятны. Живые организмы связаны единством происхождения, поэтому при всем их многообразии жизнь как таковая известна нам в единственном экземпляре. Представляется вероятным, что какие-то нетривиальные подходы возможны в случае более широкого рассмотрения вопроса, в случае сравнения особенностей жизни с известными особенностями других физических явлений.

Попытки дать содержательное определение со стороны биологов были, и если их подытожить, то выделяются две ключевых черты живого. Это особого рода устойчивость и особого рода способность изменяться. Оба этих момента во многом парадоксальны [1].

Особенности устойчивости живого хорошо подытожены выдающимся морфологом В.Н. Беклемишевым: «Живой организм не обладает постоянством материала — форма его подобна форме пламени, образованного потоком

быстро несущихся раскаленных частиц; частицы меняются, форма остается». Живое сохраняет способность к поддержанию своей структуры, к репарации, к самовоспроизводству на фоне потоков материи, энергии и информации, в условиях постоянных внешних и внутренних возмущений и случайной вариабельности. Свойства клеток сохраняются, несмотря на значительную стохастичность экспрессии многих генов [2], более того, эта стохастика может быть использована организмами [3]. Зародыши живых организмов зачастую способны развиваться к окончательной структуре, несмотря на отклонения от «стандартного» хода развития, вызванные различными внутренними и внешними причинами (известное свойство эквивиальности). Более того, стохастические отклонения в ходе развития в ряде случаев могут выступать в качестве его движителя [4]. Особь может выстраивать достаточно сложное поведение на фоне изменчивой и не вполне предсказуемой среды [5]. Популяции многих животных способны достаточно быстро восстанавливать свою численность и структуру после массовой гибели в какой-либо местности как за счет более значительного размножения, так и за счет миграций [6]. А мозаичность растительных сообществ, связанная с различными эндогенными и экзогенными нарушениями, играет существенную роль в их поддержании [7].

Не менее парадоксальна эволюционная изменчивость живого, сочетающаяся с устойчивостью и даже немислимая без нее. Подавляющее большинство эволюционных преобразований идет с сохранением значимых черт организации предка [1], что, собственно, и позволяло строить филогенетические деревья задолго до достижений молекулярной генетики. Исключением являются обычно случаи далеко зашедшего паразитизма. Этот консерватизм прослеживается на всех уровнях, включая молекулярный. Так Нох-гены обнаруживаются у всех билатеральных многоклеточных и играют значительную роль в их эмбриональном развитии [8]. Гомологи отдельных Нох-генов найдены также у гребневилов и кишечнотолостных. В то же время нет никакого сомнения в том, что изменения морфологии, происходившие при эволюции билатерий, огромны. Ген *Ocelliless (oc)*, он же *Orthodenticle*, контролирует образование головных структур, в частности, глаз, у организмов из самых разных филогенетических ветвей. Так, несмотря на накопившиеся различия в первичной последовательности, мышинный ген сохраняет способность направлять развитие глаза у дрозофил [9]. Но при этом сам глаз мыши и фасеточный глаз дрозофилы устроены совершенно по-разному. Кроме того, даже если какие-то прямые или побочные эффекты эволюционных преобразований приводят

к признакам, выглядящим дезадаптивными, как гениталии гиен [10], «по сумме баллов» особь должна как минимум оставаться жизнеспособной, как максимум — способной победить других в конкуренции, и это требование должно выполняться для каждого из этапов эволюционных преобразований. По сути дела, мы видим кончики нитей, которые хотя бы для каких-то эволюционных линий должны были оставаться непрерывными с самого зарождения жизни и протянулись до наших дней.

Весьма интересными поэтому представляются попытки рассмотреть жизнь с ее специфическими чертами с точки зрения современной физики, обнаружить их сходство с другими явлениями или, напротив, уникальность, требующую привлечения новых концепций, в том числе физических. К сожалению, они пока немногочисленны, но будем надеяться, что начало положено.

В данном выпуске журнала «Биофизика» публикуются работы, каждая из которых связана с теми или иными аспектами обсуждаемых здесь проблем. Сама по себе обсуждаемая тема настолько важна и интересна, чтобы рассчитывать на появление в дальнейшем и новых публикаций по ней.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. С. Раутиан, в сб. *Эволюция биосферы и биоразнообразие. К 70-летию А.Ю. Розанова* (КМК, М., 2006), сс. 20–38.
2. A. Azizoglu and J. Stelling, *Biochem. Soc. Trans.* **47** (6), 1795 (2019).
3. G. Balázs, A. van Oudenaarden and J. J. Collins, *Cell* **144** (6), 910 (2011).
4. В. А. Скобеева В.А. Дисс. ... канд. биол. наук (МГУ, М., 2011).
5. В. А. Непомнящих, в сб. *Синергетика и психология. Вып. 3: Когнитивные процессы*, под ред. В. И. Аршинова, И. Н. Трофимова и В. А. Шендяпина, (Когито-Центр, М., 2004), сс. 197–209.
6. И. А. Шилов, *Экология популяций и сообществ* (Изд-во «Юрайт», М., 2020).
7. О. В. Смирнова и Н. А. Торопова, *Успехи соврем. биологии* **136** (2), 199 (2016).
8. S. M. Hrycaj and D. M. Wellik, *F1000Research*, **5**, F1000 Faculty Rev-859 (2016). DOI: 10.12688/f1000research.7663.1

9. M. Friedrich, *Arthropod Structure and Development* **35** (4), 357 (2006). 10. G. L. Hammond, S. Miguel-Queralt, T. M. Yalcinkaya, et al., *Endocrinology* **153** (3), 1435 (2012).

The Origin of Life in the Context of Inanimate Nature

M.V. Fridman* and V.A. Namiot**

**Vavilov Institute of General Genetics, ul. Gubkina 3, Moscow, 119333 Russia*

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

Questions about the nature of life and the ability of living things to evolve are still attracting attention of scientists from different background. The idea that all living organisms share a common ancestor makes it difficult for biologists to give an essential definition of life. Probably, the use of the conceptual apparatus of other sciences can break this logical circle. Nevertheless, biology can say a lot about such unusual and paradoxical features of living things as its specific stability (ability to reproduce) and variability. To describe how such phenomena can be possible, it may be necessary to develop new physical ideas and models.

Keywords: life, evolution, reproduction, biology, physics

УДК 577.338, 538.945, 577.336

ГИПОТЕЗА О ФИЗИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ФЕНОМЕНА ЖИЗНИ (к дискуссии по статье Г.Р. Иваницкого «XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики»)

© 2021 г. А.М. Смолович

Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, 125009, Москва, Моховая ул., 11/7

E-mail: asmolovich@petersmol.ru

Поступила в редакцию 15.03.2021 г.

После доработки 15.03.2021 г.

Принята к публикации 24.03.2021 г.

Предложена гипотеза о том, что в основе феномена жизни лежит макроскопическое квантовое состояние органических структур, входящих в состав клетки, которое характеризуется наличием энергетической щели в электронном спектре. Оценивается порядок ширины щели. Обсуждается возможность обнаружить эту энергетическую щель в экспериментальном исследовании.

Ключевые слова: феномен жизни, куперовские пары, энергетическая щель, оптическая спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302921050227

В статье Г.Р. Иваницкого «XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики» [1] значительное место уделяется проблеме определения понятия жизни, которое по наличию или отсутствию какого-то признака или набора признаков могло бы дифференцировать живую и неживую материю, что оказывается весьма непростой задачей. Кроме того, в статье обсуждаются гипотезы возникновения жизни. Эти проблемы вызвали большой интерес и породили последующую дискуссию. Однако возможен другой подход к вопросу, вынесенному в заголовок работы [1]. В настоящее время, когда структура ряда простейших живых организмов изучена практически до атомного уровня, как отмечено в работе [2], «все большее число ученых начинает осознавать, что мы не знаем чего-то самого главного». Чего же мы можем не знать, детально зная структуру? Ответом может быть то, что мы не знаем состояние этой структуры. Если рассматривать жизнь как особое состояние органических структур, входящих в состав клетки, физическая природа которого в настоящее время еще не известна, то слова «что такое жизнь с точки зрения физики» можно понимать, как вопрос о том, какова эта природа, т.е. какой физический механизм лежит в ее основе. В этом случае кажется естественным попробовать искать какие-то аналоги среди явлений, изученных в физике конденсированного состояния. Подобный подход уже предлагался ранее рядом известных физиков.

В предисловии к своей монографии [3] Ф. Лондон предположил возможность некоторого квантового поведения, которое могло бы играть роль в биологических процессах, сходного с тем, что присутствует при сверхпроводимости и сверхтекучести. Он писал, что определенные взаимодействия между макромолекулами в биохимии можно понять не иначе, как порождение некоего квантового механизма, присущего системе в целом. Это обеспечивает системе характерную стабильность квантовых состояний с возможностью изменений без участия процессов диссипации. В работах [4, 5] У.А. Литтл обратил внимание на это замечание Ф. Лондона и отметил, что это совершенно новое и важное соображение для понимания живых систем. Затем У.А. Литтл предположил, что сверхпроводимость при близкой к комнатной температуре может быть достигнута в органическом полимере, структура которого подобна структуре ДНК.

Позднее вопросы локальной сверхпроводимости рассматривались на молекулярном уровне. Сложные молекулы с сопряженными связями содержат как электроны на внутренних орбитах (σ -электроны), так и внешние электроны (π -электроны) [6]. При этом π -электроны способны перемещаться вдоль всего молекулярного σ -остова (ядра атомов молекулы с σ -электронами), т.е. являются коллективными или делокализованными. Другими словами, π -электроны подобны свободным электронам в проводнике. Используя подход, использованный в работе [7], В.З. Кресин

показал, что в π -электронной системе возможна парная корреляция, подобная образованию куперовских пар в сверхпроводнике [8]. При этом связь между электронами в парах обусловлена их взаимодействием с σ -остовом, который играет здесь роль, подобную роли кристаллической решетки в сверхпроводниках. Сложные молекулы с сопряженными связями входят в состав биологически активных веществ. В работах [8, 9] В.З. Кресин ссылается на книгу А. и Б. Пюльманов [10], которая завершается главой «Делокализация электронов и жизненные процессы». Там делается вывод, что присутствие электронного облака в сопряженных молекулах можно рассматривать, как главную основу жизни. В.З. Кресин делает предположение, что «парная корреляция коллективизированных электронов, приводящая к возникновению щели в спектре, обеспечивает стабильность, аналогичную той, которая наблюдается в сверхпроводящих металлах, а дальний порядок, обусловленный межэлектронной корреляцией, существенен для понимания механизма связи, передачи возбуждений в биологически активных веществах» (см. раздел «Сверхпроводимость и физика сложных молекул» в работе [8]).

Поясним, что сверхпроводящее состояние в сложных молекулах не означает возможность протекания электрического тока с нулевым сопротивлением. Это лишь одно из характерных (но не в данном случае) свойств сверхпроводящего состояния, наряду рядом других. Одно из них — наличие энергетической щели в плотности электронных состояний вблизи уровня Ферми, внутри которой нет разрешенных уровней энергии. Ширина щели 2Δ соответствует энергии, связи куперовской пары электронов. Эта щель придает стабильность сверхпроводящему состоянию, ведь для разрушения состояния необходимо затратить энергию порядка ширины щели. Теория Бардина—Купера—Шриффера предсказывает ширину щели для обычных сверхпроводников при $T = 0$: $2\Delta = 3.52k_B T_c$, где T_c — температура сверхпроводящего перехода, а k_B — постоянная Больцмана (выражение (45.18) в работе [11]). Величины энергетической щели для высокотемпературных сверхпроводников [12] и для волны зарядовой плотности [13] отличаются от приведенного выражения, но также имеют порядок $2k_B T_a$, где T_a — температура сверхпроводящего или пайерлсовского перехода соответственно.

Наша гипотеза состоит в том, что в основе феномена жизни лежит макроскопическое квантовое состояние органических структур, входящих в состав клетки. Полагаем, что это не сверхпроводимость, но что стабильность этого состояния тоже обеспечивается наличием энергетической щели в электронном спектре. Предполагаем, что ширина этой энергетической щели тоже имеет

порядок $2k_B T_V$, где T_V — некоторая температура, типичная для живых организмов, например, 300 К. Это дает оценку ширины энергетической щели порядка 5×10^{-2} эВ. Можно попытаться обнаружить эту энергетическую щель в экспериментальном исследовании.

Укажем экспериментальные методы идентификации энергетической щели. Для измерения плотности состояний, включая идентификацию сверхпроводящей энергетической щели и энергетической щели волны зарядовой плотности, широко используется туннельная спектроскопия [14]. Метод использовался и для биологических объектов. В частности, одиночные молекулы ДНК исследовали методом сканирующей туннельной спектроскопии [15–17]. Однако в этих работах представлен довольно большой разброс результатов измерений. Для идентификации энергетической щели также используется традиционная оптическая спектроскопия в различных диапазонах длин волн электромагнитного спектра (см. работы [18, 19] и ссылки в них). Этот метод привлекателен для исследования живых объектов, поскольку является бесконтактным. Большинство исследований биологических объектов было проведено в спектральном диапазоне в промежутке между 600 и 2000 см^{-1} . При исследовании бактерий и фагов были использованы следующие виды оптической спектроскопии: спектроскопия комбинационного рассеяния и поверхностно-усиленная спектроскопия комбинационного рассеяния [20–24], когерентная антистоксовая спектроскопия комбинационного рассеяния [25], инфракрасная Фурье-спектроскопия [26], инфракрасная спектроскопия с временным разрешением [27, 28]. В работе [24] проведены спектроскопические исследования единичной бактерии, которую фиксировали в поле зрения конфокального микроскопа с помощью так называемого «рамановского оптического пинцета». По-видимому, этот метод следует считать предпочтительным для идентификации энергетической щели в живых структурах.

Вопрос о том, где и как следует искать энергетическую щель, является дискуссионным. Очевидно, для этого исследования следует выбрать некоторые простые организмы. Ведь даже простые биологические объекты, такие как прокариоты или вирусы, значительно сложнее, чем большинство объектов физических исследований. Их спектры тоже достаточно сложны, что затрудняет процесс идентификации энергетической щели. В случае использования в этих исследованиях бактерий может помочь сравнение их спектров в нормальном и инактивированном состоянии, что означает использование этих состояний в качестве маркеров живого (V, *vita*) и мертвого (M, *mort*) (обозначения из работы [1]). Это будет

аналогом сравнения спектров сверхпроводника при температурах выше и ниже точки сверхпроводящего перехода (см. рис. 2 в работе [18] или рис. 1 в работе [19]). Однако идентификация энергетической щели в спектре бактерии будет осложнена тем, что в живой клетке протекают известные процессы, связанные с ее жизнедеятельностью. Эти процессы также вносят вклад в разницу спектров живых и мертвых клеток [23]. Возможно, для поиска энергетической щели следует использовать спектры отдельных органелл клетки или отдельных биологических молекул, содержащихся в клетке, например, молекул белков.

Другим вариантом является использование для поиска энергетической щели спектров вирусов. Относительно того, являются ли вирусы формой жизни или органическими структурами, которые взаимодействуют с живыми организмами, мнения расходятся. В работе [1] вирусы названы «организмами на краю жизни». Когда вирусы находятся вне клетки-хозяина, они не проявляют жизненных характеристик в виде метаболизма, репликации и т.д. Можно предложить использовать в качестве маркеров V и M вирусов, находящихся внутри и вне клетки-хозяина. Для этих исследований подойдет процесс инфицирования бактерий фагами. В этом случае следует сравнивать спектры ДНК фагов до попадания в клетку бактерии и во время нахождения ДНК фага внутри клетки. Здесь учитывается, что при инфицировании внутрь бактерии попадает только ДНК фага, а его белковая оболочка (капсид) остается снаружи мембраны. Кроме того, при попадании ДНК фага в клетку происходят изменения процессов жизнедеятельности бактерии, связанные с ее инфицированием. В ряде процессов ДНК фага принимает непосредственное участие, что приведет к изменениям в ее спектре и осложнит идентификацию энергетической щели. Отдельной задачей является разделение спектров фагов, бактерий и раствора, в котором они находятся. Для этого существуют специальные методы (см. работу [29]), которые успешно применяются в том числе при спектроскопии фагов и бактерий. В частности, эти методы позволяют отличать спектр бактерии от спектра фага, а также спектры разных видов фагов друг от друга [20].

Таким образом, обсуждена гипотеза о феномене жизни как макроскопического квантового состояния органических структур, входящих в состав клетки, которое характеризуется наличием энергетической щели в электронном спектре. Обсуждена также возможность экспериментальной идентификации этой щели.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю Е.Р. Лозовскую, А.А. Синченко, С.В. Чекалина, А.В. Калинина и Д.В. Клинова за полезные консультации и обсуждения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук **180** (4), 337 (2010).
2. В. П. Реутов и А. Н. Шехтер, Успехи физ. наук **180** (4), 393 (2010).
3. F. London, *Superfluids*, Vol. 1 (John Wiley & Sons, Inc., N. Y., 1950).
4. W. A. Little, Phys. Rev. **134** (6), A1416 (1964).
5. У. Литтл, Успехи физ. наук **86** (2), 315 (1965).
6. V. Z. Kresin and Y. N. Ovchinnikov, Annals Phys. **417**, 168141 (2020).
7. А. И. Ларкин и А. Б. Мигдал, Журн. эксперим. и теорет. физики **44** (5), 1703 (1963).
8. В. З. Кресин, Журн. структурной химии **12** (4), 745 (1971).
9. В. З. Кресин, *Сверхпроводимость и сверхтекучесть* (Наука, М., 1978).
10. Б. Пюльман и А. Пюльман, *Квантовая биохимия* (Мир, М., 1965).
11. В. В. Шмидт, *Введение в физику сверхпроводников* (МЦНМО, М., 2000).
12. T. Timusk and B. Statt, Reports Progr. Phys. **62** (1), 61 (1999).
13. P. Monceau, Advances Phys. **61** (4), 325 (2012).
14. Y. I. Latyshev, in *Electron Transport in Nanosystems*, Ed. by J Bonča and S Kruchinin (Springer, Dordrecht, 2008), p. 155.
15. M. S. Xu, S. Tsukamoto, S. Ishida, et al., Appl. Phys. Lett. **87** (8), 083902 (2005).
16. E. Shapir, H. Cohen, A. Calzolari, et al. Nature Mater. **7** (1), 68 (2008).
17. N. Fardian-Melamed, G. Eidelstein, D. Rotem, et al., Adv. Mater. **31** (35), 1902816 (2019).
18. T. Timusk, Physics in Canada **67** (2), 99 (2011).
19. О. В. Мисочко, Физика твердого тела **40** (6), 998 (1998).

20. L. J. Goeller and M. R. Riley, *Appl. Spectroscopy* **61** (7), 679 (2007).
21. K. Hamasha, Q. I. Mohaidat, R. A. Putnam, et al., *Biomed. Optics Express* **4** (4), 481 (2013).
22. S. Vishnupriya, K. Chaudhari, R. Jagannathan, et al., *Particle & Particle Systems Characterization* **30** (12), 1056 (2013).
23. R. Li, D. Dhankhar, J. Chen, et al., *IEEE Access* **7**, 23549 (2019).
24. Z. Pilat, A. Jonas, J. Pilatova, et al., *Anal. Chem.* **92** (18), 12304 (2020).
25. A. Downes, R. Mouras, and A. Elfick, *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 101864 (2010).
26. C. A. Vargas, A. A. Wilhelm, J. Williams, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (20), 6431 (2009).
27. J. Chen, Y. Zhang, and B. Kohler, in *Photoinduced phenomena in nucleic acids*, Ed. by M. Barbatti, A.C. Borin, and S. Ullrich (Springer, Switzerland, 2014), vol. 2, p. 39.
28. K. de La Harpe, F. R. Kohl, Y. Zhang, et al., *J. Phys. Chem. A* **122** (9), 2437 (2018).
29. Y. H. Ong, M. Lim, and Q. Liu, *Optics Express* **20** (20), 22158 (2012).

**A Hypothesis about the Physical Phenomenon of Life
(Contribution to the Discussion of the Paper by G.R. Ivanitskii
“21st Century: what Is Life from the Perspective of Physics”)**

A.M. Smolovich

*Kotel'nikov Institute of Radioengineering and Electronics, Russian Academy of Sciences,
ul. Mokhovaya 11/7, Moscow, 125009 Russia*

It is hypothesized that macroscopic quantum state, characterized by the presence of an energy gap in the electronic spectrum, of the organic structures that are the constituents of the cell, undergoes reactions leading to the first life forms. The width (energy) of the band gap is estimated. The possibility of detecting this energy gap in an experimental study is discussed.

Keywords: phenomenon of life, Cooper pairs, energy gap, optical spectroscopy

УДК 577.3

ПОЧЕМУ НЕ ПРЕКРАЩАЮТСЯ ДИСКУССИИ НА ТЕМУ: ЧТО ТАКОЕ ЖИЗНЬ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ФИЗИКИ

(ответ на статью А.М. Смолевича
«Гипотеза о физической природе феномена жизни»)

© 2021 г. Г.Р. Иваницкий

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

E-mail: ivanitsky@iteb.ru

Поступила в редакцию 25.01.2021 г.

После доработки 12.07.2021 г.

Принята к публикации 08.07.2021 г.

Рассмотрен механизм образования энергетической щели при взаимодействии открытых нелинейных систем на разных иерархических уровнях их организации. Показано, что наличие энергетической щели не является специфическим признаком живых систем, так как этот признак имеет место и в системах, которые принято называть неживыми.

Ключевые слова: энергетическая щель, определение жизни с позиции физики.

DOI: 10.31857/S0006302921050239

Я благодарю А.М. Смолевича за проявленный интерес к моей статье [1]. Что касается его попытки отделить «живое» от «неживого» с помощью такого признака, как «наличие в электронном спектре живых систем энергетической щели», то такая попытка не приведет к успеху. Сначала отвечу на вопрос: «Что такое энергетическая щель на каждом из уровней иерархической организации биосистем?» Затем отвечу на вопрос: «Является ли наличие энергетической щели специфическим свойством живой материи и отсутствует ли этот признак в неживой материи?»

1. ЧТО ТАКОЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ЩЕЛЬ

В-первых, при температуре, близкой к комнатной температуре 293 К, а тем более для теплокровных животных, у которых внутренняя температура $T \geq 310$ К, сверхпроводимость невозможна. Сверхпроводимость предполагает, что в системе не должно происходить рассеяние энергии, т.е. она не должна преобразовать при работе часть своей кинетической энергии в тепловую энергию. Сверхпроводимость возможна, когда $T \rightarrow 0$ К, т.е. приближается к абсолютному нулю, тогда энергия тепловых флуктуаций также стремится к нулю, поскольку сопротивление флюктуационного переноса энергии в этом случае равно нулю. А.М. Смолевич в этом смысле прав, отмечая, что сверхпроводящее состояние — это лишь одно из

характерных состояний, наряду с рядом других. Он предлагает, уподобляя живую систему полупроводнику, искать разделяющий признак живого от неживого на атомном уровне и для этого использовать понятие «энергетической щели» в качестве плотности электронных состояний вблизи уровня Ферми, где нет разрешенных уровней энергии. По сути это есть характеристика устойчивости системы, полученной в результате поляризации, т.е. разделения энергии зарядов. Следует заметить, что энергия Ферми — одно из центральных понятий физики *твёрдого тела*, а живые системы состоят из материалов с разной плотностью с различающимися физико-химическими свойствами. Большей своей частью они состоят из жидкостей (коллоидных растворов) на водной основе и, следовательно, могут работать, когда $T \geq 273$ К, т.е. когда жидкость не кристаллизована, а подвижна. Напомним, что в живых организмах, обитающих на суше, содержание воды уменьшается, но по-прежнему вода составляет большую часть любого живого организма. Например, во взрослом человеке весом 70 кг в норме содержится до 75% воды, а сухая масса составляет 25%. Внутриклеточная жидкость нашего организма — 27.2 л (40%). Она включает тканевую жидкость и лимфу (20.4 л, или 30%), а также плазму крови (3.4 л, или 5%). Второе место по весу занимают кости и жир различного состава, но его содержание меньше. Человек содержит в норме по-

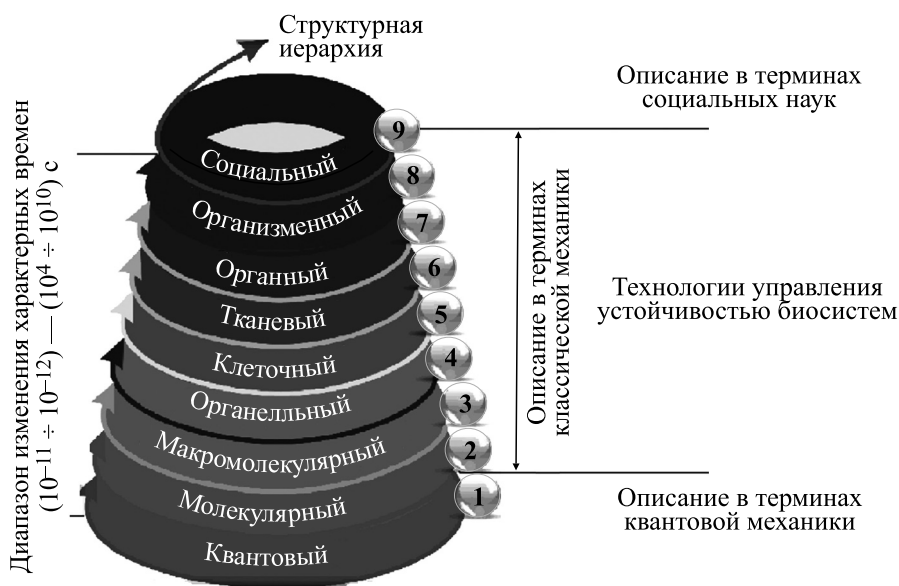


Рис. 1. Пирамида иерархических структурных уровней организации биосистем, включая социальные системы.

рядка 10.2 кг жировых компонентов (включая мембраны клеток), т.е. приблизительно 15% от своего веса. Только 10% веса человека приходится на все другие соединения (белки и нуклеиновые кислоты), хотя последние и определяют специфику нашего существования. Связанная вода занимает от 25% до 70% объема белковых структур [2]. Поэтому попытки *интегрального рассмотрения* живых систем, начиная с начала XX века, *в терминах твердых тел* (например, в терминах твердых электретов) особого успеха не принесли. Электретами называют вещества, обладающие внешним электрическим полем подобно тому, как магнит обладает магнитным полем. Основой электретов является неравновесная электрическая поляризация, создающая долговременное электростатическое поле. При воздействии на электрет любым полем (включая нагрев), которое нарушает ориентацию частиц-диполей, возникает ток, и поляризация разрушается. Энергия электрического поля переходит в тепловую энергию $k_B T$. В клетках тканей живых систем, покрытых фосфолипидной мембраной, которая обладает сопротивлением 10^4 – 10^6 Ом см и образует тканевую покров всех электрически возбудимых систем (синцитий сердца, нейронной сети мозга, стенок желудка и т. д.), такое поле существует и измерено. Однако оно существует и в неживых системах — в диэлектриках и полупроводниках с удельным сопротивлением не менее 10^7 Ом см. При термодинамическом равновесии для неживого вещества характерное время деполяризации 10^{-5} с. В живых системах с жидким наполнением, подобных электролитам, это время уменьшается

и может находиться даже в пикосекундном диапазоне. Такие параметры, как диэлектрические потери, электрическая релаксация, электропроводность и т.п., хорошо известны всем физикам. Наличие изменения энергии Ферми в термодинамике эквивалентно росту химического потенциала системы. Другими словами, поляризация не может служить признаком, отличающим живую от неживой материи.

Во-вторых, как было отмечено выше, все биологические системы имеют иерархическое строение (рис. 1). Поэтому необходимо определиться, на каком уровне мы пытаемся описать динамику работы биосистем и их взаимодействия между собой, поскольку от выбора уровня рассмотрения будет зависеть язык описания. При температурах выше абсолютного нуля по шкале Кельвина все системы находятся в колебательном режиме. В связи с этим их взаимодействия удобно рассматривать в терминах волн с детерминированной и стохастической (шумовой) компонентами. Из-за наличия вклада шума прогнозировать результат взаимодействия нелинейных биосистем можно лишь с определенной вероятностью [3–5].

В-третьих, если пытаться производить оценку энергетической щели в живых системах в терминах классической механики, то ее величина будет колебаться в широких пределах в зависимости от массы выделенных и взаимодействующих друг с другом структур. В работе [6] нами были даны способы и оценки колебаний для различных биосистем.

В-четвертых, наиболее простым методом волновых взаимодействий двух биосистем служит теория автоволн. В работе [7] (на примере постро-

ения бактериями своих колоний) было показано использование этой теории. Этот же подход к описанию живых систем распространяется и на другие биосистемы на клеточном уровне.

В-пятых, существуют по крайней мере четыре причины, которые приводят к ускорению процессов как в живых системах, так и в тех системах, которые называют «неживыми»:

ускорение процесса во времени путем увеличения шага τ (характерного внутреннего времени) по шкале внешнего реального времени t , так как при этом величина t/τ уменьшается;

— появление эстафетного ускорения за счет толчков активной среды. Примерами могут служить: волновое распространение пламени по бикфордову шнуру или пороховому скотчу, лесной пожар, переход от декогерентной волны к когерентной волне, появление солитонов при сужении граничных условий при распространении волны и т.д.;

— понижение сопротивления вязкой или газовой среде при переходе от турбулентного движения к ламинарному, а в твердотельных механических системах — появление при определенных условиях отрицательного сопротивления, например маятник Фруда, когда ускоряющий момент будет в среднем больше тормозящего [8];

— нарушение устойчивости из-за конкуренции при столкновении двух потоков, например, при описании изменения погоды в результате взаимодействия «циклон $\leftrightarrow$ антициклон».

В-шестых, если использовать язык квантовой механики для описания живых клеток, то можно сделать оценки для биохимических процессов сохранения квантовой когерентности или поляризации. При этом потребуется сравнительно большой временной интервал жизни когерентности ~ 1 с [9]. Это достигается за счет структурной организации макромолекулярных компонентов, составляющих основу живых систем. В этом временном интервале молекула фермента, ускоряющего реакцию, частично защищена от энергии теплового взаимодействия со стороны молекул остальной части клетки, находящихся в пространственных пределах от нее на расстоянии более ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Аналогично, гистон в упаковке ДНК может служить защитой когерентного кодирования нуклеотидов [10]. Конкретизация этих механизмов в приложениях к глобулярным белкам (например, гемоглобину или миоглобину) или к фибриллярным белкам (актину, миозину и др.) также может быть описана на языке квантовой механики [11–13]. Выбор языка описания — это дело исследователя. Природа едина, а выбор методов ее описания — это предмет договоренности между исследователями. Критерий один: чем проще и понятнее, тем лучше. Лишь бы результат подтверждался экспе-

риментально и имел бы практические приложения.

В-седьмых, общий закон для описания как живой, так и неживой природы один и тот же: рост когерентности в одной локальной области приводит к увеличению декогерентности (хаоса) в другой области или в окружающей среде. Это закон аффинного преобразования отношений цен действия к размерам системы, который определяет устойчивость системы при конкуренции с другими системами. На квантовом уровне он известен как принцип Гейзенберга:

$$E\tau \geq h, \quad (1)$$

где E — энергия, затраченная на один временной шаг τ , а h — постоянная Планка (минимальная цена действия).

На макроуровне его можно записать как

$$\Delta E \Delta \tau \geq \Delta H \text{ или } \Delta p \Delta x \geq \Delta H, \quad (2)$$

где ΔE — требуемое приращение кванта энергии при увеличении на один квант временного шага $\Delta \tau$ по шкале времени (сокращение времени реакции), а ΔH — приращение цены действия или требуемое приращение кванта импульса движения $\Delta p = mv$ при увеличении на один квант пространственного шага Δx по шкале пространства. Из выражения (2) имеем

$$(\Delta E \Delta \tau / \Delta p \Delta x) \geq 1. \quad (3)$$

Как распорядится любой живой организм этими параметрами при конкуренции с другими организмами и внешней средой, чтобы обеспечить устойчивость своего существования, показывает результат конкуренции. При конкуренции двух или более развивающихся систем выигрывают те, которые выживают, т.е. достигают результата существования при наименьшей цене действия.

Ниже приведем несколько примеров, поскольку примеры всегда понятнее, чем обобщения.

Первый пример. На всех иерархических уровнях живого организма вышестоящий уровень модулирует высокочастотные стохастические процессы нижнего уровня. Например, на пространственных масштабах в десятки ангстрем мы видим, что макромолекула глобулярного белка (рис. 2а) в среднем содержит порядка 2000–5000 атомов, которые в этом масштабе могут рассматриваться как неизохронные микромаятники, колеблющиеся случайно.

Они отклоняются вокруг ковалентных связей в полипептидном остоле молекулы на углы порядка 20–60°. Эти движения стохастичны и не согласованы между собой, но под влиянием периодических энергетических потоков, создаваемых переходами АТФ $\rightarrow$ АДФ в митохондриях или флуктуациями изменения кислотности среды, их колебания могут синхронизироваться. Флуктуа-

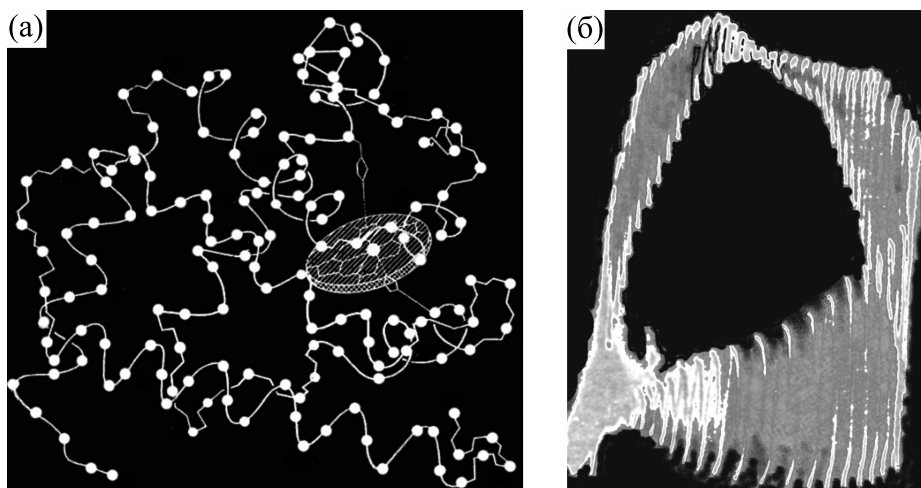


Рис. 2. Биосистемы с переходным процессом «порядок $\leftrightarrow$ хаос». (а) — Молекула глобулярного белка миоглобина имеет подвижную пространственную упаковку атомов. Ее размер порядка 50 Å. Внутри «облака» атомов находится группа атомов, формирующих гем (светлый диск), который присоединяет кислород. Различная форма «облака», возникающая при движении атомов, окружающих гем, либо мешает (при асинхронных колебаниях), либо, наоборот, способствует (при синхронных колебаниях) присоединению или отдачи атома кислорода. (б) — Вектор-кардиограмма, снятая в полярных координатах (спациокардиограмма начала инфарктного состояния). Впервые была построена чешским ученым В. Лауфбергером еще в 60-х годах XX века.

ции атомов, расположенных внутри глобулярных белков, не превышают 0.5 Å, но на поверхности могут достигать 2 Å и более с характерными временами 10^{-9} – 10^{-3} с. Если флуктуации синхронизуются, то, например, в молекуле миоглобина энергетические барьеры для проникновения молекулы кислорода снижаются почти в 20 раз. Это позволяет миоглобину в динамическом режиме выполнять свою функцию связывания молекул кислорода с затратой энергии всего 8.5 ккал моль $^{-1}$. Подобные управляемые с более высокого иерархического уровня переходы, в основе которых лежит модуляция случайного движения на нижнем уровне, характерны для работы практически всех биосистем [14].

Другой пример. Все органы живых организмов работают в циклическом периодическом режиме. Сердце, желудок, кишечник и другие органы имеют как собственный, так и навязанный извне ритм работы. Другими словами, верхний уровень (мозг), взаимодействуя с внешней средой, модулирует собственную частоту нижнего уровня (органов тела) так, чтобы обеспечить устойчивость организма в целом. Например, средняя частота сокращений сердца человека приблизительно 60–70 ударов/мин, у собаки — 90–100 ударов/мин, у крысы — 350 ударов/мин, желудок человека сокращается с частотой 3 цикла/мин, собаки — 4–5 циклов/мин, у кошки — 6–7 циклов/мин и т.д. Известно, что типичная электрокардиограмма здорового человека не является полностью регулярным процессом и имеет существенную хаотическую компоненту. Иссле-

дование хаотической динамики сердечного ритма, путем определения меры регулярности этого процесса, позволяет даже прогнозировать заболевания человека на раннем этапе их развития (рис. 2б).

При спектральном анализе циклов сердца на фоне случайных колебаний проявляется ряд специфических гармоник, отражающих состояние подкорковых нервных центров дыхания (1.2–1.5 колебаний в минуту) и активность автономного контура регуляции сердечного ритма мозгом (2 колебания в минуту). За 13 ч до остановки сердца в динамике цикла начинают исчезать хаотические компоненты. Сердечный цикл замедляется, а векторная кардиограмма становится почти окружностью. Это хорошо заметно при наложении в полярных координатах циклов друг на друга. Внезапная сердечная смерть представляет собой результат выхода системы из режима переходов «детерминированность $\leftrightarrow$ хаотичность». Управление сердца мозгом исчезает, после чего изменения быстро идут к исчезновению ритма, т.е. к остановке сердца и к гибели живого организма [14].

Если акцентировать внимание на социальных процессах, то рассмотренные выше положения оказываются полезными для описания работы в системах «хищник $\leftrightarrow$ жертва», в демографии это «рождаемость $\leftrightarrow$ смертность», или в экономике, например, при оптимизации управления биржей или рынком на основе периодической смены законов управления по результатам мониторинга возникающих ситуаций [15–19].

Механизмы переходов «детерминированность ↔ стохастичность» используются на всех структурных уровнях управления биосистемами. В синергетике в приложении к живым системам известно правило: *биосистемы работают на границе порядка и хаоса*. Энергетическая щель, о которой говорит А.М. Смолович в своей статье, — это порог энергетического перехода между порядком и хаосом. Изменение порога возбуждения приводит к изменению симметрии системы. Корректировка отклонения «симметрия ↔ асимметрия» есть способ управления биосистемами. А существенное отклонение от положения равновесия может привести к разрушению биосистемы [15].

2. МОЖНО ЛИ НАЛИЧИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ЩЕЛИ ПРИНЯТЬ ЗА АБСОЛЮТНЫЙ ПРИЗНАК ОТЛИЧИЯ ЖИВОГО ОТ НЕЖИВОГО

В моей статье «XXI век: что такое жизнь с позиции физики» [1], которая послужила поводом для заметки А.М. Смоловича, имелась таблица. Приведу ее здесь.

По-сути, в своей статье А.М. Смолович предлагает дополнить колонку «*Признаки живой материи*» этой таблицы дополнительным одиннадцатым признаком: «*Наличие в электронном спектре живых систем энергетической щели*». Однако из изложенного выше (в пятом пункте раздела 1) следует, что колонка «*Признаки неживой материи*» также будет заполнена (маятник Фруда, лесной пожар и т.д.).

ВЫВОДЫ

1. Попытка найти какой-либо один абсолютный, характерный признак живого — занятие малоперспективное. В живых системах не обнаруживаются никаких свойств, которыми не обладали бы неживые объекты.

2. Задача определения жизни и механизма ее возникновения с точки зрения физики является *некорректной обратной задачей*, поэтому она неразрешима. Наука требует фактов и основана на операционном методе. Наше желание дать точное определение *жизни и живого* — это не более чем «игра ума» с сильным антропоцентрическим акцентом. Отсюда и возникает множество определений *жизни и живого* и *их отличий от неживого*.

3. Естественно, что каждый автор считает, что данное им определение является верным и исчерпывающим. Так было и так будет, пока человечество не столкнется с другими вариантами «развитой жизни» на другой физической основе, если эти варианты действительно существуют не только в умах фантастов, а в реальности.

P.S. Работа [1], на которую обратил внимание А.М. Смолович, была написана более десяти лет назад. На некоторые вопросы, поставленные в ней, ответить удалось [15–22]. Но по-прежнему нет ответа на вопрос: «Чем отличается живое от неживого?» Причина простая. Все живое и неживое, окружающее нас, встроено в нашу Вселенную. Физические законы нашей Вселенной основаны на ее фундаментальных физических постоянных (гравитационная постоянная, постоянная Планка, скорость света в вакууме, масса покоя электрона, постоянная Больцмана, постоянная Авогадро и т.д.). Их более тридцати. Поскольку все живое возникло, эволюционировало и существует в одной и той же Вселенной с неживой природой, то оно не может не подчиняться одним и тем же ее законам. Живое собрано из тех же элементов периодической таблицы Д.И. Менделеева, что и неживое. Отличие живого от неживого состоит только в том, что живое сформировалось из *ограниченного разнообразия элементов таблицы Менделеева, но обменяло это ограничение на расширение кинетического использования разнообразия физических законов природы*. Это позволило живому существенно повысить пространственно-временную *скорость адаптации* к изменениям внешней среды, повысить скорости комбинаторных обменных операций, при сравнительно высоких температурах, между разнообразием химических элементов и, тем самым, продлить время своего существования [20]. Следовательно, в живом не может существовать какого-либо одного признака, который не проявил бы себя в какой-либо из неживых систем. Неживое плавно переходит в живое. Проведение линии раздела живого от неживого — это семантическая проблема *таксономии*, основанная на отборе признаков классификации путем договоренности между исследователями [23]. Более 40 лет тому назад мы написали книгу «Математическая биофизика клетки» [24], в которой изложили подход к описанию жизнедеятельности клетки на трех разных математических языках: биохимическом, волновом и на языке заполнения внутреннего объема живых систем на основе законов классической механики. При этом наглядно продемонстрировали, что каждый из этих языков высвечивает лишь определенную сторону жизнедеятельности клетки, но смогли их объединить в единое целое лишь частично. Возможно, дальнейшее развитие теории струн [25] позволит осуществить полное великое объединение. Однако об этом можно не только мечтать, но работать в этом направлении. Казалось бы, развитие такого обобщенного, системного подхода — это чисто философская метафизическая задача, далекая от практического приложения, и не стоит на это тратить время исследователей. Однако это не так. На рис.3 показаны наборы частных биофизических задач, на которые в случае успеха

Признаки живой и неживой материи

№	Признаки живой материи	Признаки неживой материи
1	Живые организмы характеризуются <i>упорядоченной иерархической структурой</i>	Все объекты неживой природы отвечают этому же условию и устроены по иерархическому принципу: элементарные частицы → атомы → → молекулы → макромолекулы и т.д.
2	Живые организмы являются <i>открытыми системами</i> и получают энергию из окружающей среды, используя ее для поддержания своей высокой упорядоченности	Смерчи, тайфуны, ветер, молнии черпают энергию Солнца; вулканы, землетрясения, подвижка материков черпают энергию из недр Земли. Таким образом, открытость живых систем не является специфическим признаком живого
3	Способность <i>реагировать на внешнее воздействие</i> (рецепция) — универсальное свойство всех живых систем	Намагничивание, электризация, свечение, поляризация, деформация, инерция, перемещение, разрушение и т.д. — это также ответы неживых объектов на внешние воздействия
4	Способность <i>запоминать информацию</i> о предыдущих состояниях и адаптироваться к изменению внешних условий	Ответная реакция объектов неживой природы обычно также направлена на «нейтрализацию» внешнего воздействия. Ответная реакция неживого объекта — это стремление сохранить свое исходное состояние (принцип Ле-Шателье, принцип Ленца, инерция Ньютона). Существуют проявления в неживых объектах и элементов памяти, например, магнитный гистерезис
5	Живые организмы <i>изменяются и усложняются</i>	Объекты в астрофизике (образование газо-пылевых облаков → → туманностей → галактик), в геофизике (образование горячего ядра планет → сравнительно холодной мантии поверхности планет → → тектонических плит → материков и океанов), в химии (преобразование субстратов в продукты) также демонстрируют эволюционное изменение и усложнение
6	Все живое <i>размножается</i>	Коацерватные капли органических веществ могут расти и делиться. Из растворов солей растут кристаллы. Кусочек, отломившийся от растущего кристалла, становится зародышем для роста подобного кристалла. Черные курильщики и белые столбы на дне океана также размножаются
7	Живое способно к <i>саморегуляции и регенерации повреждений</i>	Устойчивые вихри, торнадо, ячейки Релея–Бенара — саморегулирующиеся системы. Ледяная сосулька после разрушения восстанавливается снова. Кристаллы способны к регенерации дефектов (дислокаций). Следовательно, сам факт саморегуляции и регенерации не может служить отличием живого от неживого
8	Живые объекты осуществляют <i>обмен веществ</i> с окружающей средой с целью размножения и экспансии	Все реакции окисления обладают этим свойством, например горение. Преобразование энергии — это свойство всей природы, а не специфическое свойство живых систем
9	Живые объекты обладают <i>направленной подвижностью</i>	Этим свойством обладают ферромагнитные частицы в магнитном поле, ионы в электрическом поле, броуновские частицы в тепловом поле, частицы, имеющие массу, в гравитационном поле и т.д.
10	Живым объектам свойственна <i>неравновесность состояния</i>	Дожди, снегопады, лавины, водопады и т.п. — это все также неравновесные состояния

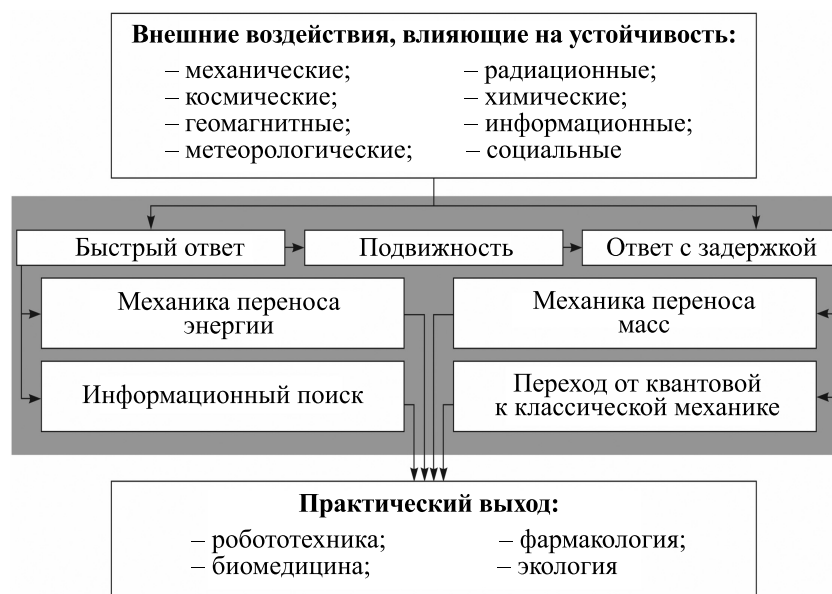


Рис. 3. Схема внешних воздействий, влияющими на нарушение устойчивости биосистем и практический выход, в случае успеха создания общей теории устойчивости живых систем.

объединения можно было бы взглянуть с новой неожиданной стороны. Все они имеют практический выход в разнообразные современные биофизические технологии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук **180**, 337 (2010).
2. Э. Лайтфут, *Явление массопереноса в живых системах* (Мир, М., 1977).
3. Б. Б. Кадомцев, Успехи физ. наук **160** (7), 163 (1990).
4. Б. Б. Кадомцев, Успехи физ. наук **164**, 449 (1994).
5. Д. С. Чернавский, *Синергетика и информация* (Наука, М., 2001).
6. Г. Р. Иваницкий, А. Б. Медвинский, А. А. Деев и М. А. Цыганов, Успехи физ. наук **168**, 1221 (1998).
7. Г. Р. Иваницкий, А. Б. Медвинский и М. А. Цыганов, Успехи физ. наук **164**, 1041 (1994).
8. С. П. Стрелков, Журн. техн. физики **3** (14), 563 (1931).
9. A. U. Igamberdiev, BioSystems **31**, 65 (1993).
10. P. C. W. Davies, BioSystems **78**, 69 (2004).
11. K. Matsuno, BioSystems **85**, 23 (2006).
12. K. Matsuno, BioSystems **85**, 23 (2006).
13. M. A. Nielsen and I. L. Chuang, Phys. Rev. Lett. **79**, 321 (1997).
14. Г. Р. Иваницкий, *Выражи закономерностей. Правило БИО – стержень науки* (Наука, М., 2011).
15. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук **187**, 757 (2017).
16. М. А. Цыганов, В. Н. Бикташев и Г. Р. Иваницкий, Биофизика **54** (4), 704 (2009).
17. Г. Р. Иваницкий, А. А. Деев и М. А. Цыганов, Вестн. РАН **81** (11), 1008 (2011).
18. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук **188**, 965 (2018).
19. Г. Р. Иваницкий и А. А. Морозов, Успехи физ. наук **190** (11), 1165 (2020).
20. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук **182**, 1238 (2012).
21. Г. Р. Иваницкий, А. А. Деев и Е. П. Хижняк, Успехи физ. наук **184**, 43 (2014).
22. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук **189**, 759 (2019).
23. Ч. Джеффри, *Биологическая номенклатура* (Мир, М., 1980).
24. Г. Р. Иваницкий, В. И. Кринский и Е. Е. Сельков, *Математическая биофизика клетки* (Наука, М., 1978).
25. А. Ю. Морозов, Успехи физ. наук **162**, (8), 83 (1992).

**Why the Topic “What Is Life from the Point of View of Physics”
Is still under Discussion (a Response to the Article by A.M. Smolovich
“A Hypothesis about the Physical Phenomenon of Life”)**

G.R. Ivanitskii

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

The mechanism of energy gap formation during the interaction of open nonlinear systems at different hierarchical levels of their organization is considered. It is shown that the presence of an energy gap is not a specific feature of living systems, since this feature also takes place in systems that are commonly called inanimate.

Keywords: energy gap, definition of life from the point of view of physics

УДК 577.3

ЕСТЕСТВЕННО-НАУЧНЫЙ И ТЕОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОДЫ К ПОНИМАНИЮ ТОГО, КАК «УСТРОЕНА» СУЩЕСТВУЮЩАЯ РЕАЛЬНОСТЬ

© 2021 г. В.А. Намиот

НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: vnamiot@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.2021 г.

После доработки 26.04.2021 г.

Принята к публикации 28.04.2021 г.

Рассматривается вопрос о том, можно ли, не выходя за рамки естественнонаучного подхода, объяснить все происходящее в нашей реальности, или же подобное объяснение может потребовать еще и рассмотрения неких «высших сил», не вписывающихся в материалистическую концепцию. На примере таких явлений, как макроэволюция (образование новых видов) и мышление, показано, что, оставаясь в рамках классического (традиционного) естественнонаучного подхода, объяснить их не удастся. Однако если допустить, что в нашей реальности могут существовать и проявляться некие квантовые и релятивистские процессы, изучаемые пока что только теоретически, то в принципе оказывается возможным даже без привлечения «высших сил» объяснить и макроэволюцию, и мышление.

Ключевые слова: эволюция, мышление, естественный отбор, креационизм.

DOI: 10.31857/S0006302921050240

Если обратиться к истории вопроса о взаимоотношении теологии и естественных наук, то можно отметить, что какие-либо принципиальные противоречия между ними, такие, согласно которым что-либо одно (или теология, или естественные науки) вообще должно быть исключено из рассмотрения, первоначально даже не обсуждались. Люди, которых справедливо можно назвать «отцами-основателями» естественных наук — Исаак Ньютон и Готфрид Лейбниц — полагали, что и то, и другое является необходимым инструментом познания реальности. Ньютон, как известно, был не только великим физиком, создателем того, что теперь называется классической физикой, но и крупнейшим богословом своего времени. Лейбниц ввел в науку понятие монады [1] — некоей абстрактной сущности, которой крайне сложно дать сколько-нибудь адекватное определение и чьи свойства принципиально отличаются от свойств известных нам материальных объектов. Но (в соответствии с логическим построением Лейбница) без этой сущности реальность вообще не могла бы существовать.

Однако можно сказать, что в дальнейшем пути теологии и естественных наук принципиально разошлись. При этом в данной статье мы будем обсуждать только те аспекты подобного расхождения, которые не выходят за рамки логики и философии и совершенно не будем касаться того,

что можно было бы назвать «борьба с ересью», т. е. такими спорами, при которых поиск истины фактически подменяется борьбой со своими научными оппонентами.

Оставаясь в рамках логики и философии, расхождение теологии и естественных наук можно, например, проиллюстрировать следующим эпизодом. Великий математик и физик Пьер-Симон Лаплас подарил императору Франции Наполеону экземпляр своей книги. Наполеон, пролистав книгу, спросил у Лапласа, почему он ни разу ни где ничего не упомянул о создателе мира? И получил такой ответ: «Государь, *эта гипотеза* мне не понадобилась».

Согласно постулатам, принятым (гласно или негласно) в настоящее время в естественных науках, все, происходящее в реальности, может быть объяснено, не выходя за рамки естественных наук, т. е. без привлечения каких-либо «высших сил». Более того, уже сам факт, что какое-либо объяснение чего бы то ни было требует привлечения этих самых сил, служит доказательством того, что предлагаемое объяснение ошибочно.

И, как считают очень многие, полагающие себя материалистами (хотя, возможно, более правильно было бы назвать их *верящими* в материализм), все современное развитие науки только подтверждает правильность этих постулатов. И

даже то, что мы в настоящее время еще многого не знаем, ни в коей мере не может поколебать это убеждение. Ответ сомневающимся будет звучать примерно так. Да, мы пока что не знаем, как это объяснить. Но когда объяснение будет получено (а оно рано или поздно должно быть найдено), то оно наверняка будет лежать в рамках естественнонаучного подхода и ни на какие «высшие силы» опираться не будет.

Но если принять подобный ответ в качестве аксиомы, причем настолько очевидной, что никаких сомнений в ее правильности не только нет, но даже и возникнуть не может, то, казалось бы, из него сразу же следует тот вывод, что теология к естественным наукам заведомо никакого отношения не имеет. Действительно, если мы уже получили объяснение явления в рамках естественнонаучного подхода, то теология нам точно не нужна. Если же мы еще не нашли такого объяснения, то нам просто следует подождать, и рано или поздно такое объяснение, не опирающееся на теологию, будет получено. Таким образом, и в этом случае мы вполне можем обойтись без теологии.

И в самом деле, приведенное рассуждение выглядит на первый взгляд совершенно неопровержимым. Тем не менее в нем содержится логическая ошибка. Она состоит в том, что без какого-либо основания из рассмотрения уже сразу исключается возможность того, что, оставаясь в рамках естественнонаучного подхода, мы никогда, сколько бы ни ждали и ни делали попыток разобраться, просто не сможем найти никакого приемлемого объяснения интересующего нас явления. Если же подобные «необъяснимые» явления все-таки существуют (а то, что они и в самом деле существуют, в ряде случаев можно доказать на уровне строгости, близком к уровню строгости математических теорем), то из этого можно сделать следующий вывод. Одного только естественнонаучного подхода (по крайней мере, в том смысле, как этот подход понимается на сегодняшний день) оказывается заведомо недостаточно, чтобы объяснить происходящее в существующей реальности.

Таким образом, для того чтобы разобраться с вопросом о том, имеются ли между естественными науками и теологией непреодолимые противоречия, нам желательно, в первую очередь, выделить подобные «необъяснимые» явления. Далее на их примере надо постараться понять, действительно ли имеющиеся в них противоречия непреодолимы или же их все же можно (и нужно) преодолеть, а также каким образом это в принципе можно было бы сделать.

Известно, что существует очень широкий класс явлений, примеры которых можно легко найти в любых книгах по естественным наукам (в том числе, разумеется, и в учебниках), не требую-

щих для своего понимания ничего такого, что бы выходило за рамки обычного естественнонаучного подхода. Обычно те «необъяснимые» явления, о которых шла речь выше, обращают на себя наше внимание только тогда, когда мы переходим к какой-либо новой области знаний или применяем методы, разработанные для одной области науки, к другой области.

Именно такая ситуация и возникает тогда, когда мы начинаем применять методы физики и математики к биологическим явлениям.

В биологии, как известно, имеется огромное количество еще необъясненных (и даже еще вообще не открытых) явлений, но подавляющая часть из них требует для своего понимания ответов на вполне конкретные вопросы, которые вполне могут быть даны и в рамках естественнонаучного подхода. Пока можно выделить только три проблемы, для понимания которых нам, возможно, будет недостаточно естественнонаучного подхода (по крайней мере, того естественнонаучного подхода, который принят на сегодняшнем уровне развития науки). Перечислим эти проблемы:

1) Проблема возникновения жизни.

2) Проблема эволюции (проблема происхождения новых видов).

3) Проблема мышления.

Проблему возникновения (зарождения) жизни мы в этой работе обсуждать не будем. Здесь в принципе возможны самые разные ситуации, например, та, что жизнь была занесена на землю из космоса. Хотя достоверно здесь мало что известно, но, даже если исключить всевозможные экзотические сценарии, все равно очень вероятно, что биологические системы возникли за относительно короткий срок, причем при столь необычных условиях, что вероятность повторения всего этого ничтожно мала. Но если событие произошло всего только один раз, то, как бы ни была мала вероятность осуществления этого, исключить возможность того, что оно все-таки могло реализоваться, причем даже чисто случайно, все же нельзя. Соответственно, никаких выводов из того, что оно реализовалось, строго говоря, сделано быть не может. Поэтому, чтобы не оказаться в той неопределенной ситуации, в которой мы в принципе не можем сделать никаких сколько-нибудь надежных утверждений, мы вообще не будем касаться проблемы возникновения жизни, а сразу перейдем к проблемам эволюции.

ТЕОЛОГИЯ И ЕСТЕСТВОЗНАНИЕ. КАК ОНИ СООТНОСЯТСЯ С ПРОБЛЕМАМИ ЭВОЛЮЦИИ

Механизм, который отвечает за макроэволюцию, т. е. за появление новых биологических видов в процессе развития биосферы, и не требующий при этом какого-либо вмешательства

«высших сил» или еще чего-то, столь же малопонятного для естествоиспытателей, был предложен и изучен Чарльзом Дарвином. Очень коротко и схематично основная идея предложенного им механизма состоит в следующем. В каждом живом существе в течение жизни могут происходить какие-то изменения (мутации), часть из которых будет унаследована его потомками. Если какие-то изменения ухудшают выживаемость унаследовавших их существ, то такие существа будут вымирать быстрее, чем те существа, которые унаследовали изменения, улучшающие выживаемость. Соответственно, они будут оставлять меньше потомства и в конце концов исчезнут из популяции. В результате через какое-то время выживаемость всей (не вымершей) популяции улучшится, и так будет происходить и в дальнейшем. Популяция, меняясь, будет все лучше и лучше приспосабливаться к внешней среде, и в результате такого изменения и будут появляться новые виды. Таким образом, основным механизмом появления новых видов, лучше приспособленных к различным факторам внешней среды, является (в соответствии с теорией Дарвина) естественный отбор.

Разумеется, Дарвин не мог знать, как «устроен» механизм наследования тех или иных признаков. Понимание того, как этот механизм «устроен» и работает, появилось уже много позже, чем идея дарвиновского «отбора».

Изложим также очень упрощенно и схематично, опуская многие, в том числе и достаточно важные детали, основные принципы того, как устроен и работает этот механизм. В живой клетке имеется геном, который представляет собой очень длинную и свернутую в относительно компактную конструкцию молекулу ДНК (причем нам в данном случае совершенно неважно, что это в действительности не одна, а две молекулы, образующие двойную спираль). На эту молекулу, подобно бусам на нитку, «навешены» специальные участки, называемые нуклеотидами (причем число различных типов таких нуклеотидов равно четырем и они обозначаются буквами А, Т, Г, Ц). Последовательность нуклеотидов на ДНК может рассматриваться как своего рода запись, как код, и именно в этой записи и содержится вся информация о наследственности клетки, организма, и тому подобного. (Также, среди прочего, подобной записью «задается» и состав тех белков, которые синтезируются в организме; при этом каждая аминокислота, входящая в такой белок, кодируется тремя нуклеотидами.) Соответственно, если в результате каких-то процессов происходит изменение такой записи в родительском организме, то в этом случае происходит и изменение тех или иных наследуемых признаков у его потомков (при этом мы, чтобы не усложнять ситуацию, ничего не говорим о том, в каких именно клетках, половых или соматических, происходят подобные изменения). И информация об этих измене-

ниях будет передаваться все дальше и дальше от родителей к детям.

Предположим, что переходу от одного биологического вида к другому, который и возникнет в дальнейшем, соответствует изменение генома, состоящее в том, что меняются q нуклеотидов. При этом каждый из них стоит на своем определенном месте в последовательности нуклеотидов. Оценим p_m — вероятность подобного изменения генома, при условии, что его можно рассматривать как единый акт. Мы можем записать:

$$p_m \sim n(z(4L)^{-1})^q, \quad (1)$$

где z — вероятность того, что в каком-то определенном месте последовательности произойдет изменение типа нуклеотида, L — число нуклеотидов в последовательности, а n — число особей, в которых могло бы возникнуть такое изменение последовательности. Для n можно записать очевидное неравенство $n \ll N$, где N — число всех живых существ, когда-либо существовавших на земле. Величину же N можно оценить исходя из следующих соображений. Поток солнечной энергии, попадающий на землю, по очень грубым оценкам может поддерживать существование не более чем 10^{16} – 10^{17} тонн биомассы. Минимальный вес живой клетки (примитивного живого индивидуума) составляет примерно 10^{-9} г. Соответственно, в каждый момент времени на земле имеется не более чем 10^{32} живых существ. Пусть каждое из них живет не более чем 10^3 с. Тогда даже за все время существования вселенной со времени «большого взрыва» (это примерно 15 млрд лет) N не будет превосходить величину 10^{46} (реально же N гораздо меньше этой величины).

При типичных значениях $L \sim (10^8$ – $10^9)$, $q \sim 10^2$ (что соответствует числу изменений типа нуклеотидов при образовании всего лишь одного нового сравнительно небольшого белка) и $n \sim N$ (что лишь увеличивает оценку для p_m) p_m оказывается столь малым, что даже во всей имеющейся вселенной за все время ее существования (начиная со времени ее рождения), подобное событие практически никогда не осуществится (см. также работу [3]).

Из этой оценки непосредственно следует, что никакая макроэволюция практически невозможна (по крайней мере, если рассматривать появление каждого нового вида в процессе макроэволюции как единый акт). Но ведь известно, что в реальности-то макроэволюция существует. Удивительным является также и то, что (как замечает в своей книге Е.В. Кунин [2]) крупные и сложно организованные виды имеют маленькую эффективную численность популяции, но это, тем не менее, не мешает им эволюционировать, причем относительно быстро.

Следовательно, приведенное выше рассуждение является неполным — оно не учитывает нечто столь важное, что оно в корне меняет тот вывод, который из него следует.

Оставаясь в рамках естественнонаучного подхода, можно предположить, что мы попросту не учли, что процесс появления любого нового вида в принципе нельзя рассматривать как единый акт изменения последовательности нуклеотидов. Этот процесс (в соответствии с тем, как многие понимают учение Дарвина) следует представлять не как единый акт, а как серию последовательных актов изменения генома, каждый из которых вносит свой относительно небольшой вклад в переход от начального вида к конечному виду. Иными словами, переход от одного вида к другому фактически представляет собой серию улучшений первоначального вида, таких улучшений, которые, в частности, делают его более приспособленным к внешней среде.

Но вот в этом месте и возникают сомнения. Действительно, мы можем в принципе, заменив единый акт серией относительно небольших последовательных актов изменения генома, очень значительно увеличить оценку вероятности p_m . Но чтобы такое увеличение имело место, требуется выполнение двух условий. Первое: нужно, чтобы q' — среднее число измененных нуклеотидов, приходящееся на один акт из серии небольших изменений генома, — было бы существенно меньше q . И второе: чтобы все (или почти все) особи в рассматриваемой популяции включили бы (возможно не сразу, а через какое-то время) произошедшее в таком акте изменение в свой геном. Фактически выполнение второго условия означает, что каждое такое небольшое изменение генома должно приносить виду существенную пользу — в противном случае число особей, которые включают его в свой геном, будет незначительным (см. также [3]).

Но когда в процессе макроэволюции происходит «плавный» переход от одного вида к другому, то вид неизбежно оказывается на какое-то время в ситуации, когда «старые» признаки уже не работают (или работают хуже, чем раньше), а «новые» еще не начали работать. В этот период особи становятся трудно конкурировать с тем, что было в популяции ранее. Никакого особого выигрыша от изменений, происходящих в геноме, особь в этом случае не получит. Соответственно, и никакого роста числа особей, получивших такие изменения в геном, не произойдет. А это, в свою очередь, должно приводить к тому, что увеличение p_m (по крайней мере, существенное увеличение) также не случится. Кроме того, на каждом шаге макроэволюции возможно не только эволюционное преобразование, но и вымирание с исчезновением соответствующей эволюционной линии,

а через несколько таких шагов оно уже гарантировано для большинства линий.

Имеется и еще один момент, который показывает, что рассматривать в общем случае серию относительно небольших изменений генома в качестве объяснения процесса макроэволюции не получится. Дело в том, что если бы новые виды образовывались в процессе, использующем подобные изменения, то неизбежно фиксировалось бы большое число останков всевозможных промежуточных форм. Между тем останков промежуточных форм наблюдается сравнительно немного (см. работу [4], на подобное обстоятельство, в свою очередь, указывают также и креационисты). Это тоже является очень серьезным аргументом против обсуждаемой здесь гипотезы.

Таким образом, суммируя сказанное, макроэволюцию нельзя объяснить только случайными изменениями генома, которые в дальнейшем, благодаря естественному отбору, будут закреплены в потомстве. Конечно, здесь может возникнуть вопрос, почему в случае микроэволюции подобный механизм работает, а в случае макроэволюции нет? Скорее всего, различие здесь количественное (хотя в данном случае можно сказать, что количество переходит в качество). Когда имеет место макроэволюция, величина q оказывается существенно больше, чем в случае микроэволюции. Число же возможных вариантов изменений генома, которое можно оценить как $(4L)^q$, в свою очередь возрастает с ростом q еще во много раз. Соответственно, вероятность появления и отбора «правильного» варианта (которая уменьшается с ростом числа возможных вариантов) оказывается столь малой, что такое событие почти никогда не реализуется.

Перейдем теперь к обсуждению каких-то иных возможностей, которые могли бы позволить осуществить переход от одного вида к другому. Если считать изменения в геноме, происходящие при таком переходе, случайными, то, как следует из вышеприведенных оценок, вероятность p_m оказывается слишком малой для осуществления такого перехода. Поэтому имеет смысл рассмотреть ситуацию, при которой изменения, происходящие в геноме, случайными не являются. Иными словами (поскольку мы здесь не выходим за рамки естественнонаучного подхода), эти изменения задаются каким-то детерминированным процессом. Предположим, что существует алгоритм, позволяющий описать такой процесс (в принципе, возможна ситуация, когда такого алгоритма могло бы и не существовать, но мы это обсуждать не будем).

Спрашивается, могут ли такие, не случайные, а задаваемые алгоритмом изменения генома, принципиально улучшить ситуацию и сделать макроэволюцию возможной? Понятно, что,

управляя изменениями генома, оказывается возможным несколько изменить вероятность p_m . В принципе, например, было бы не очень сложно предложить такие алгоритмы, которые могли бы улучшить ситуацию за счет того, что отбрасывали (убирали) некоторые возможные изменения генома, заведомо приводящие особь к гибели. Соответственно, это привело бы к какому-то увеличению вероятности появления мутаций, полезных для вида. Но принципиально суть дела это бы не изменило и, как следствие, не решило бы проблему макроэволюции. Несколько упрощая ситуацию и опуская ряд деталей, общий ход рассуждений, имеющих целью пояснить сказанное, состоит в следующем. Изменения генома, которые имеют место при переходе одного вида в другой, заведомо не могут быть малыми. Количество измененных нуклеотидов должно быть достаточно велико. И по мере усложнения видов оно еще будет возрастать (хотя не исключено, что и «простые» на наш взгляд организмы также могут иметь очень сложный геном). Соответственно, и алгоритм, способный работать с такими простыми изменениями, также не может быть простым. (В принципе, эта гипотеза может вызывать определенные сомнения и споры, но, наверное, если такие «простые» алгоритмы существовали бы, они были бы уже обнаружены.) Но тогда возникает вопрос, как такой «сложный» алгоритм мог бы появиться?

Понятно, что вероятность того, что подобный «сложный» алгоритм мог бы появиться за счет случайных мутаций, да при этом еще и не содержал ошибок, столь ничтожна, что за все время существования вселенной, начиная с «большого взрыва», такого события произойти просто не могло. (Здесь можно привести те же соображения, что и при рассмотрении возможности случайного образования нового вида в результате единого акта изменения генома). Когда же в образовавшемся алгоритме (если даже допустить, что он все же смог как-то образоваться) имеются ошибки, то очень вероятно, что такой алгоритм повредит геном и, в этом случае, не только не будет способствовать переходу популяции в новый вид, но, скорее всего, даже не сохранит и старый.

Таким образом (как следует из изложенного выше) в проблеме макроэволюции имеются принципиальные трудности, которые не позволяют, пока что, найти приемлемое естественнонаучное объяснение того, как могут появляться новые виды.

К ВОПРОСУ О ПРИРОДЕ МЫШЛЕНИЯ

Перейдем теперь к рассмотрению проблемы мышления. Как будет видно из дальнейшего, проблема макроэволюции и проблема мышления тесно связаны друг с другом, и понимание приро-

ды одной из этих проблем может помочь в понимании природы другой.

Давайте начнем обсуждение природы мышления с выяснения вопроса о том, что общего имеется у этой проблемы с проблемой образования новых видов в макроэволюции. И в том, и в другом случае имеются какие-то процессы, вырабатывающие те или иные сигналы (причем природа этих сигналов, являются они химическими или электрическими, в данном случае не важна), которые можно рассматривать как источник информации, управляющей биообъектами. Разумеется, такое управление имеет смысл только в том случае, если оно приносит пользу управляемому объекту (особи, популяции, виду, или чему-то подобному). Впрочем, если при образовании новых видов еще можно мириться с тем, что чаще всего подобная информация будет приносить не пользу, а вред, поскольку те немногие удачные находки, которые хоть изредка, но все-таки происходят, окупят все неудачи, то в случае с мышлением будет иметь место обратная ситуация. Весьма часто даже единственная ошибка может оказаться фатальной. Поэтому механизм отбора «правильной» информации в процессе мышления должен быть гораздо более строгим, чем в процессе макроэволюции.

Казалось бы, что самый простой и надежный способ получения такой, по возможности «безошибочной» информации, состоит в том, чтобы построить некий алгоритм (может быть, даже с какими-то элементами самообучения), который бы и «выдавал» требуемую информацию. Но если можно сконструировать подобный алгоритм и «ввести» его в вычислительную систему, то поведение такой системы (а эта система фактически является системой с искусственным интеллектом) должно в точности имитировать поведение биосистем, обладающих естественным интеллектом. Соответственно, если бы нам удалось доказать, что такая имитация возможна, мы тем самым доказали бы, что и тот самый алгоритм, о котором шла речь выше, тоже существует (или, хотя бы, мог бы существовать).

Итак, спрашивается, может ли система с искусственным интеллектом имитировать поведение системы с естественным интеллектом? Однако прежде чем ответить на этот вопрос, предварительно нужно указать критерий, выполнение которого позволяет признать такое имитирование успешным. Таким критерием, казалось бы, могло быть некое испытание (экзамен), прохождение которого позволяет признать, что искусственный интеллект не отличается, в принципе, от естественного. В качестве такого испытания предлагалась, в частности, следующая процедура. Берутся две полностью закрытые кабины, в каждой из которых имеется телефон, в одну из них помещается человек, а в другую — искусственный интеллект. Эксперт (человек) может по телефону

связываться с любой из этих кабин и разговаривать с тем (или с чем), находящимся там.

Если в результате этих разговоров эксперт окажется не в состоянии разобраться с тем, кто в какой кабине находится, то следует признать, что принципиальной разницы между искусственным и естественным интеллектом нет.

Однако к настоящему времени выяснилось, что все существенно сложнее — прохождение подобного критерия еще ни в коей мере не гарантирует, что искусственный интеллект окажется в силах решать те задачи, которые доступны естественному интеллекту. Можно написать относительно простую, в каком-то смысле даже примитивную программу, заведомо не способную разобраться в сколько-нибудь сложных интеллектуальных вопросах, которая, тем не менее, сможет пройти вышеуказанный критерий. Для этого достаточно составить программу таким образом, чтобы она могла поддерживать разговор до тех пор, пока он касается нескольких предварительно определенных тем, а если эксперт захочет выйти за их рамки, то применить какой-либо из также заранее запрограммированных приемов, позволяющих или «перевести» разговор на что-то другое, или же вернуться к предыдущему. При этом эксперт может подумать, что разговаривающий с ним груб, капризен, возможно даже просто глуп, но он не усомнится, что это все-таки человек.

Вернемся вновь к вопросу о критерии. Приведенное выше рассуждение показывает, что если критерий основан на каком-то экзамене, оценке эксперта и тому подобным процедурам, то его ни в коей мере нельзя признать сколько-нибудь надежным. Критерий должен быть объективным. Так, если бы удалось доказать, что существуют задачи, которые естественный интеллект решает, в то время как искусственный интеллект принципиально решить не в состоянии, то это бы означало, что два данных вида интеллекта заведомо функционируют по-разному. Следовательно, они не могут быть эквивалентны один другому.

Чтобы понять, в чем могло бы заключаться принципиальное различие между искусственным и естественным интеллектом, обсудим самые основы существующих систем искусственного интеллекта. Любая существующая на настоящий момент кибернетическая система, в том числе и такая, о которой говорят, что она способна «обучаться», работает на основе заложенного в нее алгоритма [5]. Существует, по крайней мере, несколько математически строгих определений понятия «алгоритм», причем в математической логике доказывалось, что все эти определения эквивалентны друг другу. На практике, например, при доказательстве теорем, очень удобным является определение алгоритма, данное А. Тьюрингом. Сначала вводится понятие «универсальной

машины Тьюринга» [6], которая при соответствующей введенной в нее программе оказывается в состоянии моделировать работу любого другого существующего в настоящее время логического устройства. А уже в дальнейшем на его основе и вводится понятие алгоритма.

Машина Тьюринга [6], о которой здесь идет речь, устроена в достаточной мере просто. В ней имеется бесконечно длинная в обе стороны лента, разделенная на ячейки, и так называемая головка, представляющая собой конечный автомат, способный перемещаться в обоих направлениях вдоль ленты. В ячейках ленты могут записываться определенные символы (причем число этих символов конечно), головка же может эти символы считывать, после чего менять свое состояние, стирать из ячейки прежний символ и записывать в ней новый, а затем перемещаться вдоль ленты на какое-то определенное расстояние и повторять всю вышеуказанную процедуру. Число таких повторений в принципе не ограничено. На ленте выделены специальные ячейки, в которых записывается программа, входная информация, а также результат вычислений. Как было показано А. Тьюрингом, среди всевозможных подобных машин с различными головками и т.п. имеются, как уже говорилось выше, универсальные машины, способные моделировать работу любых других таких машин.

Потребность в математически строгом определении алгоритма чаще всего возникает даже не тогда, когда нужно сконструировать какой-то алгоритм, а тогда, когда нужно доказать, что в принципе не может существовать алгоритма, способного решить поставленную задачу. Действительно, если алгоритм существует, то для доказательства его существования достаточно просто его построить и предъявить. При этом обычно, вне зависимости от наличия или отсутствия математически строгого определения алгоритма, никаких трудностей с тем, чтобы понять, является ли полученный результат алгоритмом или же нет, просто не возникает. Но если алгоритм в принципе не может существовать, то подобным образом мы ничего доказать не сможем. Ведь то, что мы не смогли построить искомый алгоритм, может означать не то, что его в принципе не существует, а только то, что мы в силу каких-то причин оказались не в состоянии его найти. Но вот если удастся доказать, что в принципе не может существовать такой программы, которая позволила бы универсальной машине Тьюринга решить поставленную задачу, то тем самым мы строго доказываем, что и соответствующего алгоритма также не существует. Наиболее известным примером подобной теоремы о «несуществовании алгоритма» является теорема об «остановке» [6], т. е. о том, что в принципе не может существовать алгоритма, способного определить, остановится ли хотя когда-нибудь «универсальная ма-

шина Тьюринга», реализующая какую-либо программу, или же будет вычислять результат «вечно».

Если бы удалось установить, что естественный интеллект в состоянии найти решение такой задачи, для которой можно доказать, что алгоритма, способного ее решить, не может существовать в принципе, то это означало бы, что между естественным интеллектом и моделирующим его поведение искусственным интеллектом существует принципиальное различие. И это различие, как ни стараться, невозможно убрать никакими программными ухищрениями...

Но поскольку мы не знаем, как «в действительности» функционирует естественный интеллект, мы оказываемся не в состоянии определить его возможности только на основе теоретических соображений. Экспериментальные же подходы также не дают материала для сколько-нибудь надежных утверждений и тоже уязвимы для критики...

Тем не менее если естественный интеллект возник и сохранился в ходе эволюции, то можно утверждать, что он важен для выживания самых разных видов. В то же время можно привести ряд аргументов, позволяющих утверждать, что интеллект, основанный только на алгоритмах, не мог бы способствовать выживанию. Действительно, системы, основанные на использовании алгоритмов, с самого начала должны быть достаточно сложными: если же усложнение происходит непосредственно в процессе развития, то на начальных этапах, пока система еще не отлажена, неизбежно будет появляться очень большое количество ошибок. Если биосистема будет управляться подобным «интеллектом», то это не только не будет способствовать ее выживанию, но, наоборот, достаточно быстро приведет к гибели. Основываясь на подобных соображениях, можно утверждать, что задача о выживании и эволюции биосистем, так или иначе решаемая естественным интеллектом, искусственным интеллектом решить не может...

Но возникает вопрос, может ли вообще существовать какая-либо информационная система, чьи возможности превосходят возможности универсальной машины Тьюринга? В какой-то (но далеко не в полной мере) этот вопрос ставится и изучается только в математической логике. В частности, там рассматриваются различные способы добавить нечто такое к универсальной машине Тьюринга, что позволит увеличить (если, конечно, это удастся) ее возможности [7]. Например, к машине Тьюринга можно добавить датчик случайных чисел (машина Тьюринга в состоянии вычислять псевдослучайные числа, но, строго говоря, «истинно случайные» числа она генерировать не может). Но даже с такой добавкой решать алгоритмически неразрешимые задачи машина

Тьюринга по-прежнему не способна. Однако если рассуждать чисто абстрактно, к машине Тьюринга в принципе можно подключить и более интересные устройства, чем датчик случайных чисел. В математической логике, например, рассматривается устройство, называемое «оракул» [7]. Оно представляет собой систему, которой можно задать вопрос, и она на этот вопрос ответит. При этом вероятность того, что ответ окажется ошибочным, или просто равна нулю, или же, если она все-таки отлична от нуля, крайне мала. Используя подобный «оракул», машина Тьюринга уже оказывается в состоянии решать алгоритмически неразрешимые задачи [7].

Само по себе существование «оракула» (если бы, конечно, он существовал в реальности, а не являлся чисто абстрактным объектом, изучаемым только в рамках математической логики) означает гораздо большее, чем просто возможность решать те или иные алгоритмически неразрешимые математические задачи. Например, в макроэволюции, в проблеме поиска таких изменений генома, которые обеспечивали переход от одного вида к другому, подобный «оракул» позволял бы сразу, не проводя экспериментальную проверку, находить правильные изменения. Действительно, если существует возможность обратиться к «оракулу» и «получить у него подсказку, позволяющую найти хорошее (с эволюционной точки зрения) решение», то очень многие, если не все, проблемы макроэволюции могли бы быть решены.

Однако математическая логика не ставит (да она и не должна ставить) вопроса о том, как может быть устроен подобный «оракул» и можно ли, а если можно, то каким именно способом, его изготовить или же чем-либо заменить. На настоящее время ответ на этот вопрос остается открытым. Но понятно, что если и макроэволюция, и мышление существуют, то в любом случае в нашей реальности должно существовать нечто (некая сущность), чьи возможности выходят за рамки возможностей универсальной машины Тьюринга (или даже машины Тьюринга с подключенным источником случайного сигнала). (В частности, такая сущность могла бы выполнять или функции «оракула», или же эквивалентные им функции). При этом по-прежнему остается неясным, можно ли описать подобную сущность, не выходя за рамки существующего естественнонаучного подхода (что не исключено), или же она потребует для своего описания чего-то принципиально нового (может быть, даже включающего в себя элементы теологии)? И может ли возникнуть ситуация, когда мы не сможем рассматривать эту сущность как совокупность одних только неодушевленных материальных объектов, и нам потребуются допустить, что она обладает чем-то вроде сознания?

О ЕСТЕСТВЕННОНАУЧНЫХ
И ТЕОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДАХ
К ПОНИМАНИЮ ТОГО, КАК УСТРОЕНА
СУЩЕСТВУЮЩАЯ РЕАЛЬНОСТЬ.
И МОЖЕТ ЛИ БЫТЬ КАКОЙ-ТО ТРЕТИЙ
ПОДХОД, НЕ СВОДЯЩИЙСЯ
К ВЫШЕПЕРЕЧИСЛЕННЫМ?

Если спросить естествоиспытателя-материалиста, как возникла окружающая нас реальность, то ответ, в силу необходимости неполный и схематичный, мог бы звучать примерно так. Около пятнадцати миллиардов лет назад вселенной просто не существовало. Не было вообще ни пространства, ни времени. Вселенная возникла в результате «большого взрыва», когда же и образовались и пространство, и время. Далее происходило расширение вселенной. В процессе расширения появились излучения и частицы, образовывались химические элементы (причем различные элементы разными способами и на разных стадиях расширения), возникли звезды и галактики, а также планеты. На некоторых планетах появилась жизнь. Естественный отбор способствовал образованию множества различных видов. И, наконец, на отдельных немногих планетах появилось мыслящее существо, способное понять окружающую его реальность. На земле высшей формой органической жизни, способной на такое понимание, является человек. (Здесь, казалось бы, было бы уместным привести цитату из М. Твена: *«Птеродактиль, а как известно, птеродактиль способен вообразить любую глупость, искренне полагал, что все эти миллиарды лет эволюции были нужны только для того, чтобы породить его — птеродактиля. Но он ошибался. На самом деле, они были нужны, чтобы породить человека»*.)

Пока речь идет о проблемах, не связанных с жизнью, все сказанное здесь каких-либо принципиальных возражений не вызывает. Но если в рамках существующего естественнонаучного подхода оценить вероятности возникновения жизни и появления новых видов, а также вероятность появления «венца эволюции» — мыслящего существа, то они оказываются столь малыми, что становятся совершенно непонятно, как такое вообще могло бы хоть когда-либо осуществиться. Конечно, можно попытаться ответить на подобные возражения, сказав, что здесь все дело в так называемом «антропном принципе», согласно которому наблюдать за реальностью можно только там, где есть наблюдатель — то есть мыслящее существо. Следовательно, вероятность того, что наблюдатель регистрирует наличие мыслящего существа, априори равна единице, поскольку он же и есть это самое мыслящее существо. А те ситуации, когда наблюдателя не существует, просто не регистрируются и соответственно нами не учитываются.

Но подобный ответ на возражения имеет смысл только в том случае, если «реальностей» или неограниченно много, или хотя бы крайне много. В противном случае ни наблюдатель, ни соответственно мыслящее существо могут и вообще не появиться.

Каким образом могло бы возникнуть множество подобных «реальностей»? В рамках квантовой теории такая возможность существует. Согласно так называемой «многомировой интерпретации квантовой теории» (предложенной в работе [8] Х. Эвереттом в качестве гипотезы, объясняющей явление «редукции волнового пакета» в квантовой механике), независимых «реальностей» должно быть очень много. И все вместе они образуют некую общность, называемую «мультиверс» [8–10]. В каждой из них имеет место своя конкретная реализация происходящих в этой «реальности» событий, причем наблюдатель из данной «реальности» не воспринимает ничего из происходящего в «чужих реальностях». (Напомним, что сама квантовая теория не предсказывает, появится ли какая-то конкретная реализация в данной «реальности» или же нет — она позволяет рассчитывать лишь вероятности появления таких реализаций.)

Вернемся вновь к «антропному принципу» и возможности использовать его для того, чтобы «снять» имеющиеся возражения. Понятно, что если в данный момент времени в какой-то «реальности» присутствует наблюдатель, то все события в этой «реальности» происходили таким образом, чтобы не противоречить факту его существования. Но это вовсе не означает, что и в дальнейшем не возникнет никаких противоречий или же нестыковок. Так, если, несмотря на малую вероятность, в рассматриваемой «реальности» имело место появление всех предшествующих появлению такого наблюдателя видов, все это вовсе не означает, что и в дальнейшем будет происходить подобное «везение». Иными словами, в дальнейшем никаких «чудес» уже не предвидится, соответственно никакие новые виды появляться уже не будут.

Конечно, макроэволюция — это процесс достаточно медленный. Поэтому весьма трудно сказать, имеет ли он место в настоящее время или же нет. Тем не менее есть все основания полагать, что никакого «прекращения макроэволюции» в настоящее время не произошло. Следовательно, попытка «обойти» имеющиеся нестыковки в проблеме образования и развития жизни с помощью «антропного принципа» не может быть признана убедительной.

Имеет смысл упомянуть здесь также и о некоторых проблемах, относящихся к онкологии, хотя они, строго говоря, и не имеют прямого отношения к макроэволюции. Рост злокачественной опухоли, как известно, сопровождается измене-

нием генома входящих в нее клеток. Можно, конечно, предположить, что в геноме возникают чисто случайные изменения, которые, в дальнейшем, в результате естественного отбора, вырастают очень опасный клон, способный тем или иным способом «уходить» от всех попыток организма его уничтожить или, хотя бы, остановить в развитии. Но ведь клеток в опухоли, даже на финальной стадии ее развития, не так уж и много — всего лишь порядка 10^9 – 10^{11} штук. Этого, скорее всего, заведомо недостаточно, чтобы надежно гарантировать при случайной мутации появление таких клеток, которые стали бы родоначальниками вышеупомянутого опасного клона. Поэтому, естественно, возникает мысль, что здесь имеет место не случайный, а целенаправленный (и даже нельзя исключить, что и управляемый) процесс внесения изменений в геном. И что подобный процесс (или его аналоги) «работает» не только в онкологии (нельзя исключить, что, повлияв на этот процесс, можно будет создать, в том числе, и новые методы лечения таких болезней), но, возможно, и в макроэволюции при образовании новых видов, и даже в мышлении.

Но если, оставаясь в рамках современной естественнонаучной парадигмы, не удастся объяснить основные принципы, лежащие в основе таких явлений, как макроэволюция и мышление, то, может быть, стоит выйти за эти рамки? Наиболее известная и проработанная попытка такого рода — это креационизм. Если говорить примитивно, то, в соответствии с этим учением, существует некая «высшая сила» (проще говоря, бог), которая и управляет всем происходящим, в том числе и наследственностью и мышлением. Разумеется, остаются вопросы, как конкретно она это делает, но это уже и не столь важно.

Конечно, если основываться на идее бога, то можно объяснить все, что угодно (в том числе и то, что не удастся объяснить, оставаясь в рамках привычного для нас материалистического подхода), и никаких противоречий при этом не возникает. Но теория, в которой возможно все, обладает очень низкой предсказательной силой. Разумеется, чисто формально, основываясь только на логике, опровергнуть такую теорию нельзя, но даже если ее и принять, то пользоваться ею оказывается весьма затруднительно. Не хотелось бы по любому случаю отрываться ссылкой на «волю бога». Хотелось бы отыскать какой-либо иной выход из возникшей ситуации, когда этого бы не потребовалось.

Может быть, этот выход состоит в том, чтобы все-таки не выходить за рамки естественнонаучной парадигмы, но определенным способом расширить эти рамки, отказавшись от некоторых допущений, которые, в настоящее время, кажутся настолько самоочевидными, что их никогда даже и не обсуждают. Но для нас такой подход, в кото-

ром есть что-то «необсуждаемое», в принципе неприемлем. Мы будем рассуждать так, как будто для нас не существуют и вообще не должны существовать какие-либо «необсуждаемые» вопросы, даже если они и могли бы на первый взгляд показаться ненужными или глупыми.

Вернемся, с учетом сказанного, вновь к вопросу о возникновении и развитии окружающей нас реальности. Креационисты полагают, что здесь не могло обойтись без участия какой-то «высшей силы». Но что было с этой «высшей силой» еще до того, как вселенная образовалась? Ведь тогда не существовало ни пространства, ни времени. Или «высшая сила» существовала как-то вне реальности, или она тогда вообще не существовала. Но если считать, что вне реальности нет вообще ничего, то мы приходим к выводу, что, по крайней мере, до рождения вселенной «высшая сила» не существовала.

Однако если «высшая сила» появилась только в момент рождения вселенной, а до этого ее вообще не существовало, то каким образом она «вдруг» сразу приобрела все свои «безграничные» знания, без которых, в частности, невозможно сконструировать геном?

Казалось бы, что мгновенно приобрести такие «безграничные» знания может только такая «высшая сила», которую не сдерживают никакие ограничения, в том числе и связанные с существующей естественнонаучной парадигмой. Иными словами, эта «высшая сила», казалось бы, выступает здесь в роли «всемогущего бога» (который к тому же может даже быть и антропоморфным). Но это, как ни странно, может быть совсем и не так. Возможна ситуация, когда, даже не выходя за рамки естественнонаучного подхода, то, что мы называем здесь «высшей силой», приобрело бы все требуемые знания. Правда, такая возможность предполагает существование некоторых квантовых и релятивистских явлений, которые изучаются пока что только теоретически, а экспериментально еще не подтверждены.

В последние годы в теоретической физике было показано (см. работы М. Морриса и К. Торна [11, 12]), что в принципе возможна ситуация «проникновения» сигнала из будущего в настоящее. Осуществить такую ситуацию на практике было бы очень сложно (а в настоящее время вообще невозможно), она требует, в соответствии с этими работами, существования так называемых «кротовых нор» (wormhole), а также какой-то экзотической материи, способной эти «норы» стабилизировать. Но уже одно то, что подобное «проникновение» сигнала хотя бы в принципе возможно, означает, что в каких-то случаях некая сущность, находящаяся в далеком прошлом, могла бы воспользоваться информацией, которая станет известной еще только когда-то в будущем (т. е. эта сущность, фактически, выполняла бы

роль «оракула»). Если речь идет о макроэволюции, эта информация могла бы оказаться полезной подсказкой для конструирования правильно-го генома.

Но дело здесь не ограничивается одной только полезной подсказкой. Ведь из будущего можно получить информацию и о том, какое изменение генома было сделано, и насколько оно было удачно. И если оно было недостаточно удачно или недостаточно полезно, то не следует осуществлять это изменение, а осуществить какое-либо другое. А если удачно — то обязательно осуществить именно это изменение. В результате подобных действий можно, в принципе, эффективно повысить вероятность появления полезного изменения генома. А это, в свою очередь, уже может существенно увеличить вероятность появления новых видов. Если подыскивать такому увеличению вероятности хоть какой-то аналог среди явлений, изучаемых в «обычной» классической физике, то оно напоминает увеличение коэффициента усиления в приемнике за счет введения положительной обратной связи.

Возвращаясь вновь к обсуждению проблем, связанных с макроэволюцией и с тем, что они могут потребовать, для своего решения, выход за рамки естественнонаучного подхода, можно сказать, что если сигналы из будущего способны «проникать» в прошлое, то ничего такого вообще может и не потребоваться. Это, конечно, вовсе не означает, что никаких «высших сил» вообще нет и быть не может. Скорее это означает, что сделать сколько-нибудь однозначный вывод относительно существования этих «сил» и их природы только на том основании, что макроэволюция присутствует в реальности, мы не сможем. Нужно также отметить, что мы в действительности не знаем, как устроена такая реальность, в которой возможно «прохождение» сигнала из будущего в прошлое, и может ли эта реальность «вписаться» в тот «естественнонаучный материализм», к которому мы привыкли.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит А. Поройкова, М.В. Фридман, В.А. Скобееву, А.М. Оловникова, Н.Г. Есипову и В.Г. Туманяна. Без их помощи эта работа скорее всего не была бы написана.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. В. Лейбниц, *Монадология* (Рипол Классик, М., 2019).
2. Е. В. Кунин, *Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции* (Центрполиграф, М., 2014).
3. А. В. Мелких, *Теория направленной эволюции* (ИД «Интеллект, Долгопрудный, 2020).
4. S. J. Gould and N. Eldredge, *Nature* **366**, 223 (1993).
5. Н. Винер, *Творец и робот* (Прогресс, М., 1966).
6. М. Минский, *Вычисления и автоматы* (Мир, М. 1971).
7. С. Ааронсон, *Квантовые вычисления со времен Демокрита* (АНФ, М., 2018).
8. H. Everett, *Rev. Mod. Phys.* **29**, 454 (1957).
9. *The Many-Worlds Interpretation of Quantum Mechanics*, Ed. by B. de Witt and N. Graham (Princeton Univ. Press, 1973).
10. М. Б. Менский, *Сознание и квантовая механика. Жизнь в параллельных мирах* (ООО «Век 2», Фрязино, 2011).
11. M. S. Morris, K. S. Thorne, and U. Yurtsever, *Phys. Rev. Lett.* **61**, 1446 (1988).
12. К. Торн, *Черные дыры и складки времени. Дерзкое наследие Эйнштейна* (Физматлит, М., 2009).

Natural Scientific and Theological Approaches to the Understanding of How the Existing Reality “Is Arranged”

V.A. Namiot

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

This paper discusses if it is possible to explain everything that happens in our reality by the methods of the natural sciences, or whether such an explanation may also require consideration of some “higher forces” that do not fit into the materialistic concept. The phenomena such as macroevolution (the formation of new species) and thinking are used as examples to show that they cannot be explained by classical (traditional) natural-scientific approach. However, suppose that certain quantum and relativistic processes, studied only theoretically so far, could exist and arise in our reality, then, in principle, it becomes possible to explain both macroevolution and thinking without involving any “higher forces”.

Keywords: evolution, thinking, natural selection, creationism

ВНИМАНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ

Замеченные опечатки

В вып. 4 тома 66 за 20214 год в статье М.А. Муриной и др. «Антитромбоцитарное действие и химическая активность N6-хлораденозинфосфата» замечены следующие опечатки:

На стр. 634 в аннотации фразу «Константа скорости реакции N6-хлораденозинфосфата с метионином составляет $1.40 \pm 0.09 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ » следует читать как «Константа скорости реакции N6-хлораденозинфосфата с метионином составляет $1.40 \pm 0.09 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ».

На стр. 636 в 1-м абзаце правой колонки фразу «Поглощение света при указанной длине волны непосредственно обусловлено анионом трийоди-

да $(\text{J}_3)^-$ » следует читать как «Поглощение света при указанной длине волны непосредственно обусловлено анионом трийодида $(\text{I}_3)^-$ ».

На стр. 638 первую строку таблицы следует читать как «Константа скорости реакции второго порядка, $\text{M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ », а приведенные в третьей строке таблицы значения — соответственно как $(5.80 \pm 0.66) \times 10^4$, $(2.40 \pm 0.19) \times 10^5$, $(1.20 \pm 0.23) \times 10^6$ и $(2.04 \pm 0.52) \times 10^4$.

На стр. 639 первую фразу в левой колонке следует читать как «парный двухвыборочный t -тест для средних значений».