# СОДЕРЖАНИЕ

# Том 65, номер 1, 2020

2

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия в исследовании биологических молекул	
Е.Л. Терпугов	5
К вопросу о выборе блокирующего белкового агента при создании метода иммунохимического анализа с использованием поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии	
А.Ю. Субекин, В.И. Кукушкин, Т.И. Новожилова, С.П. Мамонтов, Л.В. Кулик, Р.А. Хрусталёв	17
Об активации системы комплемента амилоидными агрегатами пептидов Аβ(1-40) и Аβ(1-42): факты и предположения	
Э.И. Якупова, Л.Г. Бобылёва, И.М. Вихлянцев , А.Г. Бобылёв	24
Динамические и статистические свойства кинков ДНК	
Л.А. Краснобаева, Л.В. Якушевич	29
Проявление гистерезиса в тепловых свойствах наносистем на примере переохлажденных кластеров воды во влажных G-сефадексах	
Н.А. Грунина, Т.В. Белопольская, Г.И. Церетели, О.И. Смирнова	36
Противоопухолевые свойства динитрозильных комплесов железа с тиолсодержащими лигандами и S-нитрозоглутатиона в эксперименте	
А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина	48
Эффект зрительной стимуляции на уровни гамма-аминомасляной кислоты и макромолекул в головном мозге человека <i>in vivo</i>	
А.Н. Яковлев, А. Манжурцев, П. Меньщиков, М. Ублинский, О. Божко, Т. Ахадов, Н. Семенова	61
Образование липофусцина у дрозофил при нагревании и ультрафиолетовом облучении	
А.Е. Крылова, А.В. Чаплыгина, Н.Л. Векшин	69

# БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Механизм взаимодействия наночастиц оксидов металлов с биологическими мембранами	
П.В. Мокрушников	74
Исследование межклеточных адгезионных контактов нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов методом атомно-силовой микроскопии	
С.Н. Плескова, Р.Н. Крюков, С.З. Бобык, А.В. Боряков, А.А. Брилкина	80
Эффекты комбинированного действия димерных бисбензимидазолов и ионизирующего излучения на стволовые клетки рака молочной железы линии MCF-7	
К.А. Чурюкина, А.Л. Жузе, А.А. Иванов, И.А. Замулаева	87
Снижение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах после воздействия определенных режимов слабых комбинированных магнитных полей	
В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко	97
Ингибирование гамкергической передачи как модель гиперактивации клеток Пуркинье мозжечка крыс	
Т.В. Карелина, Ю.Д. Степаненко, Д.А. Сибаров, П.А. Абушик, С.М. Антонов	104

## БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Влияние спектральных особенностей световой среды на поглощение света листьями салата и его нетто-продуктивность	
Т.Э. Кулешова, И.Н. Черноусов, О.Р. Удалова, Л.М. Аникина, Ю.В. Хомяков, А.В. Александров, И.С. Середин, С.В. Феофанов, С.А. Щеглов, Н.Р. Галль, Г.Г. Панова	112
Нейросетевая модель прогнозирования фенологии скороспелых сортов сои по климатическим факторам	
О.Д. Таратухин, Л.Ю. Новикова, И.В. Сеферова, Герасимова Т.В., С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова, К.Н. Козлов	125
Непрерывная модель для осциллирующей вспышки численности чешуекрылого фитофага <i>Malacosoma disstria</i> (Lepidoptera, Lasiocampidae)	
А.Ю. Переварюха	138
Динамика смены первостепенного махового оперения у воробьиных птиц, возможные факторы синхронизации	
М.Е. Диатроптов, В.А. Панчелюга, А.А. Станкевич	152
Сравнительное анатомическое исследование параметров закрученного потока в полости левого желудочка у животных различного размера на основании концепции смерчеобразных течений вязкой жидкости	
М.М. Тхагапсова, Е.А. Талыгин, Ш.Т. Жоржолиани, А.В. Агафонов, А.В. Дорофеев, А.Ю. Городков, Г.И. Кикнадзе, Л.А. Бокерия	165
Нестационарная вариабельность сердечного ритма во время антиортостатической пробы	
С.В. Божокин, Е.М. Лесова, В.О. Самойлов, К.А. Баранцев	175
Анализ фазовых взаимосвязей между колебательными процессами в сердечно-сосудистой системе человека	
А.В. Танканаг, А.А. Гриневич, И.В. Тихонова, Н.К. Чемерис	184
Смертность как показатель старения: возможности и ограничения	
В.Н. Крутько, В.И. Донцов	190
Моделирование полной кривой смертности человека: регуляторная модель старения	
В.И. Донцов, В.Н. Крутько	198

# дискуссии

К вопросу о различии между искусственным и естественным интеллектом

В.А. Намиот	202

# ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

Генетическая идентификация сортов сои с использованием однонуклеотидных полиморфизмов

М.В. Грецова, М.Г. Самсонова

206

## Vol. 65, No. 1, 2020

## **Molecular Biophysics**

Fourier Transform Infrared Emission Spectroscopy in the Studying of Biological Molecules	
E.L. Terpugov	5
Choice of Protein Blocking Agent in Development of a Method for Immunochemical Assay Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy	
A.Yu. Subekin, V.I. Kukushkin, T.I. Novozhilova, S.P. Mamontov, L.V. Kulik, and R.A. Khrustalev	17
On Complement System Activation by Amyloid Aggregates of $A\beta(1-40)$ and $A\beta(1-42)$ Peptides: Facts and Assumptions	
E.I. Yakupova, L.G. Bobyleva, I.M. Vikhlyantsev, and A.G. Bobylev	24
Dynamic and Statistical Properties of DNA Kinks	
L.A. Krasnobaeva and L.V. Yakushevich	29
Hysteresis Manifestation in the Thermal Properties of Nanosystems on the Example of Supercooled WaterClusters in Wet G-Sephadex	
N.A. Grunina, T.V. Belopolskaya, G.I. Tsereteli, and O.I. Smirnova	36
Antitumour Properties of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands and S-Nitrosoglutathione in the Experiment	
A.F. Vanin, L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, V.A. Rykova, N.V. Bluchterova, and M.M. Fomina	48
The Effect of Visual Stimulation on GABA and Macromolecules Levels in Human Brain <i>in vivo</i>	
A. Yakovlev, A. Manzhurtsev, P. Menshchikov, M. Ublinskiy, O. Bozhko, T. Akhadov, and N. Semenova	61
The Formation of Lipofuscin in Drosophila after Exposure to Elevated Temperature and UV Radiation	
A.E. Krylova, A.V. Chaplygina, and N.L. Vekshin	69
Cell Biophysics	
The Mechanism of Interaction of Metal-Oxide Nanoparticles with Biological Membranes	
P.V. Mokrushnikov	74
Investigation of the Adhesive Intercellular Contacts between Neutrophil Granulocytes	

and Lymphocytes by Atomic Force Microscopy S.N. Pleskova, R.N. Kriukov, S.Z. Bobyk, A.V. Boryakov, and A.A. Brilkina 80 Outcomes of the Combined Effects of Dimeric Bisbenzimidazoles and Exposure to Ionizing Radiation on MCF-7 Breast Cancer Stem Cells 87 K.A. Churyukina, A.L. Zhuze, A.A. Ivanov, and I.A. Zamulaeva Decrease of Respiratory Burst in Neutrophils after Exposure to Weak Combined Magnetic Fields of a Certain Duration 97 V.V. Novikov, E.V. Yablokova, and E.E. Fesenko

Inhibition of GABAergic Transmission as a Model of Purkinje Cell Hyperactivation in the Rat Cerebellum 104

T.V. Karelina, J.D. Stepanenko, D.A. Sibarov, P.A. Abushik, and S.M. Antonov

# **Complex Systems Biophysics**

The Influence of Spectral Properties of Lighting Environments on Light Absorption by Lettuce Leaves and Net Photosynthesis of Lettuce	
T.E. Kuleshova, I.N. Chernousov, O.R. Udalova, L.M. Anikina, Yu.V. Khomyakov, A.V. Aleksandrov, I.S. Seredin, S.V. Feofanov, S.A. Shcheglov, N.R. Gall, and G.G. Panova	112
An Artificial Neural Network Model for Prediction of Phenology of Early Maturing Soybean Varieties in Relation to Climate Factors	
O.D. Taratuhin, L.Yu. Novikova, I.V. Seferova, T.V. Gerasimova, S.V. Nuzhdin, M.G. Samsonova, and K.N. Kozlov	125
A Continuous Model for Oscillating Outbreak Population of the Phytophagous Moth, Tent Caterpillar, <i>Malacosoma disstria</i> (Lepidoptera, Lasiocampidae)	
A.Yu. Perevaryukha	138
Dynamics of the Replacement of the Primary Flight Feathers of Passerine Birds, Possible Factors in Synchronization	
M.E. Diatroptov, V.A. Panchelyuga, and A.A. Stankevich	152
Comparative Anatomical Study of the Parameters for Swirling Flow in the Left Ventricular Cavity in Animals of Different Size Based on the Concept of Tornado-Like Flows of Viscous Liquids	
M.M. Tkhagapsova, E.A. Talygin, Sh.T. Zhorzholiani, A.V. Agafonov, A.V. Dorofeev, A.Yu. Gorodkov, G.I. Kiknadze, and L.A. Bockeria	165
Non-Stationary Heart Rate Variability During Head-Down Tilt Test	
S.V. Bozhokin, E.M. Lesova, V.O. Samoilov, and K.A. Barantsev	175
Analysis of Phase Interactions between Oscillatory Processes in Human Cardiovascular System	
A.V. Tankanag, A.A. Grinevich, I.V. Tikhonova, and N.K. Chemeris	184
Mortality as an Indicator of Aging: Possibilities and Limitations	
V.N. Krut'ko and V.I. Dontsov	190
Postnatal Ontogeny and Aging: Regulatory Model Full Curve of Human Mortality	
V.I. Dontsov and V.N. Krut'ko	198
Discussions	
On the Question Regarding the Difference between Artificial	
VA Namiot	202
7.21. 1 TUIIIIOI	202

# Letters to the Editor

206

Genetic Identification of Soybean Varieties Using Single Nucleotide
Polymorphism Markers
M.V. Gretsova and M.G. Samsonova

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.342;577.344

## ЭМИССИОННАЯ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

© 2020 г. Е.Л. Терпугов

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

> *E-mail: el\_terpugov@rambler.ru* Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 29.11.2019 г. Принята к публикации 11.12.2019 г.

Инфракрасная спектроскопия является мощным аналитическим методом, который еще полностью не разработан применительно к биологическим системам. Ранее этот метод метод успешно применялся для анализа вторичной структуры. Этот миниобзор показывает последние достижения в изучении белков с применением ИК-Фурье-техники. Обсуждается применение эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии к исследованию фотофизических и фотохимических реакций в фоторецепторных белках.

Ключевые слова: ИК-Фурье-спектроскопия, стимулированная инфракрасная эмиссия, видимый свет, инфракрасный свет, белок, пигмент-белковый комплекс, аминокислоты. DOI: 10.31857/S0006302920010019

Колебательная спектроскопия представляет собой мощный инструмент для изучения биологических образцов [1-5]. Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия) и спектроскопия комбинационного рассеяния света (рамановская спектроскопия) являются двумя взаимодополняющими методами колебательной спектроскопии, которые основаны на двух принципиально разных физических процессах. Однако в обоих случаях наблюдают возбуждение молекулы до более высоких энергетических колебательных состояний. ИК-спектроскопия связана с поглощением ИК-квантов, в результате которого происходит усиление колебательных и вращательных движений молекул, обусловленных химическим составом образца [3, 5]. Химические связи претерпевают различные формы колебаний, такие как расвращения. Энергия тяжения, изгибы И большинства молекулярных колебаний соответствует энергии квантов с длиной волны 25-2,5 мкм или волновыми числами 4000-400 см<sup>-1</sup>. Полосы в спектре ИК-поглощения появляются в результате переходов между колебательными подуровнями основного электронного состояния и связаны с изменением дипольного момента, правилами отбора, симметрией молекул и степенью ангармоничности колебаний. Информация,

представленная в ИК-спектре, уникальна, ее невозможно получить с помощью спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление пленок исследуемых образцов. В работе использовали L-лизина моногидрохлорид (Aldrich-Sigma, США) без предварительной очистки. Пленку получали путем высаживания образца из 1 М водного раствора на подложку из кристаллического кремния. Толщина слоя плен-ки составляла приблизительно 1 мм. Материал подложки имеет область прозрачности в ИК-диа-пазоне.

Равномерно распределенный по гладкой поверхности подложки образец в объеме 200–300 мкл высушивали на воздухе при комнатной температуре и относительной влажности воздуха около 60% в течение нескольких часов.

Для приготовления раствора использовали деионизованную воду при pH 7.0. Деионизованная вода, используемая в этих экспериментах, была получена на системе Nanopure Diamond ultrapure (Barnstead International, США). Чистота воды подтверждается величиной проводимости в 18 МОм.

Спектроскопические исследования. Основные спектроскопические исследования проводили с использованием ряда спектроскопических мето-

Сокращения: ИК – инфракрасный, НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение, ИКЭС – эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия.

дов – дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии, низкотемпературной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии, эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии.

При дифференциальных и низкотемпературных измерениях сначала записывали спектр светоадаптированной формы основной формы бактериородопсина БР<sub>568</sub>, который сохраняли в памяти компьютера. Затем записывали спектр исследуемого интермедиата. Разностный спектр получали путем вычитания из полученного спектра исследуемого интермедиата спектра основной формы. В частности, спектр  $M_{412}$ -интермедиата получали при температуре 190 К.

Эмиссионные измерения были выполнены на отечественного ИК-Фурье-спектрометра базе ФС-02 путем модификации его оптической схемы. Для этого источник ИК-излучения был удален из прибора. Вместо него был установлен образец, который непрерывно облучался видимым светом умеренной мощности и, по сути, являлся непосредственным источником ИК-излучения, которое направлялось на собирающее зеркало и далее в интерферометр. Геометрия освещения образца видимым светом была такова, что возбуждающий свет падал практически нормально к поверхности образца и фокусировался в пятно даметром 2-4 мм с помощью короткофокусной линзы. Регистрацию вторичного ИК-излучения осуществляли в геометрии отражения. При этом возбуждающий (паразитный) свет не попадал на приемник. Случайное проникновение видимого света отсекалось пластиной из германия, установленной на входном окошке приемника. Германий, как известно, пропускает ИК-свет и не пропускает свет видимого диапазона.

Варьирование мощности возбуждающего излучения от ксеноновой лампы при исследовании интенсивностной зависимости спектра ИКэмиссии осуществлялось при помощи поглощающих светофильтров (ЛОМО, Россия). Калибровку светофильтров проводили с помощью измерителя мощности. Также использовали полосовые инфракрасные фильтры.

Записывали эмиссионные спектры в одноканальном режиме со спектральным разрешением  $4 \text{ см}^{-1}$ , которое было выбрано для лучшей воспроизводимости спектров.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**ИК-спектроскопия в исследовании глобулярных белков.** В структурных исследованиях белков ИКспектроскопия начала применяться с 50-х годов прошлого столетия [6–8] и до сих пор является блестящим инструментом при изучении конформации и динамики белковых структур [2, 9–11]. Полезность инфракрасной спектроскопии проистекает из ее способности обнаруживать изменения в относительной ориентации и водородных связях пептидных групп С=О, которые являются основными осцилляторами, связанными со структурой. Одним из основных его применений является анализ вторичной структуры белка, основанный на том, что существует тесная корреляция между положением специфических ИК-полос в спектре и вторичной структурой [12-15]. Эти корреляции были определены посредством связи частот структурно-чувствительных амидных полос со специфическими типами структуры, такими как α-спирали, β-сшивки или петли [12, 13, 16]. При большом числе степеней свободы молекулы белка ее ИК-спектр, тем не менее, имеет немного полос. Это обусловлено тем, что в ИК-спектрах белковых полимеров активны только те нормальные колебания, для которых атомы в повторяющихся единицах полимерной цепи колеблются в фазе [2, 7].

Наиболее изучено белковое колебание, связанное с полосой Амид I, локализованной в спектральной области 1700–1620 см<sup>-1</sup>. Полоса Амид I почти полностью состоит из C=O-валентных колебаний, связанных с растяжением пептидной связи, и обладает высокой чувствительностью к вторичной структуре. В зависимости от типа вторичной структуры, в которой участвуют пептидные C=O-группы, нормальные моды имеют тенденцию локализоваться в пределах определенных спектральных областей, создавая полосы частот, каждая из которых имеет свои собственные спектральные параметры (положение, ширина полосы и коэффициент ослабления).

Полоса Амид II, напротив, происходит от плоских колебаний, связанных с изгибом N–Hсвязи, и от валентных колебаний, связанных с растяжением С–N-связи. Колебание Амид II демонстрирует гораздо меньшую чувствительность к конформации белка [2]. Другие амидные полосы являются очень сложными и сильно зависят от величины силовых полей, природы боковых цепей и водородных связей и практически не используются в анализе конформационных исследований.

Одним из наиболее значительных практических преимуществ детального структурного анализа является то, что полоса «Амид I» содержит больше информации, чем просто сведения о конформации глобулярных белков. Точное положение этой полосы колебаний зависит от характера водородных связей с участием C=O- и N-Hгрупп [14]. В свою очередь, это определяется упаковкой полипептидной цепи, отражающей конформацию основной цепи и паттерн водородных связей. Таким образом, наблюдаемые контуры амидных полос белков состоят из перекрывающихся полос различных компонентов, представляющих  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -сшивки, изгибы и неупо-

рядоченные элементы структуры [2, 7, 17]. Полоса «Амид I» часто показывает сложную, неразрешенную форму линии с большим числом широких полос с неясными максимумами. Ее форма может изменяться под воздействием растворителя [16, 18, 19], из-за локальных деформаций [9], размера [9] и структурной организации локальных элементов во вторичной структуре [20]. Эти явления увеличивают внутреннее информационное содержание, но усложняют интерпретацию. Таким образом, основным аспектом в изучении белков с помощью инфракрасной спектроскопии становится расшифровка ИК-спектров, включающая в себя идентификацию и характеристики полос основных компонентов определяющих профиль полосы «Амид I» [21-24].

Появление в 1980-х годах новой техники — ИК-Фурье-спектрометров – открыло новую эру в исследовании белков. Принципиально новая конструкция ИК-спектрометров в сочетании с разработкой метода преобразования Фурье для сбора ИК-данных и надежного цифрового вычитания позволила быстро и эффективно обрабатывать и преобразовывать интерферограммы с помощью алгоритма преобразования Фурье, в результате чего быстро получать зависимости коэффициента пропускания от энергии в волновых числах [25]. Полученный в результате математической обработки спектр указывает на наличие химических связей и, следовательно, дает представление о составе и строении вещества. В настоящее время ИК-Фурье-спектроскопия признана ценным инструментом для изучения конформации белка в растворе на основе обычной воды, а также ее дейтерированных форм; она также используется для изучения структурной стабильности, сворачивания и агрегации белков [26-32].

Однако поначалу практическое использование этой техники было сильно ограничено такими факторами, как низкая чувствительность приборов, отсутствие понимания корреляции между конкретными типами упаковки основной цепи и полосами отдельных компонентов [22]. Тогда считалось, что ИК-спектр белка в водном растворе трудно, если не невозможно, получить, если только в качестве растворителя не использовать тяжелую воду, поскольку вода сильно поглощает в наиболее важной области спектра примерно при 1640 см<sup>-1</sup> и может полностью маскировать белковые полосы. Даже в растворе D<sub>2</sub>O обычно получали только качественную информацию, потому что компоненты полос поглощения, связанные с конкретными субструктурами, такими как α-спираль и β-сшивки, не могли быть разрешены [11].

В настоящее время высокая чувствительность современных ИК-приемников, стабильность ла-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

зеров и компьютеризованный инструментарий современных ИК-Фурье-спектрометров улучшил отношение «сигнал/шум» и позволил проводить обширные манипуляции с данными. Спектры могут быть получены в широком диапазоне сред с меньшими затратами времени и вещества, что стало исключительным преимуществом метода. При этом могут быть обнаружены прямые корреляции между частотами полосы «Амид I» и компонентами вторичной структуры на основе установленных экспериментальных методик анализа вторичной структуры полипептидов и белков [33-36]. Такие возможности в последние годы значительно расширили применение ИК-Фурьеспектроскопии в исследованиях вторичной структуры и динамики белка [32].

В настоящее время ИК-Фурье-спектроскопия используется не только для изучения вторичной структуры, но и при исследованиях структурной динамики, конформационных изменений (отражает связывание лигандов [37], зависимость от температуры, pH и давления [38–40]), она также используется для изучения структурной стабильности, сворачивания и агрегации белков [26, 27].

Дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия. Хотя ИК-спектроскопия позволяет изучать конформацию и динамику белка, на практике трудно определить локальные структурные изменения в белковом остове. Эта проблема происходит от существования сильного перекрывания между колебательными модами множества одинаковых групп в белке. Например, в ИК-спектре в области  $1700 \text{ см}^{-1}$  и 1500 см $^{-1}$  вносят вклад полосы «Амид I» (1620-1690 см<sup>-1</sup>) и «Амид II» (около 1550 см<sup>-1</sup>) (точная частота которых зависит от вторичной структуры белка), но также вносит вклад и поглошение боковых аминокислотных остатков, таких как аспартат, глутамат, тирозин, триптофан, лизин и аргинин (поглощающих в области локализации полос «Амид I» и «Амид II» [28-31]). В эту область могут также попадать колебания хромофора. При этом в типичном спектре ИК-поглощения пигментно-белкового комплекса в среднем инфракрасном диапазоне будет доминировать поглощение белка, в то время как поглощение молекул хромофора обычно составляет только очень незначительный вклад (~10<sup>-3</sup>-10<sup>-4</sup>, в зависимости от размера белка). Поэтому

10 , в зависимости от размера белка). Поэтому чтобы получить информацию о хромофоре или других составляющих биологической системы (белки, мембраны и так далее), участвующих в течение заданной фотореакции, в 1980-х годах прошлого столетия был разработан новый метод дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия. Впервые он был применен к бактериородопсину [41–43]. В последнее время этот метод особенно широко используется для исследований ранней фотофизики, процессов переноса энергии и мо-



**Рис. 1.** Дифференциальные спектры между исходной формой бактериородопсина БР<sub>568</sub> и формой  $M_{412}$ , записанные при температуре 190 К и относительной влажности пленок 0% (а) и 93% (б). Спектры записаны в одноканальном режиме с использованием охлаждаемых жидким азотом ртуть-кадмий-теллуровых (в английской аббревиатуре – MCT) приемников, накоплением 600 сканов и спектральным разрешением 4 см<sup>-1</sup>.

лекулярных механизмов функционирования фотосистем разной сложности (см., например, обзоры [44, 45] и ссылки в них).

Основной эксперимент заключается в сравнении двух ИК-спектров, зарегистрированных до и после данной реакции (см. рис. 1). Все колебательные полосы, принадлежащие молекулярным группам, участвующим в реакции, появятся в разностном спектре, тогда как все остальные колебания будут подавлены. В результате чувствительность метода проявляется на уровне отдельных молекулярных групп и даже химических связей. Получаемая в дифференциальном спектре информация касается таких важных событий, как протонирование/депротонирование боковой цепи одной аминокислоты, окисление/восстановление пигмента или кофактора, смещение молекулы воды, конформационные изменения хромофора или белка и так далее. Эта информация носит также структурный характер: например, в спектрах можно наблюдать не только образование водородной связи, но и получить качественную оценку прочности связи [44, 45].

С появлением ИК-Фурье-спектрометров с технологией «степ-скан» за состоянием биологической системы можно следить с временным разрешением от нано- до фемтосекунд [ 46–48].

Как было сказано выше, исторически первые исследования с помощью дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии были проведены на бактериородопсине. Они позволили определить вовлеченность индивидуальных групп на разных стадиях фотоцикла [49, 50]. Во многом успешному практическому применению этого метода способствовало разработка новых методик, связанных с подготовкой образца. Кроме мечения изо-

топами и водородно-дейтериевого обмена были разработаны специальные методики, такие как метод генетических замен или сайт-направленный мутагенез [51], избирательное прокрашивание изотопами боковых аминокислотных остатков или молекул внутренней воды [52–54]. Таким способом были идентифицированы каталитически важные аминокислоты в родопсинах [55–58]. В связи с этим особенность подготовки образцов для дифференциальной ИК-Фурье спектроскопии заслуживает отдельного рассмотрения.

Прежде всего, следует учитывать тот факт, что молярные коэффициенты экстинкции колебательных мод значительно меньше, чем у электронных переходов. Это влечет за собой необходимость использования очень концентрированных образцов. Кроме того, учитывая, что огибающая полосы поглощения воды в значительной степени маскирует важные полосы компонентов белка, необходимо уменьшить содержание воды при условии сохранности нативности белка или мембраны и его биохимических реакций при изменении гидратного состояния образца. Более серьезные проблемы возникают при исследовании водорастворимых белков. Для того чтобы решить эту проблему, было предложено использовать образцы в виде прессованных таблеток с использованием порошка бромида калия, прозрачного в ИК-области спектра. Этот метод прессования таблеток с помощью бромида калия был введен в 1952 г. и широко используется до сих пор. Он заключается в тщательном перемешивании тонко измельченной пробы с порошком бромида калия, ее прессовании и формировании полупрозрачной таблетки. Несмотря на преимущество, заключающееся в отсутствии большинства мешающих полос поглощения, к недостаткам этого метода относят возможность изменения кристаллической структуры полиморфных веществ в процессе растирания и прессования таблеток. Также из-за высокой гигроскопичности бромида калия не удается полностью избежать присутствия в ИК-спектрах полос адсорбированной воды возле  $1640 \text{ см}^{-1}$  и  $3450 \text{ см}^{-1}$ . Возможно химическое взаимодействие вещества пробы с материалом таблетки.

Метод нарушенного полного внутреннего отражения. Начиная с 1963 г., в качестве альтернативы ИК-поглощению для анализа водных растворов биологических образцов стали использовать метод ИК-отражения, известный как метод нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, в английской аббревиатуре – ATR (Attenuated total reflection)) [59]. Метод нарушенного полного внутреннего отражения требует минимальных усилий в приготовлении образца, он также позволяет исследовать поверхности самых различных материалов.

В основе метода НПВО лежит поглощение поверхностным слоем исследуемой пробы падающего излучения световой волны, выходящей из призмы полного внутреннего отражения, находящейся в оптическом контакте с изучаемой поверхностью. Детально метод описан в работе [59]. Для регистрации спектров НПВО необходимы специальные приставки в ИК-Фурье-спектрометрах. В этом случае получаемые методом НПВО инфракрасные спектры практически идентичны поглощению, а определение вторичной структуры белков по спектрам НПВО показало схожие результаты. В то же время метод также не лишен недостатков. Один из них связан с серьезными ошибками при интерпретации спектров. В последнее время метод НПВО чаще всего используется для определения ориентации белков в мембране.

Эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия. Если рассмотренные методы в ИК-Фурье-спектроскопии — пропускание (поглощение) и отражение (нарушенное полное внутреннее отражение) наиболее прочно и широко применяются в биологических исследованиях, то этого нельзя сказать об эмиссии, которая не используется в биологии.

Современные исследования с помощью эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии (ИКЭС) в большинстве случаев касаются изучения спектров естественных и искусственных источников света или лабораторных образцов, возбужденных термальными способами [60-63]. Помимо спектроскопии небесных тел, изучаемых в области астрофизики, существуют два основных направления эмиссионной спектроскопии, используемых в лабораторных условиях, - атомная эмиссионная спектроскопия, как один из наиболее широко используемых методов элементного анализа вещества, и ИКЭС, сконцентрированная главным образом на термоэмиссии молекулярных систем. ИКЭС может быть применима к анализу широкого спектра веществ органической и неорганической природы в твердом, жидком и газообразном состоянии, а также к анализу таких веществ, как сыпучие материалы, поверхности, катализаторы и тонкие пленки и минералы [62, 63].

Хотя ИКЭС имеет потенциал стать очень чувствительной, универсальной молекулярно-специфической техникой анализа молекулярного состава и структуры вещества, в настоящее время она все еще редко используется на практике. Одной из основных причин является отсутствие специализированной техники, позволяющей проводить рутинные измерения. Все измерения проводятся на базе ИК-Фурье-спектрофотометров, которые имеют специализированные приставки, или проводится модификация оптической схемы, позволяющая адаптировать прибор для эмиссионных экспериментов. Эти эксперименты зачастую происходят на грани искусства [61]. Между тем в настоящее время метод ИКЭС достаточно востребован из-за безальтернативности его применения в таких научных областях, как астрофизика, химический катализ или минералогия [63]. Поэтому метод ИКЭС продолжает совершенствоваться и развиваться. Одним из таких достижений является возможность его использования применительно к биологическим образцам, когда исключается прямой контактный нагрев, а эмиссия возбуждается с помощью видимого света с энергией, не вызывающей нагрева образца.

Спектр ИК-эмиссии, как и спектры комбинационного рассеяния света или ИК-поглощения, содержит подробную информацию о присутствующих химических связях, следовательно, он дает представление о химическом составе образца. Преимущество метода состоит в том, что он не имеет ограничений для водных растворов, поскольку молекулы воды не дают ИК-сигнала, способного маскировать важные белковые полосы. Следовательно, измерения могут проводиться в водных растворах или непосредственно на невысушенных образцах. Образец не требует специальной подготовки, что позволяет исследовать целостные клетки и даже ткани [64]. В спектральной области «Амид I» (1600-1700 см<sup>-1</sup>) и «Амид II» (1480-1575 см<sup>-1</sup>) содержатся не единичные широкие полосы, а множество хорошо разрешенных полос, что позволяет получать более подробную информацию об исследуемых процессах. При этом анализ эмиссионных спектров включает в себя пока что редко исследуемые спектральные области (>1800 см<sup>-1</sup> и <1000 см<sup>-1</sup>). Их исследование в фоточувствительных белках становятся все более популярными (см., например, работы [65-67]) (рис. 2). Как правило, в спектрах ИК-поглощения или дифференциальных спектрах спектральное окно между 1800 см $^{-1}$ и 1900 см<sup>-1</sup> лишено какого-либо спектрального вклада, в то время как в этой области в спектрах ИК-эмиссии проявляются хорошо разрешенные пики (рис. 2). Их идентификацию проводили в экспериментах с использованием модельных соединений ретиналя и аминокислот.

Рис. 2 иллюстрирует возможности метода в получении информации о хромофорном ретинале и белковых компонентах бактериродопсина в водном растворе и влажных пленках. Идентификация полос, относящихся к ретиналю, проводилась на основе сравнения с данными комбинационного рассеяния света и ИК-поглощения модельных соединений ретиналя. Идентификацию белковых полос проводили на основе анализа спектров аминокислот, используемых в качестве моделей. Оказалось, что в нерезонансных условиях под действием видимого света аминокислоты, так же как и ретиналь, способны генерировать ИК-излучение в среднем ИК-диапазоне. Это может иметь важное значение при решении вопроса о происхождении колебательного возбуждения в опсине в первичной фотофизике бактериородопсина.

Подробное описание ИК-эмиссионных экспериментов на базе ИК-Фурье-спектрометра ФС-02 было представлено ранее [68]. ИКЭС сочетает использование источника видимого света и адсорбционную ИК-Фурье-технику для записи спектров ИК-эмиссии в широком ИК-диапазоне. В этом случае стандартный источник ИК-излучения заменяется на непосредственно образец, как это схематически показано на рис. 3.

Как видно, спектр состоит из двух компонент широкой гладкой фоновой кривой и расположенных на ее фоне отдельных резких пиков. Реальный спектр ИК-эмиссии образца получали вычитанием широкой компоненты фонового излучения с использованием процедур сглаживания и фитизации полиномом 25-й степени с помощью компьютерной программы Origin 6. Регистрацию спектров проводили с максимальным уровнем полезного ИК-сигнала и минимальным влиянием фонового излучения от нагретых поверхностей. Оптимальные условия регистрации спектров задавали программно. Видимый свет в виде паразитных засветок отсекали оптическими фильтрами и германиевым фильтром, установленным на входном окошке ИК-приемника.

То, что в этих условиях резонансного поглощения ретинальным хромофором бактериородопсин может излучать ИК-радиацию в среднем ИК-диапазоне (4000–400 см<sup>-1</sup>) [68–70], подтвердили также другие авторы [71–74].

В процессе исследования нами было показано, что многочастотный (широкополосный) видимый свет помимо собственной флуоресценции может возбуждать в пигментах стимулированное ИК-излучение по механизму комбинационного типа [70, 75, 76]. В этом случае, как и при вынужденном комбинационном рассеянии, ИК-эмиссия наблюдается с теми же самыми резонансными условиями, которые имеют место при смешивании оптических волн в нелинейной среде [77-80]. Возможность процесса нелинейного оптического смешивания при использовании некогерентного источника была показана еще в 1965 г. [81]. Хотя вероятность такого процесса не столь велика, особенно при использовании низкоинтенсивных источников света, чувствительность современных ИК-Фурье-спектрометров вполне достаточна, чтобы надежно регистрировать спектры ИК-эмиссии в этих условиях. Спектры стимулированной ИК-эмиссии могут быть получены в нерезонансных и резонансных условиях. В последнем случае можно получить значительное



**Рис. 2.** Спектр ИК-эмиссии бактериородопсина в пленке (а) и водном растворе (б). Спектры записаны с использованием видимого света, попадающего в резонанс с полосой электронного поглощения хромофорного ретиналя ( $\lambda_{max} = 568$  нм), тем самым обеспечивающего избирательность процесса по отношению к ретинальному хромофору. Спектры записаны при комнатной температуре с накоплением 400 сканов и спектральном разрешением 4 см<sup>-1</sup>. Курсивом отмечены колебания хромофорного ретиналя (см<sup>-1</sup>), обычным шрифтом – колебания белка.

усиление сигнала (более чем в десять раз) [82]. Извлекаемая из спектров ИК-эмиссии структурная информация аналогична той, что извлекается из спектров ИК-поглощения и комбинационного рассеяния, поскольку и в том и другом случае наблюдаются те же самые колебательные моды [61, 83].

В данной работе представлены результаты экспериментов по селективному возбуждению отдельных репортерных групп в лизине с целью демонстрации возможностей метода в получении информации об энергетических состояниях и механизмах диссипации поглощенной энергии.

В этих экспериментах в качестве внешнего источника света использовали глобар, излучение которого пропускали через инфракрасные узко-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

полосные фильтры (рис. 4). Образцы лизина были использованы в виде пленок.

Линейная структура молекулы лизина проявляла заметную чувствительность к частотам возбуждающего Получаемый света. избыток колебательной энергии в лизине напрямую не переизлучался акцептирующей модой, а перераспределялся между модами. Характер перераспределения полученного избытка колебательной энергии и величина сигнала ИК-эмиссии зависели не столько от величины получаемого избытка энергии, сколько от специфики самой акцептирующей моды (см., например, рис. 5), что, по-видимому, определяется характером внутримолекулярного взаимодействия между модами.



**Рис. 3.** (а) — Схема установки, используемой для возбуждения эмиссии; (б) — схематическое изображение регистрируемых спектров. Регистрация ИК-спектров эмиссии проводится с помощью охлаждаемых жидким азотом низкотемпературных ртуть-кадмий-теллуровых приемников.

Так, при использовании полосового фильтра, максимально пропускающего при 936 см<sup>-1</sup> в спектральном интервале шириной 134 см<sup>-1</sup> в ИКспектре излучения (рис. 5а), наблюдается целый ряд полос, наиболее сильные из которых – возле 669 см<sup>-1</sup> (СОО<sup>-</sup>)деф., 794 см<sup>-1</sup> (СОО<sup>-</sup>)деф., 1221 см<sup>-1</sup> (С-ОН)деф., 1336 см<sup>-1</sup> (СН<sub>2</sub>)деф. и 2826 см<sup>-1</sup> (валентные (СН)СН-колебания). В то же время при использовании полосового фильтра, максимально пропускающего при  $1007 \,\mathrm{cm}^{-1}$  в спектральном интервале шириной 32 см<sup>-1</sup>, где акцептирующей модой являются валентные колебания С-С-группы, в ИК-спектре излучения (рис. 5б) наблюдаются полосы, наиболее сильные из которых находятся возле 674 см $^{-1}$  (COO<sup>-</sup>)деф., 1600 см<sup>-1</sup> (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>аз</sub>деф., 1884, 2280 и 2882 см<sup>-1</sup>. Высокочастотные полосы 1884, 2280 и 2882 см<sup>-1</sup> попадают в область составных частот и обертонов валентных колебаний С-Н-групп. Хотя во втором случае мощность падающего света была почти в три раза ниже, интенсивность ИК-спектров (рис. 5а и 5б) была практически одинаковой.

В то же время при использовании полосового фильтра, максимально пропускающего излучение при 1240 см<sup>-1</sup>, в спектральном интервале шириной 162 см<sup>-1</sup> интенсивность ИК-спектра (рис. 5в) была ниже при более высокой мощности падающего света. В этом случае зондирующий луч попадал в область крутильных  $CH_2$ -групп. В спектре ИК-излучения наблюдались полосы,

имеюшие другое относительное распределение интенсивности по сравнению со спектрами (рис. 5а и 5б). Среди них наиболее сильными являются полосы возле 674 см<sup>-1</sup> (COO<sup>-</sup>)деф, 821 см<sup>-1</sup> (не отнесена) см<sup>-1</sup>, 911 см<sup>-1</sup> (не отнесе-на), 1186 см<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>)деф, 1401 см<sup>-1</sup> (COO<sup>-</sup>), широкая полоса с максимумом возле 1860 см $^{-1}$ и узкая полоса  $2123 \text{ см}^{-1}$ . Эти две высокочастотные полосы попадают в область составных частот и обертонов валентных колебаний С-Н-групп. Аналогично, спектры на рис. 5г и 5д демонстрируют большой набор полос, относительное распределение интенсивности между которыми отличалось от того, что наблюдали выше. Интересно что во всех рассмотренных случаях рассеивание колебательной энергии происходило преимущественно с участием СН- и СООгрупп, а не  $NH_3^+$ . При этом в спектрах можно видеть, что перенос энергии происходит не только в направлении от высокочастотных высоких колебаний на более низкие по энергии низкочастотные колебания, но и, наоборот, с низкочастотных колебаний происходит перенос энергии на большие по энергии высокочастотные колебания. Фактически в этих экспериментах в молекуле лизина наблюдалось движение энергии не только вниз, как при механизме ступенчатого размена энергии, но и вверх, что возможно только при наличии в молекуле тесного ангармонического взаимодействия между модами [87-89]. За счет этого возбуждение какого-либо локального колебания было способно «активировать» достаточно большое число колебательных мод, частоты которых



Рис. 4. Характеристики ИК-фильтров, используемых для возбуждения молекулы лизина разными участками ИК-спектра.

локализованы в широком спектральном диапазоне, включая область «отпечатков пальцев», низких частот и область обертонов. Этот результат представляется особенно важным, поскольку он показывает, что небольшое по энергии колебательное возбуждение равновесной структуры молекулы вполне достаточно для того, чтобы изменить подвижную геометрию лизина, вовлекая ее во множество разнообразных колебательных движений, многие из которых могли совершаться с большой амплитудой. Участие большого числа колебаний в релаксационном процессе является отображением легкого преодоления энергетических барьеров в распространении энергии и высокой подвижности структуры молекулы лизина в колебательно-возбужденном состоянии. Лизин,

ТЕРПУГОВ



**Рис. 5.** Спектр ИК-эмиссии L-лизина гидрохлорида в диапазоне 2000–700 см–1, записанный при освещении узкими участками среднего ИК-диапазона. Отнесение полос в спектре проводили на основе данных работ [5, 31, 84–86].

как известно, присутствует практически во всех активных центрах белков и ферментов, и такая лабильность его структуры имеет большое значение для проявления биологической активности лизина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что возможность регистрации с помощью ИК-Фурьетехники слабой ИК-эмиссии представляет собой простое и в то же время чувствительное средство

получения химической и структурной информации о биологических молекулах. Инфракрасная эмиссионная спектроскопия с преобразованием Фурье как биофизический метод может быть особенно полезен при изучении механизма фотофизических и биохимических реакций.

## 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. E. Smith and G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approah* (John Wiley& Sons, 2005).
- 2. S. Krimm and J. Bandekar, Adv. Protein Chem. **38**, 181 (1986).
- E. B. Wilson, Jr., J. C. Decius, and P. C. Cross, *Molecular Vibrations: The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra* (Dover Publications, N.-Y., 1980).
- H. Callender and B. Honig, Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 6, 33 (1977).
- L. J. Bellamy, *The Infra-Red Spectra of Complex Mole*cules, 3<sup>rd</sup> ed. (Halsted Press, J. Wiley & Sons, Inc., N.-Y., 1975).
- Р. Збинцен, Инфракрасная спектроскопия высокополимеров, под ред. Л. А. Блюменфельда (Мир, М., 1966).
- 7. A. Elliott and E. J. Ambrose, Nature 165, 921 (1950).
- 8. T. Miyazawa, J. Am. Chem. Soc. 83, 712 (1961).
- 9. A. Barth, Biochim Biophys. Acta **1767** (9), 1073 (2007).
- W. Mäntele, Spectrochim. Acta. Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 138, 964 (2015).
- 11. J. K. Koenig and Sh. Yu, Acta Biochim. Biophys. Sinica **39** (8), 549 (2007).
- 12. А. Эллиот, Инфракрасные спектры и структура полимеров (Мир, М., 1972).
- A. Barth and C. Zscherp, Q. Rev. Biophys. 35 (4), 369 (2002).
- 14. S. Krimm and J. Bandekar, Biopolymers 19, 1 (1980).
- 15. M. C. Manning, Expert. Rev. Proteom. 2 (5), 731 (2005).
- 16. Ю. Н. Чиргадзе, Структура и стабильность биологических макромолекул (Наука, М., 1973).
- 17. T. Miyazawa, J. Am. Chem. Soc. 83, 712 (1961).
- W. K. Surewicz and H. H. Mantsch, Biochim. Biophys. Acta 952, 115 (1988).
- R. Gilmanshin, S. Williams, R. H. Callender, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3709 (1997).
- 20. E. L. Karjalainen and A. Barth, J. Phys. Chem. B **116**, 4448 (2012).

- 21. H. Susi and D. M. Byler, Biochem. Biophys. Res. Comm. **115** (1), 391 (1983).
- 22. D. M. Byler and H. Susi, Biopolymer 25, 469 (1986).
- 23. W. K. Surewicz and H. H. Mantsch, Biochim. Biophys. Acta **952**, 115 (1988).
- 24. A. Barth, Prog. Biophys. Mol. Biol. 74, 141 (2000).
- 25. P. R. Griffiths and J. A. de Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Wiley Interscience, N.-Y., 1986).
- P. I. Haris and D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 943 (2), 375 (1988).
- 27. M. C. Manning, Expert. Rev. Proteom. 2 (5), 731 (2005).
- 28. S. Y. Venyaminov and N. N. Kalnin, Biopolymers **30**, 1243 (1990).
- 29. S. Y. Venyaminov and N. N. Kalnin, Biopolymers **30**, 1259 (1990).
- N. N. Kalnin, I. A. Baikalov, and S. Y. Venyaminov, Biopolymer 30, 1273 (1990).
- 31. Y. N. Chirgadze, O. V. Fedorov, and N. P. Trushina, Biopolymers 14, 679 (1975).
- A. Dong, P. Huang, and W. S. Caughey, Biochemistry 29, 3303(1990).
- 33. B. C. Smith, Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (CRC Press, Boca Raton, 1996).
- 34. J. K. Kauppinen, D. J. Moffatt, H. H. Mantsch, et al., Appl. Spectrosc. **35**, 271 (1986).
- 35. D. C. Lee, P. I. Haris, D. Chapman, et al., Biochemistry **29**, 9185 (1990).
- 36. R. W. Sarver and W. C. Krueger, Anal. Biochem. **194**, 89 (1991).
- 37. A. Barth and C. Zscherp, FEBS Lett. 477, 151 (2000).
- 38. M. van de Weert, P. I. Haris, W. E. Hennink, et al., Anal. Biochem. **297** (2), 160 (2001).
- R. Chehín, I. Iloro, M. J. Marcos, et al., Biochemistry 38, 1525 (1999).
- 40. P. Herman, M. Staiano, A. Marabotti, et al., Proteins Struct. Funct. Bioinform. **63**, 754 (2006).
- 41. K. J. Rothschild, M. Zagaeski, and A. Cantore, Biochem. Biophys. Res. Commun. **103** (2), 483 (1981).
- 42. K. J. Rothschild, H. Marrero, M. Braiman, et al., Photochem. Photobiol. **40**, 675 (1984).
- 43. K. J. Rothshild, J. Bioenerg. Biomembr. 24, 147 (1992).
- 44. K. J. Rothschild, Biomed. Spectroscopy and Imaging **5** (3), 231 (2016).
- 45. W. Mantele, Trends Biosci. J. 18, 197 (1993).
- 46. F. Siebert, W. Mäntele, and W. Kreutz, FEBS Lett. **141**, 82 (1982).
- 47. F. Siebert and W. Mäntele, Eur. J. Biochem. **130** (3), 565 (1983).
- 48. F. Siebert, Methods Enzymol. 246, 501 (1995).
- 49. R. A. Mathies, C. H. Cruz Brito, W. T. Pollard, et. al., Science **240** (4853), 777 (1988).
- 50. R. A. Mathies, S. W. Lin, J. B. Ames, et al., Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **20**, 491 (1991).
- 51. 51. H. G. Khorana, G. E. Gerber, W. C. Herlihy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (10), 5046 (1979).
- 52. A. Maeda, Isr. J. Chem. 35, 387 (1995).
- 53. A. Maeda, J. E. Morgan, R. B. Gennis, et al., Photochem. Photobiol. 82 (6), 1398 (2006).

- 54. A. Maeda, R. B. Gennis, S. P. Balashov, et al., Biochemistry **44** (16), 5960 (2005).
- M. S. Braiman, T. Mogi, T. Marti, et al., Biochemistry 27, 8516 (1988).
- M. S. Braiman, T. Mogi, L. J. Stern, et al., Proteins: Structure, Function and Bioinformatic 3 (4), 219 (1988).
- 57. K. Gerwert and F. Siebert, EMBO J. 5 (4), 805 (1986).
- 58. K.Gerwert, B. Hess, and M. Engelhard, FEBS Lett. **261**, 449 (1990).
- 59. Н. Харрик, Спектроскопия внутреннего отражения (Мир, М., 1970).
- J. M. Chalmers and M. W. Mackenzie, in *Advances in Applied Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, ed. by M. W. Mackenzie (Wiley & Sons. Ltd., Chichester and N.-Y., 1988), pp. 170–188.
- 61. P. R. Griffiths, Appl. Spectrosc. 26, 73 (1972).
- 62. F. J. De Blase and S. Compton, Appl. Spectrosc. **45** (4), 611 (1991).
- 63. J. Mink and G. Keresztury, Appl. Spectrosc. 47 (9), 1446 (1993).
- 64. E. L. Terpugov, O. V. Degtyareva, and V. V. Savransky, J. Rus. Laser Research **37** (5), 401 (2016).
- J. Breton, E. Nabedryk, and A. Clerici, Vib. Spectrosc. 19, 71(1999).
- F. Garczarek, J. Wang, M. A. El-Sayed, et al., Biophys. J. 87 (4), 2676 (2004).
- 67. J. Wang and M. A. El-Sayed, Biophys. J. 90, 961 (2001).
- 68. E. L. Terpugov and O. V. Degtyareva, Biochemistry (Moscow) 66, 1315 (2001).
- E. L. Terpugov and O. V. Degtyareva, J. Mol. Struct. 565–566, 287 (2001).
- 70. A. G. Gagarinov, O. V. Degtyareva, A. A. Khodonov, et al., Vibrat. Spectrosc. **42**, 231 (2006).
- 71. J. Wang and M. A. El-Sayed, Biophys. J. 83 (3), 1589 (2002).

- 72. G. I. Groma, J. Hebling, I. Z. Kozma, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** (6), 1706 (2008).
- 73. G. I. Groma, A. Colonna, J. Lambry, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105** (19), 6888 (2004).
- I. G. Groma, A. Colonna, J.-L. Martin, et al., Biophys. J. 100 (6), 1578 (2011).
- Е. Л. Терпугов и О. В. Дегтярева, Письма ЖЭТФ 73 (6), 320 (2001).
- 76. Е. Л. Терпугов, О. В. Дегтярева, А. Г. Гагаринов и др., Краткие сообщения по физике ФИАН 12, 13 (2004).
- 77. Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics* (John-Willey & Sons, N.-Y., 1984).
- 78. S. A. Akhmanov and R. V. Khokhlov, *Problems of Nonlinear Optics* (Nauka Publ., Moscow, 1964).
- В. С. Горелик, В. А. Зубов, М. М. Сущинский и др., Письма ЖЭТФ 4, 52 (1966).
- 80. F. De Martini, Appl. Phys. 37, 4503 (1966).
- D. H. McMahon and A. R. Franklin, J. Appl. Phys. 36, 2073 (1965).
- S. E. Terpugova, O. V. Degtyareva, V. V. Savransky, et al., Am. J. Anal. Chem. 6, 731 (2015). DOI: 10.4236/ajac.2015.69070
- A. Tsuge, Y. Uwamino, and T. Ishizuka, Appl. Spectrosc. 43 (7), 1145 (1989).
- M. Wolpert and P. Hellwig, Spectochim. Acta Part A 64, 987(2006).
- A. M. Petrosyan and V. V. Ghazaryan, J. Mol. Struct. 917, 56 (2009).
- 86. *Handbook of vibrational spectroscopy*, Ed. by J. M. Chalmers and P. R. Griffiths (Wiley & Sons Ltd, 2002).
- М. В. Волькенштейн, М. А. Ельяшевич и Б. И. Степанов, *Колебания молекул* (Гос. изд-во науч.-теор. лит-ры, М.–Л., 1949).
- 88. А. Н. Теренин, *Фотоника молекул красителей* (Наука, Л., 1967).
- 89. D. D. Dlott, Chem. Physics 266, 149 (2001).

# Fourier Transform Infrared Emission Spectroscopy in the Studying of Biological Molecules

## E.L. Terpugov

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

Infrared spectroscopy is a powerful analytical tool that is yet to be fully developed in relation to biological systems. Previously, this method has been successfully used to analyze the secondary structure. This mini-review shows the latest advances in the study of proteins using the Fourier transform infrared technique. The application of Fourier transform infrared emission spectroscopy to the study of photophysical and photochemical reactions in photoreceptor proteins is discussed.

Keywords: FT-IR spectroscopy, stimulated infrared emission, visible/infrared light, protein, protein-pigment compex, aminoacids ——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.322.9

# К ВОПРОСУ О ВЫБОРЕ БЛОКИРУЮЩЕГО БЕЛКОВОГО АГЕНТА ПРИ СОЗДАНИИ МЕТОДА ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОВЕРХНОСТНО-УСИЛЕННОЙ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2019 г. А.Ю. Субекин, В.И. Кукушкин\*, Т.И. Новожилова, С.П. Мамонтов, Л.В. Кулик\*, Р.А. Хрусталёв

Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии, 111024, Москва, шоссе Энтузиастов, 23 \*Институт физики твердого тела РАН, 142432, Черноголовка Московской области, ул. Академика Осипьяна, 2 E-mail: kukushvi@mail.ru Поступила в редакцию 10.07.2019 г. После доработки 10.07.2019 г. Принята к публикации 22.08.2019 г.

Целью работы является выбор блокирующего белкового агента для проведения быстрого и чувствительного иммунохимического анализа с использованием метода SERS (поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии). Для усиления сигнала рамановского рассеяния света от белковых структур использована оптимизированная наноостровковая металл-диэлектрическая SERS-структура, а для измерения спектров усиленного оптического отклика использовался рамановский спектрометр с широким выходным лазерным пучком с длиной волны 532 нм. В результате проведенной работы были оптимизированы SERS-подложки для получения высокоинтенсивного поверхностноусиленного рамановского рассеяния света от используемой в исследованиях метки (ТРИТЦ – тетраметилродамина изоцианат), также были изучены параметры адсорбции белков, традиционно используемых в твердофазном иммунохимическом анализе, и выбраны оптимальные – бычий сывороточный альбумин и казеин. Показано, что при адсорбционном взаимодействии белка и SERS-поверхности действуют закономерности, описанные в классической адсорбционной теории.

Ключевые слова: рамановское рассеяние света, SERS, биосенсор, иммунохимический анализ, адсорбция белков.

DOI: 10.31857/S0006302920010020

В последнее время области и объемы использования рамановской спектроскопии стремительно расширяются. Этот вид оптической спектроскопии является уникальным и мощным инструментом для осуществления неразрушающего экспресс-метода в целях идентификации химических веществ и фармацевтических препаратов [1], обнаружения взрывчатых [2] и наркотических веществ [3], клинического исследования биологических тканей и жидкостей [4], медицинской диагностики состояния тканей [5] и др.

Главная причина рамановского рассеяния света в веществах заключается в том, что свет — это электромагнитная волна, в высокочастотном электрическом поле которой происходят осцилляции дипольного момента молекул. Все органические молекулы имеют характерные наборы низкочастотных колебаний. Низкочастотное внутримолекулярное колебание атомов модулирует высокочастотное колебание осциллирующего (и поэтому излучающего) дипольного момента молекул. Из-за этого в спектре рассеянного света появляются частотные компоненты, сдвинутые относительно частоты лазерного излучения на характерные частоты внутримолекулярных колебаний. Этот рамановский сдвиг позволяет однозначно распознавать разнообразные вещества.

Однако чувствительность рамановских методов детектирования различных молекулярных субстанций является чрезвычайно низкой, так как вероятность стоксовой компоненты рамановского рассеяния света составляет  $10^{-6}$ , что ставит

Сокращения: SERS – surface-enhanced Raman scattering (поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия), БСА – бычий сывороточный альбумин, ТРИТЦ – тетраметилродамина изоцианат.

под сомнение возможность использования рамановской спектроскопии для детектирования низких концентраций веществ. Эту ситуацию можно радикально изменить, если исследуемые молекулы нанести, к примеру, вблизи границы раздела металла и диэлектрика, на которой формируются поверхностные плазмон-поляритоны и происходит фокусировка электромагнитного излучения вблизи границы раздела этих сред. При взаимодействии молекул веществ, находящихся на таких поверхностях, с усиленным электромагнитным полем происходит значительное увеличение интенсивности рамановского рассеяния света - в  $10^{5}-10^{7}$  раз [6]. Это явление называется поверхностно-усиленным рамановским рассеянием света (в англоязычной литературе SERS – surfaceenhanced Raman scattering) и используется при создании биосенсоров. Эти биосенсоры являются чрезвычайно перспективными для решения задач по высокочувствительному и быстрому детектированию белковых молекул при проведении иммунохимического анализа [7]. Применение SERS-репортеров, т. е. молекул, обладающих индивидуальным высокоинтенсивным рамановским спектром, в качестве маркеров исследуемых белков способствует дополнительному усилению сигнала [8].

Оптимизация методов иммунного анализа с использованием SERS-биосенсоров особенно актуальна для создания чувствительной, селективной и быстрой диагностики различных патогенов, что имеет первостепенное значение при обеспечении экологической и биологической безопасности, а также в случаях, требующих неотложной медицинской помощи. SERS-биосенсоры можно рассматривать как хорошую альтернативу широко применяемым в настоящее время методам твердофазного иммуноферментного анализа, которые, к сожалению, не являются экспресс-методами.

При создании высокочувствительной методики детектирования белков на основе поверхностно-усиленного рамановского рассеяния света в первую очередь необходимо выбрать длину волны лазерного излучения. Важность правильного выбора обусловлена несколькими причинами. Возбуждение рамановского рассеяния света высокочастотным лазерным излучением по сравнению с низкочастотным излучением имеет на порядок большую эффективность вследствие выраженной частотной зависимости рамановской активности молекул. Кроме этого, чувствительность (квантовая эффективность) кремниевых матриц-детекторов является функцией длины волны излучения. Максимум их чувствительности приходится на диапазон 450-550 нм. К тому же при фотовозбуждении с длинами волн 350-

500 нм помимо рамановского сигнала возникает интенсивная фотолюминесценция, которая препятствует надежному измерению рамановского рассеяния света. Самый простой способ подавления сигнала фотолюминесценции заключается в уменьшении энергии фотонов накачки (ниже характерной ширины запрещенной зоны молекулы). И наконец, чувствительность рассматриваемого метода может быть значительно увеличена за счет эффектов резонансной рамановской спектроскопии. Традиционные наноостровковые металл-диэлектрические SERS-подложки имеют пик плазмонного поглощения на длинах волн 450-600 нм. По этим причинам наиболее целесообразным представляется использование лазерного излучения в диапазоне длин волн 500-550 нм для детектирования SERS-сигналов исследуемых веществ.

После выбора длины волны лазерного излучения второй важной задачей в процессе создания метода иммунохимического анализа на основе SERS-эффекта является подбор блокирующего агента. При проведении теста свободные сайты на поверхности твердой фазы, не связанные с анализируемым антигеном, могут неспецифически фиксировать меченые антитела, что приводит к повышению фонового сигнала. Для предотвращения неспецифического связывания после иммобилизации на твердую фазу аналита проводят обработку нейтральными для теста веществами блокирующими агентами.

К блокирующим агентам предъявляются следующие требования:

 – отсутствие конкуренции с антигеном за центры адсорбции на поверхности;

отсутствие маскирующих для антител свойств;

 – большая аффинность к поверхности по сравнению с антителами;

 инертность по отношению к антителам, отсутствие перекрестного взаимодействия.

Приемлемый блокирующий агент подбирается для конкретного исследования в процессе оптимизации методики. Широкое распространение в иммуноферментном анализе получили такие вещества, как бычий сывороточный альбумин (БСА) [9], казеин [2], обезжиренное молоко [10] и ряд других. В случаях, когда аналитический отклик сильно зависит от расстояния между SERSрепортером и поверхностью с плазмонными свойствами [6], на которой образуется иммунный комплекс, рекомендуется применять в качестве блокирующих агентов низкомолекулярные вещества, например глутатион [11] и подобные ему соединения, содержащие амино- или сульфгидрильную группы.



**Рис. 1.** Возможные процессы взаимодействия белков с поверхностью с соответствующими им изотермами и кинетическими кривыми адсорбции [14].  $\Gamma$  – количество адсорбированного белка;  $\Delta c$  – количество необратимо адсорбированного белка; d – толщина белкового слоя.

Ключевым моментом при создании метода иммунного анализа является изучение адсорбции его компонентов. На сегодняшний день существует множество работ, посвященных адсорбционному взаимодействию белков с различными поверхностями (кремнезем, силикагель, различные пластики для иммуноферментного анализа) и влиянию условий адсорбции [12,13]. Известны модели адсорбции белков из одно- и многокомпонентных систем, созданные на основании теоретических расчетов уравнения Лэнгмюра и на многочисленных экспериментальных данных [14]. В этой работе представлена обширная теоретическая база для понимания процессов адсорбции белков из растворов на поверхности твердых фаз различной природы (пластик, стекло и др.). Выкладки с описанием возможных процессов взаимодействия белков с поверхностью, заслуживающие особого внимания в рамках нашей статьи, представлены на рис. 1.

Из представленных на рис. 1 данных автор делает вывод, что при отсутствии белок-белкового взаимодействия на поверхности сорбента адсорбция белка соответствует изотерме Лэнгмюра и гладкой кинетической кривой (рис. 1а). В случае если молекулы белка обратимо адсорбируются в одном конформационном (или ориентационном) состоянии, но затем часть из них может перейти в необратимо адсорбированное состояние (рис. 1б), кинетическая кривая также соответ-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

ствует изотерме Лэнгмюра, однако толщина белкового слоя на поверхности твердой фазы вследствие переориентации молекул становится мень-Изменение ориентации молекулы ше. с увеличением площади адсорбции приводит к увеличению десорбции белка (рис. 1в), что соответствует наличию локального максимума на кинетической кривой и уменьшению толщины белкового слоя на поверхности твердой фазы. И наконец, когда все адсорбированные молекулы, изменяя конформацию, переходят в необратимо адсорбированное состояние (рис. 1г), кинетические кривые имеют не пологий наклон, как в классической кривой, а скорее похожи на прямую, меняющую угол наклона [14]. Таким образом, при создании метода анализа белковых структур, в котором существенную роль играют адсорбционные процессы, необходимо правильно выбрать эффективный блокирующий агент, изучить его адсорбцию как индивидуально, так и в присутствии других иммунореагентов для понимания их взаимодействия друг с другом на поверхности в условиях эксперимента.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Для измерения спектров рамановского рассеяния света использовали рамановский спектрометр EnSpectr SERS R532 (Enhanced Spectrometry, США) с широким выходным лазерным пучком, который за одно измерение проводил усреднение сигнала со



**Рис. 2.** (а) — Микрофотография поверхности островковой SERS-подложки, полученная на сканирующем электронном микроскопе; (б) — гистограмма распределения наночастиц по размерам; (в) — спектр поглощения SERS-подложки; (г) — SERS-спектр ТРИТЦ на полученной подложке.

всей площади SERS-зон (4 мм<sup>2</sup>) и тем самым минимизировал ошибку измерения, связанную с неоднородностью распределения молекул по поверхности подложки. Длина волны лазерного излучения составляла 532 нм, мощность — 30 мВт, спектральный диапазон — 100—4000 см<sup>-1</sup>, спектральное разрешение — 6 см<sup>-1</sup>.

2. SERS-структуру для детектирования белковых структур в низких концентрациях формировали на поверхности кремния с выращенным слоем оксида кремния SiO<sub>2</sub> с помощью установки вакуумного термического напыления NANO 38 (скорость напыления серебра -0.4 Å/с, толщина эквивалентной пленки 60 Å) и последующим термическим отжигом при температуре 120°C в течение 6 мин.

3. БСА, папаин и флуоресцентный краситель тетраметилродамина изоцианат (ТРИТЦ) получены от компании Sigma-Aldrich (США), а казеин от компании Serva (Германия).

4. Меченые белки синтезировали в соответствии со стандартной методикой [15].

5. Адсорбцию меченых белков (БСА, казеин, папаин) проводили погружением подложки в их растворы с концентрацией 0,1 мг/мл в физиологическом фосфатном буфере (рН 7,4). После экспозиции проводили промывку дистиллированной водой, подложку высушивали на воздухе и измеряли SERS-сигнал (по пику ТРИТЦ при  $1640 \text{ см}^{-1}$ ). Процедуру повторяли до достижения суммарного времени адсорбции 60 мин.

6. Десорбцию белков проводили погружением подложки с иммобилизованным меченым белком (сигнал предварительно измеряли) в раствор тритона X-100 с концентрацией 0,2% в фосфатном физиологическом буфере, подложку выдерживали определенное время, ополаскивали дистиллированной водой от избытка буфера, высушивали на воздухе, после чего проводили измерение сигнала. Процедуру повторяли до достижения суммарного времени десорбции 60 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

По разработанной нами методике были получены и охарактеризованы серебряные SERS-субстраты на основе оксида кремния. Результаты этой работы представлены на рис. 2.

Как видно на фотографии (рис. 2а), при напылении серебра толщиной эквивалентной пленки 60 Å с последующим термическим отжигом подложки при 120°С поверхность SERS-зон покрывалась серебряными гранулами, средний размер



**Рис. 3.** (а) — Кинетические кривые адсорбции белков, (б) — кинетические кривые десорбции БСА, (в) — кинетические кривые десорбции папаина, (г) — кинетические кривые десорбции казеина.

которых в плоскости подложки составлял 23 нм (рис. 26), средняя высота гранул — 8 нм, средний зазор между ними — 22,5 нм. Диэлектрические проницаемости серебра и оксида кремния обеспечивают подстройку пика плазмонного поглощения (рис. 2в) данной SERS-структуры (560 нм) вблизи длины волны выбранного нами лазерного излучения (532 нм). Нанесенное на подложку вещество ТРИТЦ показало высокоинтенсивный усиленный сигнал рамановского рассеяния света (рис. 2г).

Таким образом, полученные SERS-подложки удовлетворяют требованиям по дисперсности частиц по форме и размеру, а также дают равномерное распределение кластеров по поверхности. Спектр поверхностно-усиленного рамановского рассеяния света от используемого в исследованиях красителя показывает хорошую интенсивность.

Для выбора блокирующего агента, пригодного для последующего создания метода иммунного анализа с использованием SERS-детекции, изучали параметры адсорбции некоторых белков,

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

традиционно используемых в твердофазном иммуноферментном анализе. Результаты этого исследования представлены на рис. 3.

Из данных рис. За следует, что БСА соответствует адсорбционной модели, представленной на рис. 1в. Сначала под действием градиента концентрации на подложку адсорбируется максимальное количество белка. Однако большая часть белковых молекул адсорбирована обратимо. Далее следуют конформационные изменения белковых молекул на поверхности подложки или их переориентация относительно поверхности ввиду геометрической анизотропии. В результате действия того или иного процесса происходит десорбция обратимо связанных молекул с поверхности подложки и на кинетической кривой адсорбции наблюдается локальный максимум. Папаин ведет себя по классической модели адсорбции Лэнгмюра (рис. 1а), что говорит о том, что большинство молекул связано с SERS-подложкой обратимо. Казеин ведет себя согласно модели, близкой к рис. 1в. Наличие локального максимума на кинетической кривой адсорбции казеина можно связать с конформационными/ориентационными перестройками белковых молекул, переходящих в необратимо связанное состояние, и частичной десорбцией.

Были поставлены опыты (рис. 3б-г) по десорбции каждого из белков (см. раздел «Материалы и методы», п. 6). Из данных рисунков следует, что десорбция присутствует в каждом опыте и с течением времени достигает своего предела, соответствующего необратимо связавшемуся количеству белка. На рис. 36 видно, что при адсорбции БСА на SERS-подложку в течение 2 мин белок смывается с подложки интенсивнее, чем при времени его адсорбции 20 мин. Остаточный сигнал соответственно составил 65 и 95% от исходного. На рис. Зв видно, что папаин десорбируется с подложки одинаково хорошо для обеих точек адсорбционной кривой, остаточный сигнал по отношению к исходному составил 59% в случае 2 мин и 62% – для 20 мин адсорбции. Из рис. Зг следует, что казеин, аналогично БСА, хорошо смывается с подложки при времени его адсорбции 2 мин и практически полностью остается прикрепленным при времени его адсорбции 20 мин. Остаточный сигнал составил 75 и 95 % соответственно.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проделанной работы были получены SERS-подложки, дающие значительное усиление рамановского сигнала выбранной для аналитических целей метки (ТРИТЦ). На них были изучены адсорбционные свойства белковых веществ, наиболее часто употребляемых в качестве блокирующих агентов в классическом иммуноферментном анализе. Показано, что при адсорбционном взаимодействии белка и SERSповерхности действуют закономерности, описанные в классической адсорбционной теории.

Из полученных данных следует, что при достижении равновесного состояния БСА и казеин являются необратимо адсорбированными на поверхности SERS-подложек. Интерпретация киалсорбнии нетических кривых хорошо коррелирует с данными по десорбции белков. В момент времени, когда еще не достигнута точка локального максимума (2 мин, рис. 3а), существенная часть белковых молекул адсорбирована обратимо, а после достижения равновесного состояния практически все молекулы переходят в необратимо связанное состояния. Приведенные выше данные по десорбции (рис. 3б,г) подтверждают это. При адсорбции папаина отношение необратимо адсорбированных молекул к общему их числу примерно всегда одинаково и составляет около 60% вне зависимости от того, достигнуто состояние равновесия или нет (рис. 3в).

По результатам работы можно сделать вывод о том, что в качестве блокирующих агентов для иммунного анализа с применением SERS-эффекта предпочтительнее использовать БСА или казеин, так как высокое удельное содержание необратимо адсорбированных молекул дает основания полагать, что при постановке метода применяемый белок не будет частично или полностью вытеснен с поверхности антителами к исследуемому аналиту.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-72-30003).

#### 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. A. Kudelski, Talanta **76** (1), 1 (2008).
- R. Monjezi, S. Tan, B. Tey, et al., J. Virol. Methods 187 (1), 121 (2013).
- 3. M. Sanles-Sobrido, L. Rodríguez-Lorenzo, and S. Lorenzo-Abalde, Nanoscale **1** (1), 153 (2009).
- 4. S. Stockel, J. Kirchhoff, U. Neugebauer, et al., J. Raman Spectroscopy 47 (1), 899 (2016).
- G. W. Auner, S. K. Koya, C. Huang, et al., Cancer Metastasis Rev. 37 (4), 691 (2018).
- A. Wokaun, H.-P. Lutz, A. P. King, et al., J. Chern. Phys. 79 (1), 509 (1983).
- 7. A. Kaminska, E. Witkowska, K. Winkler, et al., Biosens. Bioelectron. **66**, 461 (2015).
- 8. K. Faulds, W. E Smith., and D. Graham, Anal. Chem. **76** (2), 412 (2004).
- 9. B. Dan, Zh. Huisheng, Y. Guangxin, and P. Xianyin, Anal. Methods 7 (1), 99 (2015).
- 10. T. Kuczius, K. Becker, A. Fischer, et al., Anal. Biochem. **431** (1), 4 (2012).
- D. V. Rodrigo, J. Liu, C. Zhou, et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 6 (15), 11829 (2014).
- 12. Т. Д. Хохлова, Вестн. МГУ. Сер. Химия **43** (3), 144 (2002).
- 13. Н. А. Эльтекова и А. Ю. Эльтеков, Физикохимия поверхности и защита материалов **46** (1), 56 (2010).
- 14. В.И. Севастьянов, *Биосовместимость* (ИЦ ВНИИгеосистем, М., 1999).
- Л. И. Казакова, А. В. Дубровский, И. М. Санталова и др., Биоорган. химия 38 (1), 64 (2012).

# Choice of Protein Blocking Agent in Development of a Method for Immunochemical Assay Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

## A.Yu. Subekin\*, V.I. Kukushkin\*\*, T.I. Novozhilova\*, S.P. Mamontov\*, L.V. Kulik\*\*, and R.A. Khrustalev\*

\*State Research Institute of Organic Chemistry and Technology, shosse Entuziastov 23, Moscow, 111024 Russia

\*\*Institute of Solid State Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Akademika Ossipyana 2, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

The aim of the work is to choose a protein blocking agent for fast and sensitive immunochemical analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy. An optimized SERS-based metal-dielectric nanostructure was used to obtain higher enhancement factor of Raman scattering protein molecules, and a Raman spectrometer with a wide output, imaged with the 532 nm laser line was employed to measure enhanced optical spectra of molecular adsorbates. Ultimately, SERS-substrates were optimized to obtain high-intensity surface-enhanced Raman scattering from the dye used in the studies (Tetramethylrhodamine isothiocyanate). Parameters of the adsorption process of proteins typically used in solid-phase immunochemical analysis were explored, and bovine serum albumin and casein were chosen for optimum assay results. It is shown that the interaction of a protein and SERS substrate during adsorption occurs according to classical theoretical description of adsorption.

Keywords: Raman scattering, SERS, biosensor, immunochemical analysis, protein adsorption

УДК 577.3

## ——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

# ОБ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА АМИЛОИДНЫМИ АГРЕГАТАМИ ПЕПТИДОВ Аβ(1-40) И Аβ(1-42): ФАКТЫ И ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ

© 2020 г. Э.И. Якупова\*, Л.Г. Бобылёва\*, И.М. Вихлянцев\*, \*\*, А.Г. Бобылёв\*, \*\*

 \*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3
 \*\*Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино Московской области, просп. Науки, 3
 E-mail: yakupova.mira@mail.ru
 Поступила в редакцию 20.11.2019 г. После доработки 20.11.2019 г.
 Принята к публикации 29.11.2019 г.

В статье поднят вопрос о способности активации системы комплемента амилоидными агрегатами, в частности амилоидными фибриллами пептидов Аβ(1-40) и Аβ(1-42), обнаруживаемых при болезни Альцгеймера в головном мозге. В 1992 г. на основании данных о колокализации амилоидных включений и белков системы комплемента в мозгу пациентов с болезнью Альцгеймера было высказано предположение о прямой активации этой системы амилоидами. Впоследствии был опубликован еще ряд работ в пользу такого предположения. В ходе наших исследований эти данные не подтверждаются. Так активируют ли амилоиды систему комплемента, а если нет, то что же ее активирует? На эти вопросы авторы пытаются ответить в данной статье.

Ключевые слова: система комплемента, амилоиды, амилоидозы, болезнь Альцгеймера. **DOI:** 10.31857/S0006302920010032

С описания в XVII веке увеличенной селезенки женщины началась история изучения амилоидозов — заболеваний, связанных с отложением в тканях органов амилоидных включений [1]. В дальнейшем были описаны амилоидозы таких органов, как печень, почки и ряда других, что послужило началом исследования природы данных заболеваний [1,2].

К настоящему времени известно, что амилоиды представляют собой агрегаты/фибриллы пептида или белка, который претерпел частичное или полное разворачивание своей аминокислотной цепи и впоследствии дальнейшего сворачивания сформировал неправильную конформацию. В конечном счете пептидные цепи формируют сложную кросс- $\beta$ -структуру, наделяющую амилоиды такими свойствами, как нерастворимость и устойчивость к протеолизу [3]. Из-за этого происходит накопление/отложение амилоидов и связанные с этим серьезные изменения в метаболизме тканей и органов [4], что, как считается, приводит к развитию амилоидозов.

Более тридцати различных амилоидогенных белков на сегодняшний день причисляют к тем или иным заболеваниям у людей [1–3]. Наибольшую известность среди амилоидозов приобрела болезнь Альцгеймера, которую связывают с накоплением в головном мозге амилоидных отложений пептидов А $\beta$ (1-40) и А $\beta$ (1-42) [1–3]. Известно, что для этого заболевания также характерно интенсивное нейровоспаление, в котором задействована и система комплемента [5].

Система комплемента является частью врожденной иммунной системы и состоит из большого количества различных белков плазмы, которые реагируют друг с другом, чтобы опсонизировать патогены, и вызывают ряд воспалительных реакций, которые помогают бороться с инфекцией [4]. Существуют три пути активации комплемента: 1) классический путь, который запускается антителом или напрямую связыванием компонента комплемента С1q с поверхностью патогена; 2) лектиновый (маннозный) путь, который инициируется маннансвязывающим лектином, нормальным компонентом сыворотки, связывающимся с некоторыми инкапсулированными бактериями; 3) альтернативный путь, запускающийся непосредственно на поверхности патогена [4]. Заключительный итог любого из трех путей активации комплемента - это образование мембранного атакующего комплекса C5b-9, макромолекулы, состоящей из С5-, С6-, С7-, С8- и

множественных С9-фрагментов системы [4]. Комплекс С5b-9 связывается с клеточной мембраной, формируя трансмембранный канал, провоцируя свободную диффузию ионов и малых молекул в клетку и из нее, нарушая клеточный гомеостаз, что в конечном итоге приводит к лизису клетки, если на клетке собирается достаточное количество мембранного атакующего комплекса [4]. Примечательно, что мембранный атакующий комплекс также может вызывать лизис соседних здоровых клеток организма [6].

В 1992 г. были проведены иммуногистохимические исследования, которые показали, что белок С1q колокализуется с амилоидными отложениями Аβ-пептидов в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [7]. Было сделано предположение, что Аβ-амилоиды активируют систему комплемента. Последующие исследования, проведенные in vitro, подтвердили возможность прямой активации системы комплемента амилоидными фибриллами по классическому пути при отсутствии антител [7-14]. Прямая антитело-независимая активация системы комплемента фибриллами Аβ-пептидов была продемонстрирована и для альтернативного пути [15–17]. Кроме того, было показано, что активация комплемента фибриллами Аβ-пептидов in vitro приводит к образованию С5а - мощного цитокинподобного продукта расщепления С5, а также к сборке провоспалительного мембранного атакующего комплекса С5b-9 [12, 15]. Показано, что многие белки, входящие в состав системы комплемента, включая С1q, С4, С3, С5, С6, С7, С8, С9, фрагменты активации С3, С4 и С5b-9, также колокализуются с отложениями А
 и нейрофибриллярными клубками в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [10, 12, 18-20]. Исходя из этих данных, считается, что при данном заболевании активация системы комплемента усиливает нейровоспалительный процесс вследствие непосредственного связывания системы комплемента с амилоидными фибриллами. Разрабатываются даже новые терапевтические подходы для уменьшения повреждения при нейровоспалении от воздействия системы комплемента при развитии болезни Альцгеймера [21].

Учитывая все вышесказанное и проводя собственные исследования амилоидной агрегации мышечного белка титина [22], мы заинтересовались вопросом о возможной антитело-независимой активации системы комплемента амилоидами этого белка. В ходе наших экспериментов не было обнаружено активации системы комплемента аморфными амилоидными агрегатами титина [23], что, по-видимому, исключает его роль в развитии воспаления при мышечных амилоидозах. В этих экспериментах в качестве положительного контроля мы пытались использовать амилоидные фибриллы пептидов Аβ(1-40) и Аβ(1-42),

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

которые должны были активировать систему комплемента. Однако они также не активировали систему комплемента. Полученные результаты легли в основу дискуссии о способности активации системы комплемента амилоидными агрегатами, в частности амилоидными фибриллами пептидов Аβ(1-40) и Аβ(1-42), обнаруживаемых в головном мозге при болезни Альцгеймера.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе настояшей работы использовали стандартную методику формирования амилоидных фибрилл пептидов Аβ: синтетические пептиды  $A\beta(1-40)$  и  $A\beta(1-42)$  (Sigma, США) были растворены в 100%-м диметилсульфоксиде до концентрации 10 мг/мл, после чего разводились бидистилированной H<sub>2</sub>O до концентрации 1 мг/мл, а затем до 0.3 мг/мл буферным раствором, содержащим 0.1 М трис-HCl, pH 7.4. В таком разведении образцы двое суток инкубировали при температуре 37°С. Далее амилоидные фибриллы с различной концентрацией инкубировали в течение ночи в 96-луночных планшетах при температуре 4°С. Выявление факта формирования амилоидных фибрилл происходило при помощи поликлональных LOC-антител (Millipore, США), специфически связывающихся с амилоидными фибриллами и фибриллярными олигомерами белков. Процедура проведения твердофазного иммуноферментного анализа для исследования связывания амилоидных фибрилл с белками системы комплемента представлена на рис. 1. Для этого использовали следующие материалы: бычий сывороточный альбумин, белки системы комплемента C1q (Sigma, CША) и C3b (Millipore, CША), сыворотка крови человека (Millipore, США); первичные поликлональные антитела кролика против C1q (Thermo Scientific, США) (1:1000) и моноклональные антитела мыши против СЗ (ab11871; Abcam, Великобритания) (1:1000); вторичные антитела козла, конъюгированные с щелочной фосфатазой против антител кролика или мыши (ab6722/ab6790 (1:3000); Аbcam, Великобритания), раствор NBT/BCIP (Roche, Швейцария).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе нашего эксперимента были сформированы амилоидные фибриллы пептидов  $A\beta(1-40)$  и  $A\beta(1-42)$ , что подтверждается их связыванием с амилоидо-специфическими антителами LOC (рис. 2а). Исследования по связыванию фибрилл  $A\beta$ -пептидов с белками системы комплемента (см. схему на рис. 1) как при использовании отдельных белков C1q (рис. 2б) и C3b (рис. 2в), так и сыворотки крови, содержащей эти белки ЯКУПОВА и др.



**Рис. 1.** Схема твердофазного иммуноферментного анализа для исследования связывания системы комплемента с амилоидными фибриллами. Этапы: I - фиксация амилоидных фибрилл на пластиковых стенках 96-луночных планшетов (инкубация в лунках в течение ночи при 4°C); <math>2 - после блокировки свободных участков планшетов сухим молоком, разведенным в фосфатном буферном растворе, в течение часа при 37°C в лунки добавляли либо отдельные белки системы комплемента C1q или C3b в фосфатном буферном растворе, либо содержащую их сыворотку крови человека, на 2 ч при 37°C; 3 - после трехкратной промывки фосфатным буферным раствором на 1 ч при 37°C добавляли первичные антитела против белков C1q или C3b; 4 - после трехкратной промывки фосфатным буферным раствором на 1 ч при 37°C добавляли в торичные антитела против белков C1q или C3b; 4 - после трехкратной промывки фосфатным буферным (стрелка влево) или демонстрации отсутствия связывания (стрелка вправо) исследуемых амилоидных фибрилл с белками системы комплемента добавляли раствор NBT/BCIP и проводили спектрофотометрическое исследование. В качестве отрицательного контроля вместо амилоидных фибрили использовали бычий сывороточный альбумин.

(рис. 2г,д), не выявили положительной реакции. Таким образом, в наших экспериментах не выявлена способность амилоидных фибрилл пептидов  $A\beta(1-40)$  и  $A\beta(1-42)$  активировать систему комплемента.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших экспериментов поднимают вопрос о противоречивости данных, полученных в разных лабораториях, при исследовании активации системы комплемента амилоидными агрегатами. Мы не подвергаем сомнению то, что белки системы комплемента действительно колокализуются с амилоидными отложениями/бляшками. Однако стоит помнить, что в состав амилоидных включений в тканях органов помимо Аβпептидов входят и другие компоненты, например гликозаминогликаны, аполипопротеин Е, амилоидный компонент сыворотки Р [3]. Но связь с активацией системы комплемента была выявлена только в случае Аβ-пептидов. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что амилоидные агрегаты титина и пептидов Аб(1-40) и Аβ(1-42) не участвуют в активации системы комплемента. Тогда что же может ее активировать? Возможно, что непосредственно микроорганизмы. В подтверждение этому имеются следующие данные. В мозге больных болезнью Альцгеймера

было обнаружено увеличение популяций бактерий в сравнении с мозгом здоровых людей [24]. Авторы высказали предположение о возможном вкладе таких микроорганизмов, как Firmicutes, Actinobacteria и в особенности P. acnes, в развитие нейровоспаления в мозге больных [24]. Учитывая предположение об антимикробных свойствах амилоидных агрегатов [25], колокализация амилоидов и системы комплемента, выполняющих одну и ту же роль, не кажется неожиданной. Таким образом, вполне вероятно, что не фибриллы Аβ-пептидов или другие компоненты амилоидных включений, а в большей мере микроорганизмы участвуют в активации системы комплемента при развитии нейровоспаления у больных болезнью Альцгеймера.

В контексте обсуждаемых результатов также необходимо упомянуть следующие данные. В проведенных недавно исследованиях с помощью криоэлектронной микроскопии было продемонстрировано, что выделенные и очищенные амилоидные фибриллы Аβ-пептидов из ткани мозга пациентов с болезнью Альцгеймера полиморфны и структурно отличаются от фибрилл, которые формируются *in vitro* [5]. В частности, полученные из мозга амилоидные фибриллы Аβ-пептидов являются, как отмечают авторы работы, правозакрученными, а их *in vitro* аналоги – левоза-



**Рис. 2.** Результаты экспериментов с использованием твердофазного иммуноферментного анализа: (а) – твердофазный иммуноферментный анализ с использованием LOC-антител, детектирующих наличие амилоидных фибрилл в образцах; (б) – исследование связывания амилоидных фибрилл Аβ-пептидов с изолированным компонентом Clq; (в) – исследование связывания амилоидных фибрилл Аβ-пептидов с изолированным компонентом C3b; (г) – исследование активации системы комплемента по классическому пути с использованием сыворотки крови человека; (д) – исследование активации системы комплемента по альтернативному пути с использованием сыворотки крови человека.

крученными [5]. Эти результаты поднимают актуальный вопрос о целесообразности экстра-

поляции результатов исследований амилоидов, полученных *in vitro*, на *in vivo* системы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-315-00012).

## 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

- A. A. Nizhnikov, K. S. Antonets, and S. G. Inge-Vechtomov, Biochemistry (Moscow) 80 (9), 1127 (2015).
- 2. R. Kyle, Br. J. Haematol. 114, 529-538 (2001).
- P. Westermark, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, et al., Amyloid 14 (3), 179–183 (2007).
- C. A. Janeway, Jr., P. Travers, M. Walport, et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5<sup>th</sup> ed. (Garland Science, N.-Y., 2001).
- 5. M. Kollmer, W. Close, L. Funk, et al., Nature Commun. **10**, 4760 (2019).
- M. Cedzyński, N. M. Thielens, T. E. Mollnes, et al., Front. Immunol. 10, 1869 (2019).
- J. Rogers, N. R. Cooper, S. Webster, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10016 (1992).
- S. Chen, R. C. Frederickson, and K. R. Brunden, Neurobiol. Aging 17, 781 (1996).

- H. Jiang, D. Burdick, C. G. Glabe, et al., J. Immunol. 152, 5050 (1994).
- 10. A. Afagh, Exp. Neurol. 138, 22 (1996).
- S. Webster, B. Bradt, J. Rogers, et al., J. Neurochem. 69, 388 (1997).
- 12. S. Webster, L. F. Lue, and L. Brachova, Neurobiol. Aging **18**, 415 (1997).
- 13. R. Veerhuis, M. J. Van Breemen, and J. M. Hoozemans, Acta Neuropathol. **105** (2), 135 (2003).
- 14. P. Tacnet-Delorme, S. Chevallier, and G. J. Arlaud, J. Immunol. **167** (11), 6374 (2001).
- B. M. Bradt, W. P. Kolb, and N. R. Cooper, J. Exp. Med 188, 431 (1998).
- R. Strohmeyer, Y. Shen, and J. Rogers, Brain Res. Mol. Brain Res. 81 (1–2), 7 (2000).
- M. D. Watson, A. E. Roher, K. S.Kim, et al., Amyloid 4, 147 (1997).
- P. Eikelenboom and F. C. Stam, Acta Neuropathol 57, 239 (1982).
- P. L. McGeer, H. Akiyama, S. Itagaki, et al., Neurosci. Lett. 107, 341 (1989).
- 20. Y. Shen, R. Li, E. G. McGeer, et al., Brain Res. 769, 391 (1997).
- 21. C. Landlinger, L. Oberleitner, P. Gruber, et al., J. Neuroinflammation **12**, 150 (2015).
- E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, et al., J. Biomol. Structure and Dynamics 36 (9), 2237 (2018).
- E. I. Yakupova, A. G. Bobylev, L. G. Bobyleva, and I. M. Vikhlyantsev, J. Immunoassay Immunochem. (2019). DOI:10.1080/15321819.2019.1694943
- 24. D. C. Emery, D. K. Shoemark, T. E. Batstone, et al., Front. Aging Neurosci. 9, 195 (2017).
- 25. D. K. Kumar, S. H. Choi, K. J Washicosky, et al., Sci. Transl. Med. 8 (340), 340ra72 (2016).

# On Complement System Activation by Amyloid Aggregates of $A\beta(1-40)$ and $A\beta(1-42)$ Peptides: Facts and Assumptions

## E.I. Yakupova\*, L.G. Bobyleva\*, I.M. Vikhlyantsev\*, \*\*, and A.G. Bobylev\*, \*\*

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

\*\* Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

In this paper, the question has arisen of whether the complement system can be activated by amyloid aggregates, in particular, by the amyloid fibrils of A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42) peptides found in the brains of patients with Alzheimer's disease. In 1992, based on data on colocalization of amyloid inclusions with proteins of the complement system in the brains of patients with this disease, it was suggested that this system was directly activated by amyloids. Then, this assumption had been supported by a number of subsequent studies. In our research, there is no confirmation of it. Indeed, do amyloids activate the complement system, and if no, what activates it? We try to answer these questions in this paper.

Keywords: complement system, amyloids, amyloidoses, Alzheimer's disease

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.323

# ДИНАМИЧЕСКИЕ И СТАТИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КИНКОВ ДНК

© 2020 г. Л.А. Краснобаева\*, \*\*, Л.В. Якушевич\*\*\*

\*Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2

\*\*Томский государственный университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 36

E-mail: kla1983@mail.ru

\*\*\*Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

> *E-mail: yakushev@icb.psn.ru* Поступила в редакцию 04.05.2019 г. После доработки 28.10.2019 г. Принята к публикации 11.11.2019 г.

Конформационная подвижность – одно из важнейших свойств молекулы ДНК. Ярким примером этой подвижности является образование локально расплетенных участков двойной спирали, называемых открытыми состояниями ДНК. Такие состояния играют важную роль в процессах транскрипции, репликации, денатурации. В «нерелятивистском» приближении открытые состояния ДНК часто моделируют как квазичастицы – кинки, обладающие определенной массой  $(m_k)$ , скоростью  $(u_k)$  и энергией покоя  $(E_{0k})$ . Если в молекуле ДНК образовалось не одно, а N открытых состояний, то правомерно поставить вопрос о статистике ансамбля из N кинков ДНК. Статистические свойства такого ансамбля до сих пор остаются малоизученными. В настоящей работе мы исследуем эти свойства, опираясь на полученные недавно данные о динамических характеристиках кинков ДНК. Предположив, что число кинков (N) фиксировано, взаимодействие между кинками мало и все кинки одинаковые, мы рассчитали статистическую сумму  $(Z_k)$ , свободную энергию  $(F_k)$ , функцию распределения скоростей  $(\rho_1(v_k), среднюю энергию <math>(\varepsilon_k)$ , теплоемкость  $(C_{v,k})$  и энтропию  $(S_k)$  ансамбля из N кинков ДНК, а также построили и сравнили между собой графики температурной зависимости этих характеристик для четырех однородных последовательности плазмиды pBR322.

Ключевые слова: кинки ДНК, статистика ансамбля кинков, статистическая сумма, свободная энергия, энтропия, плазмида pBR322.

DOI: 10.31857/S0006302920010044

Изучая внутреннюю конформационную подвижность молекулы ДНК, исследователи часто используют инструменты теоретической физики и нелинейной математики, включая представление о кинках, антикинках и бризерах, которые моделируют нелинейные конформационные возмущения, возникающие в двойной спирали ДНК в результате воздействия температуры, столкновений с молекулами раствора, действия радиации, взаимодействия с белками [1-4]. В частности, бризеры оказались достаточно эффективным математическим инструментом в исследованиях процессов денатурации ДНК [5, 6], а кинки – в исследованиях динамики открытых состояний ДНК, называемых также пузырьками (bubbles) и представляющих собой локально расплетенные участки двойной спирали длиной около десяти пар оснований, внутри которых водородные связи между комплементарными основаниями разорваны [7, 8].

Если молекула ДНК достаточно длинная, в ней могут образоваться не одно, а несколько нелинейных конформационных возмущений и правомерно поставить вопрос о статистических свойствах такого ансамбля. Статистическая задача особенно важна и интересна, поскольку служит ключом к интерпретации экспериментальных данных по рассеянию нейтронов или света молекулой ДНК [9], а также данных по денатурации ДНК [10]. В случае бризеров такая задача уже ставилась и решалась [2, 11]. В случае кинков вопрос о статистике все еще остается мало изученным.

Так, в монографии [12] ставился вопрос о статистике кинков ДНК, а в работе [9] рассматривалась возможность применения статистических свойств кинков для расчета динамического

Вид цепочки	$\overline{I} \times 10^{-44}$ , кг · м <sup>2</sup>	$\overline{K}'  imes 10^{-18}$ , Дж	$\overline{V} \times 10^{-20}$ , H/m	<i>а</i> ×10 <sup>-10</sup> , м
poly(A)	7.61	2.35	2.09	3.4
poly(T)	4.86	1.61	1.43	3.4
poly(G)	8.22	2.27	3.12	3.4
poly(C)	4.11	1.54	2.12	3.4
pBR322	6.14	1.93	2.21	3.4

Таблица 1. Параметры модели (3)

форм-фактора рассеяния нейтронов на ДНК. Однако отсутствие в то время полного набора данных о динамических параметрах ДНК не дало авторам возможности в полной мере применить полученные результаты к реальным последовательностям ДНК. Появление в литературе полного набора данных [13, 14] позволяет сейчас по-новому подойти к решению задачи о статистике ансамбля кинков ДНК. Кроме того, за это время заметно изменилась и сама динамическая модель ДНК, и методы исследования динамики кинков [15-19]. Они позволяют в «нерелятивистском» приближении моделировать кинки как квазичастицы, обладающие определенной массой, скоростью и энергией покоя, движущиеся в потенциальном поле ДНК с профилем, полностью определяемом последовательностью оснований [20, 21].

В настоящей работе исследуется вопрос о статистике ансамбля кинков ДНК с учетом новых данных о динамических характеристиках ДНК. Для определенности все расчеты выполняются для кинков, активированных в плазмиде pBR322, которая представляет собой небольшую кольцевую ДНК, широко используемую в исследованиях генов, а ее компоненты применяются для создания новых плазмид [22]. Последовательность плазмиды неоднородна. Она содержит 4361 азотистое основание, включая 983 аденинов, 1034 тиминов, 1134 гуанинов и 1210 цитозинов. Предположив (в первом приближении), что число кинков, активированныех в этой последовательности, фиксировано, взаимодействие между кинками пренебрежимо мало и все активированные кинки одинаковые, мы рассчитываем статистическую сумму ( $Z_k$ ), свободную энергию ( $F_k$ ), функцию распределения скоростей ( $\rho_1(\upsilon_k)$ , среднюю энергию ( $\varepsilon_k$ ), теплоемкость ( $C_{v,k}$ ) и энтропию  $(S_k)$ . Полученные результаты сравниваются с данными о статистических свойствах ансамблей кинков, активированных в четырех однородных последовательностях: poly(A), poly(T), poly(G) и poly(C).

## МОДЕЛЬ И ПАРАМЕТРЫ В КВАЗИОДНОРОДНОМ ПРИБЛИЖЕНИИ

Для моделирования внутренней динамики молекулы ДНК воспользуемся уравнением синус-Гордона:

$$I\phi_{tt} = K'a^2\phi_{zz} - V\sin\phi, \qquad (1)$$

где  $\phi$  — угловое отклонение азотистого основания; *I* — момент инерции; *K'* — константа, характеризующая крутильную жесткость сахаро-фосфатной цепочки; *V* — константа, характеризующая взаимодействие между основаниями внутри пар; *a* — расстояние между ближайшими парами оснований.

В квазиоднородном приближении коэффициенты уравнения (1) усредняют по всей длине последовательностей ДНК [13, 20]:

$$\overline{I} = I_{A}c_{A} + I_{T}c_{T} + I_{G}c_{G} + I_{C}c_{C}, 
\overline{K}' = K'_{A}c_{A} + K'_{T}c_{T} + K'_{G}c_{G} + K'_{C}c_{C}, 
\overline{V} = V_{A}c_{A} + V_{T}c_{T} + V_{G}c_{G} + V_{C}c_{C},$$
(2)

где  $c_j = n_j/n$  — концентрация оснований *j*-го типа (*j* = A, T, G, C);  $n_j$  — количество азотистых оснований *j*-го типа; n — общее количество оснований.

С учетом соотношений (2) уравнение (1) преобразуется к следующему виду:

$$\overline{I}\varphi_{tt} = \overline{K}'a^2\varphi_{zz} - \overline{V}\sin\varphi.$$
(3)

Мы рассчитали значения коэффициентов уравнения (3) для последовательности плазмиды pBR322. Результаты этих расчетов, а также полученные ранее данные о значениях коэффициентов уравнения (3) для однородных последовательностей poly(A), poly(T), poly(G) и poly(C) [13] представлены в табл. 1.

Решение уравнения (3) в виде кинка определяется формулой:

$$\phi_k(z,t) = 4 \arctan\{\exp[(\gamma_k/d_k) \cdot (z - \upsilon_k \cdot t - z_0)]\}, \quad (4)$$

где  $v_k$  – скорость кинка,  $d_k = (\overline{K}'a^2 / \overline{V})^{1/2}$  – размер кинка,  $\gamma_k = (1 - v_k^2 / C^2)^{-1/2}$ ,  $C = (\overline{K} \cdot a^2 / \overline{I})^{1/2}$  – скорость звука в ДНК.

Вид цепочки	$m_{\rm k}  imes 10^{-2}$ 4, кг	$E_{0\mathbf{k}}  imes 10^{-17}$ , Дж	$d_{\mathrm{k}}$ ×10 <sup>-8</sup> , м
poly(A)	0.226	0.177	0.361
poly(T)	0.211	0.121	0.361
poly(G)	0.253	0.213	0.290
poly(C)	0.186	0.145	0.290
pBR322	0.224	0.165	0.318

Таблица 2. Динамические параметры кинка

Гамильтониан, отвечающий уравнению (3), имеет следующий вид:

$$H = \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \frac{\overline{I}}{2} \phi_t^2 + \frac{\overline{K}' a^2}{2} \phi_z^2 + \overline{V} (1 - \cos \phi) \right] \frac{dz}{a}.$$
 (5)

Подставив решение (4) в формулу (5), вычислим полную энергию кинка ДНК:

$$E_{\rm k} = \frac{E_{0\rm k}}{\sqrt{1 - \frac{v_{\rm k}^2}{C^2}}},$$
(6)

где  $E_{0k} = 8\sqrt{\overline{K}'\overline{V}}$  – энергия покоя кинка.

В «нерелятивистском» пределе, когда скорость кинка  $v_k$  мала по сравнению со скоростью звука C, формула (6) примет следующий вид:

$$E_{\rm k} = E_{0\rm k} + \frac{8\sqrt{\overline{K'}\overline{V}}}{C^2}\frac{v_{\rm k}^2}{2}.$$
(7)

Из формулы (7) получим массу покоя  $(m_k)$ , кинетическую  $(T_k)$  и потенциальную  $(U_k)$  энергии кинка:

$$m_{\rm k} = \frac{8\sqrt{\overline{K}'\overline{V}}}{C^2},\tag{8}$$

$$T_{\rm k} = \frac{8\sqrt{\overline{K'}\overline{V}}}{C^2} \frac{\upsilon_{\rm k}^2}{2},\tag{9}$$

$$U_{\rm k} = 8(\sqrt{\overline{K'}\overline{V}}). \tag{10}$$

Импульс кинка запишем в виде:

$$p_{\mathbf{k}} = m_{\mathbf{k}} \,\upsilon_{\mathbf{k}}.\tag{11}$$

Эти динамические характеристики позволяют предложить простую модель ансамбля кинков ДНК в виде обычной классической системы, состоящей из N взаимодействующих частиц, обладающих массой  $m_k$ , импульсом  $p_k$  и энергией покоя  $E_{0k}$ .

Мы рассчитали значения основных динамических параметров кинков плазмиды pBR322. Результаты этих расчетов, а также значения этих параметров для кинков, активированных в одно-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

родных последовательностях poly(A), poly(T), poly(G) и poly(C), представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что массы кинков, активированных в рассматриваемых пяти последовательностях, соотносятся следующим образом:

$$m_{\rm k}^{\rm poly(G)} > m_{\rm k}^{\rm poly(A)} > m_{\rm k}^{\rm poly(pBR322)} > m_{\rm k}^{\rm poly(T)} > m_{\rm k}^{\rm poly(C)}$$

Видно, что самой большой массой обладают кинки, активированные в poly(G), а самые «легкие» кинки активируются в poly(C). Из табл. 2 также следует, что энергии покоя кинков соотносятся как:

$$E_{0k}^{\text{poly(G)}} > E_{0k}^{\text{poly(A)}} > E_{0k}^{\text{poly(pBR322)}} > E_{0k}^{\text{poly(C)}} > E_{0k}^{\text{poly(T)}},$$

т.е. кинки, имеющие наибольшую энергию покоя, активируются в poly(G), а наименьшую – в poly(T). В то же время размеры кинков, активированных в poly(G) и poly(C) равны, так же как и равны между собой размеры кинков, активированных в poly(A) и poly(T), причем последние больше чем первые. Размер кинков, активированных в плазмиде pBR322, занимает промежуточное значение.

# СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХРАРАКТЕРИСТИКИ АНСАМБЛЯ КИНКОВ ДНК

Статистическая сумма и функция распределения Гиббса. В соответствии с законами классической статистической физики [23] состояние ансамбля из N кинков ДНК определим набором координат и импульсов кинков:

$$Q = \{q_{k,1}, q_{k,2}, \dots q_{k,N}\},\tag{12}$$

$$P = \{p_{k,1}, p_{k,2}, \dots, p_{k,N}\},\tag{13}$$

а статистическую сумму – формулой

$$Z_{\rm k} = \frac{1}{N!} \int e^{-\frac{E(P,Q)}{k_{\rm B}T}} \frac{dPdQ}{(2\pi\hbar)^{N}},$$
 (14)

где  $k_{\rm B}$  — постоянная Больцмана, а E(P,Q) — полная энергия ансамбля.



**Рис. 1.** Функция распределения кинков ДНК по скоростям. Расчеты выполнены при фиксированной температуре *T* = 300 К для пяти видов последовательностей ДНК.

Если число кинков фиксировано, взаимодействие между ними пренебрежимо мало и все кинки одинаковые, полная энергия ансамбля кинков ДНК равна

$$E(P,Q) = NE_{0k} + \sum_{i}^{N} \frac{p_{k,i}^{2}}{2m_{k}},$$
(15)

и формула (14) для статистической суммы ансамбля кинков ДНК приобретает следующий вид:

$$Z_{\rm k} = \frac{L^N}{N!} \left( e^{-\frac{E_{0\rm k}}{k_{\rm B}T}} \sqrt{\frac{m_{\rm k}k_{\rm B}T}{2\pi\hbar^2}} \right)^N, \qquad (16)$$

где *L* – длина последовательности ДНК.

Другая важная характеристика ансамбля кинков ДНК — функция распределения Гиббса [24] имеет следующий вид:

$$\rho_{k}(P,Q) = \frac{e^{-\left(\frac{\sum\limits_{i}^{N} \rho_{k,i}^{2}}{2m_{k}k_{B}T}\right)}}{\left(L\sqrt{2\pi m_{k}k_{B}T}\right)^{N}}.$$
(17)

Так как в рассматриваемом приближении кинки ДНК являются статистически независимыми, то можно записать функцию распределении Гиббса отдельного кинка ДНК:

$$\rho_{1}(p_{k},q) = \frac{e^{-\left(\frac{p_{k}^{2}}{2m_{k}k_{B}T}\right)}}{L\sqrt{2\pi m_{k}k_{B}T}}.$$
(18)

После замены переменных  $p_k = m_k v_k$  в формуле (18), получаем функцию распределения кинков ДНК по скоростям (распределение Максвелла):

$$\rho_1(\upsilon_k) = \frac{1}{L} \sqrt{\frac{m_k}{2\pi k_B T}} e^{-\left(\frac{m_k \upsilon_k^2}{2k_B T}\right)}.$$
(19)

С помощью рассчитанных выше динамических характеристик кинков ДНК (см. табл. 2) мы построили распределения кинков по скоростям для случая плазмиды pBR322 и для четырех однородных последовательностей: poly(A), poly(T), poly(G) и poly(C) (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что функция распределения имеет форму колокола, самое большое значение высоты колокола наблюдается для кинков, активированных в последовательности poly(G), а минимальное – в последовательности poly(T). Видно также, что кривая, отвечающая распределению скоростей кинков в плазмиде pBR322, расположилась между кривыми, относящимися к кинкам, активированным в poly(A) и в poly(C). Такое расположение кривых функций распределения согласуется с соотношениями между значениями энергий покоя кинков, активированных в пяти рассматриваемых последовательностях (см. табл. 2).

Свободная энергия. Согласно законам классической статистической физики [25] свободная энергия ансамбля кинков в рассматриваемом приближении будет иметь следующий вид:

$$F_{\rm k} = -k_{\rm B}T \ln Z_{\rm k} =$$
$$= N \left[ E_{0\rm k} - k_{\rm B}T \ln \left( \frac{L}{2\pi\hbar} \frac{e}{N} \sqrt{2\pi m_{\rm k} k_{\rm B} T} \right) \right].$$
(20)

Графики температурной зависимости свободной энергии ансамбля кинков, активированных в



**Рис. 2.** Свободная энергия ансамбля из *N* кинков ДНК. Заштрихованной полосой показан температурный интервал (280...320 К), характерный для большинства живых систем. Расчеты сделаны для пяти видов последовательностей ДНК.

различных последовательностях ДНК, а также в последовательности плазмиды pBR322, представлены на рис. 2. При проведении расчетов мы использовали модельные значения: L = 1000 пар оснований и N = 10.

Из рис. 2 видно, что для всех рассматриваемых последовательностей при повышении температуры T свободная энергия ансамбля кинков ДНК уменьшается, причем при любом фиксированном значении температуры самые высокие значения свободной энергии наблюдаются в случае poly(G), а самые низкие — в случае poly(T). Также видно, что кривая, отвечающая свободной энергии ансамбля кинков в плазмиде pBR322, располагается между кривыми, относящимися к ансамблям кинков, активированных в poly(A) и в poly(C), а общее расположение кривых согласуется с соотношениями между значениями энергий покоя кинков в этих пяти последовательностях (см. табл. 2).

Средняя энергия. Средняя энергия ансамбля из *N* кинков ДНК определяется следующей формулой [25]:

$$\varepsilon_{\rm k} = (k_{\rm B}T)^2 \frac{\partial \ln Z_{\rm k}}{\partial (k_{\rm B}T)} = N \left( E_{0\rm k} + \frac{k_{\rm B}T}{2} \right). \tag{21}$$

Мы построили графики температурной зависимости средней энергии ансамбля из *N* одинаковых кинков, активированных в различных последовательностях ДНК, а также в последовательности плазмиды pBR322 (см. рис. 3).

В отличие от предыдущего случая средняя энергия ансамбля растет с ростом температуры. Однако, как видно из рис. 3, в заданном интервале значений температуры это повышение проис-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020



Рис. 3. Средняя энергия ансамбля из N кинков ДНК. Заштрихованной полосой показан температурный интервал (280...320 K), характерный для большинства живых систем. Расчеты сделаны для пяти видов последовательностей ДНК.

ходит очень медленно и практически не заметно. Что касается взаимного расположения кривых, то оно такое же, как и предыдущем случае.

**Теплоемкость и энтропия.** В рассматриваемом приближении теплоемкость ансамбля из N кинков ДНК равна константе:

$$C_{\nu,k} = \frac{\partial \varepsilon_k}{\partial T} = \frac{N k_{\rm B}}{2}.$$
 (22)

Для случая с N = 10 теплоемкость ансамбля кинков равна  $C_{v,k} = 0.69 \times 10^{-22}$  Дж/К. Очевидно, что это значение не зависит также и от вида последовательности.

Энтропия ансамбля кинков будет определяться формулой [27]:

$$S_{\rm k} = \frac{\varepsilon_{\rm k} - F_{\rm k}}{k_{\rm B}T} = N \left[ \frac{1}{2} + \ln \left( \frac{L}{2\pi\hbar} \frac{e}{N} \sqrt{2\pi m_{\rm k} k_{\rm B}T} \right) \right].$$
(23)

Графики температурной зависимости энтропии ансамбля из N одинаковых кинков, активированных в различных последовательностях ДНК, а также в последовательности плазмиды pBR322, представлены на рис. 4.

Из рис. 4 видно, что в отличие от двух предыдущих графиков, энтропия заметно растет с ростом температуры для всех пяти последовательностей. Однако взаимное расположение кривых остается таким же, как и предыдущих случаях.

## ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В данной работе были исследованы статистические свойства ансамбля кинков ДНК, получены графики температурной зависимости свобод-



**Рис. 4.** Энтропия ансамбля из *N* кинков ДНК. Заштрихованной полосой показан температурный интервал (280...320 К), характерный для большинства живых систем. Расчеты сделаны для пяти видов последовательностей ДНК.

ной энергии, средней энергии и энтропии, а также функция распределения кинков ДНК по скоростям. Эти характеристики были рассчитаны для случая фиксированного числа одинаковых кинков и при условии пренебрежимо малого взаимодействия между ними. В расчетах были использованы новые данные о динамических параметрах кинков ДНК.

Расчеты были проведены для четырех однородных последовательностей: poly(A), poly(T), poly(G) и poly(C), а также для последовательности плазмиды pBR322. Показано, что с ростом температуры свободная энергия ансамбля кинков уменьшается, а средняя энергия и энтропия увеличиваются, причем на одном и том же заданном интервале температур увеличение энтропии происходит довольно заметно, а увеличение средней энергии происходит очень медленно (практически незаметно). При любой фиксированной температуре Т самые высокие значения этих трех статистических характеристик наблюдались в случае poly(G), а самые низкие — в случае poly(T). Кривые, относящиеся к плазмиде, располагались между кривыми, рассчитанными для poly(A) и poly(C). Расчеты показали, что в рассматриваемом приближении теплоемкость ансамбля кинков не зависит ни от температуры, ни от вида последовательности, а функция распределения кинков по скоростям имеет форму колокола, высота которого достигает максимума при  $v_{\rm k} = 0$ . Самое большое значение высоты наблюдалось в случае последовательности poly(G), а самое низкое — в случае poly(T), причем кривая, относящаяся к плазмиде, всегда располагалась между кривыми, рассчитанными для poly(A) и poly(C). Такое расположение кривых на всех графиках согласуется с соотношениями между значениями

энергий покоя кинков, активированными в рассматриваемых последовательностях. Это говорит об определяющей роли значений энергий покоя в определении взаимного расположения кривых статистических характеристик ансамблей кинков, активированных в различных последовательностях.

Следует отметить, однако, что все эти результаты получены в рамках упрощенной модели ДНК, которая ограничена рассмотрением только одного вида внутренних движений ДНК – угловых колебаний азотистых оснований. Другие виды внутренних движений, такие, например, как продольные и поперечные смещения оснований, а также движения сахаров и фосфатов, не учитывались. Еще одно ограничение нашего подхода связано с использованием квазиоднородного приближения. В этом приближении учитывается состав полинуклеотидных цепочек, но не учитывается расположение азотистых оснований в последовательности ДНК. Тем не менее можно предположить, что изложенные выше методы и подходы имеют более общее значение и могут быть успешно использованы для исследования статистических и динамических свойств молекул в рамках более сложных и более реалистичных моделей ДНК.

#### 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

- Л. В. Якушевич, Методы теоретической физики в исследованиях свойств биополимеров (ОНТИ НЦБИ АН СССР, Пущино, 1990).
- M. Peyrard, Nonlinearity 17 (2), 1 (2004). DOI: 10.1088/0951-7715/17/2/R01
- 3. *Nonlinear Excitations in Biomolecules*, Ed. by M. Peyrard (Springer, Berlin, 1995).
- 4. A. Scott, *Encyclopedia of Nonlinear Science* (Frances and Taylor, New York, 2005).
- M. Peyrard and A. R. Bishop, Phys. Rev. Lett. 62 (23), 2755 (1989).
- T. Dauxois, M. Peyrard and A. R. Bishop, Phys. Rev. E 47 (1), 684 (1993). DOI: 10.1103/PhysRevE.47.684
- S. W. Englander, N. R. Kallenbach, A. J. Heeger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (12), 7222 (1980).
- A. A. Grinevich, A. A. Ryasik, and L. V. Yakushevich, Chaos, Solitons & Fractals 75, 62 (2015). DOI: 10.1016/j.chaos.2015.02.009
- L. V. Yakushevich, J. Biol. Phys. 24 (2–4), 131 (1999). DOI: 10.1023/A:1005143428994
- G. A. Wildes, M. Marty-Roda, S. Cuesta-López, et al., J. Phys. Chem. B 122 (9), 2504 (2018). DOI: 10.1021/acs.jpcb.7b11608
- А. С Шигаев, О. А. Пономарёв и В. Д. Лахно, Мат. биология и биоинформатика 8 (2), 553 (2013). DOI: 10.17537/2018.13.t162
- Л. В. Якушевич, Нелинейная физика ДНК (РХД, Москва-Ижевск, 2007).
- Л. В. Якушевич, Л. А. Краснобаева, А. В. Шаповалов и Н. Р. Кинтеро, Биофизика 50 (3), 450 (2005).

- Л. В. Якушевич и Л. А. Краснобаева, Биофизика 61
   (2), 236 (2016). DOI: 10.1134/S0006350908010041
- M. Cadoni, R. De Leo, S. Demelio, and G. Gaeta, J. Nonlinear Math. Phys. **17** (4), 557 (2010). DOI: 10.1142/S1402925110001069
- S. Vedad and A. Heidari, Progr. Appl. Math. 4 (2), 1 (2012). DOI: 10.3968/j.pam.19252502820120402.1520
- S. Zdravković, M. V. Satarić, and M. Daniel, Int. J. Modern Phys. B 27 (31), 1350184 (2013). DOI: 10.1142/S0217979213501841
- A. Di Garbo, Biophys. Chem. 208 (1), 76 (2016). DOI: 10.1016/j.bpc.2015.09.006
- L. Liu and Ch. Li, Adv. Math. Phys. 2018, 1–7 (2018). DOI: 10.1155/2018/4676281
- L. V. Yakushevich and L. A. Krasnobaeva, Math. Biol. Bioinform. 12 (1), 1 (2017). DOI: 10.17537/2017.12.1
- Л. А. Краснобаева и Л. В. Якушевич, Биофизика 63 (1) 41 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918010190
- 22. F. Bolivar, R. L. Rodriguez, P. J. Greene, et al., Gene 2 (2), 95 (1977).
- 23. Г. Ф. Караваев, Основные принципы статистической физики (ТГУ, Томск, 1993).
- 24. И. А. Квасников, Термодинамика и статистическая физика (Эдиториал УРСС, М., 2010).
- 25. И. П. Базаров, *Термодинамика* (Высш. шк., М., 1991).
- А. В. Леванов и Э. Е. Антипенко, Определение термодинамических свойств статистическими методами. Классический идеальный газ (МГУ, М., 2006).
- 27. А. Зоммерфельд, *Термодинамика и статистическая физика* (М., 1955).

# Dynamic and Statistical Properties of DNA Kinks

L.A. Krasnobaeva\*, \*\* and L.V. Yakushevich\*\*\*

\*Siberian State Medical University, Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

\*\*Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

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

Conformational mobility is one of the most important properties of the DNA molecule. A striking example of this mobility is the formation of regions of the locally unwound double helix. This motion is called the formation of open states of DNA having an important role in the processes of transcription, replication, and denaturation. In the "nonrelativistic" approximation, the open states of DNA are often modeled as quasiparticles – kinks with a certain mass  $(m_k)$ , velocity  $(u_k)$  and rest energy  $(E_{0k})$ . If there is more than one open state in the DNA molecule, the question may be raised as to the statistics of an ensemble of the *N* number of DNA kinks Statistical properties of the ensemble still remain poorly studied. In this paper, we investigate these properties based on recent data on the dynamic characteristics of the DNA kinks. It has been assumed that the *N* number of kinks is fixed, the interaction between the kinks is small and all kinks are identical. We have calculated the statistical sum  $(Z_k)$ , the free energy  $(F_k)$ , the velocity distribution function  $(\rho_1(v_k))$ , the average energy  $(\varepsilon_k)$ , the heat capacity  $(C_{v,k})$ , the entropy  $(S_k)$  of ensemble of the *N* number of DNA kinks, as well as obtained and compared the curves for temperature dependence relative to these characteristics for the four homogeneous sequences: poly(A), poly(T), poly(G), poly(C), and for the sequence of plasmid pBR322.

Keywords: DNA kinks, statistics of an ensemble of kinks, statistical sum, free energy, entropy, plasmid pBR322

УДК 577.3

# ПРОЯВЛЕНИЕ ГИСТЕРЕЗИСА В ТЕПЛОВЫХ СВОЙСТВАХ НАНОСИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ПЕРЕОХЛАЖДЕННЫХ КЛАСТЕРОВ ВОДЫ ВО ВЛАЖНЫХ G-СЕФАДЕКСАХ

© 2020 г. Н.А. Грунина\*, Т.В. Белопольская\*\*, Г.И. Церетели\*\*, О.И. Смирнова\*\*

\*Санкт-Петербургский государственный университет гражданской авиации, 196210, Санкт-Петербург, ул. Пилотов, 38 \*\*Санкт-Петербургский государственный университет, 198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Ульяновская ул., 1 E-mail: nagrunina@mail.ru Поступила в редакцию 07.06.2019 г. После доработки 26.11.2019 г. Принята к публикации 27.11.2019 г.

Продолжен цикл исследований тепловых свойств водных кластеров в системах «полисахарид-вода» (крахмал, сефадекс G-100) с низким содержанием вымораживаемой воды на примере еще одного модифицированного полисахарида – сефадекса G-25. Данный сефадекс обладает более жесткой пространственной структурой, по сравнению с сефадексом G-100. Главной особенностью данных, полученных для сефадекса G-25 методом дифференциальной сканирующей калориметрии, является дублетная структура кривой плавления кластеров воды, что свидетельствует о бимодальном характере их распределения по размерам. Наблюдаемое уменьшение температур и теплот плавления и кристаллизации водных кластеров с понижением влажности сефадекса G-25, как и в случае других полисахаридов, является типичным проявлением размерного эффекта для наносистем. При этом между температурами  $\Delta T = T_{\text{пл}} - T_{\text{кр}}$ , и теплотами  $\Delta Q = Q_{\text{пл}} - Q_{\text{кр}}$ , этих переходов существует гистерезис, что также характерно для низкоразмерных систем. Установлено, что в системе кластеров закристаллизованной переохлажденной воды в сефадексе G-25 с низкой влажностью при нагревании могут происходить процессы их трансформации (докристаллизация, реорганизация, изменение размеров) как ниже интервала плавления, так и внутри него, что свидетельствует о неравновесности исходного набора нанокластеров. Показано, что уменьшение Vнагр, а также отжиг внутри интервала плавления приводят к перераспределению кластеров по размерам и, согласно установленному размерному эффекту, к увеличению теплоты плавления. Вместе эти факты указывают на то, что неравновесность первоначально образованных при охлаждении кластеров и как следствие их способность к трансформации при повышении температуры безусловно играют важную, если не определяющую, роль в проявлении гистерезиса в тепловых свойствах нанокластеров воды.

Ключевые слова: калориметрия, нанокластеры воды, сефадексы, кристаллизация, плавление, трансформация, размерный эффект, гистерезис. **DOI:** 10.31857/S0006302920010056

Исследование различных физико-химических свойств низкоразмерных кластеров (наночастиц) в настоящее время является одной из приоритетных областей естественных наук (см., например, обзор [1] и многочисленные ссылки в нем). Существенное увеличение отношения поверхности к объему в случае наночастиц по сравнению с макрообъектами наделяет их целым комплексом специфических свойств, отличающихся от свойств объемного вещества. Помимо чисто научного, огромный практический интерес к изучению наночастиц обусловлен широким успешным использованием их уникальных свойств в технологии изготовления разнообразных быстродействующих электронных устройств, а также при создании принципиально новых материалов.

Первые исследования влияния размерных эффектов на тепловые свойства наночастиц были проведены еще в начале прошлого века [2]. В 1970-80-е годы большое внимание уделялось зависимости температуры плавления неравновесных ламеллярных нанокристаллов синтетических полимеров от их размеров [3–8]. В последние десятилетия исследования связи температуры плав-

Сокращение: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия.
ления, реже - теплоты плавления, с размерами кластеров составляют лишь незначительную часть от общего объема работ, посвященных в основном электронным и оптическим свойствам наночастиц металлов и простых соединений (см., например, работы [9-13]). В настоящее время тепловые свойства наночастиц активно изучаются методами компьютерного моделирования [14-19]. Кроме того, большое внимание уделяется экспериментальным исследованиям наночастиц, внедренных в твердотельные матрицы [20–23] или сформированных на специально выбранной твердой подложке [24-26]. Особое место при этом занимают работы, в которых рассматриваются кластеры (наночастицы), включенные не в твердотельные, а в гибкие подвижные матрицы [27-36]. Однако количество таких исследований невелико.

Предлагаемая работа относится именно к числу последних. В качестве гибкой матрицы здесь рассматриваются биополимеры (различные полисахариды) при температурах выше температур их стеклования, а внедренными в них малоразмерными частицами являются водные кластеры. В работе продолжен цикл проведенных нами ранее исследований методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) тепловых свойств переохлажденной воды, диспергированной во влажных природных и модифицированных полисахаридах [36–39].

К настоящему времени надежно установлено, что в биополимерах различных классов (белки, ДНК, полисахариды), содержащих лишь несколько процентов вымораживаемой воды, тепловые свойства водных кластеров демонстрируют размерный эффект [27–39]. Как и в случае металлических кластеров или наночастиц в твердотельных матрицах (см., например, работы [25, 26, 40, 41]), температура и теплота плавления водных кластеров в биополимерах зависят от размеров, заметно понижаясь с их уменьшением.

Более того, при ДСК-исследовании тепловых свойств водных кластеров двух систем «полисахарид-вода» (крахмалы и сефадекс G-100) [36-39] путем последовательной регистрации на одном и том же образце процессов плавления и кристаллизации вымораживаемой воды нами было установлено различие как между температурами, так и между теплотами этих переходов, т.е. существование, как и в других наносистемах [42–45], гистерезиса между этими процессами. Отметим, что хотя этот эффект многократно наблюдался для низкоразмерных частиц металлов и простых соединений, общепринятых представлений о причинах возникновения гистерезиса в тепловых свойствах нанокластеров до сих пор не существует, в литературе появляются лишь отдельные предположения. Различие между термическими параметрами кристаллизации и плавления наночастиц, отсутствующее в макроскопическом веществе, предсказывается, в частности, теоретическими исследованиями [14, 15]. В качестве основной причины появления гистерезиса при этом рассматривается сосуществование жидкой и твердой фаз в температурной области перехода [42–44]. В ряде работ в качестве причины наблюдаемого гистерезиса выдвигается существующее распределение кластеров по размерам. Именно эта причина возникновения гистерезиса, экспериментально наблюдаемого в зависимостях различных свойств металлических и органических нанокластеров от температуры при плавленииотвердевании, предложена в работах [45, 46].

Информация, изложенная выше, относится к наночастицам, состоящим из низкомолекулярных веществ и погруженным в среду, отличающуюся от них по химическому составу. Другая ситуация возникает в случае включения низкоразмерных кластеров в матрицы того же химического состава. Это относится к многочисленным исследованиям тепловых свойств частично-кристаллических синтетических полимеров, в которых кристаллиты погружены в аморфную среду этого же полимера. В работах [3-8] было установлено, что в интервале плавления исходных кристаллитов наномерного масштаба происходит их реорганизация. Тот факт, что кристаллиты находятся в среде, абсолютно идентичной им по химическому составу, позволил для оценки их размеров использовать известную формулу Гиббса-Томсона [35]. В наиболее ярких случаях реорганизация проявляется в виде четко выраженных дублетных кривых плавления, причем соотношение компонент такого дублета зависит от условий нагревания [3-8]. При этом во всех обсуждаемых работах реорганизация рассматривается как следствие неравновесности исходных кристаллитов, образовавшихся при значительном переохлаждении относительно температуры плавления.

Исследуемые нами влажные полисахариды можно рассматривать как промежуточные между этими двумя типами матриц. В системах полисахарид-вода водные кластеры находятся в полимерной матрице, стенки пор которой покрыты невымораживаемой водой, т. е. кластеры воды погружены во влажную среду.

В наших работах [37–39], где был экспериментально установлен гистерезис между процессами плавления и кристаллизации водных нанокластеров в полисахаридах, было показано, что в ходе нагревания в закристаллизованной переохлажденной воде в температурной области, предшествующей плавлению, также могут происходить процессы трансформации (реорганизации) исходных кластеров, образовавшихся при охлаждении. В крахмалах [37, 38] предположение об их возможной трансформации было выдвинуто на основании анализа и сопоставления абсолютных значений теплоемкости биополимера в нативном и аморфном состояниях. Позже при исследова-

нии тепловых свойств модифицированного полисахарида сефадекса G-100 [39] было показано, что наблюдаемое на термограммах нагревания выделение тепла докристаллизации водных кластеров в виде четко выраженного минимума в области до начала интервала плавления также является непосредственным проявлением их трансформации.

В настоящей работе исследование процессов кристаллизации переохлажденных водных нанокластеров и их последующего плавления при вариации термических режимов ДСК-измерений и влажности образца продолжено на примере еще одного сефадекса - G-25 - с другой, более жесткой по сравнению с G-100, пространственной структурой полисахаридных цепей. При этом мы надеялись получить дополнительную информацию о процессах трансформации при нагревании первоначально закристаллизованных во время охлаждения водных кластеров и, обобщив с полученными ранее сведениями, предложить возможное объяснение причин появления гистерезиса между термическими параметрами их плавления и кристаллизации. Как и в случае нанокристаллитов полимеров, одной из причин гистерезиса, на наш взгляд, может быть неравновесность нанокластеров воды, формирующихся в системах «полисахарид-вода» с низким содержанием вымораживаемой воды.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерения выполнены с помощью дифференциального сканирующего калориметра DSC-111 (SETARAM Instrumentation, Франция), чувствительность которого составляет 3 · 10<sup>-5</sup> Дж/с. Для исследования процессов кристаллизации и плавления водных кластеров в сефадексах с фиксированной влажностью были проведены многократные циклические измерения в режиме охлаждения/нагревания в области температур от 25 до  $-60^{\circ}C$ . Шкала температур калориметра в обоих режимах сканирования прокалибрована по температурам реперных веществ – индия, воды и ртути. Скорость нагревания и охлаждения образцов в большинстве опытов была одинаковой и равнялась 5 град/мин. В отдельных экспериментах использовались  $V_{\text{нагр}} = 1$  и 2 град/мин. Введение температурных поправок, зависящих от  $V_{\rm Harp}$  и массы образца, в температурной области вне фазовых переходов было проведено в соответствии с разработанной фирмой-производителем процедурой обработки данных. Процедура введения поправок к значениям температур максимумов фазовых переходов, экспериментально получаемых в режиме нагревания, подробно описана в предыдущих работах [36, 37]. С учетом поправок ошибка в определении температур исследуемых переходов составила  $\pm 1^{\circ}$ С (для  $V_{\text{нагр}} = 5$  град/мин).

Ощибка в определении теплоты плавления для  $V_{\rm harp} = 5$  град/мин составляла  $\pm 5\%$ , теплоты кристаллизации –  $\pm 10\%$ .

Отметим, что ошибка при определении абсолютных значений теплоемкости, С<sub>р,</sub> различается для режимов нагревания и охлаждения и зависит от области температур. В режиме нагревания при температурах выше  $0^{\circ}$ С она составляла  $\pm 5\%$ , в области ниже 0°C – ±7,5%. В режиме охлаждения ошибка в значении  $C_p$  составила ±10%. При понииспользуемых скоростей жении нагревания/охлаждения ошибки при определении С<sub>р</sub> значительно возрастают. В связи с этим представленные в работе кривые зависимости теплоемкости от температуры для  $V_{\text{нагр}} = 1$  и 2 град/мин получены в результате усреднения трех термограмм, зарегистрированных непосредственно друг за другом. Такая процедура вполне правомерна, поскольку ошибка при воспроизведении экспериментальных результатов с помощью DSC-111 на одном образце с фиксированной влажностью в несколько раз меньше стандартной ошибки для разных образцов той же влажности. Добавим, что воспроизводимость приведенных результатов, полученных в разное время (иногда с интервалом один-два года) также очень высока.

В качестве исследуемого был выбран сефадекс марки G-25 фирмы «Pharmacia Fine Chemicals, Швеция». Полученные в работе данные о тепловых свойствах вымораживаемой воды в G-25 сопоставлены с аналогичными результатами для G-100 [39]. Как известно, в сефадексах отдельные цепи полисахаридов сшиты поперечными глицериновыми мостиками. G-25 отличается от G-100 большей степенью их связанности [47]. Разная степень сшивания, приводя к изменению пространственной структуры сефадексов, определяет также их различную способность к набуханию в водной среде. Известно, что водный гель на основе сефадексов используется в биохимии в качестве молекулярных сит для разделения биополимеров по молекулярным массам [48]. Объем полного набухания сефадекса по отношению к сухому веществу тем больше, чем меньше в нем сшивок. При этом каждая глобула сефадекса представляет собой полимерную матрицу, в которую внедрены кластеры воды, размер которых увеличивается с ростом влажности системы. Важно, что эта система полностью проницаема для молекул воды.

Для исследования тепловых свойств низкоразмерных водных кластеров в работе использованы только начальные степени набухания,  $C_{\rm H2O} \leq 55\%$ . Общее содержание воды, включая вымораживаемую и невымораживаемую воду, в исследуемом G-25 варьировало от 10 до 55%. Необходимую концентрацию воды в образцах в различных экспериментах задавали как с помощью

их выдерживания во влажной воздушной среде (до  $\approx 40\%$ ), так и путем высушивания набухшего водного геля при T<sub>комн</sub>. Предварительно с помощью вакуумирования контрольных образцов при  $T = 105^{\circ}$ С до достижения постоянной массы была определена исходная влажность препарата, которая для G-25 составила 9,6%. При приготовлении образцов сефадекса с разной степенью гидратации масса исходных сухих образцов во всех случаях была практически одинаковой (~ 30 мг), что позволяло считать, что в процессе увлажнения количество исходных примесей в сефадексе, от которых сложно избавиться, оставалось неизменным. Для установления равномерной влажности образцы, помещенные в стальные герметичные ампулы, выдерживали в течение суток при комнатной температуре.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе получены зависимости от влажности температур и теплот процессов плавления и кристаллизации включенных в структуру сефадекса G-25 водных кластеров разного размера, а также связь между их относительными изменениями. Все закономерности установлены на основе анализа полученных ДСК-термограмм охлаждения/нагревания образцов с различной влажностью (10-55% воды) в широкой области температур (от -60 до +25°С). При этом помимо непосредственно плавления и кристаллизации водных кластеров особое внимание было уделено процессам, происходящим при нагревании в температурной области до начала плавления. В работе также были проведены опыты, демонстрирующие влияние на изучаемые переходы скорости сканирования по температуре, а также остановки в ходе ДСК измерения. Полученные для водных кластеров в G-25 новые данные сопоставлены с аналогичными результатами для G-100 при близких влажностях и условиях измерения.

Принято считать, что наблюдаемая кривая плавления вымораживаемой воды отражает распределение водных кластеров по размерам [35-39]. Однако поскольку в предыдущих исследованиях крахмалов и сефадекса G-100 [38, 39] было обнаружено, что до начала плавления при нагревании может происходить реорганизация исходных кластеров воды, возникает вопрос, какое именно распределение фиксируется при тепловом разрушении в интервале перехода – сформированное первоначально в процессе кристаллизации при охлаждении или образовавшееся в области температур, предшествующей плавлению, при нагревании. Полученные в работе данные позволяют, на наш взгляд, внести ясность в этот вопрос. Ответ на него также связан с пониманием происхождения гистерезиса между процессами плавления и кристаллизации водных нанокластеров.

Дублетная кривая плавления водных кластеров. Основная особенность полученных для сефадекса G-25 калориметрических данных заключается в том, что наблюдаемые кривые плавления вымораживаемой воды практически при всех рассмотренных влажностях являются бимодальными (рис. 1), в отличие от соответствующих одномодальных кривых в G-100. В то же время процесс кристаллизации вымораживаемой воды при охлаждении для этих же влажностей и в G-25, и в G-100 проявляется в виде одномодальных кривых (рис. 1).

Было получено, что два максимума кривой плавления отчетливо различаются при концентрации воды в образце в интервале 38–53%. При этом интенсивность первого, низкотемпературного пика по величине значительно меньше высокотемпературного максимума во всем диапазоне влажностей.

Начало кривой плавления вымораживаемой воды характеризует минимальный размер кластеров, формирующихся в рассматриваемых системах. В то же время температура максимума кривой соответствует плавлению кластеров наиболее вероятного размера. Согласно полученным данным, в случае G-25 в системе формируются два набора кластеров с разными наиболее вероятными размерами. Для оценки этих размеров можно, как уже упоминалось, использовать формулу Гиббса-Томсона, поскольку водные кластеры находятся во влажной матрице полимера, т. е. наблюдается их абсолютное смачивание и  $\cos \Theta = 1$ [35]. Проведенная нами оценка размеров водных кластеров в G-25 по температуре их плавления показала, что в зависимости от влажности сефадекса в исследуемом диапазоне речь идет о плавлении наборов кластеров с двумя наиболее вероятными размерами – ~2 нм и ~5–15 нм.

Полученные дублетные кривые плавления вымораживаемой воды в сефадексе G-25 указывают на появление дополнительного по отношению к G-100 количества водных кластеров малого размера. Их появление можно связать с большим числом поперечных сшивок между полисахаридными цепями и соответственно уменьшением размеров молекулярных сит в G-25 по сравнению с G-100. Получено, что с увеличением влажности G-25 до ~55% и температура, и теплота плавления имеющихся двух наборов кластеров изменяются по-разному. В то время как термические параметры плавления кластеров воды меньших размеров (первый максимум) при увеличении влажности сефадекса остаются практически, в пределах ошибки, неизменными, теплота и температура второго максимума меняются значительно.

Далее обсудим более детально полученные зависимости основных параметров плавления и кристаллизации водных нанокластеров от влажности сефадекса G-25.



**Рис. 1.** Термограммы охлаждения и нагревания в области кристаллизации (1', 2', 3') и плавления (1, 2, 3) вымораживаемой воды в сефадексе G-25 различной влажности: 1 - 38,3% (сплошная линия), 2 - 44,5% (пунктирная линия), 3 - 53,0% (точечная линия);  $V_{\text{нагр}} = V_{\text{охл}} = 5$  град/мин.

Температуры плавления и кристаллизации водных нанокластеров. На рис. 2 приведены значения температур плавления и кристаллизации водных кластеров, а также температур стеклования собственно полимерной матрицы при разном содержании воды в G-25 в интервале 25–55%. При этом важно отметить, что в интервале влажностей образцов, в котором наблюдается дублетная структура кривой плавления, на графике нанесены значения  $T_{пл}$  только основного высокотемпературного максимума. На этом же рисунке для сопоставления также помещены полученные ранее аналогичные результаты для G-100.

Из полученных данных (рис. 2, кривая *1*) следует, что  $T_{\Pi\Pi}$  водных кластеров уменьшается с понижением влажности G-25, что является типичным проявлением размерного эффекта для наносистем. При этом  $T_{KP}$ , которая при всех исследованных влажностях меньше  $T_{\Pi\Pi}$ , понижается еще быстрее (рис. 2, кривая 2), т.е. разрыв между значениями температур плавления и кристаллизации - гистерезис - растет с уменьшением размера кластера. Это явление также считается важнейшим свойством низкоразмерных систем. Обращает на себя внимание тот факт, что при влажностях сефадекса ниже 35% кристаллизация вымораживаемой воды при охлаждении вплоть до -60°С не наблюдается, что обусловлено близостью к области стеклования полимера. В то же время при последующем нагревании кривые плавления вымораживаемой воды на термограммах присутствуют. Полученная зависимость температуры стеклования  $T_{\rm ct}$  от влажности G-25 (рис. 2, кривая 3) показывает, насколько близки при этих концентрациях воды области стеклования полимера и возможной кристаллизации вымораживаемой воды. Это означает, что процесс кристаллизации водных кластеров в этой области



**Рис. 2.** Зависимости температур плавления (1) и кристаллизации (2) водных кластеров, а также температуры стеклования полимера (3) от влажности сефадексов G-25 (сплошные символы) и G-100 (незакрашенные символы) [39].

температур ограничен молекулярной подвижностью собственно полимерной матрицы.

Видно, что полученные для G-25 зависимости  $T_{\Pi\Pi}$ ,  $T_{Kp}$ , а также  $T_{CT}$  кластеров воды от влажности полимера практически совпадают с соответствующими результатами для ранее исследованного сефадекса G-100 [39].

**Теплоты кристаллизации и плавления кластеров воды.** Рис. 3 и 4 демонстрируют полученные зависимости теплот плавления  $Q_{\Pi\Pi}$  и кристаллизации  $Q_{\kappa p}$  вымораживаемой воды в G-25 от влажности. Приведенные на этих рисунках значения теплот отражают результаты обработки одних и тех же данных, но с помощью различной нормировки. На рис. 3 теплоты исследуемых процессов нормированы непосредственно на массу вымораживаемой воды, что позволяет получить собственно значения  $Q_{\Pi\Pi}$  и  $Q_{\kappa p}$  нанокластеров воды при разных влажностях сефадекса. Для этого предварительно была определена пограничная концентрация между вымораживаемой и невымораживае

мой водой в G-25, ниже которой на термограммах нагревания исчезает относящийся к плавлению вымораживаемой воды эндотермический максимум. Эта концентрация составила 25%. Определение границы между вымораживаемой и невымораживаемой водой было выполнено на используемой в основном в работе скорости нагревания 5 град/мин. На рис. 4 данные по теплотам исследуемых переходов представлены как результат нормировки на массу всего образца для удобства сопоставления с ранее полученными аналогичными результатами для G-100 и крахмалов [37, 39].

Отметим также, что в обоих способах обработки для расчетов  $Q_{\Pi\Pi}$  водных кластеров в случае бимодальной кривой плавления были использованы суммарные теплоты соответствующих двух максимумов.

Как видно из представленных на рис. 3 данных,  $Q_{\Pi\Pi}$  и  $Q_{KP}$  водных кластеров в G-25 с влажностью ниже 55% по величине существенно мень-



**Рис. 3.** Зависимости теплот плавления (*1*) и кристаллизации (*2*) водных кластеров в сефадексе G-25 от его влажности. Приведенные значения теплот нормированы на массу вымораживаемой воды;  $V_{\text{нагр}} = V_{\text{охл}} = 5$  град/мин.

ше, чем у объемной воды. При этом теплоты обоих переходов уменьшаются с понижением содержания воды в сефадексе (рис. 3 и 4). Наблюдаемое уменьшение  $Q_{\Pi\Pi}$  кластеров воды, как и их *T*<sub>пл</sub>, связано с типичным проявлением размерного эффекта, характерного для наносистем [25, 26, 36, 39-41]. При этом в случае нормировки на массу вымораживаемой воды (рис. 3) этот эффект очевиден, в то время как при нормировке данных на полную массу образца (рис. 4) о существовании размерного эффекта в  $Q_{\Pi\Pi}$  собственно кластеров воды можно судить лишь, если мысленно представить имеющуюся нелинейную зависимость  $Q_{\Pi\Pi}(C_{\text{H2O}})$  в виде двух, в первом приближении, прямых с разными углами наклона, эстраполированными к 100% воды (например, как в работе [49]).

Что касается уменьшения  $Q_{\rm kp}$  с понижением концентрации воды, то оно отчетливо проявляется при любом способе нормировки (рис. 3 и 4). При этом следует учесть, что в G-25 до



**Рис. 4.** Зависимости теплот плавления (1) и кристаллизации (2) водных кластеров в сефадексе G-25 от общего содержания воды в образце. Приведенные значения теплот нормированы на массу образца. На врезке: аналогичные зависимости для сефадекса G-100 [39].

 $C_{\rm H2O} \sim 35\%$  в условиях проведенного эксперимента процесс кристаллизации вымораживаемой воды вообще не был зарегистрирован ( $Q_{\rm kp} = 0$ ). Таким образом  $Q_{\rm kp}$ , как и  $Q_{\rm пл}$ , тем меньше, чем меньше влажность G-25, а следовательно, и размер формирующихся в системе кластеров воды.

Подчеркнем, что сведения о зависимости теплоты кристаллизации от размера наночастиц в литературе практически отсутствуют. Тем более это относится к прямому, проведенному в одном эксперименте измерению теплот плавления и кристаллизации нанокластеров. Тот факт, что в данной работе и в работах [37–39] с помощью метода ДСК эти данные были получены, в значительной мере объясняется выбором объекта исследования, а именно нанокластеров воды, процессы плавления и кристаллизации которых происходят в удобном, доступном для экспериментаторов диапазоне температур.

Сравнение полученных зависимостей теплот плавления  $Q_{\Pi\Pi}$  и кристаллизации  $Q_{\kappa p}$  водных кластеров в G-25 и G-100 [39] от влажности, в дополнение к  $T_{\Pi\Pi}$  и  $T_{\kappa p}$ , свидетельствует о том, что на относительно низких степенях набухания тепловые свойства кластеров воды в обоих сефадексах мало отличаются, несмотря на различие пространственных структур составляющих их глобул, каждую из которых можно рассматривать как одну гигантскую макромолекулу.

Классическое проявление гистерезиса. Приведенные на рис. 3 и 4 данные свидетельствуют также о том, что  $Q_{\rm kp}$  вымораживаемой воды понижается быстрее, чем  $Q_{\rm ПЛ}$ , и разница между значениями теплот плавления и кристаллизации гистерезис — растет с уменьшением размера кластера.

Итак, выше показано, что для обоих сефадексов, как и для других полисахаридов (крахмалов) [37, 38], существует гистерезис как между температурами плавления и кристаллизации нанокластеров воды,  $\Delta T = T_{\Pi\Pi} - T_{Kp}$ , так и между теплота-ми этих переходов,  $\Delta Q = Q_{\Pi\Pi} - Q_{Kp}$ . При этом в исследованном интервале влажностей  $T_{\Pi\Pi} > T_{Kp}$ , а  $Q_{\rm пл} > Q_{\rm кр}$ . Наиболее ярко гистерезис между параметрами исследуемых процессов проявляется при влажности сефадекса в диапазоне 35-40%. При влажности ~55%, согласно полученным данным, наблюдаемый гистерезис  $\Delta T = T_{\Pi\Pi} - T_{KP}$  существенно уменьшается (рис. 2), а  $\Delta Q = Q_{\Pi \Pi} - Q_{KP}$ становится практически незаметным (см. рис. 3 и 4). При дальнейшем увеличении влажности сефадекса > 55% параметры плавления и кристаллизации вымораживаемой воды стремятся к соответствующим значениям для объемной воды. Сравнение данных, касающихся проявления гистерезиса в тепловых свойствах водных нанокла-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

стеров в G-25 и G-100 [39], показывает также их близость друг к другу.

Процессы трансформации водных нанокластеров в полисахаридах. В тепловом поведении двух сравниваемых систем было, однако, обнаружено и различие. Наряду с полученной для G-25 дублетной структурой кривых плавления вымораживаемой воды оно проявляется в характере дополнительной кристаллизации переохлажденных кластеров воды в процессе нагревания. Как было показано ранее, докристаллизация при нагревании первоначально закристаллизованных кластеров в G-100 фиксируется в виде четкого минимума, причем теплота этого процесса вполне сопоставима с теплотой начальной кристаллизации при охлаждении (для 40%  $Q_{\rm kp} = 4$  кал/г,  $Q_{\rm докрист} \cong$ 4 кал/г,  $Q_{\Pi\Pi} = 12$  кал/г) [39]. Иными словами, было установлено, что к сформировавшимся при охлаждении кластерам льда в процессе последующего нагревания добавляется новая кристаллическая фаза воды.

На термограммах нагревания G-25 также наблюдаются минимумы, отражающие трансформацию первоначально сформировавшихся кристаллитов воды (например, кривая 2 на рис. 1). Однако связанная с этим процессом теплота в G-25 значительно меньше, чем в сефадексе G-100, т. е. в G-25 этот процесс идет менее интенсивно. Для примера, при сопоставимых влажностях значения  $Q_{\rm kp}$ ,  $Q_{\rm докрист}$  и  $Q_{\rm пл}$  в G-25 составляют 4 кал/г, ~1 кал/г, 10 кал/г соответственно (экспериментальные значения нормированы на массу образца). При этом в сефадексе G-25 наблюдается другое, гораздо более яркое проявление трансформации исходных кристаллитов воды, о чем свидетельствуют следующие эксперименты.

Рис. 5 демонстрирует влияние скорости нагревания, с учетом введенных температурных поправок, на изучаемые процессы во влажном сефадексе G-25. Для скорости нагревания 1 град/мин приведены, как отмечалось выше, результаты усреднения трехкратного нагревания образца. Видно, что уменьшение скорости нагревания с 5 до 1 град/мин приводит к существенному изменению формы дублетной кривой плавления кластеров воды в G-25, а именно, к лучшему разрешению максимумов наблюдаемого дублета, к углублению минимума между ними, что, в свою очередь, свидетельствует о выделении тепла внутри интервала плавления. Кроме того, с низкотемпературной стороны у второго максимума появляется плечо. Как итог этих изменений, происходит увеличение площади второго максимума. В результате при уменьшении скорости нагревания общая теплота плавления кластеров воды  $Q_{\pi\pi}$ увеличивается (на ~ 3 кал/г на фоне ~ 12-13 кал/г при  $C_{\text{H2O}} = 43,4\%$ ).



**Рис. 5.** Кривая плавления водных кластеров в сефадексе G-25 на разных скоростях нагревания: 1 - 5 град/мин, 2 - 1 град/мин;  $Ch_2o = 43.4\%$ .

Наблюдаемые процессы можно объяснить следующим образом. В начале интервала плавления вблизи  $-23^{\circ}$ С плавятся кристаллы воды наименьшего размера (рис. 1). Их величина, определенная на основе уравнения Гиббса–Томсона, составляет 1–2 нм. Далее в образовавшемся расплаве водные нанокластеры вновь кристаллизуются, присоединяясь к кластерам большего размера и увеличивая тем самым их количество, что и отражается в появлении плеча у второго максимума бимодальной кривой плавления со стороны низких температур (рис. 5). Поскольку  $Q_{пл}$  водных нанокластеров существенно зависит от их размера (рис. 3), результирующая  $Q_{пл}$  при этом увеличивается.

Таким образом, проведенный эксперимент показал, что обнаруженное увеличение  $Q_{\Pi\Pi}$  при уменьшении  $V_{\text{нагр}}$  может быть объяснено в рамках существующей зависимости  $Q_{\Pi\Pi}$  от размера кластера, т. е. размерного эффекта. Это же объяснение применимо, на наш взгляд, и для понимания происхождения гистерезиса между параметрами плавления и кристаллизации водных кластеров в целом.

Подтверждением такого вывода может дополнительно служить другой проведенный в работе опыт, демонстрирующий влияние на получаемое значение  $Q_{\Pi\Pi}$  нанокластеров воды разных режимов термообработки образцов, в частности, остановки сканирования и отжига в интервале плавления (рис. 6). Кривые 1 и 2 на рис. 6 относятся к стандартному циклу охлаждения-нагревания об-

разца, при котором, подчеркнем, все процессы полностью воспроизводятся при воспроизведении режимов изменения температуры. В результате термостатирования (отжига) закристаллизованного при охлаждении образца при температуре, близкой к минимуму на дублете, в течение 30 мин форма полученной при последующем нагревании от -60°C кривой плавления изменяется (кривая 3). Имевший место ранее первый максимум дублетной кривой исчезает. При этом видно, что на полученной в результате отжига кривой плавления со стороны низких температур появляется плечо, как и в предыдущем опыте с низкой скоростью нагревания, что указывает на увеличение в первоначальном распределении количества укрупненных кластеров воды. Теплота плавления  $Q_{\Pi\Pi}$  водных нанокластеров после такой термообработки также увеличивается (на ~ 4,5 кал/г на фоне ~ 14 кал/г при  $C_{\rm H2O}$  = 44,5%). Таким образом, в результате проведенного отжига сефадекса G-25 исходное распределение кластеров по размерам продолжило существенно меняться. При нагревании мелкие кристаллиты воды исчезли, при отжиге водные кластеры присоединились к более крупным, отчего результирующая  $Q_{\Pi\Pi}$  увеличилась.

Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что система кластеров переохлажденной воды в сефадексе является неравновесной и все время трансформируется при нагревании в области температур ниже 0°С как до интервала плавления, так и внутри него. Все эти процессы вносят вклад в величину гистерезиса между параметрами плавления и кристаллизации. При этом важно подчеркнуть, что обсуждаемая трансформация (реорганизация, изменение размеров) водных кластеров в полисахаридах происходит на наноуровне. В этом случае после завершения первоначального плавления повторные кристаллизация и плавление кристаллитов воды демонстрируют воспроизведение термограмм стандартного цикла ( $V_{\text{harp}} = V_{\text{охл}}$ ) и полное стирание памяти о режиме предыдущего теплового тестирования. Этим реорганизация на наноуровне существенно отличается от исследованной оптическими методами необратимой трансформации кластеров в крахмалосодержащих продуктах, происходящей на микроуровне [50].

#### выводы

В работе продолжен начатый ранее цикл исследований тепловых свойств водных кластеров в системах «полисахарид—вода» (крахмал, сефадекс G-100) с низким содержанием вымораживаемой воды. Выполненное ДСК-исследование на примере еще одного модифицированного полисахарида с другой пространственной структурой – сефадекса G-25 – позволило не только устано-



**Рис. 6.** Влияние отжига на структуру дублетной кривой плавления нанокластеров воды в сефадексе G-25.  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 44.5\%$ ; *I* и *2* – охлаждение и последующее нагревание (стандартный цикл), *3* – нагревание образца после отжига при  $T = -12^{\circ}\text{C}$ , t = 30 мин,  $V_{\text{нагр}} = V_{\text{охл}} = 5$  град/мин.

вить ряд отличительных особенностей процессов кристаллизации и плавления вымораживаемой воды в G-25, но и обобщить полученные в целом данные о тепловом поведении кластеров воды во влажных полисахаридах.

Главная особенность полученных для сефадекса G-25 калориметрических данных состоит в том, что наблюдаемые кривые плавления кластеров воды имеют дублетную структуру практически при всех (за исключением самых низких) рассмотренных в работе влажностях, в отличие от соответствующих одномодальных кривых в G-100. Этот факт отражает бимодальное распределение кластеров по размерам, т.е. возможность формирования в G-25 с его более жесткой, по сравнению с G-100, пространственной организацией двух наборов кластеров воды с разными наиболее вероятными размерами (~ 2 нм и 5-15 нм в зависимости от влажности сефадекса). В то же время процесс кристаллизации вымораживаемой воды при охлаждении для этих же значений влажности и в G-25, и в G-100 проявляется в виде одномодальных кривых.

Более того, различие в пространственных структурах G-25 и G-100 практически не оказывает влияния на проявление размерного эффекта, характерного для малых систем, в полученных зависимостях температур и теплот плавления и кристаллизации водных нанокластеров от влажности сефадекса. Кроме того, установленный для нано-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

кластеров воды в обоих сефадексах, так же как и в крахмале, гистерезис между температурами их плавления и кристаллизации,  $\Delta T = T_{\Pi\Pi} - T_{KP}$ , и между теплотами этих переходов,  $\Delta Q = Q_{\Pi\Pi} - Q_{KP}$ , также демонстрирует их близость друг к другу по характеру изменения от влажности.

Общим оказалось и то, что в системе кластеров закристаллизованной переохлажденной воды во всех исследованных полисахаридах с низкой влажностью при нагревании происходят процессы их трансформации как ниже интервала плавления, так и внутри него. В области до начала плавления реорганизация может проявляться либо в виде размытого понижения абсолютных значений теплоемкости, как при аморфизации нативного крахмала, либо, как в случае G-25 и G-100, в виде дополнительного четко выраженного экзотермического максимума на термограммах нагревания. Иными словами, в виде добавления новой кристаллической фазы воды при нагревании в области до начала плавления. Заметим, что в сефадексах с низким содержанием вымораживаемой воды первый этап ее кристаллизации при охлаждении происходит вблизи температуры стеклования, когда уменьшается подвижность собственно макромолекулярной матрицы. Именно поэтому в G-25 при влажности ниже 35% кристаллизация кластеров воды не фиксируется. При повышении влажности сефадекса и, соответственно, удалении от температуры стеклования возрастающая подвижность полисахаридных цепей обеспечивает достаточную и для кристаллизации при охлаждении, и для докристаллизации при нагревании подвижность мелких водных кластеров, свободно перемещающихся между отдельными ячейками молекулярного сита.

Наиболее ярко процессы реорганизации кластеров воды, первоначально закристаллизованных при охлаждении, проявляются в сефадексе G-25 в интервале их плавления. Их проявление зависит от условий нагревания. Во-первых, при уменьшении V<sub>нагр</sub> наблюдается изменение интенсивностей компонент дублетной кривой плавления. Во-вторых, при отжиге внутри интервала плавления происходит укрупнение мелких кластеров и, соответственно, согласно установленному размерному эффекту, увеличение теплоты плавления. Следует отметить, что зафиксировать эти изменения оказалось возможным, по-видимому, потому, что скорости рассматриваемых процессов трансформации кластеров сопоставимы с величинами используемых в работе скоростей нагревания.

Все эти процессы вместе и в отдельности свидетельствуют о неравновесности исходного набора закристаллизованных при охлаждении нанокластеров воды в сефадексе. Напомним, что близкий по характеру процесс реорганизации нанокристаллитов, наблюдавшийся в синтетических полимерах, также рассматривался как следствие неравновесности исходных кристаллитов, образовавшихся при значительном переохлаждении относительно температуры плавления.

Таким образом, именно неравновесность переохлажденных водных кластеров во всех исследованных нами системах полисахарид-вода и, как следствие, их способность к трансформации при повышении температуры вплоть до плавления является, на наш взгляд, одной из возможных, если не главной, причиной обсуждавшихся выше гистерезисных явлений. Полученные в работе результаты демонстрируют, что трансформация, приводящая к увеличению размеров исходно сформировавшихся при охлаждении кристаллитов и, соответственно, к наблюдаемому повышению температур и теплот их плавления, безусловно является важным фактором в проявлении гистерезиса в тепловых свойствах нанокластеров воды.

В заключение подчеркнем, что в результате проведенных исследований был получен однозначный ответ на поставленный в начале исследования вопрос о том, какое именно распределение закристаллизованных водных кластеров в сефадексе плавится в интервале перехода. Было надежно установлено, что наблюдаемая кривая плавления отражает тепловое разрушение не исходного, а нового, возникшего в результате разного рода перестроечных процессов (докристаллизации, реорганизации, изменения размеров), набора водных нанокластеров.

## 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. Г. Н. Макаров, Успехи физ. наук **180**, 185 (2010).
- 2. P. Pawlow, Z. Phys. Chem. 65, 545 (1909).
- 3. И. В. Сочава, Г. И. Церетели и О. И. Смирнова, Физика твердого тела **14** (2), 553 (1972).
- 4. Б. Вундерлих, Физика макромолекул (Мир, М., 1984), Т. 3.
- Ю. К. Годовский, Теплофизические методы исследования полимеров (Химия, М., 1976).
- В. А. Берштейн и В. М. Егоров, Дифференциальная сканирующая калориметрия в физико-химии полимеров (Химия, Л., 1990).
- И. В. Сочава и Г. И. Церетели, Высокомолекуляр. соединения 13 (2) 155 (1971).
- 8. Г. И. Церетели и И. В. Сочава, Высокомолекуляр. соединения **13** (11) 2612 (1971).
- 9. H. Haberland, et al., Phys. Rev. Lett. 94, 035701 (2005).
- 10. M. Schmidt, et al., Nature 393, 238 (1998).
- 11. M. Schmidt, et al., Phys. Rev. Lett. 86, 1191 (2001).
- 12. R. Berry, in *Clasters of Atoms and Molecules: Theory, Experiment, and Clusters of Atoms* (Springer-Verlag, Berlin, 1994), Ch. 2.8.
- 13. G. A. Breaux, et al., Phys. Rev. Lett. 94, 173401 (2005).
- Р. С. Берри и Б. М. Смирнов, Успехи физ. наук 175, 367 (2005).
- Р. С. Берри и Б. М. Смирнов, Успехи физ. наук 179, 147 (2009).
- D. J. Wales and R. S. Berry, Phys. Rev. Lett. 73, 2875 (1994).
- 17. R. S. Berry, Nature **393**, 212 (1998).
- 18. D. J. Wales, Adv. Chem. Phys. 115, 1 (2000).
- Р. С. Берри и Б. М. Смирнов, Журн. эксперим. и теорет. физики 127, 1282 (2005).
- 20. F. Caupin, Phys. Rev. B 77, 184108 (2008).
- C. Alba-Simionesco, B. Coasne, et al., J. Phys.: Cond. Matter 18, R15 (2006).
- B. F. Borisov, E. V. Charnaya, P. G. Plotnikov, et al., Phys. Rev. B, 58 (9), 5329 (1998).
- 23. G. Kellermann and A. F. Craevich, Phys. Rev. B 65, 134204 (2002).
- 24. S. L. Lai, et al., Phys. Rev. Lett. 77, 99 (1996)
- H. M. Lu, F. Q. Han, and X. K. Mong, J. Phys. Chem. B 112, 9444 (2008).
- 26. A. Moitra, et al., J. Phys. D 41, 185406 (2008).

- 27. *Water Relationships in Foods*, Ed. by H. Levine and L. Slade (Plenum Press, N.-Y., 1991).
- Г. М. Мревлишвили, Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул (Мецниереба, Тбилиси, 1984).
- Г. И. Церетели, Т. В. Белопольская и Т. Н. Мельник, Биофизика 42 (1), 68 (1997).
- T. V. Belopolskaya, G. I. Tsereteli, N. A. Grunina, et al., in *Starch: Recent Advances in Biopolymer Science and Technology*, Ed. by M. Fiedorowicz and E. Bertoft (Polish Society of Food Technologists, Malopolska Branch, 2010), pp. 29–44.
- T. V. Belopolskaya, G. I. Tsereteli, N. A. Grunina, et al., in *Starch Science Progress*, Ed. by L. A. Wasserman, G. E. Zaikov, P. Tomasik, et al. (Nova Science Publ., N.-Y., 2011), pp. 1–15.
- 32. K. Tananuwong and D. S. Reid, Carbohydrate Polym. **58**, 345 (2004).
- 33. S. Suzuki and S. Kitamura, Food Hydrocolloids **22**, 862 (2008).
- T. Tran, K. Thitipraphunkul, K. Piyachomkwan, et al., Starch/Stärk 60, 61 (2008).
- 35. S. Park, R. A. Venditti, H. Jameel, et al., Carbohydrate Polym. **66**, 97 (2006).
- N. A. Grunina, G. I. Tsereteli, T. V. Belopolskaya, and O. I. Smirnova, Carbohydrate Polymers 132, 499 (2015).
- Г. И. Церетели, Т. В. Белопольская, Н. А. Грунина и др., Биофизика 62 (1) 53 (2017).

- Т. В. Белопольская, Г. И. Церетели, Н. А. Грунина и др., Биофизика 62 (5) 852 (2017).
- Г. И. Церетели, Т. В. Белопольская, Н. А. Грунина и др., Биофизика 64 (1) 21 (2019).
- 40. W. Hu, et al., Eur. Phys. J. B 45, 547 (2005)
- 41. M. Binnewies and E Milke, *Thermochemical Data of Elements and Compaunds* (Wiley-VCH, Weinheim, 1999), p. 871.
- 42. T. L. Beck, J. Jellinek, and R. S. Berry, J. Chem. Phys. 87, 545 (1987).
- H. L. Davis, J. Jellineh, and R. S. Berry, J. Chem. Phys. 86, 6456 (1987).
- 44. Б. М. Смирнов, Успехи физ. наук 177, 369 (2007).
- 45. A. M. Malvezzi, et al., Phys. Rev. Lett. **89**, 087401 (2002).
- 46. T. Bachels, H.-J. Güntherodt, and R. Schäfer, Phys. Rev. Lett. **85**, 1250 (2000).
- 47. Т. Дэвени и Я. Гергей, Аминокислоты, пептиды и белки (Мир, М., 1976).
- Т. Г. Плаченов и С. Д. Колосенцев, Порометрия (Химия, Л., 1988).
- N. A. Grunina, G. I. Tsereteli, T. V. Belopolskaya, et al., in *Starch Science and Technology*, Ed. by V. P. Yuriev, P. Tomasik, et al. (Nova Science Publ., Inc., N.-Y., 2008), pp. 77–87.
- H. D. Goff, in Starch in food: Structure, function and application, Ed. by A.-C. Eliasson (Woodhead Publ. Ltd., Cambridge, 2004), pp. 425–427.

# Hysteresis Manifestation in the Thermal Properties of Nanosystems on the Example of Supercooled WaterClusters in Wet G-Sephadex

## N.A. Grunina\*, T.V. Belopolskaya\*\*, G.I. Tsereteli\*\*, and O.I. Smirnova\*\*

#### \*St. Petersburg State University of Civil Aviation, ul. Pilotov 38, St. Petersburg, 196210 Russia

#### \*\*St. Petersburg State University, Ulyanovskaya ul. 1, St. Petersburg, Staryi Peterhof, 198504 Russia

The study continues a series of DSC investigations dedicated to the thermal properties of water clusters in polysaccharide-water systems (starch, Sephadex G-100) with a low content of frozen water. In this study, another modified polysaccharide, Sephadex G-25, is employed that has a more rigid spatial structure in comparison to Sephadex G-100. The main feature of the data obtained for G-25 by differential scanning calorimetry is the doublet structure of the melting curve of water clusters, which indicates the bimodal character of their size distribution. The observed decrease of melting temperatures as well as heats of melting and crystallization of water clusters as G-25 humidity decreases is a typical manifestation of the size effect for nanosystems, as in the case of the other polysaccharides. Importantly, a hysteresis is observed between the temperatures,  $\Delta T = T_m - T_{cr}$ , and the heats,  $\Delta Q = Q_m - Q_{cr}$ , of these transitions, which is also typical of low-dimensional systems. It has been established that clusters of crystallized supercooled water in G-25 with low humidity can undergo various transformation processes (additional crystallization, reorganization, size change) upon heating, which may occur both below and within the melting interval, indicating non-equilibrium character of the initial set of nanoclusters. It has been shown that a decrease in Vheat as well as annealing within the melting interval lead to a size redistribution of water clusters increasing the heat of melting in accordance with the established size effect. Altogether, these findings suggest that the non-equilibrium character of the water clusters formed upon initial cooling and, hence, their ability to transform as the temperature increases undoubtedly play an important if not pivotal role for the hysteresis manifestation in the thermal properties of water nanoclusters.

Keywords: calorimetry, water nanoclusters, Sephadex, crystallization, melting, transformation, size effect, hysteresis

## — МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 542.957:547.7:547.854:547.857:615.27.3

# ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕСОВ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ И S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2020 г. А.Ф. Ванин<sup>\*, \*\*</sup>, Л.А. Островская<sup>\*\*\*</sup>, Д.Б. Корман<sup>\*\*\*</sup>, Н.В. Блюхтерова<sup>\*\*\*</sup>, В.А. Рыкова<sup>\*\*\*</sup>, М.М. Фомина<sup>\*\*\*</sup>

\*Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4 \*\*Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета

им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, Трубецкая ул., 8

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

*E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru* Поступила в редакцию 04.09.2019 г. После доработки 04.09.2019 г. Принята к публикации 05.09.2019 г.

Изучена противоопухолевая активность S-нитрозоглутатиона, би- и моноядерной форм динитрозильных комплексов железа с различными тиолсодержащими лигандами – глутатионом, меркаптосукцинатом, тиосульфатом – на моделях солидных перевиваемых опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарциномы Aкатол и Ca-755). Наибольшую противоопухолевую активность, выразившуюся в торможении роста опухоли на 90%, проявили препараты комплексов железа с глутатионом при внутривенном введении (карцинома легких Льюис) и S-нитрозоглутатиона при внутрибрюшинном введении животным (аденокарцинома Ca-755). Исходя из этих и ранее полученных нами данных о противоопухолевой активности такого рода соединений, а также принимая во внимание результаты других авторов в той же области исследований, сделано предположение о том, что противоопухолевый эффект вышеперечисленных препаратов определяется в основном их способностью выступать в качестве доноров ионов нитрозония. Инициированное ионами нитрозония S-нитрозирование тиолсодержащих белков, локализованных на поверхности опухолевых клеток, приводит к повышению внутриклеточного окислительного потенциала и тем самым к развитию апоптоза и гибели этих клеток.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы, противоопухолевая активность, солидные опухоли мышей.

DOI: 10.31857/S0006302920010068

Ранее нами было обнаружено, что генерирующие оксид азота соединения, такие как биядерные формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) и меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-МЅ), а также S-нитрозоглутатион (GS-NO) обладают способностью ингибировать развитие ряда солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Ca-755). Противоопухолевый эффект изученных препаратов проявлялся при их введении как внутрибрюшинно, так и внутривенно, и колебался в пределах от 60 до 90%, изменяясь в зависимости от дозового режима, схемы применения, времени оценки эффекта и природы опухолевого штамма [1–6].

В 2016 г. группой исследователей, возглавляемой профессором W.-F. Liaw (Тайвань), была обнаружена также высокая противоопухолевая активность водорастворимых моноядерных динитрозильных комплексов железа с этилмеркаптаном при их внутривенном введении на модели ксенографтов рака предстательной железы человека [7].

В продолжение данного направления работ нами с целью выявления оптимальных подходов для дальнейшего исследования доноров оксида азота в качестве противоопухолевых агентов проведено изучение противоопухолевых свойств ряда соединений, представляющих собой би-

Сокращения: Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, Б-ДНКЖ-МS – биядерные динитрозильные комплексы железа с меркаптосукцинатом, GS-NO – S-нитрозоглутатион, М-ДНКЖ-TS – моноядерные динитрозильные комплексы железа с тиосульфатом, TPO – коэффициент торможения роста опухоли, СПЖ – средняя продолжительность жизни.

ядерную форму динитрозильных комплексов железа с глутатионом, меркаптосукцинатом, моноядерную форму динитрозильных комплексов железа с тиосульфатом, а также препарата S-нитрозоглутатиона.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат железа (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, тиосульфат, меркаптосукцинат и нитрит натрия (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М растворе HCl с последующим разделением NO и примесного диоксида азота (NO<sub>2</sub>) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе, как это описано в работах [1, 8].

Синтез биядерной формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом. Б-ДНКЖ-GSH синтезировали согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лиганадами [1, 9]. В соответствие с этим методом синтез 5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH с глутатионом проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызывавшего подкисление раствора до 4,0, с последующим введением в него 28 мг (10 мМ) сернокислого железа, приводившего к дальнейшему снижению рН до 3.8. После этого в раствор добавляли 6.9 мг (10 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленного образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для GS-NO, реакция заканчивалась через 1.5 ч с образованием 10 мМ этого соединения. После этого рН раствора повышали до 7.2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования Б-ДНКЖ-GSH в растворе при участии GS-NO, Fe<sup>2+</sup> и глутатиона [9]. Для полного превращения GS-NO в Б-ДНКЖ-GS-GSH требовалось несколько часов. После удаления образовавшегося за это время осадка гидроокиси трехвалентного железа путем фильтрования раствора через фильтровальную бумагу полученный раствор замораживали в жидком азоте и использовали (после разморозки) в экспериментах на животных. Оценку полученного количества Б-ДНКЖ-GSH (молекулярная масса 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции, равными соответственно 9200 и 7400 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [1]. Согласно этой оценке, концентрация Б-ДНКЖ в растворе составляла

~2.5 мМ (5 мМ в пересчете на один железа в комплексе).

Синтез биядерной формы динитрозильных комплексов железа с меркаптосукцинатом. Б-ДНКЖ-MS синтезировали с помощью обработки газообразным NO (при давлении 150 мм рт. ст.) 1 мл раствора ферросульфата в дистиллированной воде и 4 мл 15 мМ раствора меркаптосукцината в 15 мМ НЕРЕЅ-буфере (рН 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим смешиванием этих растворов в присутствии NO, как это описано в работе [8]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 мМ. После пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего двухвалентного железа в Б-ДНКЖ-МS, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного Б-ДНКЖ-МЅ замораживали и использовали (после разморозки) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата Б-ДНКЖ-МS оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм с коэффициентом экстинкции, равным 6000  $M^{-1}cm^{-1}$  (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ).

Синтез моноядерной формы динитрозильных комплексов железа с тиосульфатом. М-ДНКЖ-ТS синтезировали аналогичным образом в аппарате Тунберга с использованием газообразного NO. Концентрация ферросульфата и тиосульфата натрия в смеси, обрабатываемой NO, составляла соответственно 5 и 20 мМ. Концентрацию полученного препарата М-ДНКЖ-ТS оценивали методом ЭПР по интенсивности характерного для этого комплекса сигнала ЭПР с  $g_{\perp} = 2.042$  и  $g_{\parallel} = 2.014$  с использованием соответствующего ЭПР-стандартного образца [10].

Синтез S-нитрозоглутатиона. GS-NO в виде 5 мМ раствора в 15 мМ HEPES-буфере (рН 7.4) получали, понижая рН смеси 5.5 мМ глутатиона и 5 мМ нитрита натрия до значения, равного 3.0-3.5, добавлением в раствор соляной кислоты, что приводило Κ розовому окрашиванию раствора. После одночасовой инкубации на воздухе рН раствора повышали до нейтральных значений. Концентрацию полученного GS-NO оценивали оптическим методом по интенсивности характерной для него полосы поглощения на 334 нм с коэффициентом экстинкции, равным  $0.904 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [11].

Биологический эксперимент. Эксперименты были проведены на 75 инбредных мышах-самках линий BDF<sub>1</sub> и Balb/с, с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевых тест-систем служили солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Са-755, пере-

виваемые подкожно в соответствии со стандартной методикой [12].

Исследовавшиеся препараты вводили животным в виде водных растворов внутривенно в хвостовую вену либо внутрибрюшинно при использовании различных дозовых режимов и схем применения.

Б-ДНКЖ-GSH вводили внутривенно мышам с карциномой легких Льюис в суточных дозах 20, 10, 2, 1 и 0,5 мкмоль/кг шестикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 11-е и 14-е сутки после перевивки опухоли; животным с аденокарциномой Акатол — в суточной дозе 10 мкМ/кг на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки.

М-ДНКЖ-ТЅ вводили внутривенно мышам с аденокарциномой Акатол в суточной дозе 10 мкмоль/кг на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки развития опухоли.

Б-ДНКЖ-МЅ вводили внутривенно в суточных дозах 2,5 и 5 мкМ/кг шестикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е, 14-е и 17-е сутки после перевивки опухоли мышам с карциномой легких Льюис и с первых по шестые сутки — животным с аденокарциномой Акатол.

GS-NO вводили мышам с аденокарциномой Ca-577 внутрибрюшинно в суточных дозах 50, 100, 200 и 400 мкМ/кг с первых по десятые сутки, мышам с карциномой легких Льюис – внутривенно в суточных дозах 10 и 20 мкМ/кг на 1-е, 4-е, 8-е, 12-е и 15-е сутки, животным с аденокарциномой Акатол – внутривенно в суточных дозах 10 мкМ/кг на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности. Показателем ростингибирующего эффекта препарата служили различия в кинетике роста опухолей (коэффициент торможения роста опухоли ТРО, %). Коэффициент торможения роста опухоли определяли из соотношения:  $TPO = [(P_C)$  $(P_T)/P_C$ ]·100%, где  $P_C$  и  $P_T$  – объем (или масса) опухоли в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как V =  $ab^2/2$ , где  $a - b^2/2$ длина, *b* – ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли использовали величину плотности опухолевой ткани, равную 1 г/см<sup>3</sup>. Показатель изменения средней продолжительности жизни мышей (СПЖ) определяли как  $\Delta \tau = [(\tau_{\rm C} - \tau_{\rm T})/\tau_{\rm C}] \cdot 100\%$ , где  $\tau_{\rm C}$  и  $\tau_{\rm T}$  – средняя продолжительность жизни контрольных и леченых животных [12].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шести-

восьми мышей при восьми-десяти животных в контроле. Наблюдение за животными продолжалось в течение всего периода развития опухоли вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка оценок размеров опухолей (массы опухолей) у животных проведена с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В представленной работе обобщены результаты экспериментального изучения зависимости противоопухолевого эффекта от дозы для препаратов Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO (при их внутрибрюшинном и внутривенном введении), оценки активности сочетанного применения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO (внутрибрюшинное введение), определения влияния природы лиганда на ростингибирующий эффект таких динитрозильных комплексов железа, как Б-ДНКЖ-GSH, Б-ДН-КЖ-MS и М-ДНКЖ-TS (внутривенное введение) на моделях солидных опухолей мышей.

Противоопухолевая активность биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом на модели карциномы легких Льюис. Ранее нами была установлена значительная противоопухолевая активность Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис [4]. Как было показано в этой работе, эффективность торможения роста опухоли увеличивалась по мере уменьшения дозы препарата в диапазоне суточных доз 20, 10 и 2 мкмоль/кг и составляла 30, 70 и 90% соответственно (рис. 1а, табл. 1). В дополнение к этим данным и для проверки отмеченного парадоксального эффекта увеличения активности препарата с уменьшением его дозы нами исследован эффект Б-ДНКЖ-GSH в разовых дозах 1 и 0,5 мкмоль/кг при той же схеме внутривенного введения (пятикратно с интервалом в трое суток) на модели карциномы легких Льюис (рис. 16, табл. 1).

Анализ результатов, полученных при введении препарата в суточных дозах 1,0 и 0,5 мкмоль/кг, свидетельствует о том, что эти малые дозы Б-ДНКЖ-GSH обладают примерно одинаковой эффективностью и тормозят развитие опухоли на 50 и 60% соответственно (рис. 16, табл. 1).

Сопоставление противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-GSH во всем диапазоне изученных суточных доз (от 20 до 0,5 мкмоль/кг) при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис свидетельствует о нелинейном характере зависимости эффекта от дозы, при которой максимальная активность препарата — 90% торможения роста опухоли по сравнению с контролем —



**Рис. 1.** Противоопухолевая активность Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном введении различных доз препарата на модели карциномы легких Льюис: (а) – *1* – контроль, *2*–*4* – Б-ДНКЖ-GSH в суточных дозах 20, 10 и 2 мкмоль/кг соответственно; (б) – *1* – контроль, *2* и *3* – Б-ДНКЖ-GSH в суточных дозах 1 и 0,5 мкМ/кг соответственно. Дозы Б-ДНКЖ-GSH приводятся в пересчете на один Fe(NO)2-фрагмент. Введение препарата внутривенно, пятикратно, на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

наблюдается при его введении в разовой дозе 2 мкмоль/кг (рис. 2, табл. 1).

Таким образом, исследование противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-GSH в широком диапазоне доз (от 20 до 0,5 мкмоль/кг в сутки) позволило установить, что оптимальным режимом применения препарата, вызывающим ингибирование роста опухоли (карцинома легких Льюис) на 90%, является его внутривенное введение в суточной дозе 2 мкмоль/кг, пятикратно с интервалом в трое суток.

Следует отметить, что Б-ДНКЖ-GSH сохраняет определенную противоопухолевую активность, выразившуюся в торможении роста опухоли на 50%, даже при позднем начале применения препарата — на седьмые сутки развития опухоли (табл. 1). Рассматривая вопросы оптимизации применения Б-ДНКЖ-GSH в качестве противоопухолевого агента, мы представляли целесообразным оценить толерантность животных опухоленосителей к введению высоких доз препарата внутрибрюшинно.

С этой целью проведено сравнительное изучение активности Б-ДНКЖ-GSH при внутрибрюшинном введении в относительно высоких дозах (100 и 200 мкмоль/кг), причем более высокая доза препарата вводилась дробно, по 100 мкмоль/кг два раза в сутки (карцинома легких Льюис).

Как видно из данных, приведенных на рис. 3 и в табл. 2, торможение роста опухоли под влиянием внутрибрюшинного введения Б-ДНКЖ-GSH возрастало с увеличением дозы. Ингибирование роста опухоли при оценке эффекта на 12-е сутки

Серия опыта	Группа	Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	Торможение роста опухоли, %
1	Б-ДНКЖ-GSH	20	16	$2.76\pm0.54$	30
1	Б-ДНКЖ-GSH	10	16	$1.19 \pm 0.14$	70
1	Б-ДНКЖ-GSH	2	16	$0.37\pm0.08$	90
1	Б-ДНКЖ-GSH*	2*	16*	$1.96 \pm 0.07*$	50*
1	Контроль	_	16	$3.93\pm0.65$	_
2	Б-ДНКЖ-GSH	1.0	19	$3.22? \pm 0.24$	50
2	Б-ДНКЖ-GSH	0.5	19	$2.50\pm0.13$	60
2	Контроль	—	19	$6.05\pm0.45$	-

Таблица 1. Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ-GSH в ряде доз при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис

Примечание. Препарат вводили на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли. \* – Препарат вводили на 7-е, 9-е, 11-е и 14-е сутки после перевивки опухоли.



**Рис. 2.** Зависимость противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-GSH от дозы при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис.

после перевивки составило 49 и 62% для доз 100 и 200 мкмоль/кг соответственно, по сравнению с контролем. СПЖ животных практически не отличалась от контроля (рис.3, табл.2).

Таким образом, показано, что животные способны переносить сублетальную для мышей дозу Б-ДНКЖ-GSH, составляющую 200 мкмоль/кг, при условии ее внутрибрюшинного дробного введения, по 100 мкмоль/кг дважды в сутки. Такое применение препарата приводило к более значительному ингибированию роста опухоли, чем его введение в дозе 100 мкмоль/кг один раз в сутки.

В целом сопоставление эффекта Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном и внутрибрюшинном введении свидетельствует о том, что путь введения препарата играет весьма существенную роль в реализации его противоопухолевой активности. Так, внутривенное применение Б-ДНКЖ-GSH в дозе 2 мкмоль/кг приводит к торможению роста опухоли на 90%, в то время как внутрибрюшинное введение препарата в дозе, на два порядка более высокой и составляющей 200 мкмоль/кг, вызывает торможение роста опухоли на 60 % (табл. 1 и 2).

Противоопухолевая активность S-нитрозоглутатиона на моделях аденокарциномы Са-755 и карциномы легких Льюис. Ранее нами была установлена значительная противоопухолевая активность препарата GS-NO на двух моделях солидных опухолей мышей – карциноме легких Льюис и аденокарциноме Са-755. Торможение роста опухолей при применении препарата внутрибрюшинно, десятикратно, ежедневно, в суточных дозах 200 и 400 мкмоль/кг составляло 70 и 60% при введении мышам с карциномой легких Льюис, а на модели аденокарциномы Са-755 – 90 и 50% соответственно. При этом было показано, что GS-NO проявляет более высокую эффективность при применении в меньшей лозе 200 мкмоль/кг сравнению по дозой C 400 мкмоль/кг. Такая парадоксальная дозовая зависимость была отмечена в отношении обоих штаммов опухолей, но особенно четко выражена на модели аденокарциномы Са-755, что требовало специального объяснения [3].

С этой целью нами на модели аденокарциномы Ca-755 проведено изучение зависимости эффекта от дозы GS-NO в диапазоне доз от 50 до 400 мкмоль/кг, при внутрибрюшинном десятикратном введении препарата.



**Рис. 3.** Противоопухолевая активность Б-ДНКЖ-GSH в высоких дозах при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис: (а) – 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-GSH, 100 мкмоль/кг/сутки; (б) – 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-GSH, 200 мкмоль/кг/сутки, дробно, два раза в сутки по 100 мкмоль/кг. Введение препарата внутрибрюшинно с первых по четвертые и с восьмых по одиннадцатые сутки.

52

Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	СПЖ т, сутки	Δτ, %
100	12	2.2	49	$31.0 \pm 4.8$	1
200 (по 100 мкмоль/кг), 2 раза в сутки	12	1.5	62	27.5 ± 5.6	—7
Контроль	12	3.9	_	$29.6\pm9.0$	_

Таблица 2. Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ-GSH в высоких дозах при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис

Примечание. Препарат вводили с первых по одиннадцатые сутки внутрибрюшинно, восьмикратно.

Как видно из данных, представленных на рис. 4 и 5, а также в табл. 3, GS-NO тормозит развитие аденокарциномы Ca-755 на 56–88% по сравнению с контролем. СПЖ животных увеличивается под влиянием GS-NO на 14–24% по сравнению с контролем. При этом наибольший эффект GS-NO – 88% торможения роста опухоли и увеличение средней продолжительности жизни животных на 24% – наблюдается при применении препарата в суточной дозе 100 мкмоль/кг.



**Рис. 4.** Противоопухолевая активность GS-NO при внутрибрюшинном введении на модели аденокарциномы Ca-755: (а) – GS-NO, 50 мкмоль/кг/сутки; (б) – GS-NO, 100 мкмоль/кг/сутки, (в) – GS-NO, 200 мкмоль/кг/сутки; (г) – GS-NO, 400 мкмоль/кг/сутки. Кривая *1* – контроль, кривая *2* – GS-NO.



**Рис. 5.** Зависимость противоопухолевого эффекта GS-NO от дозы при внутрибрюшинном введении на модели аденокарциномы Ca-755.

Таким образом, исследование противоопухолевого эффекта GS-NO в широком диапазоне доз (50–400 мкмоль/кг) при внутрибрюшинном введении на модели аденокарциномы Ca-755 позволило обнаружить нелинейный характер зависимости эффекта от дозы и выявить оптимальный режим применения препарата – введение в разовой дозе 100 мкмоль/кг, десятикратно, ежедневно, внутрибрюшинно, обеспечивающий торможение роста опухоли на 90% и увеличение средней продолжительности жизни животных на 24% по сравнению с контролем (рис. 4 и 5, табл. 3).

Тенденция к некоторому повышению активности с уменьшением дозы препарата сохраняется и при внутривенном применении GS-NO. Так, введение GS-NO внутривенно, пятикратно (с интервалом в трое суток) в разовых дозах 10 и 20 мкмоль/кг приводит к ингибированию роста карциномы легких Льюис мышей на 45 и 32% по сравнению с контролем (рис. 6, табл. 4).





**Рис. 6.** Влияние ряда доз GS-NO при внутривенном введении на кинетику развития карциномы легких Льюис мышей: *1* – контроль; *2* – GS-NO, 20 мкмоль/ кг/сутки; *3* – GS-NO, 10 мкмоль/ кг/сутки. Препарат вводился внутривенно, пятикратно – на 1-е, 4-е, 8-е, 12-е и 15-е сутки после перевивки опухоли.

карциномы легких Льюис. Определенный интерес представляет изучение возможности усиления противоопухолевого эффекта соединений, генерирующих оксид азота, путем сочетанного применения двух разных по химическому строению веществ.

С этой целью исследована эффективность совместного применения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO на модели карциномы Льюис при внутрибрюшинном введении.

Как видно из данных, представленных на рис. 7 и в табл. 5, торможение роста опухоли при индивидуальном применении Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO в дозах 100 и 200 мкмоль/кг/сутки в данном опыте не превышает 40 и 20% соответственно, при оценке эффекта на 16-е сутки после перевивки опухоли (рис. 7а, б).

Ингибирование роста опухоли при совместном применении в половинных дозах (рис. 7в) со-

Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	TPO, %	СПЖ t, сутки	Δτ, %
50	18	$1.28\pm0.40$	72	$30.3 \pm 7.4$	23
100	18	$0.57\pm0.30$	88	$30.7\pm4.8$	24
200	18	$1.26\pm0.40$	73	$29.2\pm7.6$	19
40	18	$2.05\pm0.50$	56	$28.0\pm6.7$	14
Контроль	18	$4.67\pm0.80$	—	$24.6\pm2.3$	—

Таблица 3. Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ-GSH в высоких дозах при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис

Примечание. Препарат вводили с первых по десятые сутки внутрибрюшинно.

Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	TPO, %
20	19	$4.1 \pm 0.4$	32
10	19	$3.3 \pm 0.3$	45
Контроль	19	$6.0\pm0.8$	—

Таблица 4. Противоопухолевый эффект GS-NO в ряде доз при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис

Примечание. Препарат вводили на 1-е, 4-е, 8-е, 12-е и 15-е сутки внутривенно.

ставило 55%, а при применении в полных дозах (рис.  $7\Gamma$ ) – 45% по сравнению с контролем.

табл. 5). Средняя продолжительность жизни у всех леченых животных на 4–12% ниже, чем в контроле (табл. 5).

Таким образом, очевидно, что наибольший эффект наблюдается при комбинации препаратов в половинных дозах и составляет 55% торможения на 16-е сутки развития опухоли (рис. 7,

Представленные данные по оценке эффективности совместного внутрибрюшинного применения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO свидетельствуют о



**Рис. 7.** Влияние Б-ДНКЖ-GSH, GS-NO и комбинации этих препаратов при внутрибрюшинном введении на развитие карциномы легких Льюис: (a) – 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-GSH, 100 мкмоль/кг/сутки; (б) – 1 – контроль; 2 – GS-NO, 200 мкмоль/кг/сутки; (в) – 1 – контроль; 2 – комбинация в половинных дозах: Б-ДНКЖ-GSH, 50 мкмоль/кг/сутки + GS-NO, 100 мкмоль/кг/сутки; (г) – 1 – контроль; 2 – комбинация в половиных дозах: Б-ДНКЖ-GSH, 50 мкмоль/кг/сутки, 100 мкмоль/кг/сутки; ор – 1 – контроль; 2 – комбинация в половиных дозах: Б-ДНКЖ-GSH, 50 мкмоль/кг/сутки + GS-NO, 100 мкмоль/кг/сутки; (г) – 1 – контроль; 2 – комбинация в половиных дозах: Б-ДНКЖ-GSH, 100 мкмоль/кг/сутки + GS-NO, 200 мколь/кг/сутки. Введение препаратов с первых по десятые сутки, внутрибрюшинно.

Препарат	Суточная доза (мкмоль/кг) и схема введения препарата	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	TPO, %	СПЖ мышей т, сутки	Δτ, %
ДНКЖ-GSH	100 1—10 сутки	16	$3.4 \pm 0.3$	40	$31.2\pm4.0$	9.5
GS-NO	200 1—10 сутки	16	$4.5 \pm 0.3$	20	$31.5\pm3.1$	-9.0
ДНКЖ-GSH + GS-NO	50 + 100 1–10 сутки	16	$2.6 \pm 0.4$	55	$30.2\pm5.2$	-12.0
ДНКЖ-GSH + GS-NO	100 + 200 1–10 сутки	16	$3.2\pm0.2$	45	$33.2\pm3.0$	-3.8
Контроль		16	$5.6 \pm 0.3$	—	$34.5\pm3.2$	—

Таблица 5. Противоопухолевая активность препаратов Б-ДНКЖ-GSH, GS-NO и их комбинации при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис



**Рис. 8.** Противоопухолевая активность ряда доноров оксида азота при внутривенном введении на модели аденокациномы Акатол: (а) – Б-ДНКЖ-GSH, 10 мкмоль/кг; 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки; (б) – М-ДНКЖ-TS, 10 мкмоль/кг; 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки; (в) – Б-ДНКЖ-MS, 2,5 мкмоль/кг, с первых по шестые сутки; (г) – GS-NO, 10 мкмоль/кг; 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки. *1* – Контроль, *2* – препарат.

#### ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА

Группа	Суточная доза (мкмоль/кг)	Режим введения (сутки)	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	TPO, %
Б-ДНКЖ-GSH	10	1, 4, 6, 8,11	18	$4.04\pm0.27$	18
М-ДНКЖ-ТЅ	10	1, 4, 6, 8,11	18	$3.43\pm0.26$	30
GS-NO	10	1, 4, 6, 8,11	18	$4.88\pm0.32$	0
Контроль				$4.92\pm0.37$	_
Б-ДНКЖ-МS	2.5	1-6	16	$3.04\pm0.25$	30
Контроль				$4.31\pm0.35$	—

Таблица 6. Противоопухолевый эффект ряда доноров оксида азота при внутривенном введении на модели аденокарциномы Акатол

Примечание. \* - Контроль в эксперименте с препаратом Б-ДНКЖ-МS.

Таблица 7. Максимальный противоопухолевый эффект препаратов Б-ДНКЖ-GSH, М-ДНКЖ-TS, Б-ДНКЖ-MS и GS-NO на моделях солидных опухолей мышей

Препарат	TPO, %	Штамм опухоли	Суточная доза, режим введения	
Б-ЛНКЖ-GSH	90	Карцинома дегких Льюис	2 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е,	
b dinne opri	50		7-е, 9-е и 11-е сутки	
м лнкж те	30		10 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е,	
м-дикж-15	50	Аденокарцинома Акатол	6-е, 8-е и 11-е сутки	
е пним ме	30	A HOMOWODUNIONO A MOTOR	2,5 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е,	
<b>Б-ДНКЖ-</b> МЗ		Аденокарцинома Акатол	6-е, 8-е и 11-е сутки	
	90	A HOMOVODUNIONO CO. 755	100 мкмоль/кг, внутрибрюшинно на	
GS-NO		Аденокарцинома Са-755	первые-десятые сутки	
	45	И	10 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е,	
		Карцинома легких льюис	8-е, 12-е и 15-е сутки	

тенденции к некоторому увеличению противоопухолевой активности препаратов (с 40 до 55%) при их комбинированном использовании (карцинома легких Льюис).

Сравнительная оценка противоопухолевой активности ряда доноров оксида азота на модели аденокациномы Акатол. С целью определения среди доноров оксида азота препарата, обладающего наибольшей противоопухолевой активностью, проведено сравнительное изучение соединений Б-ДНКЖ-GSH, М-ДНКЖ-TS, Б-ДНКЖ-MS и GS-NO при внутривенном введении на модели аденокациномы Акатол (рис. 8, табл. 6).

Как видно из представленных данных, аденокарцинома Акатол обладает весьма слабой чувствительностью к действию изученных препаратов, уступая в этом отношении таким моделям солидных опухолей, как аденокарцинома Са-755 и карцинома легких Льюис. Максимальное ингибирование роста аденокарциномы Акатол под влиянием протестированных препаратов не превышает 30% по сравнению с контролем и наблюдается под влиянием таких соединений, как М-ДНКЖ-ТS и Б-ДНКЖ-МS (рис. 8, табл. 6).

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

## ОБСУЖДЕНИЕ

Обобщая результаты проведенных исследований, отметим, что изученные препараты, обладающие способностью генерировать оксид азота, проявляют определенную ростингибирующую активность в отношении солидных опухолей мышей.

Выраженность противоопухолевого эффекта зависит от природы соединения, режима его применения и чувствительности опухолевого штамма. Наибольшую противоопухолевую активность, выразившуюся в торможении роста опухоли на 90%, проявили препараты Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном введении мышам с карциномой легких Льюис и GS-NO при внутрибрюшинном введении животным с аденокарциномой Са-755 (табл. 7).

Особенностью действия протестированных препаратов является нелинейный характер зависимости противоопухолевого эффекта от дозы, которая проходит через максимум (рис. 2 и 5). Такой характер зависимости «доза—эффект» является нетипичным для действия большинства известных цитостатиков и, возможно, отражает определенные особенности фармакологического механизма действия генерирующих оксид азота препаратов.

При рассмотрении приведенных выше данных, а также результатов, полученных нами ранее в работах [1-6] при изучении противоопухолевого действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и GS-NO, возникает ряд вопросов, на которые мы попытаемся ответить.

1. При сопоставлении противоопухолевого действия всех изученных соединений при их внутрибрюшинном и внутривенном введении обнаруживается четкое различие в отношении их доз, при которых достигался оптимальный эффект. При внутрибрюшинном введении он имел место при наиболее высокой дозе препаратов, тогда как при внутривенном введении наблюдалась обратная картина. Исходя из результатов работы [13], в которой было изучено влияние способов введения Б-ДНКЖ-GSH крысам на гипотензивное действие этих комплексов, есть основание предполагать, что при внутрибрюшинном введении использованных ДНКЖ и GS-NO только незначительная часть этих соединений достигает циркулирующей крови. Другими словами, даже при их наибольшей дозе (100-200 мкмолей/кг веса животных) при внутрибрюшинном введении в кровь попадает менее 1 мкмоля/кг этих соединений.

2. Здесь же возникает вопрос, почему при внутривенном введении препаратов их противоопухолевое действие снижается при повышении их дозы? Ответить на этот вопрос можно, если учесть, что, согласно работе [14], вводимые в кровь ДНКЖ и, по-видимому, S-нитрозотиолы поглощаются иммунокомпетентными клетками – в первую очередь макрофагами, включение в которые большого количества доноров NO может оказаться для этих клеток губительным [15]. Естественно, что погибшие макрофаги, включившие в себя значительное количество доноров NO, не могут обеспечить транспорт этих доноров к опухолям, как это могли бы осуществить интактные иммунокомпетентные клетки. Такую доставку макрофаги могли осуществить только при включении в них небольшого количества доноров NO, например, при внутривенном введении в кровь мышей Б-ДНКЖ-GSH в дозе не более 2 мкмолей/кг.

3. Возникает также вопрос, почему во всех наших опытах нам не удалось достичь оптимального результата — полного подавления роста злокачественных опухолей, подобно тому, как это было показано в работе китайских исследователей [7].

Прежде чем сделать какое-либо предположение в ответ на этот вопрос, следует отметить, что кроме молекул NO, которые могут высвобождаться как из ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, так и из S-нитрозотиолов, оба типа этих нитрозосоединений могут выступать еще и в качестве доноров иона нитрозония (NO<sup>+</sup>) – продукта одноэлектронного окисления NO [16]. Есть основание предполагать, что и этот катион способен, как и нейтральные молекулы NO, инициировать гибель опухолевых клеток, вызывая S-нитрозирование белков, локализованных на клеточной поверхности, и тем самым провоцируя развитие апоптоза клеток, обусловленного повышением внутриклеточного окислительного потенциала [17].

Что касается губительного действия на эти клетки молекул NO, то его обычно связывают с превращением NO в реакции с супероксидом в пероксинитрит. Последний оказывает на клетки мощное токсическое действие, высвобождая в клеточную среду после протонирования свободные радикалы гидроксила [18].

Какой из этих агентов – NO или NO<sup>+</sup> – мог оказывать в наших опытах решающее цитотоксическое действие на опухоли? Есть основание предполагать, что в качестве такого агента могли выступать ионы нитрозония. Об этом четко свидетельствуют результаты упомянутой выше работы [17], в которой было показано, что обработка М-ДНКЖ-TS одним из производных дитиокарбамата, способным перехватывать на себя из ДНКЖ группу Fe-NO с сопутствующим высвобождением из этих комплексов ионов NO<sup>+</sup>, никоим образом не влияла на эффективность цитотоксического действия M-ДНКЖ-TS.

Что касается NO, то опухолевые клетки могли выработать защиту от его действия, как это «делает» ряд патогенных бактерий [19]. Как и бактерии, злокачественные клетки могли экспрессировать синтез гемсодержащих белков, способных или окислять, или восстанавливать молекулы NO, удаляя тем самым NO из внутриклеточной среды. Вот почему в начале при контакте опухолей с использованными нитрозосоединениями, когда злокачественные клетки начинали вырабатывать защиту от NO, наблюдалась задержка в развитии опухолей, которая затем, после создания этой защиты, сменялась быстрым развитием опухолей.

Что касается способности злокачественных клеток вырабатывать защиту против катионов нитрозония, появление такого качества у этих клеток представляется маловероятным. В пользу этого предположения свидетельствует факт 90%-го ингибирования роста аденокарциномы Ca-755 при внутрибрюшинном введении мышам GS-NO (рис. 4б). Последний, как типичный представитель S-нитрозотиолов, мог по ме-

ханизму S-транс-нитрозирования [11] передавать катионы NO<sup>+</sup> на тиоловые группы поверхностных белков злокачественных клеток и тем самым подавлять, в соответствии с данными работы [17], пролиферацию клеток аденокарциномы Ca-755 в организме мышей.

Почему китайским исследователям в работе [7] удалось полностью подавить пролиферацию клеток рака простаты человека под действием моноядерных динитрозильных комплексов железа с этилмеркаптаном в качестве тиолсодержащего лиганда, способного, как и все ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, выступать в качестве доноров NO и  $NO^+$ ? Не исключено, что этот успех был обусловлен тем, что молекулы этилмеркаптана из-за своих небольших размеров гораздо слабее, чем молекулы глутатиона, могли противостоять переходу катионов нитрозония на тиоловые группы белков в злокачественных клетках, то есть препятствовать S-нитрозированию этих белков, что и могло приводить к гибели опухолевых клеток. Другими словами, успех китайских исследователей мог быть обусловлен существенно меньшей устойчивостью S-нитрозоэтилмеркаптана и в соответствии с этим меньшей устойчивостью моноядерных динитрозильных комплексов железа с этилмеркаптаном по сравнению с устойчивостью тех же соединений глутатиона, использовавшихся в наших опытах [8, 20, 21].

Нами предполагается проверка высказанных соображений в последующих исследованиях на опухолях, которые будут подвергаться действию ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами с меньшими, чем глутатион, размерами молекул. Для ответа на вопрос, какой из компонентов ДНКЖ – NO или  $NO^+$  – может быть ответственен за противоопухолевую активность ДНКЖ, предполагается изучить влияние на эту активность производных дитиокарбамата, как это было сделано в работе [17]. В том случае, если производные дитиокарбамата не будут проявлять противоопухолевый эффект, это будет означать, что противоопухолевая активность ДНКЖ и соответствующих S-нитрозотиолов обусловлена высвобождающимися из них катионами нитрозония.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **59** (3), 508 (2014).
- 2. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60** (1), 152 (2015).
- А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика 60 (6), 1157 (2015).
- 4. A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, Austin J. Reprod. Medicine & Infertility 2, 1109 (2015).
- 5. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **62** (3), 591 (2017).
- А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика 64 (5), 1216 (2019).
- S-H. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, et al., Inorg. Chem. 55, 9384 (2016).
- 8. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. 23, 1236 (2010).
- 9. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **35**, 110 (2013).
- 10. D. Sh. Burbaev, A. F. Vanin, and L. A. Blumenfeld, Zhurn. Strukt. Khimii 2, 252 (1971).
- D. L. H. Williams, in *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004), p. 35.
- Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), сс. 642–657.
- A. A. Timoshin, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, et al., Eur. J. Pharmacol. 705, 525 (2015).
- 14. H. Levandovska, T. M. Stepkowski, S. Meczynska-Wielgosz, et al., J. Inorg. Biochem. **188**, 29 (2018).
- 15. J. Mier-Carbrera, S. Gonzalez-Gallardo, and C. Hernandez-Guerrero, Reprod. Sci. 20, 1332 (2013).
- A. F. Vanin, Austin J. Analyt. Pharmac. Chem. 5, 1104 (2018).
- A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., Free Radic. Biol. Med. 40, 1340 (2006).
- J. Scicinski, B. Oronskya, S. Ning, et al., Redox Biol. 6, 1 (2015).
- J. Green, M. D. Rolfe, and L. J. Smith, Virulence 5, 1 (2013).
- 20. A. F. Vanin, R. A. Stukan, and E. B. Manukhina, Biochim. Biophys. Acta **1295**, 5 (1996).
- 21. A. F. Vanin, Nuitric Oxide Biol. Chem. 21, 1 (2009).

## Antitumour Properties of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands and S-Nitrosoglutathione in the Experiment

A.F. Vanin<sup>\*,</sup> \*\*, L.A. Ostrovskaya<sup>\*\*\*</sup>, D.B. Korman<sup>\*\*\*</sup>, V.A. Rykova<sup>\*\*\*</sup>, N.V. Bluchterova<sup>\*\*\*</sup>, and M.M. Fomina<sup>\*\*\*</sup>

\*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8, Moscow, 119991 Russia

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

The antitumor activity of S-nitrosoglutathione, bi- and mononuclear dinitrosyl iron complexes with different thiol-containing ligands such as glutathione, mercaptosuccinate, thiosulfate agaisnt murine transplantable solid tumors (Lewis lung carcinoma, Acatol adenocarcinoma and Ca-755 adenocarcinoma) was studied. Preparations of dinitrosyl iron complexes with glutathione after intravenous injection (Lewis lung carcinoma) and S-nitrosoglutathione after intraperitoneal injection (Ca-755 adenocarcinoma) in animals exhibited the highest antitumor activity. They caused 90% tumor cell growth inhibition. The results obtained, in conjunction with our earlier data concerning the antitumor activity of this type of compounds as well as the results of other researchers in this filed of study, suggest that the antitumor effect of the above mentioned compounds is due to the ability of these preparations to act as donors of nitrosonium ions. Nitrosonium ion-induced S-nitrosylation of thiol-containing proteins localized to tumor cell surfaces leads to the enhancement of the intracellular oxidative capacity thereby promoting apoptosis and death of tumor cells.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, S-nitrosothiols, antitumor activity, murine solid tumor models

УДК 57.07

## ———— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА —

# ЭФФЕКТ ЗРИТЕЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА УРОВНИ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И МАКРОМОЛЕКУЛ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА in vivo

© 2019 г. А.Н. Яковлев\*, А. Манжурцев\*\*, \*\*\*, П. Меньщиков \*, М. Ублинский\*\*, \*\*\*, О. Божко\*\*\*, Т. Ахадов\*\*\*, Н. Семенова\*, \*\*\*

\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4 \*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

\*\*\*НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, 119180, Российская Федерация,

Москва, ул. Большая Полянка, 22 E-mail: yakovlevalekcej@bk.ru Поступила в редакцию 26.08.2019 г. После доработки 19.09.2019 г. Принята к публикации 19.09.2019 г.

GABA (гамма-аминомасляная кислота) — основной тормозной нейромедиатор в мозге — играет важную роль в различных типах синаптической пластичности и патологии. В настоящей работе для прижизненного исследования влияния видеостимуляции на уровень GABA в зрительной коре мозга человека использован метод протонной магнитно-резонансной спектроскопии (<sup>1</sup>H-MPC) и импульсная последовательность MEGA-PRESS в двух модификациях: <sup>-GABA</sup>MEGA-PRESS и <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS. Первая модификация позволяет получить <sup>1</sup>Н-ЯМР-сигнал метиленовых протонов GABA с химическим сдвигом δ = 3,01 м.д. (-GABA) без примеси сигнала макромолекул. Во второй модификации этот сигнал (+GABA) является суперпозицией резонансов метиленовых протонов GABA и макромолекул. Измерено также действие постоянной видеостимуляции на уровень N-ацетиласпартата и суммарный уровень глутамата и глутамина. Постоянная видеостимуляция не изменяет содержание N-ацетиласпартата и глутамина в зрительной коре. По уменьшению интенсивности сигнала – GABA обнаружено статистически значимое снижение уровня GABA, указывающее на инактивацию синтеза GABA. Выявлено отсутствие статистически значимых изменений интенсивности резонанса +GABA, что может быть следствием воздействия видеостимуляции на макромолекулы. Для проверки этой гипотезы с помощью специально разработанной импульсной последовательности инверсии-восстановления получен сигнал макромолекул и показано, что его интенсивность нечувствительна к видеостимуляции, и отсутствие изменений интенсивности сигнала +GABA при активации следует отнести к маскирующему эффекту сигнала макромолекул.

*Ключевые слова: <sup>1</sup>Н-МРС, GABA, MEGA-PRESS, макромолекулы, зрительная стимуляция.* **DOI:** 10.31857/S000630292001007X

Нарушения процессов, регулирующих концентрацию основного тормозного нейромедиатора γ-аминомаслянной кислоты (GABA), могут быть причиной развития церебральной патологии (шизофрении [1], депрессивного расстройства [2], тревожности [3], эпилепсии [4]).

Будучи основным тормозным нейромедиатором, GABA наряду с основным возбуждающим нейромедиатором глутаматом участвует в цикле

физико-химических процессов, обеспечивающих перенос высвобождающихся из везикул нейромедиаторов в астроциты, преобразование нейромедиаторов в глутамин, транспорт глутамина в нейроны, где он превращается в глутамат [5]. В ГАМКергических нейронах глутамат преобразуется глутаматдекарбоксилазой в GABA. Таким образом. единственным предшественником GABA является глутамат, поэтому основной тормозной нейромедиатор непосредственно связан с возбуждающим. Концентрация GABA связана с функцией коры: [GABA] коррелирует со скоростью принятия решений [6], эффективность распознавания ориентации линий изображения периферическим зрением тоже может быть соотнесена с уровнем GABA [7]. Эти данные

Сокращения: GABA — ү-аминомасляная кислота, MPC — магнитно-резонансная спектроскопия, ИП — импульсная последовательность, NAA — N-ацетиласпартат, tCr — фосфокреатин, Glx — сумма глутамина и глутамата, ЧСИ — частотно-селективный импульс, SNR — отношение сигнал/шум.

показывают, что прижизненные исследования содержания GABA в различных зонах мозга значимы как для клинических целей, так и для получения новой нейрохимической информации о механизмах биологических функций мозга. Единственным методом, позволяющим измерять церебральные концентрации метаболитов in vivo, является магнитно-резонансная спектроскопия (МРС). При помощи стандартных методик локализационной спектроскопии (импульсные последовательности (ИП) PRESS [8] и STEAM [9]) в мозге в зоне интереса можно определить концентрации ряда метаболитов, в том числе оценить содержание глутамата, однако для измерения GABA такие спектры не пригодны: все резонансы GABA ( ${}^{2}CH_{2}$  – химический сдвиг  $\delta$  = 3,01 м.д.;  $^{3}CH_{2} - \delta = 1,89$  м.д.;  $^{4}CH_{2} - \delta = 2,28$  м.д.) перекрыты интенсивными сигналами других метаболитов, присутствующих в мозге в концентрациях, порядок превышающих концентрацию на GABA (в сером веществе мозга [GABA] ~2,8 мМ, в белом - ~0,3 мМ [10]). К мешающим определению GABA сигналам относятся сигналы N-ацетиласпартата (NAA,  ${}^{2}CH_{3} - \delta = 2,01$  м.д.), креатина и фосфокреатина (tCr, N(CH<sub>3</sub>) –  $\delta$  = 3,03 м.д.), глутамина + глутамата (Glx,  ${}^{4}\text{CH}_{2} - \delta = 2,4$  м.д.) [11].

Для определения уровня GABA создана ИП MEGA-PRESS [12], которая позволяет из сигнала при  $\delta = 3,01$  м.д. вычесть интенсивный синглетный сигнал tCr. В этой ИП используется эффект спин-спинового (J)-взаимодействия и зависимость фазы сигналов в мультиплете от времени эха ТЕ (Ј-эволюция). В молекуле GABA протоны соседних метиленовых групп при  $\delta = 1,89$  м.д. и δ = 3,01 м.д. связаны Ј-взаимодействием, в результате которого резонанс при 3,01 м.д расщепляется в триплет с константой J = 7,35 Гц. J-эволюция вызывает расфазирование триплета, который при TE = 1/2J, превращается в триплет с внешними компонентами в противофазе к центральной компоненте. Применение частотно-селективного импульса (ЧСИ) на  $\delta = 1,9$  м.д рефокусирует Ј-эволюцию сигналов триплета, и он оказывается сфазированным. Очевидно, что влияние на J-эволюцию сигнала GABA не затрагивает сигнал tCr, перекрывающий интересующий нас триплет. В ИП MEGA-PRESS, в отличие от стандартной ИП PRESS, проводится набор двух серий спектров: В 
—серии в ИП PRESS добавляют ЧСИ на  $\delta_{\bigoplus} = 1,9$  м.д. В  $\ominus$ -серии ЧСИ прилагается симметрично относительно сигнала воды на  $\delta_{\Theta} = 7,6$  м.д. и не затрагивает область сигналов церебральных метаболитов, поэтому спектр — серии представляет собой стандартный PRESS-спектр. Вычитание спектров одной серии из спектров другой серии элиминирует сигнал tCr. Оставшийся редактированный сигнал при 3 м.д. является суперпозицией резонансов GABA, макромолекул и гомокарнозина, поэтому в дальнейшем ИП с приведенным выше расположением ЧСИ мы будем называть <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS. Вклад макромолекул в редактированный резонанс при использовании <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS составляет 50%, а гомокарнозина – 16% [13]. ИП <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS наиболее часто применяется для измерения уровня GABA, вероятно, в предположении, что изменения интенсивности этого сигнала могут быть следствием изменения исключительно GABA.

Из-за недостаточной селективности ЧСИ на  $\delta_{\bigoplus} = 1,9$  м.д воздействует не только на триплет GABA, но и на сигнал метиленовых протонов макромолекул при  $\delta = 1,7$  м.д., связанных J-взаимодействием с протонами макромолекул при  $\delta = 3$  м.д. с константой J = 7,8 Гц. Это обуславливает присутствие в спектрах <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS наличие сигнала макромолекул. Однако если в  $\ominus$ -серии использовать ЧСИ на  $\delta_{\ominus} = 1.5$  м.д., можно исключить сигнал макромолекул и получить сигнал GABA с минимальной примесью (гомокарнозин) [14]. Такой вариант ИП MEGA-PRESS мы в дальнейшем будем называть <sup>-GABA</sup>MEGA-PRESS.

Таким образом, в зависимости от расположения селективных импульсов в ⊖-серии сигнал GABA может быть зарегистрирован либо с макромолекулами (+GABA), либо без макромолекул (–GABA).

Подавление макромолекул приводит к снижению интенсивности сигнала на 3 м.д. и создает сложности при его обработке. Это объясняет частое использование ИП <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS для характеристики содержания GABA in vivo в локусах мозга человека. В состоянии покоя этим методом установлено, что вклад макромолекул в суммарный сигнал одинаков в пределах ошибки в разных корковых зонах (несмотря на разную интенсивность сигнала +GABA или сигнала макромолекул) и сохраняется со временем [15]. Обнаружено большее содержание макромолекул в сером веществе, чем в белом [16]. Однако неясно. что происходит в случае патологии или при нейроактивации. В ответ на двигательную нагрузку [6], активацию когнитивных функций [17], физическую активность [18] зафиксированы изменения интенсивности сигнала +GABA. Существуют лишь четыре исследования GABA в зрительной коре при видеостимуляции. В двух из них измеряли сигнал – GABA и обнаружили его снижение [19,20]. При измерении сигнала +GABA отмечается как увеличение [21], так и уменьшение его интенсивности [22].



Рис. 1. Расположение спектроскопического вокселя.

Таким образом, участие основного тормозного нейромедиатора в регуляции процессов возбуждения-торможения при нейроактивации изучено явно недостаточно. Имеющиеся данные получены с применением разных модификаций ИП MEGA-PRESS, что, возможно, приводит к неоднозначным результатам. Причиной может быть влияние нейроактивации не только на GABA, но и на макромолекулы. Присутствие сигнала макромолекул может маскировать эффекты изменения GABA [23]. Отсюда возникает необходимость исследовать влияние видеостимуляции на интенсивность сигналов +GABA и -GABA в <sup>1</sup>H-MPспектрах зрительной коры мозга человека, выделить сигнал макромолекул, оценить влияние нейроактивации на интенсивность сигнала макромолекул и определить, маскирует ли этот сигнал возможные изменения GABA.

В настоящей работе впервые исследовано влияние видеостимуляции на концентрацию макромолекул. Получены значения уровня GABA и суммарного уровня глутамина и глутамата в условиях постоянной видеостимуляции с использованием ИП <sup>-GABA</sup>MEGA-PRESS.

#### МЕТОДЫ

Объекты исследования. В исследовании приняли участие три группы добровольцев. Группа для исследования –GABA состояла из 16 человек (средний возраст 29  $\pm$  7 лет); измерение +GABA проводили в группе из 8 человек (средний возраст 25  $\pm$  3 лет); исследование макромолекул – в группе из 16 человек (25  $\pm$  7 лет). Все пациенты были

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

здоровы и ознакомлены с процедурой исследования.

Зрительная стимуляция. Исследование состояло из двух блоков одинаковой длительности (9 мин 36 с): «покоя» и «стимуляции». Для исключения незапланированной зрительной активации во время «покоя» освещение в аппаратной томографа было выключено заблаговременно, а испытуемого просили закрыть глаза. Затем испытуемого просили открыть глаза, включали экран (система SensaVue) и через систему зеркал предъявляли зрительную стимуляцию – шахматная доска, мерцающая с частотой 8 Гц. Внимание испытуемого оценивали по появляющимся с разными промежутками времени красным крестам на черном фоне (пять раз за две минуты), которые испытуемый должен был считать и на каждое пятое появление нажимать на кнопку, вызывавшую звуковой сигнал в аппаратной томографа.

Получение диагностических изображений с помощью магнитно-резонансной томографии. Все исследования выполнены на магнитно-резонансном томографе Achieva dStream 3T (Philips, Нидерланды) при помощи приемной катушки dStream HeadNeckSpine coil. Отсутствие очагового поражения и объемного процесса в головном мозга устанавливали по данным диагностической магнитно-резонансной томографии (Т1-, Т2взвешенные изображения, изображения с ослаблением сигнала свободной жидкости и диффузионно-взвешенные изображения). Спектроскопический воксел располагали в зрительной коре (рис. 1), которую визуализировали по данным функциональной магнитно-резонансной томографии [24].

Протокол получения данных методом магнитнорезонансной спектроскопии. В ИП <sup>-GABA</sup>MEGA-PRESS применяли следующие параметры: время эха (*TE*) = 80 мс, задержка на релаксацию (*TR*) = 2 с, число накоплений (NSA) = 288 (по 144 накопления на каждую серию), ЧСИ длительностью 20 мс применяли на  $\delta_{\oplus}$ = 1,9 м.д. в  $\oplus$ -сериях и  $\delta_{\Theta}$  = 1,5 м.д. в  $\ominus$ -сериях. В ИП <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS *TE* = 68 мс, ЧСИ длительностью 14 мс располагали на  $\delta_{\oplus}$ = 1.9 м.д. и  $\delta_{\Theta}$  = 7,5 м.д. Ј-модуляция изменяет вид мультиплета GABA в области 3 м.д. в разных сериях. Размер спектроскопического воксела для спектров макромолекул и –GABA: 20 × 40 × 30 мм<sup>3</sup>, для +GABA – 25 × 45 × 35 мм<sup>3</sup>.

Выделение сигнала макромолекул. Резонансы, принадлежащие макромолекулам, имеют низкое время продольной релаксации  $T_1$  [25]. Это дает возможность выделить сигнал макромолекул при  $\delta = 3$  м.д., используя инвертирующий импульс с последующим восстановлением макроскопиче-

ской намагниченности [25]. Для исключения сигналов GABA и гомокарнозина в области 3 м.д. применяли дополнительный инвертирующий импульс блочной формы шириной 50 Гц и временем инверсии *TI* = 530 мс. Этот импульс использовали как предварительный в обеих модификациях ИП MEGA-PRESS – для получения сигнала макромолекул в <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS и для оценки качества подавления сигналов метаболитов в <sup>-GABA</sup>MEGA-PRESS. Оценку остаточного сигнала в последнем случае проводили, сравнивая отношение сигнал/шум (SNR) в сигнале на 3 м.д. с макромолекулами и без них. В отношении сигнал/шум оценка сигнала производится как разница максимального и минимального значения в области  $\delta = 2,8-3,5$  м.д., а шум как стандартное отклонение среднего значения интенсивности шумовых дорожек в области 11-12 м.д. или 12-13 м.д после вычетания полиноминальной функции (n = 2) из спектра в каждой из этих областей. [26].

Обработка спектральных данных. Все спектры обрабатывали в программе GANNET [26] на базе МАТLAB. Программа автоматически подбирает параметры для аппроксимации резонансов одной гауссовой линией. Результатом обработки являлись значения интенсивностей сигналов +GABA, –GABA, макромолекул а также GLX, tCr (при обработке ⊖-серии в ИП -GABA MEGA-PRESS). Погрешность аппроксимации резонансов оценивали по выдаваемому программой параметру *CRLB* [27]. Из дальнейшего анализа исключали значения интенсивностей сигналов –GABA с погрешностью обработки > 20%, что уменьшило размер выборки с 15 до 10 человек.

Для нормировки интенсивностей в качестве референса использовали интенсивность tCr. Эффект видеостимуляции на параметры +GABA/Cr, -GABA/Cr, Glx/Cr и интенсивность сигнала макромолекул выявляли путем межгруппового сравнения данных, полученных в покое и в периоде видеостимуляции. Наборы данных проверяли на принадлежность к нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность эффекта оценивали по критерию Вилкоксона для связанных выборок [28].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Рис. 2а представляет спектр, полученный при использовании ИП  $^{-GABA}$ MEGA-PRESS с предварительным добавлением инвертирующего импульса. Спектр не содержит резонансных линий при  $\delta = 3$  м.д., сигнал подавлен. Для точной интерпретации результата проведена следующая количественная оценка. Среднее значение SNR в спектрах  $^{-GABA}$ MEGA-PRESS с инвертирующим



**Рис. 2.** MEGA-PRESS спектр (усредненный по 288 динамикам) с инвертирующим предварительным импульсом: (а) — с подавлением макромолекул, (б) — без подавления макромолекул. Как и ожидалось, сигнал при  $\delta = 3$  м.д. отсутствует.

импульсом составляет 1,76, в то время как в спектрах  $^{+GABA}$ MEGA-PRESS с таким же импульсом SNR = 7,42. Таким образом, наш метод обеспечивает подавление сигнала –GABA в 4,2 раза.

На рис. 2б представлен спектр <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS, полученный с использованием с инвертирующего импульса, в котором сигнал на 3 м.д. на 90% (см. обсуждение) соответствует сигналу макромолекул.

На рис. За изображены изменения интенсивности сигнала – GABA, нормированного на креатин, у каждого испытуемого. Видно, что в восьми случаях из десяти изменение отрицательное и



**Рис. 3.** (а) – Изменения относительной интенсивности сигнала –GABA в зрительной коре в состоянии покоя и активации у каждого испытуемого; (б) – сравнение медиан –GABA/Сг в покое и при зрительной стимуляции.

лишь в двух случаях — положительное. При помощи рангового критерия Вилкоксона установлено, что найденное изменение —GABA/Cr статистически достоверно. Из рис. Зб видно, что медиана изменения —GABA/Cr составляет 12% (p < 0.05).

В результате зрительной стимуляции не выявлено статистически достоверного изменения отношений Glx/Cr, +GABA/Cr, а также макромолекул.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение уровня GABA в ответ на зрительную стимуляцию. Полученный нами результат соответствует данным измерений сигнала GABA на томографе с напряженностью постоянного магнитного поля  $B_0 = 7$  Тл; авторы показали, что концентрация GABA в зрительной коре достоверно снижается на 5% под влиянием десятиминутной видеостимуляции [19]. Из данных работы [19] следует, что даже увеличение спектрального разрешения при  $B_0 = 7$  Тл не позволяет разделить сигналы GABA и макромолекул, и обнаруженный авторами эффект относится к сумме GABA и макромолекул, хотя вклад последних в этом случае должен уменьшиться. Вероятно, по этой причине эффект видеостимуляции меньше, чем обнаруженный нами по данным, полученным с помошью ИП <sup>-GABA</sup>MEGA-PRESS, когда сигнал макромолекул элиминирован полностью. В отличие от результатов, представленных в настоящей работе, исследование влияния такой же стимуляции с помощью <sup>+GABA</sup>MEGA-PRESS MPC в поле 3Т [22] обнаружило статистически значимое сни-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

жение +GABA/Cr. Противоположный по знаку эффект зрительного возбуждения, достоверный рост [+GABA], найден в работе [21]. Из приведенных данных следует, что снижение концентрации GABA наблюдается лишь в тех МРС-исследованиях, в которых удается избавиться от вклада макромолекул, тогда как измерения +GABA при зрительном возбуждении дают противоречивые результаты [21,22].

Мы не нашли изменения интенсивности сигнала Glx под влиянием видеостимуляции. Однако измерения глутамата в поле 7T, в котором разрешаются сигналы глутамата и глутамина, показали, что в ответ на зрительную стимуляцию содержание глутамата статистически значимо увеличивается на 3%, если стимул предъявляют в течение 10 мин [27], и на 2% – при блочной пятиминутной стимуляции [30].

После высвобождения из везикул глутамат почти полностью попадает в астроциты, где из него синтезируется глутамин, превращающийся после переноса в нейроны в глутамат [31]. Таким образом, взаимопревращение глутамата и глутамина в цикле может быть причиной постоянства Glx. К <sup>1</sup>Н-МРС-измерений сожалению. глутамина практически нет, за исключением исследования в поле 7Т с использованием зрительного возбуждения, под действием которого обнаружены противонаправленные и примерно одинаковые изменения (содержание глутамата увеличивается на  $0,22 \pm 0,11$  мМ, а содержание глутамина снижается на 0,18 ± 0,11 мМ) [32]. Это означает, что изменения суммарной концентрации глутамата и глутамина под влиянием видеостимуляции не будут наблюдаться, что соответствует нашим данным.

Из постоянства концентрации Glx могут следовать два вывода. Либо при активации зрительной коры глутамат участвует исключительно в цикле нейромедиаторов и не включается в другие процессы (например, окисление, синтез GABA), либо его концентрация пополняется за счет повышения потребления глюкозы. В пользу первого предположения свидетельствует обнаруженное нами снижение GABA, которое может быть следствием уменьшения расхода глутамата в синтезе GABA, а также следствием использования GABA в качестве субстрата вместо глутамата в цикле Кребса.

Содержание N-ацетиласпартата в ответ на длительную стимуляцию сохраняется. В нескольких цитированных ранее работах, выполненных на томографах с  $B_0 = 7$  Тл, исследовали влияние зрительной стимуляции на содержание метаболитов в зрительной коре и, как и в нашем исследовании, не зафиксировали статистически достоверного изменения суммарного содержания NAA и N-ацетиласпартат-глутамата [21,30]. Однако измерение суммарного содержания NAA и N-ацетиласпартат-глутамата с помощью ИП MEGA-PRESS в поле 3Т показало, что такой же, как использованный нами, способ видеостимуляции вызывает в зрительной коре испытуемых снижение суммарного содержания NAA и N-ацетиласпартат-глутамата на 60% и увеличение NAA на 18% [33]. Если учесть, что вклад NAA и N-ацетиласпартат-глутамата в суммарный сигнал составляет 10% и использовать данные работы [33], то следует ожидать снижения интенсивности суммарного сигнала tNAA примерно на 10%. По нашим данным, этот эффект зрительного возбуждения не наблюдается. Возможно, расхождение данных с нашими результатами объясняются разными способами оценки концентраций: авторы работы [33] измеряют не интегральные интенсивности сигналов, а высоты их пиков.

Таким образом, наблюдаемое в нашем исследовании постоянство tNAA в ответ на видеостимуляцию в основном совпадает с результатами тех авторов, которые использовали стандартную оценку эффектов видеостимуляции на основе интегральной интенсивности сигнала tNAA.

Маскировка эффекта более интенсивным сигналом макромолекул. В настоящей работе мы показали, что видеостимуляция влияет на интенсивность сигнала -GABA, тогда как интенсивность сигнала +GABA не изменилась. При этом интенсивность сигнала макромолекул в ответ на стимуляцию не изменяется. Отсюда можно сделать вывод, что сигнал макромолекул маскирует изменения GABA. Причина в том, что сигнал макромолекул значительно превышает по интенсивности сигнал GABA, это делает невозможным зафиксировать небольшой эффект изменения при текущем уровне погрешности. Согласно нашим измерениям, вклад макромолекул в суммарный сигнал при  $\delta = 3$  м.д. составляет ~63%, а GABA (и гомокарнозин) – соответственно 37%. Расчет выполнен, исходя из сравнения средних значений интенсивностей сигналов макромолекул и –GABA. В нашей работе погрешность обработки сигнала +GABA составляет ~10% (ошибка обработки, полученная в Gannet), при этом вклад зафиксированного изменения GABA (12%) в суммарный сигнал (+GABA) равен ~4%.

В то же время каждое третье измерение –GABA превышает погрешность обработки в 20% из-за низкого значения SNR. Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что измерение сигнала +GABA сопровождаются риском потери эффекта. При этом следует иметь в виду низкую интенсивность сигнала –GABA, что создает серьезные трудности при его обработке, а это означает необходимость улучшения методики для повышения значения SNR.

Оценка качества подавления сигналов метаболитов. На результат измерения сигнала макромолекул может повлиять неполное подавление сигнала GABA и гомокарнозина. По остаточному вкладу этих сигналов оценим возможность ложного постоянства сигнала макромолекул при видеостимуляции. До подавления доля GABA в общем сигнале +GABA равнялась 37%; после подавления она снизится до 12%, поскольку интенсивность сигнала макромолекул не изменится, а интенсивность GABA снизится в 4,2 раза. Снижение остающейся части GABA на 12% при видеостимуляции соответствует ~1,7% от измеренного сигнала макромолекул. Увеличение интенсивности сигналамакромолекул, превышающее данное значение, могло бы быть обнаружено в настоящей работе в отсутствие других факторов, влияющих на погрешность измерения. Таким образом, не более 2% от интенсивности сигнала макромолекул могут объясняться наличием остаточного сигнала -GABA в активированной зрительной коре.

Наблюдаемые макромолекулы не участвуют в процессе нейротрансмиссии. Общую характеристику резонансов макромолекул можно найти в работе [34]. Достоверных биохимических данных о структуре макромолекул все еще нет. В <sup>1</sup>Н-МР-спектрах мозга крысы *in vivo* сигналы этих соединений отнесены согласно их химическим сдвигам к метильным и метиленовым протонам аминокислотных остатков цитозольных белков или аполипопротеинов [34]. В частности, сигнал макромолекул на 3 м.д. соответствует структурному фрагменту с концевой группой  $-CH_2NH_2$ лизина (как и GABA). В настоящей работе в ответ на зрительную активацию изменение сигнала макромолекул на  $\delta = 3$  м.д. не выявлено. Это указывает на

отсутствие концентрационных, конформационных и структурных изменений макромолекул, затрагивающих фрагмент, резонирующий при  $\delta = 3$ м.д., под влиянием процесса нейротрансмиссии.

#### выводы

Из результатов настоящей работы можно сделать вывод, что макромолекулы со структурным фрагментом, резонирующим на 3 м.д., не вовлечены в процесс нейротрансмиссии при обработке зрительного стимула. Снижающийся в условиях нагрузки уровень GABA при постоянстве уровня Glx свидетельствует о роли тормозного нейромедиатора в обеспечении баланса процессов возбуждения-торможения в зрительной коре при длительной видеостимуляции.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-13-00030).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры были одобрены этическим комитетом Научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы, а также соответствовали Хельсинкской декларации о проведении исследований с участием людей.

Все участники исследования дали информированное согласие на участие в экспериментах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. D. A. Lewis, D. W. Volk, and T. Hashimoto, Psychopharmacology **174** (1), 143 (2004).
- G. Sanacora, G. F. Mason, D. L. Rothman, et al., Arch. Gen. Psychiatry 56 (11), 1043 (1999).
- A. W. Goddard, G. F. Mason, A. Almai, et al., Arch. Gen. Psychiatry 58 (6), 556 (2001).
- 4. O. A. Petroff and D. L. Rothman, Mol. Neurobiol. 16 (1), 97 (1998).
- 5. L. K. Bak, A. Schousboe, and H. S. Waagepetersen, J. Neurochem. **98** (3), 641 (2006).
- 6. A. Floyer-Lea, M. Wylezinska, T. Kincses, and P. M. Matthews, J. Neurochem. **95** (3), 1639 (2006).
- R. A. E. Edden, S. D. Muthukumaraswamy, T. C. A. Freeman, and K. D. Singh, J. Neurosci. 29 (50), 15721 (2009).

- P. A. Bottomley, Ann. N.-Y. Acad. Sci. 508 (1), 333 (1987).
- J. Frahm, K. D. Merboldt, and W. Hänicke, J. Magn. Resonance 72 (3), 502 (1987).
- P. K. Bhattacharyya, M. D. Phillips, L. A. Stone, and M. J. Lowe, Magn. Reson. Imaging 29 (3), 374 (2011).
- V. Govindaraju, K. Young, and A. A. Maudsley, NMR Biomed. 13 (3), 129 (2000).
- 12. M. Mescher, H. Merkle, J. D. Kirsch, et al., NMR Biomed. **11** (6), 266 (1998).
- S. J. Kish, T. L. Perry, and S. Hansen, J. Neurochem. 32 (6), 1629 (1979).
- R. A. Edden, N. A. Puts, and P. B. Barker, Magn. Reson. Med. 68 (3), 657 (2012). DOI: 10.1002/mrm.24391.
- 15. D. C. Shungu, X. Mao, R. Gonzales, et al., NMR Biomed. **29** (7), 932 (2016).
- M. Považan, G. Hangel, B. Strasser, et al., Neuroimage 121, 126 (2015).
- 17. L. Michels, E. Martin, P. Klaver, et al., PloS One 7 (4), e31933 (2012).
- R. J. Maddock, G. A. Casazza, D. H. Fernandez, and M. I. Maddock, J. Neurosci. 36 (8), 2449 (2016).
- R. Mekle, S. Kühn, H. Pfeiffer, et al., NMR Biomed. 30 (2), e3672 (2017).
- 20. C. Chen, H. P. Sigurdsson, S. Pépés, et al., NeuroImage **156**, 207 (2017).
- P. Bednařík, I. Tkáč, F. Giove, et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 35 (4), 601 (2015).
- 22. K. Kurcyus, E. Annac, N. M. Hanning, et al., J. Neurosci. **38** (46), 9967 (2018).
- 23. П. Е. Меньщиков, Н. А. Семенова, Т. А. Ахадов и др., Биофизика **62** (6), 1221 (2017).
- 24. А. В. Манжурцев, Н. А. Семенова, М. В. Ублинский и др., Изв. РАН. Сер. хим., № 6, 1630 (2016).
- 25. R. A. De Graaf, *In vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques* (John Wiley & Sons, 2019).
- 26. http://www.gabamrs.com.
- 27. S. Cavassila, S. Deval, C. Huegen, et al., NMR Biomed. **14** (4), 278 (2001).
- 28. https://www.stat.auckland.ac.nz/~wild/ChanceEnc/ Ch10.wilcoxon.pdf.
- 29. S. Mangia, I. Tkác, R. Gruetter, et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 27 (5), 1055 (2007).
- B. Schaller, R. Mekle, L. Xin, et al., J. Neurosci. Res. 91 (8), 1076 (2013).
- 31. A. Schousboe and U. Sonnewald, *Glutamate/-GABA-glutamine Cycle* (Springer International Pu, 2016).
- 32. Y. Lin, M. C. Stephenson, L. Xin, et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. **32** (8), 1484 (2012).
- 33. R. C. G. Landim, R. A. Edden, B. Foerster, et al., Magn. Reson. Imaging **34** (3), 239 (2016).
- K. L. Behar and T. Ogino, Magn. Reson. Medicine 30 (1), 38 (1993).

## The Effect of Visual Stimulation on GABA and Macromolecules Levels in Human Brain *in vivo*

A. Yakovlev\*, A. Manzhurtsev\*\*, \*\*\*, P. Menshchikov\*, M. Ublinskiy\*\*, \*\*\*, O. Bozhko\*\*\*, T. Akhadov\*\*\*, and N. Semenova\*, \*\*, \*\*\*

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

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

\*\*\*Clinical and Research Institute of Emergency Paediatric Surgery and Traumatology, ul. Bolshaya Polyanka 22, Moscow, 119180 Russia

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the brain and plays an important role in various types of synaptic plasticity and pathology. In present work, proton magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-MRS) and two modified MEGA-PRESS pulse sequences such as <sup>-GABA</sup> MEGA-PRESS and +GABA MEGA-PRESS were used to investigate the effect of visual stimulation on the GABA level in human visual cortex in vivo. With -GABA MEGA-PRESS it was possible to acquire <sup>1</sup>H-NMR-signal of methylene protons of GABA with the chemical shift  $\delta = 3.01$  ppm without signals from macromolecules. When +GABA MEGA-PRESS was implemented, the GABA signal was a superposition of resonances of methylene protons of GABA and macromolecules. The effect of constant visual stimulation on the level of N-acetylaspartate and total level of glutamate and glutamine was also estimated. Constant visual stimulation has no effect on the levels of N-acetylaspartate and glutamine in the visual cortex. -GABA signal intensity decreased with a statistically significant decrease in the level of GABA signal intensity leading to inactivation of GABA synthesis. No statistically significant changes in the intensity of +GABA resonance were found, probably due to the effect of visual stimulation on macromolecules. In order to test this hypothesis a signal from macromolecules was acquired using specifically-designed inversion-recovery pulse sequence. It was shown that the intensity of this signal is unaffected by visual stimulation and the lack of changes in the intensity of +GABA signal during stimulation has to be considered as the masking effect of macromolecular signal...

Keywords: <sup>1</sup>H-MRS, GABA, MEGA-PRESS, macromolecules, visual stimulation

УДК 577.336+ 57.01

## ОБРАЗОВАНИЕ ЛИПОФУСЦИНА У ДРОЗОФИЛ ПРИ НАГРЕВАНИИ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ОБЛУЧЕНИИ

© 2020 г. А.Е. Крылова, А.В. Чаплыгина, Н.Л. Векшин

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

> *E-mail: nvekshin@rambler.ru* Поступила в редакцию 04.09.2019 г. После доработки 04.09.2019 г. Принята к публикации 05.09.2019 г.

Проведено спектроскопическое изучение возникновения липофусцинового «мусора» в туловищах и головах дрозофил *Drosophila melanogaster* (*vestigial*) под действием повышенной температуры и интенсивного ультрафиолетового облучения. После часового воздействия температуры (48°С) или ультрафиолетового облучения в туловищах и головах дрозофил обнаруживается деградация триптофановых остатков белков, сопровождающаяся появлением голубой флуоресценции термолипофусцина или фотолипофусцина соответственно. Предполагается, что триптофановые остатки активно участвуют в формировании этих липофусцинов. Кроме того, наблюдалась термодеструкция и фотодеструкция ретиналя глазного родопсина.

Ключевые слова: липофусцин, ретиналь, Drosophila melanogaster, ультрафиолетовое облучение. **DOI:** 10.31857/S0006302920010081

Накопление внутриклеточного «мусора» липофусцина (этот общепринятый термин неудачен, так как не в каждом липофусцине много липидов) является одним из индикаторов старения организмов [1, 2]. При естественном старении, а также при воздействии некоторых вредных экологических факторов на животных количество внутриклеточного «мусора» увеличивается [3, 4]. В зависимости от условий в разных органах могут накапливаться различные виды липофусцина, сильно варьирующего по своему составу и свойствам [4-6]. Когда «мусора» накапливается слишком много, животное умирает [7-10]. Помимо накопления липофусцина, у старых животных увеличивается количество межбелковых сшивок [6, 11], уменьшается содержание цитохромов и флавинов [12] и т.д.

Хотя продолжительность жизни животных, как известно, сильно зависит от генетических особенностей и мутаций, никакой специальной «программы» смерти, о которой иногда говорят [13], у животных не существует [7].

Плодовые мушки (*Drosophila melanogaster*) являются удобным объектом для изучения естественного и искусственного старения [8–10, 13, 14], так как у них небольшая продолжительность жизни, высокая плодовитость, маленькие размеры и неприхотливость к условиям содержания. При комнатных температурах эти мушки живут обычно 20–30 суток. При понижении температуры, при особом питании и при отборе для размножения только молодых самок продолжительность жизни возрастает многократно [8].

Одним из экологических факторов, ускоряющих старение, является повышенная температура, активирующая образование перекиси водорода и перекисное окисление липидов, вызывающих денатурацию белков и накопление липофусцина в разных объектах [5, 7–9, 12, 14, 15]. Другим экологическим фактором является ультрафиолетовое облучение, которое может действовать аналогичным образом [8, 16, 17].

Целью данной работы является спектроскопическое изучение возникновения липофусцинового «мусора» в тушках и головах нелетающих дрозофил (*Drosophila melanogaster*, мутация vestigial) под действием двух экологических факторов – повышенной температуры и интенсивного ультрафиолетового облучения. Кроме того, показана деградация ретиналя глазного родопсина и его участие в образовании липофусцинового «мусора» в головах дрозофил после этих воздействий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на нелетающих дрозофилах *Drosophila melanogaster* (мутация vestigial) в возрасте 10–20 суток. Дрозофил выращивали и содержали согласно протоколу, описанному в работе [8]. Чтобы минимизировать влияние компо-



Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового воздействия на мушек повышенной температуры (48°С): 1 – туловище, контроль, 2 – туловище, опыт, 3 – голова, контроль, 4 – голова, опыт.

нентов пищи кишечника на регистрируемые показатели (оптическую плотность и флуоресценцию экстрактов туловищ и голов мушек), за восемь часов до опыта дрозофил оставляли без еды (давали только воду).

Для исследования воздействия повышенной температуры на мушек их помещали в пластиковую пятимиллилитровую пробирку типа Eppendorf, устанавливаемую в камеру термостата при 48°C на 1 ч.

Для облучения дрозофил ультрафиолетовым и видимым светом (250—800 нм) использовали ксеноновую лампу мощностью 450 Вт, дополнительно снабженную водным светофильтром (в большой кварцевой ячейке), ослабляющим ближний инфракрасный свет и полностью отрезающим среднее инфракрасное (тепловое) излучение (эта лампа моделирует естественное солнечное облучение, т.к. имеет сходный спектр). Живых мушек помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и облучали в течение 1 ч. При этом кювету держали открытой, чтобы не происходило сильного повышения температуры внутри кюветы.

Затем десять опытных и десять контрольных (без нагрева или облучения) мушек декапитировали, после чего отдельно гомогенизировали головы и отдельно — туловища. Гомогенизацию проводили путем тщательного растирания в фарфоровой ступке пестиком в 0,5 мл изопропанольно-водного (с соотношением 1 : 4) раствора с последующим добавлением еще 1,5 мл такого же раствора. Нерастворимые частицы (крылышки, ножки и др.) отбрасывали или отфильтровывали.

Все полученные экстракты проб были выровнены по величине поглощению при 280 нм для получения сходных концентраций по белку. Спектры поглощения экстрактов в ультрафиолетовой и видимой области регистрировали на спектрофотометре ПЭ-5400-УФ (ООО «Экохим», Санкт-Петербург). Спектры флуоресценции экстрактов снимали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см по известным методикам [17, 18].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В спектрах поглощения экстрактов голов дрозофил наблюдаются две интенсивные полосы – в районе 260–290 нм и 420–520 нм (рис. 1). Первая обусловлена в основном ДНК (260 нм) и белками (270 нм – тирозины, 280 нм – триптофаны) [17, 18], а вторая – ретиналем, принадлежащем родопсину пигментных клеток глаз [19]. Кроме того, имеется слабая, едва заметная полоса в районе 330–370 нм. В этой области поглощают флавины, НАДН, НАДФН, антраниловая кислота и липофусцин [7, 11, 18], количество которых у дрозофил мало и не определенно.

После часового воздействия на дрозофил повышенной температуры (48°С) в спектрах поглощения наблюдается уменьшение оптической плотности в ультрафиолетовой области (рис. 1). В туловищах снижение оптической плотности в ультрафиолетовой области обусловлено исключительно деградацией триптофановых остатков белков. Об этом свидетельствует то, что уменьшается поглощение при 280 нм, но не при 260 нм. ДНК при умеренном нагреве не деградирует. В случае же голов после нагрева в спектре в ультрафиолетовой области не возникает коротковолнового сдвига. Это связано с тем, что значительный вклад в ультрафиолетовую полосу экстрактов голов дает ретиналь глазного родопсина, а не триптофаны белков. Ретиналевая полоса в видимой области после часового нагрева мушек уменьши-



**Рис. 2.** Спектры поглощения экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового ультрафиолетового облучения мушек: *1* – туловище, контроль, *2* – туловище, опыт, *3* – голова, контроль, *4* – голова, опыт.

лась вдвое. Значит, при высокой температуре происходит повреждение пигментных клеток глаз, сопровождающееся окислением и деградацией ретиналя. Деградировавший ретиналь можно рассматривать как внутриклеточный «мусор».

Аналогичные изменения возникают после часового ультрафиолетового облучения дрозофил (рис. 2), причем ароматические аминокислоты в этом случае деградируют сильнее, чем при нагревании, а ретиналь — почти настолько же. Интенсивный ультрафиолетовой свет поглощается триптофановыми и тирозиновыми остатками белков, вызывая денатурацию, а интенсивный видимый свет поглощается глазным ретиналем родопсина, вызывая его деградацию.



Рис. 3. Спектры голубой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового воздействия на мушек повышенной температуры (48°С): 1 – туловище, контроль, 2 – туловище, опыт, 3 – голова, контроль, 4 – голова, опыт. Возбуждение флуоресценции – 360 нм.

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

Поскольку спектрофотометрически детектировать липофусцин практически невозможно (слишком слаба полоса в районе 360 нм из-за его малого количества), то он был детектирован спектрофлуориметрически. Одним из свойств липофусцина является его интенсивная флуоресценция в голубой области при возбуждении в ближней ультрафиолетовой области [12, 16, 20]. При этом наибольший вклад часто вносит митохондриальный липофусцин [5, 6, 10, 12, 16].

В спектре изопропанольно-водных экстрактов контрольных дрозофил видна полоса голубой флуоресценции (при возбуждении на 360 нм, см. рис. 3). Интенсивность и положение максимума спектров экстрактов туловищ и голов различаются. В экстрактах туловищ голубая полоса втрое сильней, чем в экстрактах голов, и имеет максимум при 410 нм, а не при 435 нм. В голубую полосу могут вносить неопределенный вклад несколько флуорофоров: шиффовый хромофор липофусцина, НАДН, НАДФН, антраниловая кислота и др., что, по-видимому, и обусловливает существенный спектральный сдвиг между экстрактами из туловищ и голов.

После часового прогрева дрозофил при температуре 48°С в экстрактах туловищ возникает очень интенсивная полоса с максимумом при 420 нм (рис. 3), принадлежащая исключительно образовавшемуся термолипофусцину. Спектр термолипофусцина сдвинут в длинноволновую сторону относительно исходной полосы (до нагрева). Нельзя исключить, что одной из флуорофорных групп термолипофусцина является антраниловая кислота – продукт деградации белкового триптофана.

В экстрактах голов после часового прогрева дрозофил при температуре 48°С интенсивность голубой полосы возрастает вдвое, но без суще-



**Рис. 4.** Спектры голубой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил до и после часового ультрафиолетового облучения мушек: 1 — туловище, контроль, 2 — туловище, опыт, 3 — голова, контроль, 4 — голова, опыт. Возбуждение флуоресценции — 360 нм.

ственного спектрального сдвига (рис. 3). Значит, в этом случае термолипофусцин сильно схож с исходным липофусцином. Можно предположить, что они оба в значительной степени являются продуктами деградации ретиналя, а не только белков.

После часового ультрафиолетового облучения дрозофил в спектрах голубой флуоресценции экстрактов туловищ и голов наблюдаются явления, аналогичные наблюдаемым при нагреве (рис. 4). Однако, в отличие от нагрева, для экстрактов туловищ при этом не наблюдается длинноволнового сдвига. Фотолипофусцин туловищ отличен от термолипофусцина туловищ. В случае же голов фотолипофусцина туловищ. В случае же голов фотолипофусцин спектрально не отличается от исходного липофусцина голов. Вероятно, фотолипофусцин голов в значительной степени является продуктом фотодеградации ретиналя, а не только триптофановых остатков белков.

Предположение о важной роли триптофановых остатков белков в формировании голубой флуоресценции термолипофусцина и фотолипофусцина подтверждается данными по белковой флуоресценции.

На рис. 5 приведены спектры белковой флуоресценции экстрактов туловищ и голов после часового воздействия на дрозофил повышенной температуры. В обеих пробах после воздействия обнаруживается снижение интенсивности триптофановой полосы. Это согласуется со спектрофотометрическими данными. Значит, количество триптофановых остатков после прогрева дрозофил действительно заметно уменьшается. По-видимому, термолипофусцин, как и фотолипофусцин, образуется из любых триптофансодержащих белков. Повышенная температура может



Рис. 5. Спектры белковой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил после часового воздействия повышенной температуры (48°С): 1 – туловище, контроль, 2 – туловище, опыт, 3 – голова, контроль, 4 – голова, опыт. Возбуждение флуоресценции – 280 нм.

приводить как к образованию шиффовых оснований белков с окисленными липидами, так и к деградации триптофановых остатков до антраниловой кислоты. В обоих случаях должна возникать голубая флуоресценция термолипофусцинового «мусора» (при возбуждении на 360 нм), что и наблюдалось нами (см. рис. 3).

Сходное, но еще более выраженное падение триптофановой флуоресценции наблюдается в экстрактах туловищ после часового ультрафиолетового облучения (рис. 6). В экстрактах голов снижение тоже имело место, но было существенно меньше. Данный факт хорошо согласуется с тем, что при ультрафиолетовом облучении дрозофил в их головах возникает мало фотолипофусцина (рис. 4). Это можно объяснить тем, что ретиналь, поглощая ультрафиолетовой свет, экранирует собой белки, защищая триптофаны от ультрафиолетового воздействия. Вероятно, именно поэтому белки туловищ менее подвержены фотодеструкции, чем белки голов.

Вышеприведенные результаты хорошо согласуются с ранее полученными на митохондриях печени крысы [1, 6, 16,] и на нематодах [11] данными о важной роли деградации триптофановых остатков в формировании двух типов внутриклеточного «мусора» — нефлуоресцирующих межбелковых сшивок и флуоресцирующего липофусцина.

Итак, возникновение липофусцинового «мусора» в тушках и головах нелетающих дрозофил (Drosophila melanogaster, vestigial) под действием повышенной температуры или интенсивного ультрафиолетового облучения весьма сходно. Оно в значительной степени обусловлено дегра-


Рис. 6. Спектры белковой флуоресценции экстрактов туловищ и голов дрозофил после часового ультрафиолетового облучения: 1 – туловище, контроль, 2 – туловище, опыт, 3 – голова, контроль, 4 – голова, опыт. Возбуждение флуоресценции – 280 нм.

дацией триптофановых остатков белков и ретиналя.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность А.М. Львову за участие в проведении предварительных экспериментов.

#### 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. U. T. Brunk and A. Terman, Eur. J. Biochem. **269**, 1996 (2002).
- 2. A. Terman and U. T. Brunk, Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. **106** (2), 265 (1998).
- 3. A. Höhn and T. Grune, Redox Biol. 1, 140 (2013).
- T. Jung, N. Bader, and T. Grune, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1119, 97 (2007).
- 5. А. В. Чаплыгина и Н. Л. Векшин, Биофизика **64** (1), 101 (2019).
- А. В. Чаплыгина и Н. Л. Векшин, Успехи геронтологии 31 (2), 197 (2018).
- 7. Н. Л. Векшин и М. С. Фролова, Биофизика **64** (1), 162 (2019).
- N. Linford, C. Bilgir, J. Ro, and S. Pletcher, J. Visual. Exp. 71, 1 (2013).
- 9. J. Miquel, P. Lundrgen, K. Bensch, and H. Atlan, Mechanisms of Ageing and Development 5, 347 (1976).
- F. Scialo, A. Sriram, J. Enriquez, et al., Cell Metabolism 23, 725 (2016).
- 11. Е. Л. Гагаринский и Н. Л. Векшин, Успехи геронтологии, № 5, 676 (2017).
- M. S. Frolova and N. L. Vekshin, Biochem. & Analyt. Biochem. 7 (3), 357 (2018).
- D. Denton, M. T. Aung-Htat, and S. Kumar, Biochim. Biophys. Acta 1833, 3499 (2013).
- 14. F. Wood and J. H. Nordin, Insect. Biochem. 10, 95 (1980).
- 15. R. S. Sohal, I. Svensson, and U. T. Brunk, Mechanisms of Ageing and Development **53**, 209 (1990).
- М. С. Фролова, А. М. Сурин, А. В. Браславский и Н. Л. Векшин, Биофизика 60 (5), 1125 (2015).
- 17. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, 2002).
- N. L. Vekshin, *Fluorescence Spectroscopy of Biomacro*molecules (Photon-Vek, Pushchino, 2009).
- F. Schutt, B. Ueberle, M. Schnölzer, et al., FEBS Lett. 528 (1–3), 217 (2002).
- 20. H. Donato and R. S. Sohal, Exp. Gerontol. 13 (3–4), 171 (1978).

## The Formation of Lipofuscin in Drosophila after Exposure to Elevated Temperature and UV Radiation

## A.E. Krylova, A.V. Chaplygina, and N.L. Vekshin

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

In this work, we studied by spectroscopy how exposure to elevated temperature regime or intense UV radiation leads to the occurrence of lipofuscin debris in carcasses and heads of *Drosophila melanogaster (vestigial)*. After one-hour exposure to elevated temperature ( $48^{\circ}$ C) or UV radiation degradation of tryptophan residues followed by the appearance of blue fluorescence of thermo-lipofuscin or photo-lipofuscin, respectively, was observed in Drosophila carcasses and heads. Evidence suggests that tryptophan residues are actively involved in the formation of these lipofuscins. Thermal and photo-destruction of retinal of the eye rhodopsin were also seen.

Keywords: lipofuscin, retinal, Drosophila melanogaster, ultraviolet irradiation

——— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ =

УДК 577.352.4+576.314.63

## МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ

© 2020 г. П.В. Мокрушников

Новосибирский государственный архитектурно-строительный университет («Сибстрин»), 630008, Новосибирск, ул. Ленинградская, 113 E-mail: pwm64@ngs.ru

Поступила в редакцию 17.05.2019 г. После доработки 29.09.2019 г. Принята к публикации 30.09.2019 г.

Развитие нанотехнологий, искусственное получение наночастиц оксидов металлов с размерами от 1 до 100 нм поднимает вопрос о биологической безопасности таких наночастиц. Наночастицы размером менее 10 нм способны проникнуть в кровоток, а оттуда уже в различные органы – мозг, печень, почки, легкие, селезенку. Наночастицы – патогенный экзогенный фактор, меняющий структуру и функции природных биомембран. Ранее было установлено *in vitro*, что в мембрану проникают наночастицы, имеющие радиус меньше критического значения  $R_{\rm cr}$ . При этом микровязкость липидного бислоя биомембран уменьшается, образуются сквозные поры, которые могут слиться в трещины и разрушить мембрану. Если радиус наночастиц больше критического, то они адсорбируются на поверхности мембран, увеличивая их микровязкость. В обоих случаях наночастицы нарушают нормальное функционирование природных биомембран и клеток. В представленной работе дана термодинамическая модель прямого (не за счет эндоцитоза) проникновения наночастиц увеличивается значение  $R_{\rm cr}$ .

Ключевые слова: плазматические мембраны, механические напряжения в биомембранах, структурные переходы в биомембранах, взаимодействие наночастиц и биомембран. DOI: 10.31857/S0006302920010093

Наночастицы оксидов металлов находят широкое применение в машиностроении, космосе, химической промышленности, электронике, косметике и т.п. [1]. Развитие нанотехнологий, искусственное получение наночастиц с размерами от 1 до 100 нм поднимает вопрос об их биологической безопасности. Наночастицы размером меньше 10 нм способны проникнуть в кровоток, а оттуда уже в различные органы: мозг, печень, почки, легкие, селезенку [2]. Установлено, что наночастицы — патогенный экзогенный фактор, меняющий структуру и функции биологических мембран [3, 4].

Наночастицы, взаимодействуя с эритроцитами, меняют микровязкость и механические напряжения липидного бислоя их мембран [3, 4]. Экспериментально *in vitro* установлено, что механические напряжения в биомембране влияют на активность некоторых мембранных белков [5, 6]. Это объясняется структурными изменениями в биомембранах [7–9]. Известно, что механические напряжения и структурные изменения в биомембранах влияют на некоторые функции эритроцитов, например, на их способность проходить через микрокапилляры [10–12]. На механические напряжения в мембранах влияют экзогенные и эндогенные факторы, например присутствие гормонов [13, 14], белков плазмы крови [15], витамина Е [16]. Изменение микровязкости мембран эритроцитов является, по-видимому, одним из механизмов приспособления человеческого организма к суровым условиям Крайнего Севера [17, 18]. Попадание внутрь организма человека наночастиц может помешать работе такого приспособительного механизма.

Полученные в этих работах результаты позволили сформулировать общий принцип, согласно которому нативная мембрана эритроцита в крови при физиологических параметрах крови находится в состоянии структурного перехода. Под этим понимается следующее. Природная биомембрана состоит из белок-липидных доменов, в которых укладка молекул более плотная, и мезополос разрыхления липидного бислоя между доменами с менее плотной укладкой молекул [7, 13, 14]. Домены и мезополосы разрыхления образуют мозаичную структуру биомембраны, соотношение занимаемых ими площадей постоянно меняется. В нативных природных биомембранах идет постоянный процесс перестройки структуры. Небольшие изменения pH крови, концентрации гормонов в крови, ее температуры резко изменяют конформацию биомембраны, ее функции с помощью изменения поля механических напряжений в биомембране [13, 14]. Под конформацией нативной природной биомембраны понимается не только состав ее белков и липидов, но и конформация мембранных белков и фазы липидного бислою, распределение белков и липидов по бислою.

Наночастицы, взаимодействуя с мембранами эритроцитов, тоже способны резко менять конформацию биомембран, делая невозможным выполнение биомембранами их функций [3, 4]. В этом и заключается цитотоксичность наночастиц. Уже при концентрации 10<sup>-15</sup> моль/мг белка наночастиц кварца или корунда во взвеси эритроцитов наблюдаются изменения рельефа поверхности эритроцитов [3, 4]. Крупные наночастицы, обладающие размером больше критического, адсорбируются на поверхности мембран, неспецифически связываясь с молекулами фосфолипидов бислоя, образуя с ними электростатические, ван-дер-ваальсовы, гидрофобные связи и увеличивая микровязкость липидного бислоя и механические напряжения в мембране. Наночастицы кварца и корунда не вызывают заметного тушения собственной флуоресценции триптофанильных радикалов мембранных белков [3, 4]. Это значит, что не происходит конформационных изменений в мембранных белках, наночастицы связываются с белками очень слабо. Крупные наночастицы внутрь бислоя не проникают, конформацию белков они сильно не изменяют. Похожая ситуация наблюдается при взаимодействии клеток с гормонами [13, 14]. Более гидрофильные гормоны хуже проникают в гидрофобный липидный бислой, слабее связываются с белками. Изменение микровязкости мембран при воздействии на них более гидрофильных гормонов ниже, чем при воздействии более гидрофобных [13, 14]. Возможно, неспецифическому связыванию гормонов и гидрофильных наночастиц с гидрофильными участками белков, находящихся на поверхности мембраны, препятствуют молекулы воды, гидратированные на полярных участках мембранных белков. По-видимому, гидратированные молекулы воды, связываясь с гидрофильными наночастицами или гормонами, уменьшают энергию системы «белок-вода-наночастица» за счет ограничения своей подвижности. Происходит стабилизация системы, уменьшается вероятность того, что наночастицы или гормоны могут напрямую неспецифически связаться с мембранными белками [13, 14].

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

Если размер наночастиц меньше критического, то они проникают в мембрану. При этом происходит снижение микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов, что говорит об уменьшении плотности упаковки липидного бислоя. Структура биомембраны разрыхляется. Несколько пор в поверхности биомембраны, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга, сливаются между собой с образованием трещин на поверхности биомембраны. Постепенное увеличение количества таких трещин на поверхности приводит к деградации мембраны эритроцита и дальнейшему ее разрушению [3, 4]. Появившиеся после внедрения наночастиц в бислой поры уменьшают средние механические напряжения в биомембране. Возникает снятие механического напряжения в биомембране (разрыхление структуры липидного бислоя), оно передается липидам, которые прилегают к интегральным белкам (преимущественно связанным с цитоскелетом эритроцита – спектрин-актин-анкириновой сетью). Таким образом, снижается также микровязкость и в области белок-липидного взаимодействия. В данном случае можно полагать, что структурные переходы в эритроцитарных мембранах инициируются в основном в области липид-липидных взаимодействий. Действие на белки передается за счет кооперативности гетероструктуры биомембраны.

Экспериментально *in vitro* показана возможность прямого (не за счет эндоцитоза) проникновения нанокристаллов оксидов металлов в мембраны эритроцитов [3, 4]. В мембрану проникают нанокристаллы, имеющие радиус меньше критического значения  $R_{\rm cr}$ . Значение  $R_{\rm cr}$  для корунда (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) составляет от 15 до 20 нм (дзета-потенциал поверхности равен +15 мВ). Значение R<sub>сг</sub> для кварца (SiO<sub>2</sub>) составляет 5-8 нм (дзета-потенциал поверхности равен -35 мВ). Установлено, что значение критического радиуса зависит от дзетапотенциала наночастицы [3, 4]. Механизм внедрения нанокристаллов в биомембраны оставался неясным. В нашей работе приведена термодинамическая модель прямого (не за счет эндоцитоза) проникновения наночастиц в липидный бислой мембраны.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Встраивание наночастиц в бислой обусловлено гидрофобным эффектом. В эксперименте давление и температура остаются постоянными [3, 4]. Термодинамическим методом можно рассчитать значение критического радиуса наночастицы, при котором она встраивается в биомембрану. В результате тепловых колебаний бислоя наночастица может выйти из мембраны. После ее выхода из мембраны в последней остается пора,



Участок биомембраны с наночастицей: 1 – липид бислоя, 2 – наночастица радиусом r и высотой 2r, h – толщина бислоя.

если радиус поры больше некоторого значения [19, 20]. Для простоты расчетов примем, что рассматриваемые наночастицы – круглые цилиндры высотой 2r и радиусом r (рис. 1). На рис. 1 изображен участок биомембраны со встроенной наночастицей: 1 – липид бислоя, 2 – наночастица радиусом *г* и высотой 2*г*, *h* – толщина бислоя. В своей модели мы предполагаем, что наночастица при встраивании в мембрану не взаимодействует с гидрофобными участками мембранных белков (вероятность близкого расположения наночастицы и белка мала). Поверхность поры выстилают полярные группы фосфолипидов. Толщина мембраны около поры немного увеличивается [21, 22]. Этим увеличением в нашей модели пренебрегаем. До встраивания наночастиц в бислой они окружены сольватным слоем молекул связанной воды, белков, ионов. Молекулы сольватного слоя образуют водородные связи с полярными группами на поверхности наночастиц. Часть этих молекул теряет свою подвижность, «замораживается». При встраивании наночастицы в бислой молекулы его сольватной оболочки сдергиваются с нее липидами бислоя. Происходит «размораживание» этих молекул. Водородные связи между молекулами сольватной оболочки и полярными группами поверхности наночастицы замещаются водородными связями между полярными группами поверхности наночастицы и головок фосфолипидов.

Ранее были получены оценки критического размера водной поры, самопроизвольно образующейся в липидном бислое [19, 20]. Изменение свободной энергии липидного бислоя при этом равно

$$\Delta G = 2\pi \mathbf{r} \cdot \gamma - \pi \mathbf{r}^2 \left( \tilde{\gamma} + \Delta C_0 \cdot \frac{|\Delta \varphi|^2}{2} \right),$$

где  $\gamma$  – линейное натяжение кромки поры, r – радиус поры,  $\widetilde{\gamma}$  – энергия поверхностного натяжения мембраны,  $\Delta \phi$  – разность электрических потенциалов на внутренней и внешней поверхностях мембраны,  $\Delta C_0$  — изменение удельной электрической емкости мембраны после появления в ней поры.

При встраивании наночастицы в мембрану в выражении для изменения энергии Гиббса системы «мембрана-наночастица» нужно дополнительно учесть гидрофобный эффект, равный изменению энтропии «размороженных» молекул, умноженной на температуру. Нужно учесть работу электрического поля мембраны по встраиванию наночастицы в мембрану (взятого с обратным знаком). Эта работа появляется из-за наличия заряда на поверхности наночастицы. Одна из возможностей образования заряда на неметаллических частицах - поверхностная диссоциация твердой фазы, которая содержит какие-либо функциональные группы, способные к электролитической диссоциации. В буфере вокруг наночастицы образуется двойной электрический слой, который характеризуется дзета-потенциалом [23]. Таким образом, при встраивании наночастицы в мембрану изменение энергии Гиббса системы «мембрана-наночастица» равно:

$$\Delta G_1 = \Delta G - T \cdot \Delta S \cdot 2\pi r \cdot h - q \frac{|\Delta \varphi|}{2}, \qquad (1)$$

где  $\Delta S$  — увеличение энтропии молекул при их «размораживании» на единицу площади наночастицы; h — толщина мембраны, q — заряд наночастицы. Предполагаем, что радиус поры совпадает с радиусом наночастицы.

Наночастица будет встраиваться в мембрану, если изменение энергии Гиббса бислоя и нанокристалла  $DG_1$  будет меньше нуля. Сделаем оценки для величин, входящих в  $DG_1$  согласно выражению (1). До вхождения нанокристалла в бислой этот участок бислоя представлял из себя заряженный конденсатор. После вхождения наночастицы конденсатор исчезал. Разность электрических потенциалов на наружной стороне плазматической мембраны и на ее внутренней стороне созда-

ется в основном за счет разности концентраций ионов. Разность концентраций ионов поддерживается работой  $Na^+, K^+$ -АТФаз мембран [24]. Толщина слоя этих ионов, прилегающего к мембране, очень мала. Высота наночастицы (2*r*) больше толщины мембраны *h*. В модели предполагается, что слой ионов, создающих разность потенциалов в биомембране, не обвалакивает наночастицу. Изменение энергии при этом равно

$$\Delta C_0 \cdot \frac{\left|\Delta \varphi\right|^2}{2} = -\frac{\varepsilon_{\pi} \cdot \varepsilon_0}{h} \cdot \frac{\left|\Delta \varphi\right|^2}{2}, \qquad (2)$$

где  $\varepsilon_{\pi}$  – диэлектрическая проницаемость липидного бислоя,  $\varepsilon_0$  – электрическая постоянная. В экспериментах [3, 4] измеряли дзета-потенциал  $\varphi(x)$  наночастиц, который связан с поверхностным потенциалом  $\varepsilon_0$  следующим соотношением [24]:

$$\varphi(x) = \varphi_0 \cdot \exp(-\chi \cdot x). \tag{3}$$

Здесь *х* — расстояние от плоскости скольжения до поверхности наночастицы:

$$\chi = \left(\frac{2 \cdot z^2 \cdot C_0 \cdot F_0^2}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot R \cdot T}\right)^{1/2}$$

где z – валентность ионов буфера, T – абсолютная температура буфера,  $F_0$  – число Фарадея,  $C_0$  – средняя концентрация ионов в буфере,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость буфера, R – газовая постоянная. При выводе соотношения (3) считаем, что буфер – симметричный электролит.

Заряд на поверхности наночастицы q можно оценить по формуле заряда для заряженной сферы, поскольку наночастица в виде цилиндра с высотой 2r и радиусом r близка по форме к сфере радиусом r:

$$q = \frac{\varepsilon_{\rm cr} \cdot \varphi_0}{k} r, \tag{4}$$

где  $\varepsilon_{cr}$  — диэлектрическая проницаемость нанокристалла,  $k = 1/4\pi\varepsilon_0$ . Энтропийный член можно записать в виде

$$T \cdot \Delta S \cdot 2\pi \cdot r \cdot h = \Delta G_{\text{гидр}} \cdot \frac{2\pi \cdot r \cdot h \cdot 4}{\pi \cdot D^2 \cdot c_{\text{г}} \cdot N_{\text{A}}}, \quad (5)$$

где  $\Delta G_{\text{гидр}}$  — энергия гидрофобного взаимодействия, D — диаметр молекулы воды,  $N_{\text{A}}$  — число Авогадро,  $c_{\text{г}}$  — коэффициент гидрофобности сольватной оболочки наночастицы. Коффициент гидрофобности показывает, какая часть молекул сольватной оболочки лишилась подвижности, «заморозилась». Если выражения (2) — (5) подставить в уравнение (1) и приравнять к нулю, то можно получить выражение для критического значения радиуса наночастицы  $R_{\text{сr}}$ :

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

$$R_{\rm cr} = \frac{\Delta G_{\rm {\tiny FHZP}} \cdot \frac{8h}{D^2 \cdot c \cdot N_{\rm A}} + \frac{\phi_0 \varepsilon_{\rm cr}}{k} \cdot \frac{|\Delta \phi|}{2} - 2\pi\gamma}{\frac{\pi \varepsilon_0 \varepsilon_{\rm cr}}{h} \cdot \frac{|\Delta \phi|^2}{2} - \pi\tilde{\gamma}}.$$
 (6)

При радиусе цилиндра наночастицы меньше  $R_{\rm cr}$  энтропийный член в выражении (1) для свободной энергии будет превышать энергию связи «выбитых» липидов и внедрение наночастицы в бислой будет термодинамически выгодным, так как в этом случае значение  $\Delta G_1 < 0$ . Если наночастица заряжена отрицательно (в выражении (6)  $\varphi_0 \leq 0$ ), это затрудняет ее внедрение в мембрану. В этом случае ей нужно преодолеть силы электростатического отталкивания, критический радиус  $R_{\rm cr}$  из выражения (6) уменьшается. Напротив, если наночастица заряжена положительно, то электростатические силы помогают ей внедриться в бислой. Критический радиус  $R_{\rm cr}$  из выражения (6) при этом увеличивается.

Сделаем оценки критических радиусов наночастиц для оксидов кремния и алюминия. По литературным данным можно взять следующие значения: линейное натяжение кромки поры  $\approx 10^{-11}$  H, энергия поверхностного натяжения мембраны  $\tilde{\gamma} \approx 0.03$  мН/м, толщина мембраны  $h \approx 10^{-8}$  м, разность электрических потенциалов на внутренней и внешней поверхностях мембраны  $\Delta \phi = 0.5$  В, диэлектрическая проницаемости липидного бислоя  $\varepsilon_{\pi} = 3$ , диаметр молекулы воды  $D \approx 0,28$  нм, расстояние от плоскости скольжения до поверхности наночастицы  $x \approx 2D$ , коэффициент гидрофобности сольватной оболочки наночастицы  $c_{\Gamma} =$ 90, диэлектрическая проницаемость наночастиц кварца  $\varepsilon_{cr} = 4$ , дзета-потенциал наночастиц кварца  $\phi(x) = -35$  мВ, диэлектрическая проницаемость наночастиц оксида алюминия  $\varepsilon_{cr} = 10$ , дзета-потенциал наночастиц оксида алюминия  $\varphi(x) = 15$  мВ, концентрация анионов в буфере  $C_0 = 140$  мМ/л, валентность ионов буфера z = 1, диэлектрическая проницаемость буфера є =120 [24]. Подставив эти величины в выражение (6), получим величины критических диаметров наночастиц кремния 6 нм, оксида алюминия – 20 нм.

Действительно, ранее экспериментально установлено, что значение  $R_{\rm cr}$  для корунда  ${\rm Al_2O_3}$  составляет 15–20 нм (дзета-потенциал поверхности +15 мВ). Значение  $R_{\rm cr}$  для кварца SiO<sub>2</sub> составляет 5–8 нм (дзета-потенциал поверхности –35 мВ) [3, 4]. Чем выше дзета-потенциал поверхности, тем выше и критический радиус наночастицы. Наночастицы с большим радиусом, чем  $R_{\rm cr}$ , просто адсорбируются на поверхности и не разрушают биомембрану. Можно предположить, что при радиусах наночастиц, меньших некоторого значения  $R_{\min}$ , поры в мембранах не будут появляться. После выхода наночастиц такого размера из мембран образованные ими поры будут затягиваться. В работе [20] приведена оценка для  $R_{\min}$ :

$$R_{\min} = \frac{\gamma}{\tilde{\gamma} + \frac{\varepsilon_0 \left(\varepsilon_{\rm B} - \varepsilon_{\rm A}\right)}{h} \cdot \frac{\left|\Delta\phi\right|^2}{2}}.$$

Подставляя приведенные выше значения, получим  $R_{\min} = 1.1$  нм. Можно сделать вывод, что происходит разрушение мембраны эритроцита при взаимодействии с наночастицами радиусом  $R_{\min} \le r \le R_{cr}$ . Этот процесс нарушает транспортные функции эритроцитов, ускоряет процессы старения красных кровяных клеток. Все эти факторы могут привести к различным сердечно-сосудистым заболеваниям у человека уже в довольно молодом возрасте. Наночастицы такого рода, проникнув через ядерную мембрану, могут «прилипать» к различным органеллам или образовывать аддукты ДНК, способные вызывать структурные разрушения и мутации [1, 2].

Становится понятно, почему некоторые косметические кремы и скрабы являются опасными для кожи. Кристаллы минералов, используемых в этих кремах, измельчаются до очень маленького размера. Если этот размер меньше  $R_{\rm cr}$  для данного кристалла, то наночастицы, содержащиеся в креме, начнут разрушать клетки эпидермиса.

### выводы

Наночастицы – патогенный экзогенный фактор, меняющий структуру и функции биомембран [1-4]. В мембрану проникают наночастицы, имеющие радиус меньше критического значения *R*<sub>сг</sub>. При этом микровязкость липидного бислоя биомембран уменьшается, образуются сквозные поры, которые могут слиться в трещины и разрушить мембрану [3, 4]. Если радиус наночастиц больше критического, то они адсорбируются на поверхности мембран, увеличивая их микровязкость [3, 4]. В обоих случаях наночастицы нарушают нормальное функционирование мембран и клеток. В представленной работе дана термодинамическая модель прямого (не за счет эндоцитоза) проникновения наночастиц в липидный бислой мембраны. Показано, что при увеличении дзета-потенциала наночастицы увеличивается ее значение  $R_{\rm cr}$ .

### 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

- B. H. Kim, M. J. Hackett, J. Park, and T. Hyeon, Chem. Mater. 26, 59 (2014).
- M. A. Maurer-Jones, I. L. Gunsolus, C. J. Murphy, and C. L. Haynes, Anal. Chem. 85 (6), 3036 (2013).
- 3. П. В. Мокрушников, Л. Е. Панин, Б. Н. Зайцев и др., Биофизика **56** (6), 1105 (2011).
- A. I. Kozelskaya, A. V. Panin, I. A. Khlusov, et al., Toxicology in Vitro 37, 34 (2016).
- Л. Е. Панин и П. В. Мокрушников, Биофизика 59 (1), 127 (2014).
- 6. P. V. Mokrushnikov, L. E. Panin, and B. N. Zaitsev, Gen. Physiol. Biophys. **34** (3), 311 (2015).
- 7. Л. Е. Панин, П. В. Мокрушников, В. Г. Куницин и др., Физич. мезомеханика **14** (1), 5 (2011).
- 8. П. В. Мокрушников, Биофизика **62** (2), 330 (2017).
- П. В. Мокрушников, Труды Новосибирского государственного архитектурно-строительного университета (Сибстрин) 21 (1) 17 (2018).
- Л. Е. Панин, П. В. Мокрушников, Р. А. Князев и др., Атеросклероз 6, 12 (2012).
- В. Г. Куницын, П. В. Мокрушников и Л. Е. Панин, Бюл. СО РАМН 5 (127), 28 (2007).
- 12. П. В. Мокрушников, Бюл. СО РАМН 1 (147), 38 (2010).
- 13. L. E. Panin, P. V. Mokrushnikov, V. G. Kunitsyn, and B. N. Zaitsev, J. Phys. Chem. B **114**, 9462 (2010).
- L. E. Panin, P. V. Mokrushnikov, V. G. Kunitsyn, and B. N. Zaitsev, J. Phys. Chem. B 115, 14969 (2011).
- П. В. Мокрушников, А. Н. Дударев, Т. А. Ткаченко и др., Биол. мембраны 33 (6), 406 (2016).
- 16. Л. Е. Панин и П. В. Мокрушников, Вестн. Новосибирского гос. пед. ун-та **5** (15), 101 (2013).
- О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, П. В. Мокрушников и др., Вестн. Уральской мед. акад. науки 48 (2), 149 (2014).
- П. В. Мокрушников, Л. П. Осипова, Т. В. Гольцова и А. А. Розуменко, Якутский мед. журн. 54 (2), 15 (2016).
- 19. В. Ф. Антонов, Е. Ю. Смирнова и Е. В. Шевченко, Липидные мембраны при фазовых превращениях (Наука, М., 1992).
- Ю. А. Чизмаджев, В. Б. Аракелян и В. Ф. Пастушенко, Биофизика мембран (Наука, М., 1981).
- 21. S. A. Akimov, P. E. Volynsky, T. R. Galimzyanov, et al., Sci. Reports 7 (1), 12152 (2017).
- 22. S. A. Akimov, P. E. Volynsky, T. R. Galimzyanov, et al., Sci. Reports 7 (1), 12509 (2017).
- 23. В. Н. Вережников, Избранные главы коллоидной химии (Воронежский гос. ун-т, Воронеж, 2011).
- 24. А. Б. Рубин, Биофизика (Наука, М., 2004).

## The Mechanism of Interaction of Metal-Oxide Nanoparticles with Biological Membranes

### P.V. Mokrushnikov

Novosibirsk State University of Architecture and Civil Engineering (SIBSTRIN), Leningradskaya ul. 113, Novosibirsk, 630008 Russia

Advances in nanotechnologies, artificial methods for synthesis of metal-oxide nanoparticles with sizes between 1 to 100 nm bring up the concern about the appropriate biosafety level for the materials obtained. Nanoparticles having size less than 10 nm are able to penetrate into the bloodstream, and through the bloodstream can enter various organs such as brain, liver, kidneys, lungs, and spleen. Nanoparticles show bactericidal activity against pathogenic bacteria that disturb the structure and functions of natural biomembranes. Earlier in vitro studies showed that nanoparticles with a diameter below a critical value of  $R_{\rm cr}$  permeate the membrane. As a result, microviscosity of the lipid bilayer of biomembranes decreases. This process is accompanied with the formation of transversal pores which can merge into cracks and destroy the membrane. When nanoparticles are larger than a critical size, adsorption of these nanoparticles onto the membrane surfaces leads to an increase in membrane microviscosity. In both cases, nanoparticles disrupt normal function of natural biomembranes and cells. This paper presents a thermodynamic model of the direct (not relying on endocytosis) penetration of nanoparticles into the lipid bilayer membrane. It was shown that the  $R_{\rm cr}$  value increases with increase in zeta potential of the nanoparticle.

Keywords: plasma membranes, mechanical stresses in biomembranes, structural transitions in biomembranes, interaction of nanoparticles with biomembranes УДК 539.611

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ КОНТАКТОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2020 г. С.Н. Плескова\*, \*\*, Р.Н. Крюков\*, С.З. Бобык\*, \*\*, А.В. Боряков\*, А.А. Брилкина\*

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

\*\*Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева 603950, Нижний Новгород, ул. Минина, 24/1 E-mail: pleskova@mail.ru Поступила в редакцию 23.07.2019 г. После доработки 23.07.2019 г.

Принята к публикации 27.11.2019 г.

Атомно-силовая микроскопия была использована для создания системы измерения межклеточных адгезионных контактов. Методом сканирующей электронной микроскопии была доказана эффективность использования поли-L-лизина для фиксации нейтрофилов и лимфоцитов на зонде. Было показано, что при фиксации одной клетки на зонде, а второй — на поверхности подложки можно проводить релевантные измерения сил межклеточной адгезии, используя режим FS-спектроскопии. Были измерены силы межклеточной адгезии между нейтрофилами и лимфоцитами. Для нейтрофилов она составила –  $38.5 \pm 13.7$  пH, а для лимфоцитов –  $35.6 \pm 8.3$  пH. Таким образом, адгезия между нейтрофилами статистически значимо выше адгезии, возникающей между лимфоцитами.

Ключевые слова: межклеточная адгезия, атомно-силовая микроскопия, FS-спектроскопия, нейтрофилы, лимфоциты, сканирующая электронная микроскопия. **DOI:** 10.31857/S000630292001010X

Атомно-силовая микроскопия позволяет: 1) получать изображения отдельных клеточных структур и самих клеток с высоким разрешением; 2) осуществлять динамический мониторинг изменений клеток (деления, гибели, движения по субстрату, отдельных метаболических процессов) в режиме реального времени; 3) определять микромеханические свойства клеток, в том числе оценивать резерв ее механической прочности; 4) вносить в клетку или доставать из нее отдельные молекулы (например, РНК) не нарушая ее жизнеспособности; 5) определять наличие и укладку основных белков клеток; 6) оценить особенности свертки/развертки белков; 7) получать информацию о локализации и плотности экспрессии основных адгезинов; 8) изучать сенсосомы; 9) разрезать вирусы; 10) связывать механические свойства белков с местом локализации на поверхности клетки; 11) исследовать молекулярные динамические процессы, протекающие с высокой скоростью методом высокоскоростной микроскопии [1]. Функционализация зондов лигандами позволяет оценить силу лиганд-рецепторных белковых взаимодействий [2–4]. Таким образом, этот тип микроскопии является единственным, который позволяет не только визуализировать происходящие явления, но и активно моделировать различные экспериментальные процессы.

В пионерской работе [5] впервые были исследованы силы межклеточной адгезии на примере склонных к агрегации клеток Dictyostelium discoideum (клеточный слизевик, относящийся к типу Mycetosoa). Той же группой авторов была продемонстрирована действенность модели исследования адгезионных контактов клеток млекопитающих между рецептором VLA-4 (α4β1 integrin) лимфоцитов (метастазирующая меланомы В 16) человека и рецептором VCAM-1, который экспрессируется на мембране эндотелия сосудов bEnd.3 [6]. Они установили, что сила спеодномолекулярного цифического контакта составляет 33 ± 12 пН. Аналогичные взаимодействия измерены между молекулой ІСАМ-1 эндотелиальных клеток и MUC-1 и CD43, экспрессируемых на клетках рака мочевого пузыря. Было

Сокращение: СФР – стерильный физиологический раствор.

установлено, что сила взаимодействия ICAM-1 и CD43 соответствовала 43 пH, а связывание между молекулами ICAM-1 и MUC-1 – около 53 пH [7].

Однако в клинической практике трудно вычленить единичные молекулярные контакты в суммарной силе взаимодействия, возникающей между клетками в процессе межклеточной адгезии, агрегации и при других физиологических и патологических процессах. Тем не менее адгезионные контакты между целыми клетками крайне важны. В частности, дефициты адгезии нейтрофилов к эндотелию (например, впервые описанный иммунодефицит, связанный с генетическим дефектом CD18) сопровождаются тяжелыми рецидивирующими инфекциями, в том числе глубокими тканевыми абсцессами и нейтрофилией [8]. И напротив, гиперадгезия нейтрофилов к эндотелию, тромбоцитам и друг к другу является одним из патогенетических звеньев синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания и следствием септического процесса [9]. Поэтому важно разрабатывать системы, которые могли бы исследовать суммарную силу адгезионных контактов между клетками.

Целью данного исследования было использование режима спектроскопии в атомно-силовой микроскопии для разработки принципиально новой системы исследования сил межклеточной адгезии и измерение с помощью этой системы силы адгезионных контактов между нейтрофилами и лимфоцитами.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали венозную кровь здоровых доноров обоих полов в возрасте 20-40 лет, полученную из Нижегородского областного центра крови им. Н.Я. Климовой. Кровь стабилизировали гепарином (25 ЕД/мл) и разводили забуференным раствором, физиологическим содержащим 0.137 M NaCl и 0.0027 M KCl, pH 7.35 (200 g, 3 мин) в соотношении 1:1. Для выделения нейтрофильной и лимфоцитарной фракции использовали двойной градиент фиколла-урографина (р1 = 1.077 г/мл,  $\rho 2 = 1.117$  г/мл, 200 g, 40 мин) [10]. Полученные фракции раздельно отмывали забуференным физиологическим раствором (200 g, 3 мин), и использовали в конечной концентрации 1 · 10<sup>6</sup> кл/мл. Клетки брали в эксперимент сразу после выделения, жизнеспособность по тесту с трипановым синим составляла не менее 99%.

Клетки высаживали на Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-зонд (C-MSCT, Bruker, США), имеющий следующие характеристики:  $f_0 - 4 - 10$  кГц, k - 0.010 Н/м. Предварительно кантилевер с зондом был обработан в течение 50 мин поли-L-лизином (Merck, США), затем трехкратно отмыт 10 мкл стерильного

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020



**Рис. 1.** Схема проведения эксперимента по изучению межклеточной адгезии: одна клетка фиксирована на зонде, вторая — на подложке. Обе клетки живые, поскольку все исследования ведутся в физиологических жидкостях.

физиологического раствора (СФР). После отмывки на кантилевер с зондом наносили суспензию клеток (10 мкл), инкубировали 20 мин при 37°С и трижды отмывали СФР. Кантилевер устанавливали на головку с каплей СФР, которая обеспечивала жизнеспособность клетки во время короткого времени транспорта и погружения зонда в чашку Петри.

В стерильную чашку Петри (35 мм, Corning® Treated Culture Dishes, США) вносили 2 мл суспензии клеток, инкубировали для достижения спонтанной адгезии 20 мин при 37°С и трижды отмывали СФР. Затем «жидкостную ячейку» переносили на столик атомно-силового микроскопа NTegra (NT-MDT, Россия).

Силы межклеточной адгезии определяли методом FS-спектроскопии. Теоретические основы метода и его подробное описание изложены в работах [1,11,12]. Проводили выставление зонда над клеткой, под контролем оптического микроскопа, затем выполняли захват обратной связи в контактном режиме. После этого выставляли диапазон измерения высоты положения кантилевера над клеткой – 100–5000 нм. Сила прижатия варьировала в диапазоне 10-50% от максимально возможного, а время снятия кривой – от 2 до 60 с. После получения FS-кривой обратную связь отключали, чтобы не повредить клетки, проводили переход на новую область и процесс повторяли. Каждый образец подвергали исследованию в течение 1 ч. Далее проводили замену образцов как на зонде, так и на чашке Петри. Исследования проводили до получения 816 кривых.

Схема проведения эксперимента представлена на рис. 1.

По окончании эксперимента зонд с фиксированной на нем клеткой трижды отмывали СФР, клетку фиксировали глутаровым альдегидом (2.5%, 10 мин), отмывали трехкратно СФР, высушивали и исследовали методом сканирующей электронной микроскопии, доказывающим ее присутствие на поверхности зонда.



**Рис. 2.** Изображение, полученное методом сканирующей электронной микроскопии: (а) – интактный зонд, имеет четкие грани и форму, близкую к пирамидальной; (б) – нейтрофил, расположенный на кончике зонда (после сканирования нейтрофил был фиксирован 2.5%-м глутаровым альдегидом. Ядро нейтрофила расположено на вершине зонда, цитоплазматическая часть тесно связана с поверхностью кантилевера. Сам зонд не деформирован, его размеры форма и характер вершины не изменены.

Электронно-микроскопической исследование зондов проводили на электронном микроскопе JSM-IT300LV (JEOL, Япония) в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе зонда не более 0.25 нА для минимизации воздействия тока на образцы, разрешение составляло не менее 10 нм. Изображения были получены одновременно в низкоэнергетичных вторичных электронах и отраженных электронах.

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

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе доказывалась эффективность поли-L-лизина для фиксации клетки на зонде. На рис. 2 представлены результаты исследований методом сканирующей электронной микроскопии. Рис. 2а показывает, что зонд без обработки имеет четкую геометрию призмы, поверхность кантилевера чистая, свободная от органики. На рис. 26 видно, что после обработки зонда и кантилевера поли-L-лизином клетка надежно закрепляется на зонде. Нейтрофил оказывается фиксированным на зонде, причем его цитоплазматическая часть зафиксирована на кантилевере, тогда как ядросодержащая часть фиксируется непосредственно на вершине зонда.

На втором этапе проводили сканирование клеток на поверхности чашки Петри в СФР в витальном состоянии. На рис. 3 представлен результат сканирования лимфоцита и нейтрофила в на-



**Рис. 3.** Живые интактные клетки, адгезированные на поверхности чашки Петри в результате процесса самопроизвольной адгезии: (а) – нейтрофил, (б) – лимфоцит.



**Рис. 4.** Кривые отвода при взаимодействии двух нейтрофилов: один иммобилизован на зонде, второй – адгезирован на поверхности чашки Петри. Серая кривая – соответствует выраженному адгезионному контакту между двумя клетками, черная кривая – слабому взаимодействию между двумя клетками.

тивном состоянии. Концентрацию клеток подбирали таким образом, чтобы они располагались близко друг к другу, чтобы облегчить позиционирование зонда при проведении FS-спектроскопии. Внесение дополнительных закрепляющих агентов на чашку Петри не требовалось, поскольку и нейтрофилы и лимфоциты имеют высокую собственную адгезионную активность и прочно прикрепляются к пластику. Нейтрофил на рис. 3 имеет типичную морфологию: сегментированное ядро и хорошо распластанную цитоплазматическую часть, в которой четко видны гранулы. Представленная на рис. 3 клетка относится к хорошо распластанным [13]. Очевидны морфологические различия между лимфоцитом и нейтрофилом: лимфоцит имеет ровное округлое ядро, меньший размер и высокоразвитую мембранную поверхность.

В результате проведения FS-спектроскопии получили силовые кривые. На рис. 4 представлены кривые отвода кантилевера от поверхности клетки. На них четко визуализируются скачки («ступени»). Каждая ступень соответствует разрыву связей между рецепторами клетки находящейся на зонде и рецепторами, экспрессирующимися на мембране нейтрофила, адгезированного на чашке Петри.

Были расчитаны силы всех адгезионных контактов, возникающих между клетками, как разница между начальным уровнем и максимальной

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

точкой «ступени». Результаты расчета представлены на рис. 5.

Медианные значения сил межклеточной адгезии составили для нейтрофилов  $38.5 \pm 13.7$  пH, для лимфоцитов –  $35.6 \pm 8.3$  пH. Статистический анализ позволил опровергнуть «0»-гипотезу и показал, что различия между силами межклеточной адгезии у нейтрофилов и лимфоцитов статистически значимы (W = 148823.5; Z = -2.0279).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Из рис. 4 следует, что характер силовых кривых был разным. Например, черная кривая соответствует минимальному взаимодействию между клетками, тогда как серая — обычному взаимодействию, сопровождающемуся многочисленными рецепторными контактами. Нулевой уровень соответствует отсутствию взаимодействия между клетками (релаксированный кантилевер), а работа адгезии может быть оценена как площадь под кривой отвода по следующей формуле:

$$A_{\rm ad} = \int F dl,$$

где F – сила взаимодействия клеток, H; l – расстояние между клетками, м.

Для черной кривой интеграл площади между нулевой силой и кривой составлял < 100 аДж, тогда как о наличии большого количества рецепторных контактов можно говорить при достиже-



Рис. 5. Распределения сил адгезионных контактов, возникающих между клетками.

нии работы адгезии ≥100 аДж (в случае, описанном на рис. 4 она составила ~ 500 аДж).

Анализ серой кривой показывает, что характер рецепторного связывания не однороден. На мембране нейтрофилов экспрессируется большое число рецепторов, принимающих участие в адгезии: Е -, Р - и L-селектины, ICAM-1, VCAM-1, CD11a/CD18, CD11b/CD18,  $\alpha_{v}\beta_{2}$ -интегрины, а на мембране лимфоцитов – VLA-4 (и ряд других интегринов, например, CD103/ $\beta_{7}$ ), CD11a/CD18, MAdCAM-1 [14].

Поэтому каждая ступень может соответствовать как разрыву единичных рецептор-рецепторных связей, так и нескольких рецепторных связей между клетками. Достоверно определить разрыв единичного рецептор-рецепторного взаимодействия в данной системе невозможно, поскольку всегда будет существовать вероятность разрыва нескольких связей в интервал времени меньший, чем возможно разрешить аппаратно. Для оценки работы адгезии в системе молекулярных связей на уровне единичных рецепторов необходимо использовать другую систему: зонд, функционализированный отдельной молекулой, фиксированной через линкер, и клетку либо единичную молекулу, фиксированную на подложке [15].

Очевидно, что высокие ступени, например  $\Delta F_4$ , составлены из множества маленьких ступе-

ней. С учетом разного количества рецепторов каждого класса (интегрины, селектины и так далее), экспрессируемых на мембранах, и разной аффинности этих рецепторов, а также учитывая возможное неспецифическое взаимодействие между клетками, суммарную силу адгезионных контактов между клетками можно рассчитать по следующей формуле:

$$\Delta F_k = a \cdot f_1 + b \cdot f_2 + \sum_i c_i \cdot f_i + C,$$

где  $\Delta F_k$  — высота *k*-ступеньки силовой кривой отвода; *a*, *b*, *c<sub>i</sub>* — количество рецепторов различных типов;  $f_1, f_2, f_i$  — силы разрыва между рецепторами различных типов; *C* — неспецифическое взаимодействие.

Нужно учитывать и тот факт, что характер распределения рецепторов на поверхности неоднороден, поскольку они могут располагаться как поодиночке, так и формировать «рецепторные поля» как, например, наблюдается в иммунологических синапсах. Формирование рецепторных полей происходит на основе рафтов — особых мембранных структур, которые представляют собой специализированную платформу, контролирующую большое количество клеточных функций [16]. Но и в самих рафтах характер распределения рецепторов неоднороден. Различают три основных варианта поведения рецепторов в раф-

тах: 1) рецепторы ассоциируются в устойчивом состоянии с липидными рафтами и могут быть активированы связыванием с лигандами; 2) индивидуальные рецепторы со слабой аффинностью к рафтам олигомеризуются лигандным связыванием, и это приводит к увеличению времени пребывания в рафте; 3) активированные рецепторы рекрутируются перекрестно-связывающими протеинами в соседние рафты, и это приводит к коалесценции платформ [17]. Эти факты делают оценку рецепторных взаимодействий еще более сложной. Возможно, в том случае, если рецепторы сконцентрированы в виде рецепторных полей на рафтах, мы получаем большие ступени >100 пН, а в тех случаях, когда речь идет о более слабых взаимодействиях между рецепторами на внерафтовой части мембраны величина одиночных ступеней уменьшается до 30-60 пН. Нельзя также полностью исключить возможность олигомеризации рецепторов, экспрессируемых на мембране клетки, фиксированной на зонде, от первичного взаимодействия с клеткой на подложке и рекрутинг рецепторов в рафт после первичного взаимодействия.

На рис. 5 распределение ограниченно 500 пН, однако при измерениях максимальное регистрируемое значение составило 2400 пН. Распределение сил адгезионных контактов представляет собой ассиметричную кривую с максимумом в районе 30–40 пН для обоих типов клеток. Тем не менее распределение сил адгезионных контактов статистически отличается у нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов, что говорит о различиях в рецепторных полях этих типов клеток.

Таким образом, при фиксации одной клетки на поверхности зонда поли-L-лизином и связывании другой клетки на поверхности чашки Петри можно получить действенную систему измерения сил межклеточной адгезии. Поскольку происходит постепенное отведение зонда OT поверхности клетки, регистрируются все силы межклеточного взаимодействия от слабых (предположительно неспецифических), лежащих в районе 10 пН, до сильных (предположительно, формируемых обширными рецепторными полями, из-за которых разорвать контакты при отведении зонда труднее), лежащих в диапазоне от 100 до 2400 пН. Подавляющее большинство связей определялось в районе 30-40 пН, что, на наш взгляд, соответствует силе единичных рецепторных взаимодействий.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено Комиссией по биоэтике ННГУ им. Н.И. Лобачевского (создана 11.11.16 г., приказ о создании № 497-ОД), прото-кол № 9 от 17.07.17 г.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. С. Н. Плескова, Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях (Издательский дом «Интеллект», Долгопрудный, 2011).
- H. Kim, H. Arakawa, T. Osada, et al., Ultramicroscopy 97 (1–4), 359 (2003).
- L. A. Chtcheglova, L. Wildling, J. Waschke, et al., J. Mol. Recognition 23, 589 (2010).
- L. Xiao, Q. Chen, Y. Wu, et al., Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes 1848 (10), 1988 (2015).
- M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, et al., Nat. Cell Biol. 2 (6), 313 (2000).
- R. H. Eibl and M. Benoit, IEE Proc. Nanobiotechnol. 151 (3), 128 (2004).
- V. S. Rajan, V. M. Laurent, C. Verdier, et al., Biophys. J. 112, 1246 (2017).
- 8. M. C. Dinauer, Blood 133 (20), 2130 (2019).
- S. Gando, T. Kameue, N. Matsuda, et al., Thromb. Res. J. 116 (2), 91 (2004).
- M. T. Aguado, N. Pujol, E. Rubiol, et al., J. Immunol. Methods 32, 41 (1980).
- 11. E. A. Hassan, W. F. Heinz, M. D. Antonik, et al., Biophys. J. 74, 1564 (1998)
- 12. A. A. Bukharaev, A. A. Mozhanova, N. I. Nurgazizov, et al., Phys. Low-Dim. Struct. **3**, 31 (2003).
- С. Н. Плескова, М. Б. Звонкова и Ю. Ю. Гущина, Морфология. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 127 (1), 60 (2005).
- С. М. Белоцкий и Р. Р. Авталион, Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты (БИНОМ, М., 2008).
- H. Yang, J. Yu, G. Fu, et al., Exp. Cell Res. 313 (16), 3497 (2007).
- С. Н. Плескова и Е. Е. Пудовкина, Цитология 55 (8), 586 (2013).
- K. Simons and D. Toomre, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 1 (1), 31 (2000).

## Investigation of the Adhesive Intercellular Contacts between Neutrophil Granulocytes and Lymphocytes by Atomic Force Microscopy

S.N. Pleskova\*, \*\*, R.N. Kriukov\*, S.Z. Bobyk\*, \*\*, A.V. Boryakov\*, and A.A. Brilkina\*

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

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

Atomic force microscopy was used to create a system for measuring intercellular adhesion. Scanning electron microscopy was applied to confirm that poly-L-lysine is the best for fixation of neutrophil granulocytes and lymphocytes on the tip. It was shown that when one cell is fixed on the tip and the other one on the substrate surface, it is possible to carry out relevant measurements of intercellular adhesion forces by FS spectroscopy. Intercellular adhesion forces of neutrophils and lymphocytes were measured. The adhesion forces of neutrophils and lymphocytes were:  $38.5 \pm 13.7$  pN and  $35.6 \pm 8.3$  pN, respectively. Thus, adhesion of neutrophils is statistically significantly higher than adhesion of lymphocytes.

Keywords: intercellular adhesion, atomic force microscopy, FS spectroscopy, neutrophils, lymphocytes, scanning electron microscopy

——— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ =

УДК 57.085.23

# ЭФФЕКТЫ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ МСF-7

© 2020 г. К.А. Чурюкина\*, А.Л. Жузе\*\*, А.А. Иванов\*\*, И.А. Замулаева\*

\*Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, 249036, Обнинск Калужской области, ул. Королева, 4 \*\*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

> *E-mail: churiukina@inbox.ru* Поступила в редакцию 16.08.2019 г. После доработки 25.11.2019 г. Принята к публикации 29.11.2019 г.

Работа посвящена поиску способов элиминации и/или повышения радиочувствительности популяции опухолевых стволовых клеток, составляющих радиорезистентную часть злокачественных новообразований. Исследованы эффекты раздельного и комбинированного действия у-излучения в дозе 4 Гр и димерных бисбензимидазолов серии DB(n) с количеством групп в метиленовом линкере, соединяющем два бисбензимидазола (n), равном 5 или 7, на опухолевые стволовые клетки линии MCF-7 рака молочной железы человека. Показано, что бисбензимидазол DB(5) значимо снижает относительное и абсолютное количество опухолевых стволовых клеток в 5.8 и 7.5 раза соответственно по сравнению с контролем (p = 0.001 в обоих случаях), а бисбензимидазол DB(7) – в 3.6 (p = 0.003) и 5.2 раза (p = 0.004) соответственно. Облучение приводит к увеличению относительного и абсолютного количества опухолевых стволовых клеток в 1.7 и 1.6 раза (p < 0.05) соответственно по сравнению с контролем. При комбинированном воздействии бисбензимидазолов DB(5,7) и облучения происходит значительное снижение относительного количества опухолевых стволовых клеток в 8.2 (p = 0.003) и 4.1 раза (p = 0.004) соответственно по сравнению с раздельным облучением. Еще более выраженные эффекты обнаружены в отношении абсолютного количества опухолевых стволовых клеток, которое уменьшалось при комбинированном воздействии в 16.6 и 14.1 раза соответственно по сравнению с облучением (p = 0.006 в обоих случаях). При комбинированном действии бисбензимидазолов DB(5,7) и облучения происходит блокирование радиационно индуцированной эпителиально-мезенхимальной трансзиции по критерию экспрессии виментина — одного из основных маркеров этого процесса, играющего важную роль в формировании пула опухолевых стволовых клеток.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, димерные бисбензимидазолы, ионизирующее излучение, комбинированное воздействие, проточная цитометрия.

**DOI:** 10.31857/S0006302920010111

Лучевая терапия широко применяется в клинике в качестве одного из основных методов лечения злокачественных новообразований. Несмотря на постоянное совершенствование существующих и внедрение новых методов лучевого лечения (адронная, бинарная, тканевая, фотодинамическая терапия и др.), остается нерешенной проблема возникновения рецидивов и метастазов у части пролеченных больных с полной клинической регрессией первичного очага. Многочисленные механизмы радиорезистентности опухолевых клеток, которые могут обеспечить выживание части из них как источника рецидивирования опухолевого процесса после лучевой терапии, изучаются уже не один десяток лет и с разных позиций, но в последние годы внимание специалистов в области радиационной онкологии привлечено к концепции о существовании опухолевых стволовых клеток (OCK) [1, 2]. Показано, что OCK, обнаруженные *in vitro* в стабильных и первичных культурах опухолевых клеток, а также *in vivo* в большинстве злокачественных новообразований экспериментальных животных и человека, обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в гетерогенные линии клеток,

Сокращения: ОСК — опухолевые стволовые клетки, DB(n) — димерные бисбензимидазолы (dimeric bisbenzimidazoles, n — число метильных групп в линкере), ЭМТ эпителиально-мезенхимальная трансзиция, ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцитат, ФЭ — фикоэритрин.



**Рис. 1.** Химическая формула димерных бисбензимидазолов DB(n), где n = 1-11.

которые составляют опухоль (в отличие от нестволовых клеток). Кроме того, результаты собственных исследований и данные литературы доказывают, что ОСК являются более радио- и химиорезистентными по сравнению с остальной массой опухолевых клеток [3–8].

Эти обстоятельства, во-первых, дают основание предполагать, что именно ОСК определяют неблагоприятные отдаленные результаты лучевой и комбинированной терапии и, во-вторых, обосновывают необходимость поиска средств, направленных на элиминацию ОСК и/или повышение их чувствительности к известным противоопухолевым воздействиям. В этой связи следует отметить, что в последнее время происходит стремительный рост количества публикаций, сообщающих о результатах поиска и разработки таких средств не только на стадии доклинических, но и клинических испытаний [9–11]. В основе таких исследований лежат многочисленные данные о молекулярно-клеточных особенностях и механизмах радио- и химиорезистентности ОСК, включая более высокую эффективность репарации радиационных повреждений ДНК (например, за счет активации чекпоинт-киназ СНК1 и СНК2), высокую активность антиоксидантной системы (например, вследствие повышенной экспрессии белков, участвующих в утилизации свободных радикалов), быстрое выведение во внеклеточную среду многих цитотоксических препаратов из ОСК (в результате гиперэкспрессии АТФ-зависимых белковых транспортеров на клеточной мембране) по сравнению с остальными (нестволовыми) клетками и т. д. [4, 12–15]. Формирование резистентности ОСК на уровне организма - еще более сложный процесс, поскольку включает влияние множества сигнальных молекул (например, TGF-b1, FGF, IL-6, HIF, Wnt-лиганды и так далее), секретируемых не только опухолевыми, но и различными стромальными клетками, и таких факторов, как концентрация кислорода и рН внеклеточной среды, влияющих на радиочувствительность [16, 17]. Соответственно, мишенями средств элиминации ОСК или изменения их свойств являются сигнальные пути, активные преимущественно в ОСК, включая Hengehog, Notch, Stat, Wnt/β-катенин и другие, транспортеры оттока веществ из клеток, системы репарации ДНК, и пути клеточной гибели, различные факторы микроокружения опухоли, поверхностные антигены ОСК (CD44, CD133 и др.) [12, 14, 18–21].

Недавние исследования продемонстрировали важную роль эпигенетических механизмов, таких как метилирование ДНК и модификация гистонов, в процессах дифференцировки/дедифференцировки опухолевых клеток и поддержании резистентности ОСК к противоопухолевым воздействиям (в том числе к ионизирующему излучению) [22, 23]. В связи с этим соединения, способные влиять на ремоделирование хроматина и другие эпигенетические изменения, могут представлять интерес в плане поиска средств элиминации и/или повышения радиочувствительности ОСК. Российскими химиками из Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН были синтезированы оригинальные ДНК-связывающие соединения – димерные бисбензимидазолы (dimeric bisbenzimidazoles -DB(n), которые содержат в своей структуре два 2,6-замещенных бензимидазола, связанных между собой олигометиленовым линкером разной длины (*n* – число метильных групп в линкере, может варьировать от 1 до 11) (рис. 1) [24]. Во внеклеточных модельных системах было показано, что эти соединения эффективно ингибируют ДНК-метилтрансферазу и ДНК-топоизомеразу I [25, 26]. Кроме того, некоторые бисбензимидазолы (с n = 5 или 7) оказались высокотоксичными для общей массы клеток рака молочной железы линии MCF-7 по критериям снижения их количества, жизнеспособности и клоногенной активности в условиях in vitro [27], однако влияние этих соединений на ОСК ранее не исследовалось. Поэтому целью данной работы является выяснение эффектов действия бисбензимидазолов DB(5,7) на ОСК линии MCF-7 при раздельном применении и в комбинации с ионизирующим излучением. Оценива-

ли эффекты действия DB(5,7) на ОСК и остальные клетки по критериям внутриклеточного содержания этих соединений, относительного и абсолютного количества клеток, сохранивших жизнеспособность в близкие сроки после воздействия. Кроме того, в работе впервые исследовали влияние указанных соединений на эпителиально-мезенхимальную трансзицию (ЭМТ), которая, как известно, участвует в формировании пула ОСК, резистентности этих клеток к повреждающим воздействиям и усиливается под влиянием ионизирующего излучения [28-31]. В частности, показано, что при облучении в опухолевых клетках активируется транскрипция основных регуляторов ЭМТ (Snail, ZEB-1, STAT3, HIF-1b и др.), которые, в свою очередь запускают сигнальные пути, в том числе TGF-β, WNT, p38 MAPK и другие, способствующие приобретению выжившими после облучения опухолевыми клетками фенотипа ЭМТ и ОСК [29]. Поэтому, учитывая важную роль ЭМТ в радиационном ответе опухолевых клеток эпителиального происхождения и принимая во внимание известные данные о значении метилирования ДНК для ЭМТ, мы предположили, что DB(n), способные ингибировать активность ДНК-метилтрансферазы, могут влиять на ЭМТ и таким образом изменять размер пула ОСК. Для проверки этого предположения была исследована экспрессия виментина (белка промежуточных филаментов цитоскелета, являющегося одним из основных маркеров ЭМТ) после раздельного или комбинированного действия DB(5,7) и ионизирующего излучения.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 культивировали во флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> (Corning, США) в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (Biosera, Франция), пенициллина (50000 ед/л), стрептомицина (50 мг/л) и глютамина (292 мг/л) в CO<sub>2-</sub>инкубаторе (NuAire, США) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки рассевали два раза в неделю, снимая с подложки с помощью раствора версена и трипсина (ПанЭко, РФ).

Исследуемые химические соединения. Димерные бисбензимидазолы DB(*n*) синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по методике, подробно описанной в работе [24]. Они представляют собой низкомолекулярные флуоресцентные соединения, нековалентно связывающиеся с А-Т-парами в узкой бороздке ДНК. Из всей линейки DB(*n*) в данной работе использовали два соединения, в

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

которых бисбензимидазольные блоки соединены между собой линкером с числом метильных групп (*n*), равным 5 или 7.

Инкубация с изучаемыми соединениями и облучение клеток. Через сутки после посева к клеткам добавляли DB(5) или DB(7) в конечной концентрации 20 мкмоль/л, при которой, как ранее было показано [25], происходит выраженное уменьшение общего количества опухолевых клеток. Клетки инкубировали с соединениями 24 ч в стандартных условиях и затем подвергали воздействию  $\gamma$ -излучения на установке «Рокус-AM» в дозе 4 Гр (мощность дозы 1,5 Гр/мин), которая также была выбрана ранее для исследования эффектов комбинированного действия DB(*n*) на общую популяцию клеток MCF-7 [25]. Далее клетки помещали в стандартные условия культивирования в CO<sub>2</sub>-инкубатор на двое суток.

Определение количества CD44+CD24<sup>-/low</sup>-OCK. Выбор маркеров для идентификации ОСК рака молочной железы в нашей работе был сделан на основе литературных данных. Как известно, рак молочной железы был первой солидной опухолью, в которой установлено наличие ОСК [32]. Авторы этого исследования идентифицировали ОСК по экспрессии CD44 при отсутствии или низкой экспрессии CD24 на поверхности этих клеток с помощью соответствующих антител. По настоящее время этот иммунофенотип (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>) наиболее часто используется в различных исследованиях для выявления ОСК рака молочной железы, в том числе в стабильной культуре линии MCF-7. Учитывая многочисленные доказательства принадлежности CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>-клеток к популяции ОСК рака молочной железы, именно этот иммунофенотип был выбран нами для выявления ОСК.

Клетки извлекали из флаконов в холодный раствор Хэнкса и инкубировали со смесью моноклональных антител к CD44, меченных флуоресцеинизотиоцитатом (ФИТЦ) (BD Biosciences, США), и антител к CD24, меченных фикоэритрином ( $\Phi$ Э) (BD Biosciences, CША), из расчета по 20 мкл антител на 1 млн клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела соответствующих изотипов к гемоцианину улитки, конъюгированные с теми же флуорохромами, что и антитела к указанным (BD поверхностным Biosciences, маркерам США).

Пробы инкубировали с антителами 30 мин на льду в темноте, затем отмывали в 0,01 моль/л фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, pH 7.2) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage (BD Biosciences, США). Для измерения флуоресценции ФИТЦ использовали узкополосные фильтры 530/30 нм, для ФЭ – 585/42 нм. Полученные данные об интенсивности прямого и бокового светорассеяния, флуоресценции ФИТЦ и ФЭ записывали в файл, который обрабатывали с помощью программы CellQuestPro (BD Biosciences, CША). Определяли относительное количество ОСК (в %) с иммунофенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> среди неповрежденных клеток, выделенных по параметрам прямого и бокового светорассеяния по общепринятой методике. Абсолютное количество CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>-OCK определяли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе, определенное с помощью камеры Горяева.

Оценка внутриклеточного содержания бисбензимидазолов DB(5,7) в стволовых и нестволовых опухолевых клетках. Благодаря тому, что комплекс DB(n)-ДНК обладает достаточно высокой флуоресценцией [33] в рабочем диапазоне современных проточных цитофлуориметров, оснащенных ультрафиолетовым лазером, существует возможность анализа внутриклеточного содержания этих соединений с помощью метода проточной цитометрии. Для оценки внутриклеточного содержания DB(5,7) отдельно в ОСК и в остальных (нестволовых) клетках общую культуру инкубировали с соединениями в концентрации 20 мкМ в течение 72 ч, окрашивали с помощью антител к CD44-ФИТЦ и CD24-ФЭ, как описано выше, затем выполняли исследование с помощью проточного цитометра FACS Vantage, оснащенного двумя лазерами с длинами волн 488 нм и 365 нм. Для измерения флуоресценции ФИТЦ и ФЭ использовали стандартные светофильтры 530/30 нм и 585/42 нм соответственно (при  $\lambda_{BO36} = 488$  нм). Интенсивность флуоресценции DB(5,7) оценивали в диапазоне 424/44нм (при  $\lambda_{BO36} = 365$  нм). Данные о флуоресценции ФИТЦа, ФЭ и DB(5,7) записывали в файл. При последующей обработке данных с помощью программы CellQuestPro выделяли регион CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>клеток, после чего анализировали интенсивность флуоресценции DB(5) или DB(7) в этом регионе и в остальных клетках отдельно.

Определение экспрессии виментина после комбинированного действия бисбензимидазолов DB(5,7) и облучения. В предварительной серии экспериментов изучали экспрессию виментина в различные сроки после облучения в дозе 4 Гр. Экспрессию указанного белка определяли через 24, 48, 72 и 96 ч после радиационного воздействия с помощью проточной цитометрии после иммуноцитохимического окрашивания соответствующими антителами. Для этого клетки снимали со дна культуральных флаконов, из каждого флакона отбирали аликвоты по 250 тыс. клеток, далее клетки фиксировали и хранили в ацетоне при – 20°С. Перед окрашиванием клетки трехкратно отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе с 1% бычьего сывороточного альбумина, после чего инкубировали с моноклональными антителами к виментину, меченными  $\Phi \Theta$ , в течение 1 ч при комнатной температуре в соотношении 5 мкл антител/250 тыс. клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела того же изотипа к гемоцианину улитки, конъюгированные с ФЭ. После инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител фосфатно-солевым буферным раствором и немедленно анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD Biosciences, США) по показателям интенсивности светорассеяния и флуоресценции ФЭ. С помощью программы CellQuestPro определяли среднюю интенсивность флуоресценции ФЭ в клетках после исключения дебриса по показателям светорассеяния.

В следующей серии экспериментов изучали влияние DB(5,7) и облучения на экспрессию виментина. Использовали те же условия комбинированного воздействия, что при исследовании количественных изменений пула ОСК, т. е. концентрация соединений составляла 20 мкмоль/л, доза облучения – 4 Гр, а время после облучения (48 ч) было выбрано по результатам описанных выше предварительных экспериментов. Методика подготовки проб к проточноцитометрическому анализу в экспериментах по комбинированному действию DB(n) и облучения не отличалась от вышеописанной методики, использованной в предварительных экспериментах по изучению временной зависимости экспрессии виментина после облучения.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили по критерию Манна—Уитни с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Для построения графиков использовали программу Origin 6.0 (Місгосаl Software, Inc., США). Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторах. Полученные результаты объединяли. Различия считали значимыми при p < 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутриклеточное содержание бисбензимидазолов DB(5) и DB(7) в OCK и остальных клетках. Внутриклеточное содержание DB(5) и DB(7) оценивали в сравниваемых популяциях опухолевых клеток через 72 ч инкубации с соединениями. В течение этого времени могли происходить как накопление, так и откачивание соединений из живых клеток. Как показано на рис. 2, интенсивность флуоресценции как DB(5), так и DB(7) в



**Рис. 2.** Средняя интенсивность флуоресценции опухолевых стволовых и нестволовых клеток линии МСF-7, инкубированных с DB(5,7), по данным витального исследования с помощью проточной цитофлуориметрии; \* - p < 0.001 при сравнении с интенсивностью контрольной аутофлуоресценции.

ОСК и остальных клетках была примерно одинакова, но значительно выше контрольной автофлуоресценции (p < 0,001). Эти данные указывают на то, что исследуемые соединения способны проникать в живые клетки и сохраняться в них в течение длительного времени. При этом важно отметить, что содержание DB(5,7) в ОСК и остальных клетках не отличается, хотя известно, что ОСК способны более эффективно откачивать во внеклеточную среду многие химические соединения, включая традиционные химиопрепараты. В дальнейшем представляет интерес исследовать отдельно процессы накопления и выведения DB(n) из клеток изучаемых популяций.

Изменение относительного и абсолютного количества опухолевых стволовых клеток CD44+CD24<sup>-/low</sup> после комбинированного действия бисбензимидазолов DB(5) или DB(7) и γ-излучения. Эффекты раздельного и комбинированного действия изучаемых соединений и γ-излучения оценивали через 48 ч после облучения по изменению количества клеток с иммунофенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>.

Установлено, что облучение клеток линии MCF-7 приводит к увеличению относительного количества CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> OCK в 1.7 раза по сравнению с контролем (рис. 3). Предварительная инкубация с DB(5,7) перед облучением значительно снижает этот показатель как по сравнению с раздельным действием облучения, так и по сравнению с интактным контролем. Так, показано, что DB(5) в комбинации с ионизирующем излучением уменьшает относительное количество

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020



**Рис.** 3. Изменение относительного количества CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> OCK после раздельного и комбинированного действия DB(5,7) и  $\gamma$ -излучения в дозе 4 Гр. Клетки облучали через 24 ч после добавления соединений, количество OCK определяли через 48 ч после облучения. Обозначения: \*\* –  $p \leq 0.004$  при сравнении с облучением, ^ – p < 0.05 при сравнении с контролем, ^^–  $p \leq 0.006$  при сравнении с контролем.

СD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> клеток в 4.8 раза по сравнению с контролем: средняя доля OCK ( $\pm$  *SE*) в контроле составляет 0.29  $\pm$  0.04%, доля этих клеток в группе «DB(5) + облучение» – 0.06  $\pm$  0.01% (p = 0.002). DB(7) в комбинации с ионизирующим излучением снижает долю OCK в меньшей степени – до 0.12  $\pm$  0.04%, т.е. в 2.4 раза по сравнению с контролем (p = 0.006). Важно, что DB(5,7) в комбинации с ионизирующим излучением сильнее уменьшают относительное количество OCK по сравнению с раздельным облучением – в 8.2 и 4.1 раза (p = 0.003 и p = 0.004) соответственно – и тем самым нивелируют стимулирующее влияние облучения на количество CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> OCK.

Интересно, что и одиночное действие DB(5,7) также значимо снижает относительное количество OCK по сравнению с интактным контролем в 5.8 и 3.6 раза соответственно: средняя доля OCK в группе «DB(5)» составляет  $0.05 \pm 0.01\%$  (p = 0.001), в группе «DB(7)» –  $0.08 \pm 0.02\%$  (p = 0.003).

На рис. 4 представлены данные об изменении абсолютного количества клеток CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> после раздельного и комбинированного действия изучаемых соединений и γ-излучения. Показано, что облучение приводит к росту абсолютного количества ОСК в 1.6 раза по сравнению с контролем, в то время как общее количество клеток, напротив, уменьшается в 1.7 раз. Установлено, что в



**Рис. 4.** Изменение абсолютного количества CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> OCK и остальных опухолевых клеток после раздельного и комбинированного действия DB(5) или DB(7) и облучения в дозе 4 Гр. Клетки облучали через 24 ч после добавления соединений, количество OCK определяли через 48 ч после облучения. Обозначения: \*-p < 0.05 при сравнении с облучением, \*-p < 0.006 при сравнении с облучением,  $-p \le 0.004$  при сравнении с контролем.

комбинации с ионизирующим излучением как DB(5), так и DB(7) значимо снижают абсолютное количество клеток CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> по сравнению с раздельным облучением и контролем. Так, в комбинации с облучением DB(5) приводит к снижению абсолютного количества OCK в 10.4 раза по сравнению с контролем (p = 0.004) и в 16.6 раза по сравнению с облучением (p = 0.006),

а DB(7) – в 8.9 раза по сравнению с контролем (p = 0.004) и в 14.1 раза по сравнению с облучением (p = 0.006). При этом количество остальных клеток, составляющих подавляющее большинство, тоже уменьшается после комбинированного действия исследуемых соединений и облучения, но в меньшей степени – в 2.4 и 3.8 раза соответственно по сравнению с контролем (p = 0.004 в обоих случаях) и в 1.4 и 2.2 раза соответственно по сравнению с облучением (p < 0.05).

Раздельное действие DB(5,7) также приводит к снижению абсолютного количества клеток CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> по сравнению с интактным контролем в 7.5 и 5.2 раза (p = 0.001 и p = 0.004) соответственно. При этом абсолютное количество остальных клеток уменьшается лишь в 1.8 и 3.3 раза (p = 0,001 и p = 0,003) (данные не показаны).

Изменение экспрессии виментина после раздельного и комбинированного действия бисбензимидазолов DB(5,7) и ионизирующего излучения. Как показано с помощью проточной цитометрии, интактные клетки рака молочной железы линии MCF-7 в общей массе не экспрессируют виментин, так как средняя интенсивность флуоресценции клеток, обработанных антителами к этому белку, не отличается от таковой после инкубации с контрольными иммуноглобулинами того же изотипа (рис. 5). Однако через 48-96 ч после облучения в дозе 4 Гр обнаружено специфическое связывание антител к виментину, что свидетельствует об индукции ЭМТ под влиянием у-излучения. Таким образом, было установлено, что через 48 ч после облучения можно зарегистрировать не только описанное выше увеличение пула ОСК, но и радиационно-индуцированный про-



**Рис. 5.** Уровень экспрессии виментина в различные сроки после облучения клеток линии MCF-7 в дозе 4 Гр. По оси ординат — средняя интенсивность флуоресценции с антителами к виментину в процентах от контроля (без облучения). Указана величина р при сравнении с контролем неспецифического связывания, среднее значение которого показано сплошной горизонтальной линией, величины SE — пунктирными линиями.



**Рис. 6.** Интенсивность связывания клеток линии MCF-7 с антителами к виментину после раздельного и комбинированного действия DB(5) или DB(7) и облучения в дозе 4Гр. Через 24 ч после добавления соединений клетки облучали, через 48 ч после облучения выполняли фиксацию клеток для последующего окрашивания и проточноцитометрического анализа. Сплошная горизонтальная линия показывает среднюю интенсивность флуоресценции клеток после обработки контрольными иммуноглобулинами (изотипический контроль неспецифического связывания), пунктирные линии отмечают стандартную ошибку ( $\pm SE$ ) средней интенсивности флуоресценции в контроле неспецифического связывания; \* – p = 0.03 при сравнении с интактным контролем,  $^{n} p = 0.003$  при сравнении с контролем неспецифического связывания.

цесс ЭМТ. Поэтому эта временная точка была выбрана для дальнейшего исследования комбинированного действия DB(5,7) и ионизирующего излучения на ЭМТ по критерию белковой экспрессии виментина. Интересно отметить, что в исследуемой клеточной культуре через 24 ч после облучения экспрессия виментина еще не обнаруживается, как не удается выявить на этом сроке и повышения количества ОСК (данные не показаны).

Инкубация клеток с DB(5,7) перед облучением и в течение 48 ч после него блокирует радиационную ЭМТ (рис. 6), одновременно снижая размер пула ОСК до уровня ниже, чем в контроле.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что одним из важных свойств ОСК является высокая интенсивность откачивания во внеклеточную среду многих химических соединений, включая противоопухолевые препараты, благодаря высокой экспрессии соответствующих АТФ-связывающих транспортеров на клеточной мембране [34]. Нами показано, что внутриклеточное содержание DB(n), где n = 5 или 7, примерно одинаково в ОСК и остальных клетках в отличие от многих известных химиопрепаратов. Эта базовая информация позволяет использовать данные соединения для изучения их противоопу-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

холевого и радиомодифицирующего действия на ОСК.

В данном исследовании показано, что раздельное облучение приводит к росту доли ОСК, выделенных по иммунофенотипу CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>. Эти данные подтверждают более высокую резистентность ОСК к действию редкоионизирующего излучения (по сравнению с основной массой опухолевых клеток) и согласуются с результатами многочисленных исследований, в которых использовались различные подходы к идентификации ОСК рака молочной железы как в экспериментальных, так и в клинических условиях [4, 5, 7, 14, 35–37].

В последнее время помимо механизмов высокой радиорезистентности ОСК, приводящих к сохранению их жизнеспособности и пролиферации после облучения, обсуждается еще один механизм увеличения количества ОСК после воздействия редкоионизирующего излучения перепрограммирование дифференцированных опухолевых клеток, выживших после облучения, в опухолевые стволовые клетки [14, 36]. Процесс дедифференцировки может объяснить увеличение не только относительного, но и абсолютного количества ОСК после радиационного воздействия – эффект, который наблюдался нами в данном исследовании при выявлении ОСК по имунофенотипу и ранее при использовании другого

метода идентификации этих клеток по интенсивному откачиванию флуоресцентного красителя Хехста 33342 [7, 38]. Очевидно, такая дедифференцировка является достаточно редким событием в интактных опухолях/клеточных культурах, но может происходить чаще под влиянием различных факторов, включая ионизирующее излучение. Механизмы этого явления изучались в последние годы во многих лабораториях мира, в результате чего была выяснена роль ЭМТ в поддержании и даже увеличении пула ОСК после облучения путем дедифференцировки нестволовых клеток [29, 36, 39]. Как хорошо известно, радиационное воздействие способно индуцировать ЭМТ опухолевых клеток эпителиального происхождения [29-31], что было подтверждено в данной работе на примере рака молочной железы линии MCF-7 и показано, что повышение белковой экспрессии виментина (одного из основных маркеров ЭМТ) можно зарегистрировать через 48 ч после облучения и в более отдаленные сроки, исследованные в работе (до 96 ч).

В настоящее время накапливаются данные о возможности ингибирования ЭМТ с помощью различных средств, среди которых достаточно эффективными оказались разнообразные модификаторы структуры хроматина [40–42]. В экспериментах с клеточными культурами показано, что блокаторы ЭМТ снижают количество ОСК, поэтому их использование считается очень перспективным в сочетании с традиционными противоопухолевыми воздействиями [43, 44].

Следует отметить, что в процесс перепрограммирования вовлечены эпигенетические механизмы, в том числе изменение метилирования ДНК [45]. Показано, что метилирование ДНК играет непосредственную роль в клеточной миграции, инвазии, метастазировании и ЭМТ опухолевых клеток, а также является важным регуляторным механизмом для поддержания ключевых характеристик ОСК [22, 23, 46]. Логично было предположить, что DB(n), которые обладают ингибирующей активностью в отношении ДНК-метилтрансферазы, способны влиять на размер пула и свойства ОСК путем блокирования ЭМТ. И действительно, при совместном применении DB(n)(где n = 5 или 7) и ионизирующего излучения показано отсутствие экспрессии виментина (одного из основных маркеров ЭМТ), что свидетельствует о блокировании радиационно индуцированного процесса ЭМТ. Важно, что при этом, как и ожидалось, происходило снижение относительного и абсолютного количества ОСК. Интересно, что сама по себе инкубация клеток с DB(5,7) приводила к уменьшению количества ОСК не только по сравнению с таковым при облучении, но и по сравнению с интактным контролем. Можно предположить, что в этом случае эффекты действия изучаемых соединений обусловлены ингибированием спонтанной ЭМТ, которая происходит редко и затрагивает малое число опухолевых клеток, вызывая их дедифференцировку в ОСК, составляющих в контроле лишь 0.29%. Вполне объяснимо, что в интактной культуре MCF-7 не удается зарегистрировать ЭМТ в общей клеточной массе, поскольку этот процесс происходит только в небольшой части клеток. составляющих доли процента от общей популяции. Для подтверждения этого предположения о способности DB(5,7) влиять на спонтанную ЭМТ необходимы дальнейшие исследования экспрессии генов и белковых продуктов, контролирующих этот процесс, в отсортированных ОСК.

В целом полученные результаты согласуются с рядом экспериментальных исследований, в которых показано, что ингибиторы ДНК-метилирования повышают эффективность радиационного воздействия на опухолевые клетки как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [45, 47]. При этом существенно снижается экспрессия генов, контролирующих поддержание ОСК в состоянии дедифференцировки, как показано на примере рака поджелудочной железы [47].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, внутриклеточное содержание синтетических DB(n), где n = 5 или 7, оказалось одинаковым в опухолевых стволовых и нестволовых клетках. Оба соединения способны нивелировать стимулирующее действие у-излучения на популяцию ОСК, заключающееся в повышении относительного и абсолютного количества этих клеток. При комбинированном действии DB(5,7) и облучения происходит блокирование радиационно индуцируемого процесса ЭМТ и значительное уменьшение пула ОСК по сравнению не только с облучением, но и с интактным контролем. Возможным механизмом действия изученных соединений на ОСК является ингибирование ДНК-метилирования ряда генов, контролирующих дедифференцировку опухолевых клеток и свойства ОСК, что требует дальнейшего изучения.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-10025).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. R. P. Coppes and A. Dubrovska, Clin. Oncol. 29, 329 (2017).
- C. Peitzch, I. Kurth, N. Ebert, et al., Int. J. Radiat. Biol. 95, 1 (2019).
- 3. P. Zhu and Z. Fan, Biophys. Rep. 4 (4), 178 (2018).
- N. K. Lytle, A. G. Barber, and T. Reya, Nat. Rev. 18, 669 (2018).
- 5. E. Battle and H. Clevers, Nat. Med. 23 (8), 1124 (2017).
- О. Н. Матчук, И. А. Замулаева, Е. И. Селиванова и др. Радиац. биология. Радиоэкология **52** (3), 261 (2012).
- О. Н. Матчук и А. С. Саенко, Радиация и риск 22 (2), 67 (2013).
- О. Н. Матчук и И. А. Замулаева, Радиация и риск 28 (2), 112 (2019).
- 9. J. Kaiser, Science 347, 226 (2015).
- M. Ahmed, K. Chaudhari, R. Babaeli-Jadidi, et al., Stem Cells 35, 839 (2017).
- 11. A. Desai, Y. Yan, and L. S. Gerson, Stem Cells Translational Medicine 8 (1), 75 (2019).
- 12. Y. J. Kim, E. L. Siengler, N. Siriwon, and P. Wang, J. Cancer Metastasis and Treatment **2**, 233 (2016).
- M. Diehn, R. W. Cho, N. A. Lobo, et al., Nature 458 (7239), 780 (2009).
- C. Lagadec, E. Vlashi, L. D. Donna, et al., Stem Cells 30, 833 (2012).
- 15. C.-H. Chang, M. Zang, K. Rajapaksha, et al., Stem Cell Reports 5, 378 (2015).
- S. Skvortsov, I. I. Skvortsova, D. G. Tang, and A. Dubrovska, Stem Cells 36 (10), 1457 (2018).
- 17. V. Plaks, N. Kong, and Z. Werb, Cell Stem Cell **16** (3), 225 (2015).
- Y. Pan, S. Ma, K. Cao, et al., J. Cancer Research and Therapeutic 14, 1469 (2018).
- 19. J. D. Kuhlmann, L. Hein, I. Kurth, et al., Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry **16**, 38 (2016).
- T. Nunes, D. Hamdan, C. Leboeuf, et al., Int. J. Mol. Sci. 19 (12). DOI: 10.3390/ijms19124036 1 (2018).
- L. Phi, I. Sari, Y.-G. Yang, et al., Stem Cells Int. 2018, Article ID 5416923 (2018). DOI: 10.1155/ 2018/5416923.
- 22. E. N. Wainwright and P. Scaffidi, Trends in Cancer **3** (5), 372 (2017).
- T. B. Toh, J. J. Lim, and E. K.-H. Chow, Mol. Cancer 16 (1), Article No 79 (2017). DOI: 10.1186/s12943-017-0596-9.

- 24. А. А. Иванов, В. И. Салянов, С. А. Стрельцов и др., Биоорган. химия **37** (4), 530 (2011).
- 25. N. A. Cherepanova, A. A. Ivanov, D. V. Maltseva, et al., J. Enzyme Inhib. Med. Chem. **26**, 295 (2011).
- 26. О. Ю. Сусова, А. А. Иванов, С. С. Моралес Руис и др., Биохимия **75** (6), 781 (2010).
- К. А. Чурюкина, И. А. Замулаева, А. А. Иванов и др., Радиац. биология. Радиоэкология 57 (2), 136 (2017).
- N. Loret, H. Denys, P. Tummeres, et al., Cancers 11 (6), 838 (2019). DOI: 10.3390/cancers11060838.
- S. Y. Lee, E. K. Jeong, M. K. Ju, et al., Mol. Cancer 16 (1), Article No 10 (2017). DOI: 10.1186/s12943-016-0577-4.
- H.-R. Park, S.-K. Jo, and U. Jung, In Vivo 33 (6), 1773 (2019).
- J. Lu, Y. Zhong, J. Chen, et al., Cell Physiol. Biochem. 50, 721 (2018).
- M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (7), 3983 (2003).
- К. В. Попов, Е. И. Егорова, А. А. Иванов и др., Биол. мембраны 25 (3), 173 (2008).
- 34. R.-R. Begicevic and M. Falasca, Int. J. Mol. Sci. **18** (11), 2362 (2017). DOI: 10.3390/ijms18112362.
- M. Krause, A. Dubrovska, A. Linge, et al., Adv. Drug Delivery Rev. **109**, 63 (2017).
- 36. F. Li, K. Zhou, B. Zhang, et al., Oncol. Lett. **12**, 3059 (2016).
- И. А. Замулаева, О. Н. Матчук, Е. И. Селиванова и др., Радиац. биология. Радиоэкология 54 (3), 256 (2014).
- О. Н. Матчук, Н. В. Орлова и И. А. Замулаева, Радиац. биология. Радиоэкология. 56 (5), 487 (2016).
- H.-C. Chi, C.-Y. Tsai, M.-M. Tsai, et al., Int. J. Mol. Sci. 18 (9), 1903 (2017). DOI: 10.3390/ijms18091903.
- 40. T. Boulding, R. D. McCuaig, A. Tan, et al., Sci. Rep. 8, Article No 73 (2018). DOI: 10.1038/s41598-017-17913-x.
- S. Ambrosio, C. D. Sacca, and B. Majello, Biochim. Biophys. Acta – Gene Regulatory Mechanisms 1860, 905 (2017).
- 42. A. Kanamoto, I. Ninomiya, S. Harada, et al., Int. J. Oncol. 49, 1858 (2016).
- 43. M. Garg, World J. Stem Cells 9 (8), 118 (2017).
- 44. S. Kotiyal and S. Bhattacharya, Biochem. Biophys. Res. Commun. **453**, 112 (2014).
- 45. R. I. Miousse, R. K. Kutanzi, and I. Koturbash, Int. J. Radiat. Biol. **93**, 457 (2017).
- 46. M. W. Luczak and P. P. Jagodzinski, Folia Histochem. Cytobiol. 44 (3), 143 (2006).
- H.-M. Kwon, E.-J. Kang, K. Kang, et al., Oncotarget 8 (51), 89005 (2017).

## Outcomes of the Combined Effects of Dimeric Bisbenzimidazoles and Exposure to Ionizing Radiation on MCF-7 Breast Cancer Stem Cells

K.A. Churyukina\*, A.L. Zhuze\*\*, A.A. Ivanov\*\*, and I.A. Zamulaeva\*

\*A. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Koroleva 4, Obninsk, Kaluga Region, 249036 Russia

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

The study aims to determine how to eliminate and/or increase radiosensitivity of a population of cancer stem cells, which are responsible for radioresistance in malignant neoplasms. The single and combined effects of  $\gamma$ -radiation at a dose of 4 Gy and dimeric bisbenzimidazoles of DB(n) series with the number of groups in the methylene linker connecting two benzimidazoles, n = 5 or 7 on the cancer stem cells were studied in the MCF-7 human breast cancer cell line. It was shown that DB(5) significantly reduces the relative and absolute number of cancer stem cells by a factor of 5.8 and 7.5 compared to control, respectively (p = 0.001 in both cases), DB(7) - by a factor of 3.6 (p = 0.003) and 5.2 (p = 0.004), respectively. The single irradiation resulted in an increase of the relative and absolute number of cancer stem cells by a factor of 1.7 and 1.6 (p < 0.05) compared to control, respectively. The combined effects of DB(5,7) and exposure to ionizing radiation resulted in a significant decrease in the relative number of cancer stem cells by a factor of 8.2 and 4.1, respectively, as opposed to the effects after single radiation exposure (p = 0.003 and p = 0.004). Even more pronounced outcomes of the combined effects of DB(5,7) and exposure to radiation were found with regard to the absolute number of cancer stem cells, which decreased by a factor of 16.6 and 14.1, respectively, compared to those after single irradiation (p = 0.006 in both cases). DB(5,7) in combination with ionizing radiation inhibits radiation-induced epithelial-mesenchymal transition as it was shown by the expression of vimentin, one of the markers linked to this process, vimentin plays an important role in the formation of the cancer stem cell pool.

Keywords: cancer stem cells, dimeric bisbenzimidazoles, ionizing radiation, combined effect, flow cytometry

УДК 577.3

## СНИЖЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА В НЕЙТРОФИЛАХ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ РЕЖИМОВ СЛАБЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ

© 2020 г. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко

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

*E-mail: docmag@mail.ru* Поступила в редакцию 14.11.2019 г. После доработки 14.11.2019 г. Принята к публикации 20.11.2019 г.

Показано, что слабые комбинированные магнитные поля – постоянное магнитное поле (60 мкТл) и коллинеарное ему переменное низкочастотное магнитное поле на частоте 49.5 Гц – при амплитудах в диапазоне 60–180 нТл вызывают при превентивном 40-минутном воздействии значительное снижение интенсивности респираторного взрыва в суспензии нейтрофилов в ответ на активатор – пептид N-формил-Met-Leu-Phe, регистрируемое методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Эта частота (49.5 Гц) переменной компоненты комбинированных магнитных полей формально соответствует циклотронной частоте для иона Fe<sup>3+</sup>. На близких частотах (46.0 и 48.5 Гц) степень выраженности этого эффекта комбинированных магнитных полей значительно (в три раза) снижается. На частоте переменной компоненты комбинированного магнитного поля 33 Гц эффект отсутствует. Воздействие магнитным сигналом, представляющим собой сумму всех исследованных частот (33.0, 46.0, 48.5 и 49.5 Гц), приводит к эффекту, в два раза менее выраженному, чем при воздействии на частоте 49.5 Гц.

Ключевые слова: слабое магнитное поле, нейтрофилы, респираторный взрыв, свободные радикалы, активные формы кислорода, ион трехвалентного железа, хемилюминесценция. **DOI:** 10.31857/S0006302920010123

Для выяснения механизмов биологического действия слабых комбинированных (коллинеарных постоянного и переменного) магнитных полей (КМП) является важным экспериментальное исследование действия различных режимов КМП на хорошо изученных экспериментальных объектах. Один из них – респираторный взрыв в нейтрофилах – оказался чувствителен к вариациям параметров магнитных условий, предшествующих этому процессу [1]. Множество потенциальных мишеней для действия КМП (свободные радикалы, протоны, молекулярный кислород, ионы железа, ионы кальция и др.) участвуют в респираторном взрыве в нейтрофилах, что позволяет спланировать и провести дифференциальные эксперименты при различной настройке параметров поля.

Ранее нами был зарегистрирован праймирующий эффект (предактивация респираторного взрыва в нейтрофилах) слабых комбинированных

постоянного (42 мкТл) и коллинеарного ему низкочастотного переменного (сумма частот 1.0; 4.4 и 16.5 Гц, с общей амплитудой 0.86 мкТл) магнитных полей, который проявлялся как более выраженное усиление хемилюминесценции суспензии нейтрофилов, после их предварительной обработки КМП в течение часа, в ответ на введение бактериального пептида N-формил-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13ацетата в присутствии люминола [1]. Было показано лишь небольшое усиление перекисного окисления липидов в нейтрофилах после действия этого режима КМП [2]. Не было выявлено взаимосвязи увеличения интенсивности перекисного окисления липидов с процессом функциональной предактивации нейтрофилов в результате действия этого КМП, так как ионол, ингибитор перекисного окисления липидов, не снижал в этом случае индекс прайминга нейтрофилов [2]. Также не снижала индекс прайминга предварительная добавка перехватчика синглетного кислорода гистидина или перехватчика гидроксильных радикалов диметилсульфоксида [3]. Было показано, что низкие концентрации

Сокращения: КМП – комбинированные магнитные поля, ПМП – постоянное магнитное поле.



**Рис.** 1. Блок магнитной обработки: *1* – магнитные экраны; *2* – соленоид; *3* – термостастабилизированная кювета; 4 – экспериментальные образцы.

(~1 мкМ) хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ блокируют стимулирующий эффект этого КМП [3]. Одним из ключевых моментов механизма предактивации нейтрофилов в КМП является выраженная зависимость величины эффекта от концентрации атмосферных газов [4]. Было показано, что предварительная мягкая частичная дегазация суспензии нейтрофилов при давлении атмосферных газов 640 мм рт. ст. приводит к существенному (четырехкратному) снижению клеточного ответа на КМП и практически не отражается на способности клеток генерировать респираторный взрыв в ответ на активатор (пептид N-формил-Met-Leu-Phe) в контроле (частично дегазированная суспензия нейтрофилов) [4]. Это позволяет предположить, что молекулярный кислород может являться одним из вероятных акцепторов слабого КМП в исследуемой тест-системе.

В случае этого режима КМП, стимулирующего респираторный взрыв, мы при выборе параметров переменной низкочастотной компоненты опирались на ранее полученные результаты действия этих параметров поля на мышей с трансплантированной опухолью [5, 6]. В этом случае для формирования переменного магнитного сигнала в качестве формального алгоритма был использован принцип настройки поля на циклотронные частоты ряда простых и комплексных ионов: (НАД)<sup>+</sup>, ионной формы глутаминовой кислоты и ионов K<sup>+</sup> (1,0; 4,4 и 16, 5 Гц соответственно этим ионам, при величине постоянного магнитного поля (ПМП) 42 мкТл). Как показали эксперименты, такой трехчастотный суммарный сигнал обладал наиболее выраженной противоопухолевой активностью по сравнению с отдельными, входящими в него, моночастотами [5, 6]. В настоящей работе, используя тот же принцип подбора частоты поля, мы решили проверить,

проявляется ли эффект КМП в более высокочастотном диапазоне переменной компоненты (30—50 Гц) при настройке поля на циклотронные частоты ионов с большей величиной соотношения q/m и при более сильном ПМП (60 мкТл).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование комбинированных магнитных полей. Эксперименты проводили с относительно слабыми магнитными полями с величинами, сопоставимыми с уровнем геомагнитного фона и менее него, а также в диапазоне частот, близких к присутствующей в лабораторных помещениях промышленной частоте (50 Гц). Поэтому в опытах была использована специальная, необходимая для корректного выполнения таких работ, исследовательская аппаратура – установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления геомагнитного поля – до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 10 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка состояла из трех вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм), закрытых крышками с отверстиями для подводки измерительной и термостабилизирующей аппаратуры (рис. 1). Определение остаточных полей в установке проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Для формирования экспериментальных слабых однородных коллинеарных постоянного и переменного КМП внутри этой системы был установлен специальный индуктор (соленоид), который был подключен к источнику постоянного тока – для формирования постоянного поля – и к источнику переменных низкочастотных магнитных сигналов – для формирования переменной компоненты поля различной интенсивности. Размеры экспериментального участка внутри экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее шести).

Частоты переменной компоненты КМП соответствовали циклотронным частотам ионов  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $H_3O^+$  и  $Fe^{3+}$ , рассчитанным по стандартному выражению:

## $f_{\rm c} = qB_{\rm DC}/2\pi m,$

где q и m – заряд и масса иона,  $B_{\rm DC}$  – индукция постоянной компоненты КМП (ПМП = 60 мкТл). Рассчитанные таким образом частоты были равны 33.0, 46.0, 48.5 и 49.5 Гц. Параметры переменного магнитного поля (частоты и амплитуды) были зада-

ны цифровым методом с использованием цифроаналогового преобразователя платы L 791 («L-Card Company», Москва, Россия). Это обеспечило высокую точность их настройки. Для генерации переменного магнитного поля через соленоид пропускали переменный ток следующего типа:

$$I(t) = \sum_{i=1}^{n} A_i \cos \omega_i t$$
, где  $\omega_i = 2\pi f_i$ ,  $f_i$  – частота в Гц,

который продуцировал изменяющееся во времени переменное магнитное поле с максимальной амплитудой 480 нТл. В ряде опытов использовали эти частоты по отдельности при амплитуде 120 нТл, а также на одной из частот (49.5 Гц) в диапазоне амплитуд 40–480 нТл при фиксированных значениях: 40; 60; 80; 120; 150; 180; 240 и 480 нТл.

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения перитонеальных нейтрофилов использовали лабораторных мышей-самцов линии CD-1 массой 22-25 г, полученных из питомника лабораторных животных «Пущино». В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из Saccharomyces carevisiae, Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, их брюшную полость промывали четырьмя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 4 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли на 60 мин при 4°С. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 96%. Для опытов образцы получали, разводя суспензию нейтрофилов стандартной средой Хенкса (138 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ  $Na_2HPO_4$ , 5 мМ  $NaHCO_3$ , 5.5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Экспонирование суспензии нейтрофилов. Нейтрофилы инкубировали при 37.0 ± 0.2°С в концентрации 1 млн/мл по 0.25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметром 1.2 см и длинной 5.5 см), применяемых затем для измерения хемилюминесценции. Типичное время инкубации составляло 40 мин. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного термостата.

Образцы основных контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл при таком же

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними (контроль геомагнитного поля). В качестве дополнительного контроля использовали образцы, инкубируемые внутри вышеописанной экспериментальной установки для формирования КМП, при постоянном поле 60 мкТл, но с отключенным источником переменного МП (контроль установки). Опытные образцы экспонировали внутри экспериментальной установки при заданных значениях КМП. Опыты повторяли не менее трех раз.

Регистрация хемилюминесценции. После инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контроле и опыте после добавки в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0.35 мМ и активатора генерации активнах форм кислорода – хемотаксического формилированного пептида N-формил-Met-Leu-Phe (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. В работе был использован хемилюминометр Lum-1200 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применяли программу PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в основном контроле, принятом за 100%.

Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение данных из двух контрольных групп (группа 1 – образцы в геомагнитном поле с величиной постоянной компоненты 44 мкТл, в присутствии техногенного магнитного фона на 50 Гц величиной 15–50 нТл; группа 2 – образцы, помещенные в установку для формирования КМП с отключенным источником переменного магнитного поля ( $\Pi M \Pi = 60$  мкТл, переменное магнитное поле < 10 нТл)) не выявило различий в интенсивности респираторного взрыва между этими группами образцов (контроль геомагнитного поля  $100 \pm 10.6\%$ ,  $3.75 \pm 0.40$  B, n = 6; контроль установки 94.4  $\pm$  10.3%, 3.54  $\pm$  0.37 B, n = 6, p = 0.405881). Поэтому, а также в связи с возможностью одновременной инкубации с опытными образцами, в качестве основного контроля в дальнейших экспериментах использовали образцы, экспонируемые в геомагнитном поле (контроль геомагнитного поля).

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в комбинированном МП с переменной компонентой в виде суммы всех четырех исследуемых частот (33.0 Гц; 46.0 Гц; 48.5 Гц; 49.5 Гц) при ее общей амплитуде 480 нТл вызывает существенную деактивацию респираторного взрыва (рис. 2 и 3, табл. 1). Интенсивность хемилюминесцен-



100

Рис. 2. Влияние комбинированных магнитных полей с ПМП = 60 мкТл на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов. По оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения), звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп (P < 0.05). По оси абсцисс – номер группы: 1 - контроль установки; 2 - сумма частот 33; 46; 48.5; 49.5 Гц, амплитуда 480 нТл; 3 - 33 Гц, амплитуда 120 нТл; 4 - 46 Гц, амплитуда 120 нТл; 5 - 48.5 Гц, амплитуда 120 нТл; 6 - 49.5 Гц, амплитуда 120 нТл.

ции нейтрофилов в связи с этим воздействием снижается приблизительно на 30%. Исследование вклада в эффект отдельных частот при их одинаковой амплитуде (по 120 нТл) показало, что наибольшим ингибирующим действием (~60%) КМП обладает на частоте 49.5 Гц (рис. 2 и 3, табл. 1). В этом случае величина эффекта приблизительно в два раза превышает эффект, полученный при воздействии поличастотным сигналом. Частота 33.0 Гц при ПМП = 60 мкТл не оказывает влияния на изучаемый параметр (рис. 2, табл. 1), а частоты 46.0 и 48.5 Гц по отдельности вызывают одинаковый и относительно слабый ингибирующий эффект (~20%).

Более детальное исследование амплитудной зависимости действия КМП на частоте 49.5 Гц показало выраженную и практически одинаковую степень ингибирования респираторного взрыва в диапазоне амплитуд переменной компоненты 80–180 нТл (рис. 4, табл. 2). При уменьшении амплитуды переменного поля до 40 нТл степень выраженности эффекта значительно снижается. При увеличении переменного поля на этой частоте до 240 нТл эффект действия КМП существенно ослабевает, а при 480 нТл уже не проявляется (рис. 4, табл. 2).

Следует отметить, что частота 49.5 Гц при постоянном поле 60 мкТл, на которой отмечается максимальный ингибирующий эффект в наших опытах, соответствует, по крайней мере формально, циклотронной частоте для иона Fe<sup>3+</sup>. Пока мы не можем однозначно утверждать, что действие этого КМП связано с влиянием поля именно на этот ион трехвалентного железа. Для этого нужны более веские экспериментальные доказательства. В этой связи следует отметить, что принцип метода, используемого в нашей работе для детекции эффекта КМП – люминол-зависимой хемилюминесценции – основывается на том, что в процессе стимуляции нейтрофилы продуцируют большое количество различных прооксидантов, способных в процессе взаимодействия с люминолом генерировать мощную хемилюминесценцию, интенсивность которой пропорциональна функциональному статусу клеток [7].



**Рис. 3.** Влияние комбинированных магнитных полей с ПМП = 60 мкТл на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции 1 мкМ пептида N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола: *1* – контроль; *2* – сумма частот 33.0, 46.0, 48.5 и 49.5 Гц, амплитуда 480 нТл; *3* – 49.5 Гц, амплитуда 120 нТл.

Параметры переменного магнитного поля	Интенсивность хемилюминесценции			
	Контроль		Опыт	
	%	Вольты	%	Вольты
сумма 33, 46, 48.5, 49.5 Гц; 480 нТл	$100 \pm 9.3$	$4.41 \pm 0.41$ $n = 6$	71,4 ± 9.1	$3.15 \pm 0.29^{*};$ n = 6; p = 0.000304
33 Гц, 120 нТл	100 ± 11.4	$3.21 \pm 0.37$ n = 6	108.7± 9.3	$3.49 \pm 0.23;$ n = 6; p = 0.171964
46 Гц, 120 нТл	$100\pm6.3$	$3.71 \pm 0.23$ $n = 6$	$80.5\pm6.7$	2.97 $\pm$ 0.20*; n = 6; p = 0.009675
48.5 Гц, 120 нТл	$100 \pm 8.2$	$4.24 \pm 0.35$ $n = 6$	$80,9 \pm 8.8$	$3.43 \pm 0.30^{*};$ n = 6; p = 0.003463
49.5 Гц, 120 нТл	100 ± 9.1	$3.03 \pm 0.28$ $n = 8$	41.9 ± 11.5	1.27 $\pm$ 0.15*; n = 6; p = 0.000000

Таблица 1. Интенсивность респираторного взрыва в суспензии нейтрофилов после действия КМП с постоянной компонентой 60 мкТл при различных частотах переменного магнитного поля

Специальные опыты показали, что основным и наиболее сильным окислителем люминола в этой системе является гипохлорит [8], который появляется в результате действия железосодержащего фермента миелопероксидазы, принимающей непосредственное участие в формировании интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции при респираторном взрыве [7]. Частичное ингибирование этого фермента могло бы объяснить снижение интенсивности респираторного взрыва в нашем случае (действие КМП на резонансной частоте иона Fe<sup>3+</sup>). Экспериментальное исследование этого аспекта молекулярного механизма КМП, по-видимому, имеет смысл провести в первую очередь.

В литературе присутствуют единичные сообщения о биологическом действии КМП при настройке на циклотронную частоту иона  $Fe^{3+}$  [9]. Так, например, было показано, что такое КМП, но значительно с более сильной, чем в нашем случае, переменной компонентой (в 1.8 раз больше коллинеарного постоянного поля 46.8 мкТл). увеличивает потребление у бактерий Rhodospirillum rubrum, штамм VKM B-1621 растворенного железа [10]. В этой работе величину переменного поля задавали с учетом модели магнитного параметрического резонанса [11]. Однако эта модель неприменима для анализа результатов в нашем случае (нанотесловые поля), так как в наших экспериментах показана четкая частотная зависимость эффекта: изменение его величины в три раза при изменении действующей частоты на 1 Гц с 48.5 Гц до 49.5 Гц при одинаковой амплитуде 120 нТл. Параметрическая гипотеза в случае для

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

нанотесловых полей [12] не способна в принципе предсказать таких изменений, так как не содержит элемента частотной селективности. В этом она не согласуется с результатами целого ряда более ранних и последующих экспериментов раз-



Рис. 4. Влияние комбинированных магнитных полей с ПМП = 60 мкТл на частоте 49.5 Гц при различной величине переменного магнитного поля на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов. По оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения), звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп (P < 0.05). По оси абсцисс – номер группы: 1 – контроль установки, 2 – амплитуда 40 нТл, 3 – 60 нТл, 4 – 80 нТл, 5 – 120 нТл, 6 – 150 нТл, 7 – 180 нТл, 8 – 240 нТл, 9 – 480 нТл.

Амплитуда переменного магнитного поля, нТл	Интенсивность хемилюминесценции				
	Контроль		Опыт		
	%	Вольты	%	Вольты	
40	$100 \pm 5.0$	$4.02 \pm 0.20$ $n = 6$	72.9 ± 10.0	$2.93 \pm 0.29^*;$ n = 6; p = 0.000071	
60	100 ± 6.21	$3.48 \pm 0.19$ $n = 6$	$66.2 \pm 8.4$	$2.27 \pm 0.19^*;$ n = 6; p = 0.000012	
80	$100 \pm 7.6$	$3.76 \pm 0.29$ $n = 6$	$50.3 \pm 5.9$	$1.89 \pm 0.11^*;$ n = 6; p = 0.000000	
120	100 ± 7.9	$3.76 \pm 0.29$ $n = 6$	$42.5\pm7.4$	$1.31 \pm 0.10^*;$ n = 6; p = 0.000000	
150	$100 \pm 8.7$	$3.07 \pm 0.27$ $n = 6$	53.1 ± 10.6	$1.63 \pm 0.17^*;$ n = 6; p = 0.000004	
180	$100 \pm 7.3$	$3.21 \pm 0.24$ $n = 6$	53.1 ± 12.4	$1.86 \pm 0.23^*;$ n = 6; p = 0.000008	
240	$100\pm10.8$	$3.79 \pm 0.41$ $n = 6$	$85.2\pm10.8$	$3.23 \pm 0.35;$ n = 6; p = 0.055095	
480	$100 \pm 5.8$	$3.65 \pm 0.21$ $n = 6$	92.3 ± 8.7	$3.37 \pm 0.29;$ n = 6; p = 0.121968	

Таблица 2. Интенсивность респираторного взрыва в суспензии нейтрофилов после действия КМП с постоянной компонентой 60 мкТл при различных амплитудах переменного магнитного поля на частоте 49,5 Гц

личных авторов, выполненных с крайне слабыми нанотесловыми полями [13–19]. Из всех известных на данный момент гипотез первичного механизма действия слабых КМП [20–27] эта гипотеза, по крайней мере в современной редакции [12], наименее подходит для объяснения уже полученных экспериментальных данных, возможно нуждаясь вследствие этого в модификации.

С практической точки зрения полученный нами результат — возможность выраженного ингибирования интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах с помощью слабых КМП представляется важным, так как открывает перспективу использования таких полей для коррекции состояния при хронических воспалительных заболеваниях, в частности при заболеваниях суставов и других патологиях. Важно отметить, что эффективно действующая частота 49.5 Гц очень близка к промышленной частоте (50 Гц), а также по величине (60—180 нТл) практически попадает в диапазон флуктуаций амплитуд промышленной частоты в жилых помещениях. Единственным отличием здесь является необходимость присутствие чуть более выраженной, чем в средних широтах (38–53 мкТл), коллинеарной постоянной компоненты 60 мкТл. Однако близость этих параметров позволяет предметно поднять вопросы экологической значимости слабых магнитных полей, а также их потенциального влияния на здоровье. В этой связи также интересны последние данные о влиянии имитаций геомагнитных бурь на биологические объекты [28, 29].

## 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

- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика 61 (3), 510 (2016).
- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Г. В. Новиков и Е. Е. Фесенко, Биофизика 62 (5), 926 (2017).
- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика 62 (3), 547 (2017).
- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика 63 (2), 277 (2018).
- 5. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, Bioelectromagnetics **30**, 343 (2009).
- В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., Биофизика 55 (4), 631 (2010).
- 7. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
- Д. И. Рощупкин, Н. С. Белакина и М. А. Мурина, Биофизика 51, 99 (2006).
- 9. В. Н. Бинги, Принципы электромагнитной биофизики (Изд-во «Физматлит», М., 2011).
- 10. G. Khokhlova, T. Abashina, N. Belova, et al., Bioelectromagnetics **39** (6), 485 (2018).
- 11. V. V. Lednev, Bioelectromagnetics 12 (2), 71 (1991).
- Н. А. Белова и В. А. Панчелюга, Биофизика 55 (4), 750 (2010).
- 13. В. В. Новиков и М. Н. Жадин, Биофизика **39** (1), 45 (1994).
- 14. В. В. Новиков, Биофизика 39 (5), 825 (1994).

- 15. M. N. Zhadin, V. V. Novikov, F. S. Barnes, and N. F. Pergola, Bioelectromagnetics **19**, 41 (1998).
- E. D'Emilia, L. Giuliani, M. Ledda, et al., Electromagn. Biol. Med. 36 (1), 55 (2017).
- 17. A. Pazur, Electromagn. Biol. Med. 37 (2), 100 (2018).
- N. V. Bobkova, V. V. Novikov, N. I. Medvinskaya, et al., Electromagn. Biol. Med. **37** (3), 127 (2018).
- 19. E. G. Novoselova, V. V. Novikov, S. M. Lunin, et al., Electromagn. Biol. Med. **38** (1), 74 (2019).
- 20. V. N. Binhi, Bioelectromagnetics 21, 34 (2000).
- 21. V. N. Binhi and F. S. Prato, Sci. Reports 8, 13495 (2018).
- 22. L. Makinistian, Sci. Reports 9, 7478 (2019).
- 23. V. V. Novikov and A. V. Karnaukhov, Bioelectromagnetics **18**, 25 (1997).
- В. О. Пономарев, В. В. Новиков, А. В. Карнаухов и О. А. Пономарев, Биофизика 53 (2), 197 (2008).
- 25. А. В. Карнаухов, Биофизика 42 (4), 971 (1997).
- 26. E. Del Giudice, M. Fleischmann, G. Preparata, et al., Bioelectromagnetics 23, 522 (2002).
- 27. A. R. Liboff, C. Poggi, and P. Pratesi, Electromagn. Biol. Med. **36**, 265 (2017).
- 28. И. Л. Голованова, А. А. Филиппов, Ю. В. Чеботарева и др., Вопр. ихтиологии 55 (4), 476 (2015).
- 29. А. В. Романовский, Д. С. Песня, Е. И. Извеков и др., Биофизика 59 (6), 1151 (2014).

# Decrease of Respiratory Burst in Neutrophils after Exposure to Weak Combined Magnetic Fields of a Certain Duration

## V.V. Novikov, E.V. Yablokova, and E.E. Fesenko

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

It has been shown that after 40-min exposure to weak combined magnetic fields: a static magnetic field ( $60 \mu$ T) and a collinear low-frequency magnetic field with frequency of 49.5 Hz within the 60-180 nT range, a significant decrease in the respiratory burst activity of the neutrophil suspension was recorded in response to peptide N-formyl-Met-Leu-Phe activation. This decreased response was shown by luminol-dependent chemiluminescence. The frequency of 49.5 Hz of the alternating component of combined magnetic fields nominally corresponds to Fe<sup>3+</sup> ion cyclotron resonance frequency. At closely spaced frequencies (46 Hz and 48.5 Hz), the biological effect of combined magnetic fields tended to be three times less pronounced. There is no biological effect at 33 Hz, the frequency of the alternating component of combined magnetic fields. Exposure to magnetic signal, which is the sum of all investigated frequencies (33.0; 46.0; 48.5 and 49.5 Hz), led to the effect which was two times less pronounced than that after exposure to combined magnetic fields at 49.5 Hz.

Keywords: weak magnetic field, neutrophils, respiratory burst, free radicals, reactive oxygen species, ion  $Fe^{3+}$ , chemiluminescence

**———— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ** =

УДК 577.352, 576.32

# ИНГИБИРОВАНИЕ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ КАК МОДЕЛЬ ГИПЕРАКТИВАЦИИ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС

© 2020 г. Т.В. Карелина, Ю.Д. Степаненко, Д.А. Сибаров, П.А. Абушик, С.М. Антонов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

*E-mail: polinaabushik@gmail.com* Поступила в редакцию 06.08.2019 г. После доработки 14.10.2019 г. Принята к публикации 18.11.2019 г.

Патологические изменения в мозжечке зачастую сопряжены с дисфункцией клеток Пуркинье, которая проявляется в чрезмерной спайковой активности. Вопреки классической модели нейродегенерации, когда гиперактивацию нейронов вызывают долговременным действием высоких концентраций возбуждающих агонистов (глутамата или *N*-метил-D-аспартата), в наших экспериментах увеличение частоты спайковой активности клеток Пуркинье было вызвано за счет ингибирования тормозной передачи антагонистом ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов габазином (гидробромидом 6-имино-3-(4метоксифенил)-1(6*H*)-пиразинобутановой кислоты). У взрослых и молодых животных габазин вызывал достоверное увеличение частоты разрядов клеток Пуркинье через 25 и 45 мин действия соответственно. Таким образом, на взрослых животных данная модель работала более эффективно, чем на молодых, что определяется онтогенетическими особенностями формирования коры мозжечка. Более того, применение NS 309 (6,7-дихлор-1*H*-индол-2,3-дикетон-3-оксима), модулятора Ca<sup>2+</sup>активируемых K<sup>+</sup>-каналов малой проводимости, в данной модели позволяло компенсировать вызванное антагонистом габазином увеличение частоты простых спайков в разряде клеток Пуркинье до уровня контрольных значений у молодых и взрослых крыс.

Ключевые слова: клетки Пуркинье, мозжечок, SK-каналы, ГАМК, спайк. **DOI:** 10.31857/S0006302920010135

Мозжечок млекопитающих играет ключевую роль в моторной активности, осуществляя мониторинг всех двигательных актов и снижая ошибку между задуманным и совершенным действием [1]. На клетках Пуркинье (КП), которые являются ключевым морфофункциональным элементом коры мозжечка, происходит конвергенция всей сенсорной информации, поступающей в мозжечок. Аксоны этих клеток формируют единственный эфферентный путь из коры мозжечка к его ядрам и вестибулярным центрам продолговатого мозга [2, 3]. Спинномозговая атаксия является нейродегенеративным заболеванием, которое проявляется в нарушении координации и точности движений и сопровождается изменением паттерна активности КП, а затем их дисфункцией и гибелью [4, 5]. Известно, что за счет выброса ГАМК (у-аминомасляной кислоты) интернейроны молекулярного слоя коры мозжечка регулиру-

ют активность КП [6]. Ранее при создании модели гиперактивации КП, сопровождающей спинномозговую атаксию, было показано, что активация рецепторов глутамата в срезах мозжечка и *in vivo*, вопреки ожиданиям, приводила к ингибированию постсинаптических токов КП и снижала частоту простых спайков. Важно, что ап-ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов пликация антагониста SR 95 531 (гидробромида 6-имино-3-(4-метоксифенил)-1(6Н)-пиразинобутановой кислоты) снимала ингибирующее действие агониста рецептора глутамата *N*-метил-D-аспартата, тем самым увеличивая спонтанную активность КП [7]. Более того, на срезах мозга в гиппокампе [8], тканевых эксплантантах неокортекса [9], в первичной моторной и соматосенсорной коре in vivo [10] и нейронах коры в первичной культуре ткани [11] было показано, что блокирование тормозной ГАМКергической передачи бикукуллином приводит к возникновению эпилептиформных волн деполяризации нейронов, увеличению частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических токов и генерации эпилептоподобной электрической активности. Следует отметить, что отмывка бикукуллина не подавляла генерацию подобных

Сокращения: КП — клетки Пуркинье, ГАМК —  $\gamma$ -амино-масляная кислота, SR 95 531 — 6-имино-3-(4-метоксифенил)-1(6*H*)-пиразинобутановой кислоты гидробромид (габазин), SK-каналы — Ca<sup>2+</sup>-активируемые K<sup>+</sup>-каналы малой проводимости, NS 309 — 6,7-дихлор-1H-индол-2,3-дикетон-3-оксим.

аномальных форм электрической активности нейронной сети [11].

В развитии центральной нервной системы ГАМК регулирует морфогенез, а именно миграцию клеток и их синаптогенез, т. е. рост аксонов к мишеням иннервации, образование синапсов, а также и клеточную гибель. Показано, что только к 30-м суткам постнатального развития (Р30) формируется полноценная тормозная ГАМКергическая синаптическая передача, присущая зрелой центральной нервной системе [12]. При исследовании функциональной активности КП необходимо также учитывать и возрастные особенности дифференцировки клеточных элементов и их связей в коре мозжечка. Например. звездчатые клетки начинают образовывать синапсы с дендритами КП в Р14, что совпадает с началом расширения дендритного дерева КП [13]. Другие авторы указывают на то, что процесс синаптогенеза протекает в коре мозжечка вплоть до Р90 [14], а на Р21 в белом веществе мозжечка еще присутствуют пролиферирующие КП [15]. Кроме этого, на третьей неделе постнатального развития продолжается формирование электрофизиологических свойств КП, так как в этот период появляются смешанные Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-спайки и тримодальный паттерн разряда КП [16]. Также онтогенетические особенности присущи и экспрессии Ca<sup>2+</sup>активируемых К<sup>+</sup>-каналов малой проводимости (SK-каналы), модуляция которых приводит к снижению частоты простых спайков КП, тем самым оказывая терапевтический эффект при лечении спинномозговой атаксии [4, 5, 17, 18]. У старых животных снижение частоты простых спайков КП за счет введения положительных модуляторов SK-каналов происходит быстрее, чем у взрослых животных, что определяется возрастными особенностями динамики внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и снижением экспрессии потенциал-зависимых Са<sup>2+</sup>-каналов в молекулярном слое мозжечка [19].

Таким образом, ввиду несостоятельности гиперактивирующего действия агонистов рецепторов глутамата на КП [7] и наличием отногенетических особенностей развития коры мозжечка, цель данной работы заключалась в создании модели гиперактивации КП и сравнении ее эффективности у разных возрастных групп животных. В работе был проведен анализ изменения частоты простых спайков КП при ингибировании тормозной передачи через ГАМК<sub>А</sub>-рецепторы у молодых (P14–15) и взрослых (P90–150) крыс в модели *in vivo*. В данной модели активации КП проведен анализ изменения частот образования спайков при модуляции SK-каналов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили с помощью метода внеклеточной регистрации активности КП мозжечка на самцах крыс линии Вистар. При проведении экспериментов животные были разделены на две группы: молодые (всего 22 крысы возрастом от 14 до 15 суток или Р14–15 соответственно) и взрослые (всего 26 крыс возрастом от 3 до 6 месяцев или Р90-150 соответственно). Для наркотизации животных использовали уретан, который вводили внутрибрюшинно из расчета 1200 мг/кг массы животного. При необходимости в ходе эксперимента дозу увеличивали до 1600 мг/кг. Регистрацию и идентификацию КП осуществляли по ранее описанной методике [20]. V наркотизированного животного удаляли скальп, снимали мышечный слой и сверлили отверстие диаметром 2 мм в затылочной кости над червем мозжечка. Затем крысу закрепляли в стереотаксической установке. Для регистрации внеклеточной активности КП использовали стеклянные микроэлектроды из боросиликатного стекла (внешний диаметр 1.5 мм, внутренний -1.1 мм, Sutter Instrument, США), заполненные раствором 2.5 M NaCl. Погружение микроэлектрода в ткань мозжечка осуществляли с помощью автоматического манипулятора с шагом погружения 5 мкм на глубину до 5 мм. КП идентифицировали по характерному для них паттерну активности: наличию простых и сложных спайков, а также тормозной паузы после сложного спайка перед серией простых. Сигнал от регистрируемой клетки усиливали с помощью дифференциального усилителя (AC/DC Differential Amplifier, model 3000, A-M Systems, Inc, США) и оцифровывали с частотой дискретизации 10000 изм/с с помощью аналого-цифрового преобразовтеля L-791 (ЗАО «Л-КАРД», Россия) в оригинальной программе Bioactivity Recorder v. 5.3, разработанной Д.А. Сибаровым [http://sibarov.ru/index.php?slab=software] для последующего анализа частоты простых спайков в программе Clampfit 10.2 (Molecular Devices Corp, США). Количество зарегистрированных КП соответствует количеству использованных животных, т. е. на одном животном была зарегистрирована одна КП. Подачу действующих веществ осуществляли согласно стандартной методике [21] путем их аппликации микропипеткой на обнаженную (диаметром 2 мм) поверхность мозжечка в области введения микроэлектрода.

Сначала была проведена контрольная серия экспериментов, в которой осуществляли аппликацию физиологического раствора (0.9% NaCl) на обнаженную поверхность мозжечка в зоне введения микроэлектрода. Затем в следующих двух сериях экспериментов для ослабления тормозного влияния интернейронов на КП и, как следствие, создания условия для повышенного возбуждения КП

был использован избирательный антагонист ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов SR 95 531 (габазин, Tocris, США). Для снятия гипервозбуждения КП использовали позитивный модулятор SK- и IK-каналов -NS 309 (6,7-дихлор-1Н-индол-2,3-дикетон-3-оксим) (Tocris, США). При аппликации веществ и физиологического раствора осуществляли визуальный контроль уровня жидкости в краниальном окне и для поддержания его на одном уровне повторно апплицировали раствор микропипеткой. За час регистрации общий объем апплицируемого вещества составлял 500 мкл и соответственно за 30 мин регистрации – 250 мкл. Действующие вещества использовали в концентрации 200 мкМ как для SR 95 531, так и для NS 309. Растворы действующих веществ готовили на 0.9%-м NaCl. Внеклеточную регистрацию активности идентифицированной КП осуществляли 30-секундными интервалами в течение 15 мин до аппликации вещества (исходная частота) и 60 мин после аппликации, через каждые 5 мин.

В первой серии экспериментов после регистрации исходной активности КП (рис. 1а) было исследовано влияние SR 95 531 на паттерн разряда КП мозжечка (рис. 16). Во второй серии экспериментов помимо регистрации исходной активности КП и после 60 мин действия антагониста ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов SR 95 531 осуществляли аппликацию NS 309 и продолжали регистрацию активности КП в течение еще 40–60 мин.

При сравнении данных из контрольной серии экспериментов с экспериментальными для каждой клетки определяли среднее значение частоты простых спайков в течение 30 с по всем указанным временным отметкам. После этого высчитывали среднее значение по всем зарегистрированным клеткам и стандартную ошибку среднего для всех временных отметок. Затем высчитывали относительные частоты, приняв за единицу исходную частоту спайков до аппликации. В дальнейшем для выявления достоверности отличий между контрольной серией экспериментов и сериями с аппликацией антагониста ГАМКА-рецепторов SR 95 531 и активаторов SK-каналов NS 309 для каждой временной отметки использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением поправки Бонферрони.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние антагониста ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов SR 95 531 на частоту простых спайков клеток Пуркинье у молодых и взрослых крыс. В контрольной серии экспериментов как у молодых животных, так и у взрослых крыс при аппликации физиологического раствора в течение 60 мин не было выявлено достоверного изменения частоты простых спайков в разряде КП относительно исходного значения. Изменение среднего значения относительной частоты простых спайков по сравнению с исходной частотой в отдельные периоды регистрации в возрастной группе P14 составило 7– 18%, а у взрослых животных – 7–13%. Таким образом, было продемонстрировано, что сама процедура аппликации не влияла на картину разряда КП.

У крысят SR 95 531 вызывал постепенное увеличение частоты простых спайков в разряде КП (верхняя кривая на рис. 1в). Через 45 мин после аппликации были обнаружены достоверные отличия от контроля в соответствующей временной точке (p < 0.05, n = 6, ANOVA, поправка Бонферрони), которые сохранялись до конца периода регистрации. Наибольшее значение частота простых спайков достигала через 60 мин от начала аппликации и была более чем в два раза больше контрольного значения в это же время. У взрослых животных, в отличие от молодых крыс, при аппликации SR 95 531 достоверное увеличение частоты простых спайков в разряде КП (рис. 2а,б) достигалось через 25 мин после начала аппликации (p < 0.05, n = 7, ANOVA, поправка Бонферрони), т. е. раньше, чем у молодых крыс. При этом максимальное увеличение происходило уже к 30 мин регистрации, но в среднем лишь на 30% (рис. 2в).

Как видно из рис. 1 и 2, характер изменений частоты простых спайков в разряде КП у животных разных возрастных групп отличается друг от друга. Если у двухнедельных крысят наблюдался неуклонный рост частоты простых спайков на протяжении всего периода аппликации SR 95 931, то у взрослых животных, начиная с 25 мин от начала аппликации, значение частоты простых спайков практически не менялось до конца периода аппликации. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данный подход – использование селективного антагониста ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов SR 95 931 как блокатора тормозной активности в нейронной сети [7] – применим для получения модели гипервозбуждения КП мозжечка.

Влияние положительного модулятора SK/IKканалов на частоту простых спайков клеток Пуркинье, вызванных действием антагониста ГАМК<sub>А</sub>рецепторов SR 95 531. Во второй серии экспериментов мы проверяли гипотезу о том, что гиперактивацию КП мозжечка, полученную при ослаблении тормозного влияния, оказываемого на нее интернейронами молекулярного слоя, можно нивелировать за счет активации Ca<sup>2+</sup>-активируемых калиевых каналов. Для этой цели мы применяли агонист SK/IK-подтипов Ca<sup>2+</sup>-активируемых калиевых каналов NS 309. Как в группе молодых крыс (P14–15), так и в группе взрослых животных (P90–150) нам удалось получить снижение частоты простых спайков в паттерне разряда КП. Од-



**Рис. 1.** Активность клеток Пуркинье мозжечка молодых крыс (14-е–15-е сутки постнатального развития, P14–15) в контроле и под влиянием антагониста ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов SR 95 531. Представлены фрагменты записи активности КП исходно, до аппликации SR 95 531 (200 мкМ) (а), и во время аппликации антагониста (б). (в) – Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч при аппликации физиологического раствора (серая линия) и антагониста SR 95 531 (черная пунктирная линия). Звездочками показано статистически достоверное отличие от контрольных значений частоты в соответствующие моменты времени (ANOVA, поправка Бонферрони; \* – p < 0.05, \*\*\* – p < 0.001).



**Рис. 2.** Активность клеток Пуркинье мозжечка взрослых крыс (90-е–150-е сутки постнатального развития, P90–150) исходно и под влиянием антагониста ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов SR 95 531 (200 мкМ). Представлены фрагменты записи активности КП исходно, до аппликации SR 95 531 (а), и во время аппликации антагониста (б). (в) – Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч при аппликации физиологического раствора (серая линия) и антагониста SR 95 531 (черная пунктирная линия). Звездочками показано статистически достоверное отличие от контрольных значений частоты в соответствующие моменты времени (ANOVA, пост-тест Бонферрони; \* – p < 0.05, \*\* – p < 0.01, \*\*\* – p < 0.001).

нако было зафиксировано возрастное отличие (рис. 3). В контрольных условиях к 60-й минуте измерений частота простых спайков у молодых крыс достигала 6.0  $\pm$  0.9 имп/с, а при действии антагониста ГАМК<sub>А</sub>-рецепторов SR 95 531 в этой же временной точке наблюдалось достоверное


**Рис. 3.** Частота простых спайков (ПС) клеток Пуркинье исходно (0 мин), после 60 мин действия антагониста ГАМК<sub>А</sub>рецепторов SR 95 531 (200 мкМ) и последующей аппликации положительного модулятора SK-каналов NS 309 (200 мкМ) в течение 15–20 мин и 25–30 мин. Представлена средняя частота простых спайков КП мозжечка: (а) – молодых крыс (14-е–15-е сутки постнатального развития, P14–15); (б) – взрослых крыс (90-е–150-е сутки постнатального развития, P90–150). Звездочками и линиями показано статистически достоверное отличие от исходных значений частоты или частоты после воздействия (ANOVA, пост-тест Бонферрони; \* - p < 0.05, \*\* - p < 0.01, \*\*\* - p < 0.001).

увеличение их частоты по сравнению с контролем до 12.1  $\pm$  2.3 имп/с (p < 0,001, n = 9, ANOVA, посттест Бонферрони, рис. 3а). При последующей аппликации агониста SK/IK-каналов NS 309 частота простых спайков достоверно снижалась через 15—20 мин и достигала  $5.6 \pm 0.9$  имп/с, что достоверно не отличалось от контрольных значений (p > 0.5, n = 9, ANOVA, поправка Бонферрони). Увзрослых (Р90-150) крыс, в отличие от молодых (Р14-15) животных, уровень частоты простых спайков в контрольных условиях был существенно выше и достигал в среднем 29.1 ± 3.5 имп/с (n = 10), тем не менее SR 95 531 вызывал достоверное по сравнению с контролем увеличение частоты простых спайков до 41.1 ± 2.5 имп/с (p < 0.001, n = 10, ANOVA, пост-тест Бонферрони). Важно, что, в отличие от молодых крыс, аппликация NS 309 приводила к достоверному снижению частоты простых спайков до уровня контроля лишь через 25-30 мин (p > 0.05, n = 10ANOVA, поправка Бонферрони). Таким образом, можно сделать вывод, что как у молодых животных, так и у взрослых активация SK/IK-подтипов Ca<sup>2+</sup>-активируемых К<sup>+</sup>-каналов способна снять гиперактивацию КП мозжечка в условиях снижения тормозного влияния, оказываемого на КП интернейронами молекулярного слоя. При этом исходное значение частоты простых спайков у крысят восстанавливалось раньше, чем у взрослых животных.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Нейродегенеративные изменения в мозжечке зачастую сопряжены с дисфункцией КП [22], которая может проявляться в чрезмерной спайко-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

вой активности. Вопреки классической нейродегенеративной модели, когда гиперактивацию нейронов вызывают долговременным действием высоких концентраций возбуждающих агонистов [23, 24], в наших экспериментах гиперактивация КП была вызвана за счет ингибирования тормозной передачи, опосредованной ГАМК<sub>А</sub>-рецепторами, что согласуется с данными о применении антагонистов и блокаторов ГАМКА-рецепторов как инициаторов эпилептиформных волн деполяризации нейронов и временному увеличению частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических токов [11]. Активность КП напрямую зависит от зрелости остальных клеточных элементов коры мозжечка и формирования полноценной ГАМКергической передачи [12, 16]. У крысят процесс морфо- и гистогенеза коры мозжечка продолжается весь первый месяц постнатальной жизни [13, 25]. При этом происходят функциональные изменения КП, а именно увеличение активности за счет усиления ГАМКергического влияния тормозных интернейронов молекулярного слоя на КП в результате созревания их связей с КП [26]. В наших экспериментах у молодых и взрослых крыс ингибирование ГАМКАрецепторов SR 95 531 достигало насыщающих концентраций вблизи КП постепенно по мере диффузии, поэтому скорость наступления эффекта могла зависеть от возрастных особенностей созревания коры мозжечка. Так, у молодых крыс увеличение спайковой активности наступало в два раза медленнее, чем у взрослых крыс (рис. 1в и 2в). Это, по-видимому, объясняется различиями в степени зрелости морфологических и функциональных свойств КП и незаконченным процессом формирования ГАМКергических синап-

сов в этом возрасте. Следует отметить, что частота простых спайков в контроле (исходно) у молодых крыс ниже, чем у взрослых. Это соответствует нормальному постнатальному физиологическому развитию, когда в онтогенезе происходит увеличение спайковой активности [19], и может объясняться уменьшением длительности рефрактерного периода, следующего за возникновением спайка [27]. Таким образом, примененная нами модель гиперактивации КП через ингибирование ГАМКергической передачи *in vivo* может эффективно применяться при исследовании нейродегенеративных состояний в мозжечке крыс. Более того, использование модулятора SK-каналов NS 309 в данной модели позволило предотвратить развитие гиперактивации КП, тем самым продемонстрировав терапевтический эффект снижение частоты простых спайков КП. Это согласуется с данными о восстановлении нарушенного паттерна активности КП и снижении симптомов спиномозговой атаксии у мутантных животных [4, 5, 17, 18]. В работе, выполненной in vivo на взрослых и старых крысах, показано, что частота простых спайков КП при аппликации NS 309 снижается быстрее у старых крыс, что опосредовано онтогенетическим изменением экспрессии потенциал-зависимых кальциевых каналов Р/Q-типа и исчезновением потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа в молекулярном слое мозжечка [19, 28].

Таким образом, результаты, представленные в данной работе, показывают различие в скорости снижения активности КП: у молодых крыс снижение частоты простых спайков происходило быстрее, чем у взрослых, что может быть опосредовано различиями в экспрессии потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов и  $Ca^{2+}$ -проницаемых рецепторов *N*-метил-D-аспартата [29]. Причины возрастных отличий в эффекте модуляции SK-каналов требуют дальнейшего изучения, поскольку могут быть связаны с дефицитом функций КП, связанных с особенностями онтогенетического развития.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290427-7.

#### 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. M. Ito, Brain Res. 886 (1–2), 237 (2000).
- 2. J. M. Bower, Front. Cell. Neurosci. 4, pii:27 (2010).
- 3. J. C. Eccles, M. Ito, and J. Szentagothai, The *cerebel-lum as a neuronal machine* (Springer-Verlag, Berlin, 1967).
- 4. V. G. Shakkottai, M. do Carmo Costa, J. M. Dell'Orco, et al., J. Neurosci. **31** (36), 13002 (2011).
- 5. J. T. Walter, K. Alvina, M. D. Womack, et al., Nat. Neurosci. 9 (3), 389 (2006).
- W. Pan, W.-Y. Wu, Y.-H. Bing, et al., Pharmacology 103, 82 (2019).
- 7. H. Liu, S.-N. Zhao, G.-Y. Zhao, et al., Brain Res. **1560**, 1 (2014).
- H. S. Swatzwelder, W. W. Anderson., and W. A. Wilson, Epilepsy Res. 2 (4), 239 (1988).
- M. J. Gutnick, B. Wolfson, and F. Baldino, Exp. Brain Res. 76 (1), 131 (1989).
- 10. M. Sáeza, M. Ketzefb, J. Alegre-Cortésa, et al., Neuroscience **381**, 115 (2018).
- 11. Д. А. Сибаров, П. А. Абушик, А. Е. Большаков и др., Биол. мембраны **31** (1), 33 (2014).
- 12. C. Takayama and Y. Inoue, Anat. Sci. Int. **79**, 124 (2004).
- 13. J. Altman, J. Comp. Neurol. 145, 399 (1972b)
- J. Takács and J. Hámori, J. Neurosci. Res. 38 (5), 515, (1994).
- 15. H. Yamanaka, Y. Yanagawa, and K. Obata, Neurosci. Res. **50**, 1 (2004).
- B. E. McKay and R. W. Turner, J. Physiol. 567 (3), 829 (2005).
- M. Gymnopoulos, L. A. Cingolani, P. Pedarzani, et al., J. Comp. Neurol. **522** (5), 1072 (2014).
- M. D. Womack and K. Khodakhah, J. Neurosci. 23 (7), 2600 (2003).
- 19. Т. В. Карелина, Ю. Д. Степаненко, П. А. Абушик и др., Acta Naturae **8**, 4(31), 53 (2016).
- 20. П. А. Егорова, Т. В. Карелина, О. Л. Власова и др., Журн. эвол. биохим. физиол. **50** (2), 102 (2014).
- Z. Gao, B. Todorov, C. F. Barrett, et al., J. Neurosci. 32 (44), 15533 (2012).
- M. Samson, D. O. Claassen, Neurodegener Dis. 17 (4– 5), 155 (2017).
- 23. E. V. Mironova, A. A. Evstratova, and S. M. Antonov, J. Neurosci. Methods **163**, 1 (2007).
- 24. A. Lau, M. Tymianski, Pflugers Arch. 460 (2), 525 (2010).
- 25. M. B. Pisu, E. Roda, D. Avella, et al., Neuroscience **129**, 655 (2004).
- 26. M. Hausser and B. A. Clark, Neuron 19, 665 (1997).
- 27. S. Guan, S. Ma, Y. Zhu, et al., Brain Res. **1097** (1), 59 (2006).
- Y. H. Chung, C. M. Shin, M. J. Kim, et al., Brain Res. 903 (1–2), 247 (2001).
- D.A. Sibarov, J. D. Stepanenko, I.V. Silantiev, et al., J. Mol. Neurosci. 64 (2), 300 (2018).

# Inhibition of GABAergic Transmission as a Model of Purkinje Cell Hyperactivation in the Rat Cerebellum

# T.V. Karelina, J.D. Stepanenko, D.A. Sibarov, P.A. Abushik, and S.M. Antonov

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

Pathological changes in the cerebellum are commonly associated with Purkinje cell dysfunction manifesting with excessive spike activity. Despite a classical model of neurodegeneration according to which neuronal hyperactivity is induced by long-lasting effects of high concentrations of excitatory agonists (glutamate or *N*-methyl-D-aspartate), in our experiments the frequency of Purkinje cell spike activity increased with suppression of inhibitory transmission by gabazine (6-imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6*H*)-pyridazinebutanoic acid hydrobromide), a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist. Gabazine induced a significant increase in the frequency of Purkinje cell spike output after 25 min and 45 min in adult rats and young rats, respectively. Thus, this model was considered to be more appropriate for adult animals than for young animals; it can be explained by ontogenetic aspects of the cerebellar cortex maturation. Moreover, the use of NS 309 (6,7-dichloro-1*H*-indole-2,3-dione-3-oxime), a modulator of small conductance calcium-activated potassium channels, in this model made it possible to compensate for an increase in the frequency of Purkinje cell simple spike output induced by gabazine, that decreased Purkinje cells spiking frequency to control values typical for young and adult animals.

Keywords: Purkinje cells, cerebellum, SK-channels, GABA, spike

УДК 58.035

# ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ СВЕТОВОЙ СРЕДЫ НА ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА ЛИСТЬЯМИ САЛАТА И ЕГО НЕТТО-ПРОДУКТИВНОСТЬ

# © 2020 г. Т.Э. Кулешова\*, И.Н. Черноусов\*\*, О.Р. Удалова\*\*, Л.М. Аникина\*\*, Ю.В. Хомяков\*\*, А.В. Александров\*\*, И.С. Середин\*\*\*, С.В. Феофанов\*\*\*, С.А. Щеглов\*\*\*\*, Н.Р. Галль\*, Г.Г. Панова\*\*

\*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26 \*\*Агрофизический научно-исследовательский институт, 195220, Санкт-Петербург, Гражданский просп., 14

\*\*\*000 «02 Световые Системы», 196084, Санкт-Петербург, ул. Новорощинская, 4а

\*\*\*\*Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49

E-mail: www.piter.ru@bk.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 10.05.2019 г. Принята к публикации 21.08.2019 г.

Исследована эффективность поглощения света с различным спектральным составом листьями салата и выбору оптимальных условий световой среды для повышения продуктивности и качества растительной продукции, выращиваемой в условиях искусственного освещения. Салат сорта Тайфун выращивали методом тонкослойной панопоники в автоматизированной вегетационной установке с использованием пяти вариантов различных источников света. Разработанный авторами неповреждающий метод измерения спектров поглощения листьев in vivo позволил сделать заключение о влиянии особенностей спектрального состава светового потока на оптические характеристики, отражающие физиологическое состояние растений. С приростом биомассы листа салата на 1 г в течение 10 суток в условиях максимальной продуктивности количество поглощенной энергии фотонов увеличивалось на ~140 мкмоль ·  $m^{-2} \cdot c^{-1}$ , значения индекса светопоглощения ниже 70 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> соответствовали образцам с минимальными результатами по ростовым характеристикам. Схожесть спектральных характеристик освещения в области фотосинтетически активной радиации ламп ДНаТ и светодиодных светильников, излучающих желтый свет, и практически одинаковой доли фотосинтетически активных фотонов в синей, зеленой и красной областях спектра привели к одинаковому приращению поглощения света в процессе развития растений. Однако значительное отличие в продуктивности салата (~50%), а также росте, развитии и биохимическом составе свидетельствует о лучшем влиянии ламп ДНаТ на свойства растительной культуры. Полученные данные свидетельствуют, что спектр освещения с интенсивностью ~25 мкмоль · м<sup>-2</sup> · c<sup>-1</sup> в диапазоне 400–500 нм, ~150 мкмоль · м<sup>-2</sup> · c<sup>-1</sup> в 500–600 нм, ~150 мкмоль ·  $\cdot M^{-2} \cdot c^{-1}$  в 600–700 нм приводит к высокой продуктивности салата.

Ключевые слова: интенсивная светокультура, спектры освещения, светодиодные светильники, оптика листа, светопоглощение, нетто-продуктивность.

DOI: 10.31857/S0006302920010147

При выращивании растений в условиях защищенного грунта или в тепличных комплексах с недостатком или отсутствием естественного света ключевыми факторами являются правильно подобранные спектр, интенсивность и длительность искусственно созданного освещения. В литературе подчеркивается, что вопросы оптимизации спектра и интенсивности фотосинтетически активной радиации в продукционном процессе растений на разных этапах их вегетации, изучения возможностей использования света разного спектрального состава в организации направленного биосинтеза биологически ценных соединений различного назначения остаются малоизученными и весьма актуальными. При этом важным аспектом исследований является поиск и обоснование возможности снижения затрат электроэнергии на единицу производимой продукции, которые при реализации интенсивной светокультуры составляют более 40% [1–3]. Пере-

численные аспекты создания и регуляции световой среды становятся реализуемыми при использовании светодиодных источников света. Перспективность их применения в интенсивной светокультуре отмечена многими авторами [4–6]. Появление мощных сверхъярких и модульных светодиодов расширило технические возможности для увеличения продуктивности и эффективности выращивания тепличных культур [7–9]. Однако весь потенциал светодиодов можно использовать, лишь понимая механизм влияния светового потока и спектра излучения в области фотосинтетически активной радиации как на общую физиологию растений, так и на их отдельные виды и сорта. Без этих знаний практическое применение светильников на основе светодиодов не приводит к желаемым результатам, и, более того, исследователи столкнулись с проблемой снижения продуктивности и качества выращиваемой растительной продукции [10].

В основе выбора диапазонов и полос излучения большинства представленных на рынке светодиодных фитосветильников лежит представление о важности двух полос – в синей (450 нм) и красной областях (660 нм) спектра [11], соответствующих максимумам поглощения основных фотосинтетических пигментов растений. Отсутствие в светильниках других полос спектра в диапазоне длин волн фотосинтетически активной радиации – 380–720 нм или неоптимальное их соотношение в так называемых светильниках «полного спектра» является причиной возникновения вышеуказанной проблемы с реализацией продукционного потенциала растений. Для создания светодиодных светильников, обеспечивающих адекватные условия освещения растений, необходимо дальнейшее исследование физиологических эффектов узкополосного освещения с учетом энергетической и регуляторной роли различных спектральных составляющих освещения, а также видоспецифичности реакций растений на изменение спектрального состава света.

Как известно, чувствительным показателем физиологического состояния растений, характеризующим их потребности, особенно в отношении фотосинтетически активного потока фотонов, являются спектральные характеристики прошедшего через листья света, его интенсивности и максимумов на соответствующих длинах волн [12, 13]. Изучение оптических характеристик растений может стать основой для выбора источников освещения с наиболее эффективным спектром излучения для светокультуры.

Спектральные методы исследования жизнедеятельности растений широко распространены и применяются. Спектрофотометрирование почв и растительных покровов является одним из эффективных методов изучения свойств и количе-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

ственной оценки состояния сельскохозяйственных полей и посевов [14]. Существуют методы оценки всхожести семян фотометрическим методом: например, в работе [15] вместо измерения электропроводности раствора с выдержанными в нем семенами определяли его оптическую плотность при 360 нм. Одним из наиболее распространенных методов исследования работы пигментного аппарата и воздействия факторов внешней среды на параметры фотосинтеза является анализ параметров флуоресценции хлорофилла [16, 17].

В настоящее время активно разрабатываются методы диагностики поглощения света листьями [18, 19], создаются спектральные библиотеки [20]. Для одновременной регистрации в одном эксперименте коэффициентов отражения, пропускания и поглощения излучения были предложены методы на основе одной интегрирующей сферы, двух и полусферы [13, 14]. По характеру диффузного отражения и светоотражающей анизотропии возможно изучение структуры поверхности листьев, величина светопропускания связана с прозрачностью листьев, а по величине поглощенной световой энергии можно судить об особенностях усвоения излучения в зависимости от длины волны.

Для анализа спектров поглощения света растениями in vivo необходимо обеспечить возможность экспрессных многодневных измерений спектров отражения и пропускания света у живых листьев, неоднородных по длине и ширине, на одном растении или их популяции на протяжении роста и развития без причинения вреда растению, что является технически сложной задачей должны быть реализованы следующие параметры: 1) одновременная регистрация в одном эксперименте отражения и пропускания излучения; 2) эффективный захват диффузно-отраженного или проходящего света; 3) фиксация и позиционирование тестируемого образца; 4) варьирование спектра и интенсивности излучения источника света в физиологически значимых для растений диапазонах.

Таким образом, цель данной работы заключалась в разработке, апробации методики и экспериментальной установки, позволяющей измерять спектры поглощения листьев *in vivo*, и исследовании влияния спектральных характеристик излучения на поглощение света листовой поверхностью растения, их рост, нетто-продуктивность и качество формируемой растительной продукции.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в вегетационном опыте в регулируемых условиях на базе биополигона Агрофизического НИИ (Санкт-Петербург). Объектом изучения служили растения салата (Lactūca sātiva L.) сорта Тайфун, так как параметры его листьев напрямую связаны с нетто-продуктивностью и характеризуют выход продукции. Растения выращивали методом тонкослойной панопоники в автоматизированной вегетационной установке площадью 6 м<sup>2</sup>, при полностью искусственном освещении [21, 22]. В качестве источника минерального питания, подаваемого в растильни, использовали раствор Кнопа [23].

В исследовании оценивали влияние световой среды различного спектрального состава на поглощение света листьями салата и его нетто-продуктивность. Установка для выращивания была условна разделена светонепроницаемыми перегородками на пять световых зон, источниками света в которых служили лампы ДНаТ-400 и светодиодные светильники с различным спектральным составом излучения, обозначенные далее следующим образом: 1) S – дуговая натриевая трубчатая лампа, 2) У – светодиодный аналог ДНаТ-400 (ООО «О2 Световые системы» и Агрофизический НИИ, Санкт-Петербург), излучающий желтый свет с максимумами излучения на длинах волн 450, 500 и 595 нм и соотношением интенсивностей этих пиков 1 : 3 : 13, 3) Р – аналог используемых на данный момент в тепличных комплексах светодиодных светильников (ООО «О2 Световые системы», Санкт-Петербург), излучающий розовый свет и имеющий максимумы излучения на длинах волн 450 и 665 нм с соотношением интенсивностей 1:2, 4) W - светодиодный светильник с промышленным белым светом с соотношением максимумов 1:1 на длинах волн 450 и 600 нм, 5) В – промышленный светодиодный светильник с белым светом и с соотношением максимумов 1:3 на длинах волн 450 и 600 нм. Фактически Y отличается от светильников W и B большей интенсивностью излучения в зеленой и красной частях спектра, а светильник Р имеет смещенный максимум в красной области с 600 до 665 нм.

В табл. 1 приведены измеренные с помощью интегрирующей сферы и ПЗС-спектрометра CCS200 (Thorlabs, США) и усредненные по всей поверхности выращивания спектры излучения использованных светильников. На основе предложенного в работе [24] алгоритма и полученных экспериментально спектров излучения рассчитана плотность фотосинтетически активной радиации во всем видимом диапазоне и в условно разделенных на синюю (400–500 нм), зеленую (500– 600 нм) и красную (600–700 нм) части спектра.

Для освещения растений величину облученности от различных источников света установили равную 70–75 Вт/м<sup>2</sup> фотосинтетически активной радиации, продолжительность светового периода – 14 ч в сутки. Поддерживали относительную влажность воздуха 65–70% иемпературу воздуха в пределах 20-22°С днем и 18-20°С – ночью.

Для получения спектров поглощения листьев растений *in vivo* была разработана и собрана экспериментальная установка [25] (рис. 1). За основу была взята система измерения оптических свойств тканей с помощью двух интегрирующих сфер [26] — исследуемый образец помещается между сферами, одна из которых (ИС1) регистрирует отраженный свет, а другая (ИС2) — прошедший.

Интегрирующие сферы с внутренним диаметром 50 мм сконструированы в СПбПУ и выполнены на 3D-принтере из АБС-пластика. Окраска внутренней поверхности сфер произведена в соответствии с приложением Д ГОСТ Р 55702-2013, оптические свойства оттестированы по сравнению с эталонной поверхностью сферы EVER-FINE (EVERFINE Corporation, Китай). Спектральный коэффициент отражения краски в видимом диапазоне составил 85 ± 5%. В качестве источника излучения света в схеме использовали специализированный светодиодный светильник разработки российской инжиниринговой компании «О2 Световые системы» (Санкт-Петербург) с регулируемыми каналами излучателей (светодиодов), рассчитанными под фотосинтетически активный диапазон и позволяющий работать в физиологически важных для растения областях спектра с максимумами в диапазонах длин волн 650-670 нм, 720-740 нм, 440-460 нм, 415-435 нм, а также белый спектр с коррелированной цветовой температурой 4500 К. Интенсивность излучения каждого канала управляется драйвером, что позволяет формировать необходимый спектр и световой поток при воздействии на объект исследования. Световой поток от светильника собирается с помощью плоско-выпуклой линзы и через коллиматор 74-UV (Ocean Optics, США) с расходимостью пучка менее 2° заводится в интегрирующую сферу ИС1, таким образом, освещается исследуемая область образца диаметром 12 мм. Детектором служит оптический оптоволоконный ПЗС-спектрометр CCS200 (Thorlabs, США) с диапазоном регистрации спектра 200-1000 нм и шагом длины волны <2 нм, соединенный с интегрирующими сферами с помощью оптоволокна BFL200HS02 (Thorlabs, США) диаметром 200 мкм. Исследуемый образец помещается между двумя сферами, одна из которых (ИС1) регистрирует отраженный от объекта свет, другая (ИС2) – прошедший сквозь него свет. Коэффициент поглощения листа  $A(\lambda)$  рассчитывается по формуле

$$A(\lambda) = 1 - R(\lambda) - T(\lambda), \qquad (1)$$

где  $R(\lambda)$  — коэффициент отражения образца, равный отношению отраженного потока излучения к потоку, упавшему на тело,  $T(\lambda)$  — коэффициент пропускания образца, равный отношению пото-

Источник света	Спектральный состав излучения источников	PPFD, мкмоль · $m^{-2} \cdot c^{-1}$		Поглощение 400—700 нм 21-й день → 31-й день			Спектры поглощения света в диапазоне 400— 700 нм на 21-й и 31-й дни развития растений	
	в диапазоне 400—700 нм	400—500 нм	500—600 нм	600—700 нм	400—500 нм, %	500—600 нм, %	600—700 нм, %	
S, лампа ДНаТ		341 ± 24 (+72 в ИК)			42 ± 5% → 57 ± 3% 143 → 194 мкмоль · м <sup>-2</sup> · c <sup>-1</sup>			
		29	185	127	19 → 23	10 → 14	13 → 20	
Ү, желтый		$342 \pm 24$			41 <u>-</u> 140 → 19	± 6% → 56 ± 1 мкмоль	9% ${ m M}^{-2} \cdot { m c}^{-1}$	$\frown$
		23	156	163	19 → 22	9 → 14	13 → 20	
Р, розовый		$332 \pm 23$			39 ± 4% → 51 ± 11% 129 →1 70 мкмоль · м <sup>-2</sup> · с <sup>-1</sup>			$\sum$
		61	123	148	18 → 21	9 → 11	12 → 18	
W, белый		$325 \pm 23$			58 ± 13% → 62 ± 8% 189 → 201 мкмоль · м <sup>-2</sup> · c <sup>-1</sup>			
		69	150	106	23 → 24	14 → 16	20 → 21	
В, белый		$334 \pm 23$		$50 \pm 1\% \rightarrow 62 \pm 3\%$ 167 $\rightarrow 207$ мкмоль · м <sup>-2</sup> · c <sup>-1</sup>			$\frown$	
		39	162	133	22 → 24	10 → 16	18 → 22	

Таблица 1. Величина плотности фотосинтетически активной радиации и скорость усвоения листьями салата света различного спектрального состава

Примечание. PPFD – плотность фотосинтетически активной радиации (photosynthetic photon flux density).



Рис. 1. Схема экспериментальной установки для измерения спектров пропускания и отражения листьев растений, включающей в себя: *1* – косинусный корректор, *2* – собирающую линзу, *3* – источник света, *4* – интегрирующую сферу ИС1, *5* – коллиматор, *6* – шторку, *7* – оптоволокно, *8* – спектрометр, *9* – образец, *10* – интегрирующую сферу ИС2, *11* – штатив.

ка излучения, прошедшего через среду, к потоку излучения, упавшему на ее поверхность.

Зоны отбора проб из среды роста салата схематично показаны на рис. 2а, для каждого варианта освещения и концентрации раствора взяты по пять тестируемых объектов, выборка тестируемых объектов произведена по всей зоне роста. Спектры поглощения регистрировали для области площадью 115 мм<sup>2</sup> для центральной части листа на 21-й день развития (рис. 26), для центральной части и верхушки на 31-й день развития (рис. 2в).

Для оценки влияния параметров освещения на поглощение света листьями салата мы предложили использовать первую оценочную версию величины, потенциально описывающей приращение поглощения света на прирост биомассы и обозначенный нами в дальнейшем как индекс светопоглощения I. За первоначальное поглощение принято среднее значение между поглощением света 21-дневным листом салата, имеющего общую площадь, сравнимую с окном интегрирующей сферы, и центральной частью 31-дневного листа, предположительно не отличающегося по своей структуре от той же области более раннего периода развития. Разница между поглощением «новой» и «старой» частей листа  $\Delta A$  нормируется на значение накопленной за период между измерениями биомассы  $\Delta m$ . Таким образом, на данном этапе индекс светопоглощения определяет величину поглощения фотосинтетически активного потока фотонов, необходимого для прироста 1 г биомассы за исследуемый диапазон времени роста при заданных условиях освещения, и рассчитывается по следующей формуле:

$$I = \frac{\Delta A}{\Delta m} = \frac{A_{31U} - \frac{A_{31D} + A_{21D}}{2}}{m_{31} - m_{21}},$$
 (2)

где I – индекс светопоглощения (мкмоль · м<sup>-2</sup> · c<sup>-1</sup>),  $A_{31U}$  – интегральное поглощение света в диапазо-



**Рис. 2.** Зоны (1–5) отбора проб из среды роста салата (а); условная область измерения поглощения света на листовой пластине салата – в центральной части листа на 21-й день развития (б) и в центральной части и верхушке листа на 31-й день развития (в).

Источники	Высота растений		Площадь листа		Сухое вещество листьев		Сухое вещество корней		Масса надземной части	
света*	СМ	% от контроля	см <sup>2</sup>	% от контроля	%	% от контроля	%	% от контроля	г/м <sup>2</sup>	% от контроля
S	$20.6 \pm 1.0$	100	97.2	100	3.7	100	7.4	100	5990	100
Y	$18.0 \pm 0.7$	87	70.7	73**	4.2	114	6.3	85**	3350	56**
Р	17.1 ± 0.6	83**	74.3	76**	3.9	105	6.6	89	3090	52**
W	$13.3 \pm 0.4$	65**	41.2	42**	4.8	130**	6.3	85**	1920	32**
В	$12.9 \pm 0.5$	63**	30.6	32**	5.4	146**	6.7	91	2250	38**

**Таблица 2.** Влияние источников света различного спектрального состава на рост и продуктивность растений салата в регулируемых условиях биополигона Агрофизического НИИ

Примечание. \* — Источники света: S —лампы ДНаТ-400; Y — светодиодный аналог ДНаТ; P — аналог светодиодных фитосветильников с максимумами излучения на длинах волн 450 и 665 нм; W — светодиодный светильник с промышленным белым светом; В — светодиодный светильник с промышленным белым светом. \*\* — Значение достоверно отличается от контрольного на 5%-м уровне значимости.

не 400-700 нм верхушкой 31-дневного листа (мкмоль · м<sup>-2</sup> · c<sup>-1</sup>),  $A_{31D}$  – интегральное поглощение света центральной частью 31-дневного листа (мкмоль · м<sup>-2</sup> · c<sup>-1</sup>),  $A_{21D}$  – интегральное поглощение света центральной частью 21-дневного листа (мкмоль · м<sup>-2</sup> · c<sup>-1</sup>),  $m_{31}$  – масса исследуемого листа 31-дневного салата (г),  $m_{21}$  – масса исследуемого листа 21-дневного салата (г).

Реакция овощных культур на моделируемые условия световой и корнеобитаемой среды оценивалась по показателям роста, нетто-продуктивности и биохимическому составу получаемой растительной продукции. На протяжении вегетационных периодов также проводили фенологические наблюдения. Уборку салата проводили на 31-е сутки от высева семян. При уборке учитывали массу растений, длину, ширину максимального развитого листа, высоту растений, число листьев, определяли содержание нитратов и других биохимических показателей.

Биохимический состав растительной продукции, характеризующий ее качество и безопасность, определяли в аккредитованной на техническую компетентность и независимость Испытательной лаборатории Агрофизического НИИ Россельхозакадемии (Санкт-Петербург) в соответствии с требованиями современных норма-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

тивных документов и по общепринятым методикам [27–29].

Дисперсионный и регрессионный анализы, а также другая статистическая обработка обобщаемых данных выполнены с помощью программного обеспечения MS Excel 2010 и Statistica 8. В тексте и таблицах приведены средние арифметические значения параметров и их доверительные интервалы при 95%-м уровне вероятности по *t*-критерию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа данных по росту, развитию, продуктивности растений салата и качеству его растительной продукции свидетельствуют, что в большинстве своем они имели достоверно более высокие значения у растений, выращенных под лампами ДНаТ по сравнению с таковыми под светодиодными светильниками при одинаковых облученности и условий микроклимата (табл. 2). В связи с этим значения показателей роста, продуктивности растений салата, качества его растительной продукции под лампами ДНаТ были выбраны как референтные. Так, по показателям роста, в частности, по высоте растения, сформированные под лампами ДНаТ, превышали в виде выраженной тенденции или достоверно (на 13–

Солоржание	Источники света*							
Содержание	S	Y	Р	W	В			
Витамин С, мг/100 г.н.в.	16.61	11.99**	12.65**	8.10**	11.09**			
Сумма сахаров, % а.с.в.	19.31	13.61**	11.31**	12.89**	16.04			
Нитраты, мг/кг н.в.	1560	2154**	1920**	3043**	1423			
Азот, % а.с.в.	3.51	3.64	4.11**	4.28**	3.72			
Фосфор, % а.с.в.	0.58	0.72**	0.76**	0.57	0.61			
Калий, % а.с.в.	7.7	8.18	9.25**	11.20**	8.36			
Кальций, % а.с.в.	2.29	1.95**	2.35	2.02	2.31			
Магний, % а.с.в.	0.604	0.567	0.625	0.468**	0.587			
Свинец, мг/кг а.с.в.	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10			
Кадмий, мг/кг а.с.в.	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010			

Таблица 3. Биохимический состав растительной продукции салата в зависимости от спектра облучения растений под различными источниками света в регулируемых условиях биополигона Агрофизического НИИ

Примечание. \* — Источники света: S —лампы ДНаТ-400; Y — светодиодный аналог ДНаТ; P — аналог светодиодных фитосветильников с максимумами излучения на длинах волн 450 и 665 нм; W — светодиодный светильник с промышленным белым светом; В — светодиодный светильник с промышленным белым светом. \*\* — Значение достоверно отличается от контрольного на 5%-м уровне значимости.

37%) таковые под светодиодными светильниками; по площади листьев - на 27-68%; по массе надземной части на квадратном метре или продуктивности – на 44–62%. Следует отметить, что существенно более низкие значения оцениваемых показателей были у растений под промышленными светильниками белого света W и В. Растения под светодиодными светильниками с желтым (Ү) и розовым (Р) светом имели несколько лучшие значения показателей роста и продуктивности, чем под светодиодными светильниками W и В, но также значимо уступали таковым под лампами ДНаТ. Судя по изменению процентного содержания сухого вещества, в корнях растений под светодиодными источниками оно преимущественно несколько ниже, а в листьях – выше, чем под лампами ДНаТ-400. С учетом более низких показателей роста и продуктивности выявленные закономерности позволяют предположить, что растения в менее благоприятных условиях световой среды под тестируемыми светодиодными светильниками пытаются адаптироваться к ним посредством синтеза и накопления в листьях различных соединений защитного плана, как это отмечается в литературе для растений, выращиваемых под источниками света с высокой интенсивностью излучения в сине-фиолетовой области спектра [30].

Данные оценки биохимического состава растений свидетельствуют о более низком содержании витамина С, сахаров в листьях салата, выращенного под светодиодными светильниками по сравнению салатом, выращенным под лампами ДНаТ-400 (табл. 3). При этом в листьях, за исключением варианта с промышленными светильниками белого света, отмечается более высокое содержание нитратов, даже превышающее значения ПДК или близкое к ее граничным значениям в остальных вариантах с светодиодными светильниками. Следует отметить также несколько более высокое содержание макроэлементов – общего азота, фосфора, калия – в надземной части салата при падении показателей роста и продуктивности под светодиодными светильниками, по сравнению с растениями под лампами ДНаТ-400.

Выявленные различия в показателях роста, развития, продуктивности и в биохимическом составе растений салата, сформированных под лампами ДНаТ-400 и под светодиодными светильниками с различным спектральным составом, обусловлены особенностями его влияния на процессы поглощения и усвоения света листьями растений. В ходе вегетационного периода салатов, освещаемых различным спектром излучения, на 21-й и 31-й дни развития, были сняты спектры поглощения света центральной частью и верхушкой листовой поверхности (табл. 1). Рас-



**Рис. 3.** Отношения коэффициентов максимального поглощения, соответствующих разным длинам волн –  $A_{440}/A_{667}$ (а) и  $A_{460}/A_{620}$  (б) для листовой поверхности 21-дневного (темные столбики) и верхушки листа 31-дневного салата (светлые столбики), освещаемого лампой ДНаТ S и светодиодными светильниками с различными спектрами освещения Y, P, W и B.

считано количество поглощенного листьями фотосинтетически активного потока фотонов, растущее с увеличением возраста растения, спектр поглощения условно разделен на синий (400–500 нм), зеленый (500–600 нм) и красный (600–700 нм) диапазоны, для которых также рассчитан процент поглощенного светового потока на разных стадиях развития.

Измеренные значения суммарного поглощения в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм варьируют от 42 до 62 %, причем наибольшая доля поглощения приходится на синюю область от 400 до 500 нм и составляет 18-24%, для красной (600-700 нм) области характерны значения от 12 до 22% и в зеленой (500-600 нм) области листья обладают наименьшим поглощением - 9-16%. При освещении лампами ДНаТ, желтым и розовым светом интегральное поглощение света листьями схоже на 21-й и на 31-й день развития в центральной части листьев, но увеличивается в области их верхушки. Этот экспериментальный результат коррелирует с представлением о нарастании биомассы листа – на 31-й день «старая» часть листа поглощает так же, как и раньше (на 21-й день), а новая – верхушка поглощает больше энергии квантов для ускорения развития. Однако такая динамика не наблюдается при освещении белым светом – значения поглошения практически для всех случаев идентичны. Это объясняется замедленным ростом и отставанием в развитии листьев салата в этом варианте облучения. Также заметна разница в соотношении поглощения по областям спектра. На 31-й день верхушка листа почти сравнивает поглощение света в синей и красной областях – разница составляет <3%, при этом поглощение в зеленой части спектра остается пропорционально соотношениям для центральной части 21-дневного и 31-дневного листьев.

Получено различие в форме спектральных кривых для образцов, освещаемых ДНАТ (S), желтым (Y), розовым (P) и двумя вариантами белого (W, B) источниками света. В области 470– 640 нм различия в интенсивностях достигают 15%, хотя при этом величины коэффициентов поглощения на основных максимумах длин волн 440 и 667 нм в большинстве случаев совпадают. Также важно отметить разницу между спектрами поглощения 21-дневных и 31-дневных растений: в первом случае на спектрах видно наличие более четко выраженных максимумов на длинах волн 480, 500, 590 и 620 нм.

Наибольшее различие между вариантами выражено в соотношении максимальных интенсивностей поглощения, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла a (440 нм и 667 нм) и хлорофилла b (460 нм и 620 нм). В качестве характеристики, определяющей форму полученных спектральных кривых, мы использовали отношение максимумов коэффициентов поглощения:  $A_{440}/A_{667}$  и  $A_{460}/A_{620}$ , соответствующие длинам волн 440 нм к 667 нм и 460 нм к 620 нм (рис. 3).

Соотношение поглощения света с длинами волн 440 и 667 нм  $A_{440}/A_{667}$ , потенциально связанных с количеством хлорофилла *a*, с увеличением периода развития растения уменьшается и на 31-й день для всех вариантов отношение этих максимумов становится равным единице. Преобладающее на более ранних этапах роста поглощение света синей части спектра для вариантов со светильниками S, Y, P выравнивается с поглощением красного диапазона в конце вегетационного



Рис. 4. Индекс светопоглощения — приращение поглощения света на прирост биомассы для салата, освещаемого источниками света с различным спектральным составом: S — лампами ДНаТ-400, Y — светодиодным аналогом ДНаТ, P — аналогом используемых в тепличных комплексах светодиодных светильников, W — светодиодным светильником с белым светом и соотношением максимумов 1:1, B — светодиодным светильником с белым светом и с соотношением максимумов 1 : 3.

периода. Различия в соотношении  $A_{460}/A_{620}$ , потенциально характеризующих содержание хлорофилла *b*, менее выражено для всех вариантов, однако заметна тенденция к увеличению его значения с ростом растения для источников света S, Y, P и уменьшение для светильников W, B.

Для того чтобы охарактеризовать, каким образом меняется поглощение с ростом растения, нами был введен индекс светопоглощения (формула (2)), рассчитанные значения которого для тестируемых вариантов приведены на рис. 4. Интересно отметить совпадение значений индекса при освещении салата натриевой лампой и ее светодиодным аналогом. Данные условия были наиболее эффективными и привели к быстрому приросту биомассы и лучшему развитию растения. Из этого можно сделать вывод, что с приростом биомассы листа салата на 1 г в течение 10 суток оптимальным является увеличение количепоглощенной ства энергии фотонов на ~140 мкмоль  $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$ .

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Для понимания механизма поглощения фотонов листьями растений и выявления роли длины волны световой энергии был проведен эксперимент, который заключался в облучении растений салата светом с различным спектральным составом и регистрации поглощенного светового потока. В ходе исследования была выявлено влияние спектров освещения на спектры поглощения листьев растений в процессе их развития, что позволяет предложить использовать анализ спектра поглощения листа растения как один из вариантов фитомониторинга. Разработанный и использованный в работе метод спектрометрического анализа с помощью системы из двух интегрирующих сфер хорошо применим и достаточно удобен для измерения спектров поглощенной энергии листьями салата в ходе их жизнедеятельности и дает возможность получать информацию о поглощении излучения от источника освещения и связанных с этим фотосинтетических реакциях.

Взятый в качестве референтного спектр освещения дуговой натриевой трубчатой лампы действительно показал лучшие результаты по показателям нетто-продуктивности салата и поглощению света листьями растений. В связи с тем, что для описания эффективности поглощения света листьями на определенной длине волны нет общепринятой количественной характеристики, мы использовали значения, полученные для образцов, освещаемых лампами ДНаТ, как контрольные. Самые приближенные к ним результаты наблюдали при использовании светодиодных светильников Y, разработанных ООО «О2 Световые системы» совместно с Агрофизическим НИИ и ориентированных по своим спектральным свойствам на лампы ДНаТ.

Данные по показателям роста, продуктивности и биохимическому составу салата позволили сделать следующие заключения о влиянии световой среды на растения. Максимальные высота, площадь листьев, продуктивность растений, а также более высокие качественные характеристики растительной продукции были зафиксированы при освещении растений лампами ДНаТ при одинаковых облученности растений и условий микроклимата. Под светодиодными светильниками У и Р высота растений была снижена на 20%, а под светильниками W и В – отличалась почти на 40%. Более сильные отличия заметны в размере площади листьев, где разница между параметрами растений, освещаемых светильниками S и светодиодными источниками W и B, достигает почти 70%. Это говорит о замедленном развитии салата при его облучении белым светом, излучаемым промышленными светильниками W и В. В результате такое снижение показателей роста и развития растений салата под влиянием тестируемых светодиодных источников света закономерно приводит к снижению значений продуктивности на 44-62%. При этом растения под светодиодными светильниками с желтым (Y) и розовым (Р) светом имели несколько лучшие значения показателей роста и продуктивности, чем под светодиодными светильниками W и B, но значимо уступали таковым под лампами ДНаТ. Более низкое содержание сухого вещества в кор-

нях и более высокое его накопление в листьях растений, сформированных под тестируемыми светодиодными источниками света Y, P, W и B, при существенно более низкой массе надземной части салата, предположительно свидетельствует об образовании и накоплении в них веществ защитной природы. Образование этих веществ связано с расходованием энергии и ресурсов и отрицательным образом отражается на продуктивности и качестве урожая растительной продукции. Косвенным подтверждением этого факта является увеличенное поглощение листьев в области 470-640 нм для растений, освещаемых белым светом. Возможно, это связано с повышенным содержанием пигментов, выполняющих защитные функции и синтезирующихся в стрессовых условиях - каротиноидов с максимумом поглощения в районе 480 нм и антоцианов, поглощающих в области 500-520 нм.

О неоптимальности спектрального состава тестируемых светодиодных светильников по сравнению с лампами ДНаТ свидетельствуют и данные оценки биохимического состава растений, а именно: отмечается снижение содержания витамина С и содержания сахаров в листьях салата (табл. 3). При этом в них, за исключением варианта с промышленными светильниками белого света, отмечается более высокое содержание нитратов, даже превышающее значения ПДК или близкое к ее граничным значениям в остальных вариантах с светодиодными светильниками. Несколько более высокое содержание макроэлементов – общего азота, фосфора, калия – в надземной части салата при падении показателей роста и продуктивности под светодиодными светильниками, по сравнению с таковым под лампами ДНаТ-400, позволяет предположить более низкую интенсивность физиологических процессов фотосинтеза, роста и развития, где данные соединения используются и трансформируются, а также о расходовании пластичных веществ растений салата в процессах его адаптации к неблагоприятным световым условиям среды обитания.

Ланные по поглошению света листьями салата в зависимости от спектра их освещения (табл. 1) можно охарактеризовать следующим образом. Поглощение в синей (400-500 нм), зеленой (500-600 нм) и красной (600-700 нм) областях спектра варьирует в пределах 40-49%, 19-25%, 30-39% от интегрального соответственно на 21-й день развития и 37-42%, 22-28%, 35-36% - на 31-й день. Хотя излучение от источников света во всех вариантах в синем диапазоне (400-500 нм) меньше, чем в зеленом и красном, поглощение фотонов энергией 2,5-3,1 эВ листьями выше других и достигает почти половины от суммарного. Для 21-дневного салата отмечено большее поглошение излучения в красной части спектра (на 6-8%) при освещении обоими вариантами белого света.

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

Через 10 дней разница в поглощении в области 600-700 нм для всех вариантов не превышает 4%. В большинстве случаев действие этого диапазона связывают с морфологическими изменениями и стимуляцией роста растений, однако в проведенных нами экспериментах отмечено отставание в развитии для образцов, потреблявших большее количество «красных» фотонов на ранних этапах. В диапазоне 500-600 нм для верхушки 31-дневного листа салата характерно большее поглощение света в вариантах освещения светодиодными светильниками W и B. Известно, что зеленый свет необходим оптически более плотным листьям, так как обладает высокой проникающей способностью. Благодаря этому излучение данного диапазона достигает нижних ярусов и восполняет находящимся там листьям недостающую для протекания фотосинтеза энергию. Также в образцах салата, облучаемых светодиодными светильниками W и B с белым светом, содержание сухого вещества больше, чем в других образцах, что говорит о более плотной структуре листа. Максимальная доля поглощения в области 400-500 нм свойственна для растений, освещаемых белым светом и показавших наименьшее показатели по продуктивности. На первый взгляд, данный эффект повышенного поглощения в синем диапазоне спектра напрямую не коррелирует с более интенсивным излучением источника света в области 400-500 нм. Большее поглощение листьями растений в этой части спектра, с одной стороны, может быть связано с протеканием гравиотропических реакций, а с другой – с работой фотосинтетического аппарата. Высота салата, выращенного под лампой S, светильниками Y и P достигает 20 см, тогда как для образцов, освещаемых светильниками W и B и поглощающих меньшее количество света в диапазоне 400-500 нм от интегрального, высота составляет 10-13 см.

Рассмотрим классическое представление организации светособирающего комплекса пигментов как антенны, представив упрощенную модель антенного комплекса и условно разделив входящие в нее пигменты на поглощающие в синей (400-500 нм), зеленой (500-600 нм) и красной (600-700 нм) областях спектра (рис. 5). Для возбуждения реакционных центров P<sub>680</sub> и P<sub>700</sub>, осуществляющих превращение энергии света в химическую, необходимо поглощение фотонов с энергиями 1.82 и 1.77 эВ. При поглощении светособирающими пигментами квантов больших энергий (например, в синем диапазоне 2.48-3.09 эВ) электроны переходят на орбитали с более высоким энергетическим уровнем, и перенос энергии на нижние уровни (первый синглентный уровень реакционного центра и переход в основное состояние) возможен только с потерей энер-



**Рис. 5.** Схема передвижения и превращения энергии по антенному комплексу от светособирающих пигментов к реакционному центру с переходами между возбужденными состояниями пигментов после поглощения синего, зеленого и красного света.

гией – выделением в виде света или тепла. Перенос энергии от одной молекулы пигмента к другой или к реакционному центру осуществляется с большой скоростью ( $\sim 10^{-10} - 10^{-12}$  с), но только между близлежащими молекулами. Несомненно, такая организация значительно увеличивает эффективность усвоения света за счет обеспечения пигмент-белковыми комплексами захвата фотонов разных длин волн и транспорта энергии возбуждения в реакционные центры. Однако, вопервых, «лишняя» энергия, испускаемая в виде флуоресценции или теплоты, не используется на фотосинтез. Во-вторых, в сооответствии с полученными экспериментальными данными, при избыточном интегральном поглощении (167 и 188 мкмоль  $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$ для вариантов со светильниками W и B) наблюдается замедленное развитие, что, возможно, связано с тем, что пигменты, возбужденные коротковолновым светом не успевают передавать энергию на пигменты, которые также перешли в возбужденное состояние, но при поглощении фотонов с большей длиной волны. Возникает конкуренция за перенос энергии на фотоактивный пигмент.

Рассчитанный коэффициент  $A_{440}/A_{667}$ , определяющий «сглаженность» спектра поглощения чем он ближе к единице, тем меньше разность между доминирующими максимумами, подтверждает, что преобладание поглощения в синей области приводит к более развитой миграции энергии по фотосинтетической пигментной матрице. Так как с увеличением этого коэффициента растет продуктивность растений, можно предположить, что поглощение одинакового количество квантов разных энергий ведет к стимуляции и развитию пигментного аппарата, что в свою очередь повышает фотосинтез и скорость развития растений.

Важно отметить, что непотраченная на фотосинтез энергия используется растениями на осуществление других процессов. Об этом свидетельствует различие в поглощении светочувствительными пигментами в растворе от поглощения листьями *in vivo*, наиболее заметное в зеленой области спектра.

На основании проведенных комплексных исследований установлено наибольшее положительное влияние ламп ДНаТ на рост, продуктивность и качество растений салата сорта Тайфун при выращивании его в регулируемых условиях интенсивной светокультуры, что связано с более эффективным поглощением и усвоением света листьями растений по сравнению с наблюдаемым под тестируемыми светодиодными источниками света с различным спектральным составом. Среди последних наиболее близкое к референтному влияние на растение отмечается под светодиодными светильниками - аналогами ДНаТ, наименьшее — под светильниками с белым светом W и В. Светодиодные светильники по степени положительного влияния на растения их спектрального состава света расположились в ряду: аналог ДНаТ ≥ аналог тепличных светильников с максимумами излучения на длинах волн 450 и 665 нм > белый светодиодный светильник с соотношением максимумов излучения на длинах волн 450 нм к 600 нм 1 : 3 > белый светодиодный светильник с соотношением максимумов излучения на длинах волн 450 нм к 600 нм 1 : 1.

С приростом биомассы листа салата на 1 г в течение 10 суток оптимальным является увеличение количества поглощенной энергии фотонов на ~140 мкмоль · м $^{-2}$  · с $^{-1}$ . Такой вывод был сделан исходя из того, что это значение характерно для референтного варианта, взятого за эталон и показавшего наилучшие результаты практически по всем показателям. Такое же значение приращения поглощения было получено для варианта освещения светодиодным светильником Ү, ориентированным по спектральным характеристикам в области фотосинтетически активной радиации на ДНаТ. Необходимо отметить, что значение индекса светопоглощения ниже 70 мкмоль ·  $\cdot$  м<sup>-2</sup> · c<sup>-1</sup> соответствует образцам с минимальными результатами по продуктивности и ростовым характеристикам.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что спектр освещения, излучающий ~25 мкмоль ·  $m^{-2}$  ·  $c^{-1}$  в диапазоне 400-500 нм, ~150 мкмоль ·  $m^{-2} \cdot c^{-1}$  в диапазоне 500-600 нм, ~150 мкмоль  $\cdot$  м<sup>-2</sup>  $\cdot$  с<sup>-1</sup> в диапазоне 600-700 нм приводит к высокой продуктивности салата. Схожесть спектральных характеристик освещения в области фотосинтетически активной радиации ламп ДНаТ и светодиодных светильников Ү, излучающих желтый свет, и практически одинаковой доли фотосинтетиечски активных фотонов в синей, зеленой и красной областях спектра привела к одинаковому приращению поглощения света (~140 мкмоль ·  $m^{-2} \cdot c^{-1}$ ) в процессе развития растений. Однако значительное отличие в продуктивности салата (~50%), а также росте, развитии и биохимическом составе свидетельствует о лучшем влиянии ламп ДНаТ на свойства растительной культуры. Возможно, это связано с наличием излучения в ИК-диапазоне, исследование влияния которого является предметом изучения в дальнейших экспериментах.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

# СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. S. Kurihara, T. Ishida, M. Suzuki, and A. Maruyama, Focusing on Modern Food Industry **3**, 1 (2014).
- O. Hitoshi, H. Tatsuya, K. Kouji, and N. Yoshifumi, Environ. Control Biol. 53 (2), 93 (2015).
- J. E. Park and K. Nakamura, Environ. Control Biol. 53 (2), 89 (2015).
- 4. N. Yeh and J. P. Chung, Renewable and Sustainable Energy Reviews **13** (8), 2175 (2009).
- 5. Y. Qi-chang, J. Agricultural Sci. Technol. 6, 42 (2008).
- С. А. Ракутько и А. Е. Пацуков, Світлотехніка та електроенергетика 2, 18 (2013).
- А. В. Аладов, Е. Д. Васильева, А. Л. Закгейм и др., Светотехника 3, 8 (2010).
- G. Tamulaitis, P. Duchovskis, Z. Bliznikas, et al., In Abstr. Book of 4<sup>th</sup> Int. Conf. on Solid State Lighting (Int. Soc. for Optics and Photonics, 2004), pp. 165–173.
- 9. D. T. Nhut, T. Takamura, H. Watanabe, et al., Plant Cell, Tissue and Organ Culture **73**, 43 (2003).

- О. В. Аверчева, Ю. А. Беркович, А. Н. Ерохин и др., Физиология растений 56, 17 (2002).
- Anderson Jr, W. Grant, and L. S. Capen, U.S. Patent № 6921182. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2005).
- 12. А. А. Шахов, В. С. Хазанов и С. А. Станко, Ботан. журн. **46** (2), 222 (1961).
- 13. А. Б. Брандт и С. В. Тагеева, Оптические параметры растительных организмов (Наука, М., 1967).
- И. С. Лискер, в кн. Физические методы и средства получения информации в агромониторинге (АФИ, Л., 1987), сс. 3–21.
- М. В. Архипов, В. Н. Савин, Е. В. Канаш и др., вкн. Биофизика растений и фитомониторинг (АФИ, Л., 1990), сс. 186–208.
- В. С. Лысенко, Т. В. Вардуни, В. Г. Сойер и В. П. Краснов, Фундаментальные исследования 1 (4), 112 (2013).
- 17. G. H. Krause and E. Weis, Annu. Rev. Plant Biol. **42** (1), 313 (1991).
- M. Mõttus, A. Hovi, and M. Rautiainen, Appl. Optics 56 (3), 563 (2017).
- 19. Е. М. Басарыгина, О. Г. Лицингер и Т. А. Путилова, АПК России **24** (5), 1141 (2017).
- 20. A. Hovi, P. Raitio, and M. Rautiainen, Silva Fenn. **51**, 1 (2017).
- Ю. И. Желтов и Г. Г. Панова, Патент РФ на полезную модель №108705, Бюл. Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, № 27 (2011).
- G. G. Panova, I. N. Chernousov, O. R. Udalova, et al., Reports of the Academy of Agricultural Sciences [Doklady RASHN] 4, 17 (2015).
- В. А. Чесноков, Е. Н. Базырина, Т. М. Бушуева, Выращивание растений без почвы (Изд-во ЛГУ, Л., 1960).
- Т. Э. Кулешова, М. Н. Блашенков, Д. О. Кулешов и Н. Р. Галль, Научное приборостроение 26 (3), 35 (2016).
- T. E. Kuleshova, I. S. Seredin, S. A. Cheglov, et al., J. Phys.: Conf. Ser. **1135**, 012013 (2018).
- 26. J. W. Pickering, S. A. Prahl, N. Van Wieringen, et al., Appl. Optics **32** (4), 399 (1993).
- 27. В. А. Тутельян и Е. Н. Беляев, СанПиН 2.3.2.1078-01 (2001).
- 28. А. И. Ермаков, В. В. Арасимович и Н. П. Ярош, Методы биохимического исследования растений (Агропромиздат (Ленинградское отд-ние), Л., 1987).
- И. М. Скурихина и В. А. Тутельяна, Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов (Брандес – Медицина, М., 1998).
- 30. Е. В. Вязов и Н. В. Шалыго, Докл. Нац. Академии наук Беларуси **59** (2), 87 (2015).

# The Influence of Spectral Properties of Lighting Environments on Light Absorption by Lettuce Leaves and Net Photosynthesis of Lettuce

# T.E. Kuleshova\*, I.N. Chernousov\*\*, O.R. Udalova\*\*, L.M. Anikina\*\*, Yu.V. Khomyakov\*\*, A.V. Aleksandrov\*\*, I.S. Seredin\*\*\*, S.V. Feofanov\*\*\*, S.A. Shcheglov\*\*\*\*, N.R. Gall\*, and G.G. Panova\*\*

\*Ioffe Physical-Technical Institute, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia

\*\*Agrophysical Research Institute, Grazhdanskiy prosp. 14, St. Petersburg, 195220 Russia

\*\*\*LLC "O2 Lighting Systems", ul. Novoroshchinskaya 4, St. Petersburg, 196084 Russia

\*\*\*\*Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Kronverkskiy prosp. 49, St. Petersburg, 197101 Russia

In the current study, we investigated the effect of light with different spectral composition on lettuce leaf light absorption and found optimal light conditions to enhance the yield and quality of plant species grown under artificial light. "Typhoon" lettuce exposed to five different light intensities was grown by the method of small-volume panoponics in an automated greenhouse. The method developed by researchers of this study was employed to estimate in vivo light absorption in lettuce leaves. The use of this method does not cause an injury to the plant. Based on data obtained, we conclude that spectral properties of lighting environments can influence leaf optical traits reflecting the physiological status of plants. When the plant productivity was maximum, the biomass of lettuce increased by 1 g for 10 days with the percentage photon of light absorbed up to ~140  $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>, the plant had worse growth characteristics under light intensity of below 70  $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>. Because light spectral characteristics of high-pressure sodium arc lamp and LED producing yellow light were similar in the range of photosynthetic active radiation and photosynthetic active photon flux density was almost equal in the blue, green, and red spectral regions, plants had similar light absorption during the growth cycle. At the same time, there is significant increase in yield of lettuce (~50%), as well as better plant growth, development and biochemical composition under HPS lamps. Differences observed under different artificial light showed that HPS lamp produced a light spectrum which was more suitable for photosynthesis. The data obtained indicate that the lighting spectrum emitting  $\sim 25 \,\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in the range of 400–500 nm,  $\sim 150 \,\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  in 500–600 nm, ~150  $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup> at 600–700 nm leads to high lettuce productivity.

Keywords: intensive photoculture, lighting spectra, LED, leaf optical properties, light absorption, net photosynthesis ——— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 519.876.5

# НЕЙРОСЕТЕВАЯ МОДЕЛЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ФЕНОЛОГИИ СКОРОСПЕЛЫХ СОРТОВ СОИ ПО КЛИМАТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

© 2020 г. О.Д. Таратухин\*, Л.Ю. Новикова\*, \*\*, И.В. Сеферова\*\*, Герасимова Т.В.\*\*, С.В. Нуждин\*, \*\*\*, М.Г. Самсонова\*, К.Н. Козлов\*

> \*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

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

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

\*\*\*Университет Южной Калифорнии, СА 90089, Лос-Анжелес, США

*E-mail: kozlov\_kn@spbstu.ru* Поступила в редакцию 30.10.2019 г. После доработки 30.10.2019 г. Принята к публикации 01.11.2019 г.

Фенология сои сильно зависит от температуры и продолжительности светового дня и четко указывает на изменения климата. Авторами разработана модель, которая включает в себя три искусственные нейронные сети для прогнозирования временных интервалов между посевом, всходами, цветением и созреванием в зависимости климатических факторов, а также ансамбли регрессионных моделей для прогнозирования урожайности, содержания белка и масла в семенах. Проанализированы данные по созреванию скороспелых образцов сои, фенотипированных на двух опытных станциях ВИР имени Н.И. Вавилова в Северо-Кавказском и Северо-Западном регионах России. Модель реализована на языке Python с использованием библиотек Keras и TensorFlow.

*Ключевые слова: климатические факторы, соя, искусственные нейронные сети.* **DOI:** 10.31857/S0006302920010159

Благодаря комплексу ценных свойств растений и зерна, соя (*Glvcine max* (L.) Merr.) является одной из главнейших белково-масличных культур в мире. Высокое содержание белка (40-45%) и масла (20-25%) в семенах сои обеспечивает постоянный рост значения этой культуры в мировой экономике. Соя – растение короткого дня теплообеспеченных регионов умеренных широт, однако ее биологический потенциал позволяет выращивать сорта в широком диапазоне климатических условий. В условиях глобальных и региональных климатических трендов научной основой для изучения механизмов адаптации растений к изменению условий обитания является математическое моделирование и прогнозирование [1-3]. Индикатором климатических изменений и степени пригодности сортов к складывающимся климатическим условиям является фенология растения [4].

Математические модели хозяйственно ценных показателей, таких как, например, длина периодов «посев-всходы», «всходы-цветение», «цветение-созревание», могут строиться различными методами. Часто используются регрессионные модели с различными наборами факторов [5]. Распространенным подходом является расчет суммы накопленных «единиц тепла» в сутки. Продолжительность периода между фазами развития определяется нахождением суммы вкладов всех дней до достижения заданной величины, необходимой для завершения фазы. Вклад за день часто принимается равным произведению функций длины дня и средней суточной температуры воздуха [6–9]. Динамические и имитационные модели [10] позволяют исследовать развитие растения.

Искусственные нейронные сети являются одним из широко применяемых методов машинного анализа, который используется в различных областях, в том числе для описания хозяйственно-ценных признаков растений [11–13]. Искусственные нейронные сети основываются на концепции слоев искусственных нейронов. Исходные данные подаются в нейронную сеть на входной слой, с которого поступают на произвольное число промежуточных слоев, а результат считывается с выходного слоя. Такие параметры, как размерность и количество скрытых слоев, должны быть заданы с учетом объема имеющихся экспериментальных данных. Модели на основе

Группа	Сорта
EC	Sito, Major
Канада	Maple Ridge, KG-20
Север	ПЭП 26, ПЭП 27, ПЭП 28, ПЭП 2, ПЭП 17, ПЭП 18
Сибирь	СибНИИСХ 6, Степная 90, СибНИИК 15/83, Алтом, Степная 85
Швеция	Fiskeby 840-2-7, Fiskeby 840-7-3, Fiskeby V, Fiskeby 1040-4-2, Bravalla
Центр	Соер 13-91, Мадева, Восход*1191/79, Белор, Магева, УСХИ 6, Соер 4, Окская, Светлая

Таблица 1. Группировка сортов по областям селекции

нейронных сетей используются и для исследования фенологических показателей [14].

#### ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Сбор фенотипических данных, показателей продуктивности и качества семян проводили в ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР) в двух географических районах – в Санкт-Петербурге (г. Пушкин) и Краснодарском крае (на Кубанской опытной станции) в 2004-2006 гг. В изучение были включены скороспелые сорта, способные вызревать в условиях Краснодарского края и формировать выполненные семена в условиях Северо-Западного региона. В Пушкине проведено два посева – основной и ранний, 25 и 11 мая соответственно, на Кубани посев проводили с 7 по 13 мая. В 2004 г. в Пушкинском филиале сумма активных температур (выше  $+10^{\circ}$ C) за вегетацию в зависимости от сроков посева составляла от 1718,9 до 1721,5°С; сумма осадков за вегетацию составила от 181,1 до 182,3 мм. В 2005 г. сумма активных температур составляла от 1768,3 до 1924,5°С, сумма осадков за вегетацию – от 82,8 до 90,6 мм. В 2006 г. сумма активных температур составляла от 1789,2 до 1930,8°С, сумма осадков за вегетацию – от 58,2 до 84,7 мм. На Кубанской опытной станции (КОС ВИР) в 2004 г. сумма активных температур за вегетацию была выше и составляла 2020°С при сумме осадков 339,7 мм; в 2005 г. сумма активных температур составляла 2247°С, сумма осадков – 107 мм. Продолжительность светового дня составляла от 16 ч (в мае) до 18 ч (в июне) в Пушкине и от 14 ч (в мае) до 15 ч (в июне) на КОС ВИР.

Полевые исследования проводили общепринятыми методами в соответствии с «Методическими указаниями по изучению коллекции зерновых бобовых культур» [15] и «Международным классификатором СЭВ рода Glycine Willd» [16]. У изучаемых образцов за годы исследований и по вариантам опыта содержание белка и масла в семенах заметно варьировало. В условиях Северо-Запада содержание белка колебалось от 27,4 до 49,7%, а масла — от 13,8 до 20,9%. В Краснодарском крае содержание белка составляло от 32,8 до 46,1%, а масла — от 16,4 до 24,4%.

## ГРУППИРОВКА ДАННЫХ

Исходные данные содержат информацию о сортах, которые были созданы в нескольких географических областях. Образцы были объединены в группы по областям селекции (см. табл. 1) для сравнения результатов моделирования.

По происхождению образцы могут быть разделены на созданные в Европе (Sito, Major), в Канаде (Maple Ridge, KG-20), в сибирских селекционных центрах (СибНИИСХ 6, Степная 90, Сиб-НИИК 15/83, Алтом, Степная 85), в Швеции (Fiskeby 840-2-7, Fiskeby 840-7-3, Fiskeby V, Fiskeby 1040-4-2, Bravalla), в селекционных центрах средней полосы РФ (Соер 13-91, Мадева, Восход\*1191/79, Белор, Магева, УСХИ 6, Соер 4, Окская, Светлая), а также экспериментальные образцы, созданные в ВИРе в Ленинградской области (ПЭП 26, ПЭП 27, ПЭП 28, ПЭП 2, ПЭП 17, ПЭП 18).

#### МОДЕЛЬ ДЛИНЫ ПЕРИОДОВ НА ОСНОВЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

В работах [14, 17] была предложена модель на основе нейронной сети, которая состоит из четырех входных нейронов, двадцати нейронов в единственном скрытом слое и единственного выходного нейрона. В данной работе сеть была модернизирована для включения информации о принадлежности образца одной из групп  $G_k$ , k = 1, ... 6. Для каждого образца  $G_k = 1$ , если образец принадлежит к группе k, в иных случаях  $G_k = 0$ . Схема сети показана на рис. 1. Показаны



**Рис. 1.** Нейронная сеть модели длины периодов «посев-всходы», «всходы-цветение» и «цветение-созревание». На входы сети  $I_1-I_5$  подаются результаты применения специально подобранных функций климатических факторов,  $G_1-G_6$  получают информацию о принадлежности к группе. Показаны связи только первого нейрона входного слоя с нейронами скрытого слоя, чтобы не загромождать рисунок. Все нейроны входного слоя связаны с каждым нейроном скрытого слоя.

связи только первого нейрона входного слоя с нейронами скрытого слоя, чтобы не загромождать рисунок. Все нейроны входного слоя связаны с каждым нейроном скрытого слоя.

На входы сети  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ ,  $I_4$ ,  $I_5$  подаются результаты применения специально подобранных функций, которые обобщают влияние ежедневных показателей максимальной и минимальной температуры, осадков, солнечной радиации и длины светового дня на состояние растения. Число входных функций по сравнению с предыдущими моделями было увеличено до пяти.

Входные данные  $I_i$  вычисляются по формуле (1) для каждого дня D суммированием по всем предыдущим дням j неотрицательных значений функций  $f_i$  от  $g_j$  – вектора ежедневных погодных данных и параметров:

$$I_{i} = \sum_{j=1}^{D} H(f_{i}(g_{j})) f_{i}(g_{j}),$$
(1)

$$g_j = \{T_{x,j}, T_{m,j}, P_j, R_j, L_j, T_{x,c}, T_{m,c}, P_c, R_c, L_c\},$$
(2)

где H — функция Хевисайда (равна единице для неотрицательных аргументов, иначе 0);  $T_{m,c}$ ,  $T_{x,c}$  — нижняя и верхняя температурные границы роста;  $L_c$  — базовая длина светового дня;  $T_{m,j}$ ,  $T_{x,j}$ ,  $L_j$  — минимальная температура, максимальная температура и длина светового дня за день j;  $P_c$ ,  $P_j$  — базовое и ежедневное количество осадков;  $R_c$ ,  $R_j$  — базовая и ежедневная солнечная радиация. Конкретные значения параметров в векторе  $g_j$  и вид функций  $f_j$  должны быть выяснены в ходе обучения сети для достижения наилучших результатов.

#### МОДЕЛЬ УРОЖАЙНОСТИ, СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА И МАСЛА В СЕМЕНАХ

Модели прогнозирования урожайности, содержания белка и масла в семенах строили с помощью программы autoML [18] на языке Python 3 по признакам: «Группа», «Длина периода «посев-всходы»», «Длина периода «всходы–цветение»», «Длина периода «цветение–созревание»», «Температура «посев-всходы»», «Осадки «посев-всходы»», «Температура «всходы–цветение»», «Осадки «всходы–цветение»», «Садки «всходы– ние»», «Осадки «всходы–цветение»», «Температура «всходы–созревание»», «Садки «всходы– созревание»». АutoML использует автоматическое машинное обучение на основе байесовской оптимизации для построения ансамбля регрессионных моделей. Такой подход позволяет снизить риск переобучения [18].

#### ПРОГНОЗЫ ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА

Моделирование погоды на каждый день на Кубани с 2019 до 2030 года было проведено с помощью генератора погоды — программы МаркСим [19–23]. Были учтены социоэкономические сценарии развития, которые описываются четырьмя характерными профилями концентрации углекислого газа (Representative Concentration Pathways, RCPs), принятые IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change — Межправительственная группа экспертов по изменению климата) для



Рис. 2. Сравнение данных и решения модели для содержания масла (а), белка (б) и урожайности (в).

пятого оценочного отчета (Assessment Report, AR5) в 2014 г. Профили соответствуют широкому кругу возможных изменений будущих антропогенных выбросов парниковых газов и называются гср26, гср45, гср60 и гср85 в соответствии с возможными значениями нарушения радиационного баланса Земли в 2100 г. относительно преиндустриальной эры (+2.6, +4.5, +6.0 и +8.5 Bt/m<sup>2</sup> соответственно) [24].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ АДАПТАЦИИ МОДЕЛЕЙ

С помощью программы autoML [18] построены модели урожайности, содержания белка и масла в семенах сои по признакам: «Группа», «Длина периода «посев-всходы»», «Длина периода «всходы-цветение»», «Длина периода «цветение-созревание»», «Температура «посев-всходы»», «Осадки «посев-всходы»», «Температура «всходы-цветение»», «Осадки «всходы-цветение»», «Температура «всходы-созревание»», «Осадки «всходы-созревание»», «Осадки «всходы-цветение»», «Температура «всходы-созревание»», «Осадки «всходы-созревание»». Набор данных включал 194 записи. В программе autoML были использованы параметры по умолчанию.

На рис. 2 показано сравнение данных о содержании масла и белка в семенах и урожайности и решений модели. Видно, что модель достаточно точно описывает экспериментальные данные. Коэффициент корреляции Пирсона на уровне значимости <0.01 составил для масла 0.88, для белка – 0.72, для урожайности – 0.75.

С использованием бутстрап-подхода в программе sklearn [25] были оценены относительные доли влияния признаков на модели (см. табл. 2). Урожайность и содержание белка в семенах в значительной степени зависели от генотипа, содержание масла — от тепловлагообеспеченности вегетации.

Модели для длин периодов «посев—всходы», «всходы—цветение» и «цветение—созревание» были запрограммированы на языке Python с использованием Keras [26] и TensorFlow [26] в качестве вычислителя. Данные о ежедневных максимальных и минимальных температурах, осадках и длине дня были взяты в открытом доступе в сети Интернет (https://rp5.ru). Аналитический вид функций  $f_i$ , а также значение констант  $T_{m,c}$ ,  $T_{x,c}$ ,  $L_c$ ,  $P_c$ ,  $R_c$  были получены путем минимизации отклонения решения модели от данных с использованием методов разностной эволюции [28, 29] и грамматической эволюции [17, 30].

Точность моделей оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона между экспериментальными данными и решением модели. Модели с наилучшей точностью были отобраны

Признак	Модель содержания масла	Модель содержания белка	Модель урожайности
Группа	0.096	0.300	0.274
Длина периода «посев—всходы»	0.077	0.072	0.130
Длина периода «всходы—цветение»	0.044	0.072	0.096
Длина периода «цветение— созревание»	0.059	0.088	0.131
Температура периода «посев-всходы»	0.024	0.079	0.054
Осадки периода «посев—всходы»	0.088	0.091	0.037
Температура периода «всходы— цветение»	0.044	0.077	0.074
Осадки периода «всходы—цветение»	0.044	0.043	0.054
Температура периода «всходы— созревание»	0.200	0.089	0.090
Осадки периода «всходы—созревание»	0.324	0.089	0.059

Таблица 2. Относительные доли влияния признаков в модели урожайности, содержания белка и масла в семенах сои

Примечание. Значения округлены до трех знаков после запятой по правилам округления.

Имя	Период «посев–всходы»	Период «всходы—цветение»	Период «цветение— созревание»
$f_1$	$P_j - P_c$	$R_j - R_c - T_{x,j} - T_{x,c} + 1/T_{m,j}$	R <sub>c</sub>
$f_2$	$(T_{x,j} - T_{x,c}) - (T_{x,j} - T_{x,c})/L_j$	$1/(T_{x,j} - T_{x,c})/(1/(R_j - R_c))$	$1/(T_{x,j} - T_{x,c})$
$f_3$	$T_{\mathrm{m,}j}$	$1/(L_j - L_c) + (T_{m,j} - T_{m,c}) + 1/P_j$	$1/(P_j - P_c) - (P_j - P_c) + (L_j - L_c)$
$f_4$	$(T_{x,j} - T_{x,c})(T_{m,j} - T_{m,c})$	$1/(T_{\rm m,j} - T_{\rm m,c})$	$(T_{x,j} - T_{x,c}) + 1/(T_{x,j} - T_{m,c})$
$f_5$	$T_{x,j} - 1/(T_{x,j} - T_{x,c})$	1	$T_{\mathrm{m,}j} - T_{\mathrm{x,c}}$
$T_{\rm m,c}$	6.683	10.174	10.975
$T_{\rm x,c}$	26.136	29.868	23.805
$L_{c}$	_	15.493	15.544
$P_{\rm c}$	7.288	_	0.376
$R_{\rm c}$	_	6.479	0.090
r	0.79	0.78	0.067

Таблица 3. Характеристика моделей периодов на основе нейронных сетей и

Примечание.  $T_{m,c}$ ,  $T_{x,c}$  – нижняя верхняя граница роста;  $L_c$  – базовая длина светового дня;  $T_{m,j}$ ,  $T_{x,j}$ ,  $L_j$  – минимальная, максимальная температура и длина светового дня за день *j*;  $P_c$ ,  $P_j$  – базовое и ежедневное количество осадков;  $R_c$ ,  $R_j$  – базовая и ежедневная солнечная радиация; r – коэффициент корреляции Пирсона между экспериментальными данными и решением модели.



**Рис. 3.** Прогноз времени всходов сои по группам образцов разного происхождения. Различными символами — квадрат, круг, треугольник и обратный треугольник – помечены значения, соответствующие четырем характерным профилям концентрации углекислого газа: rcp26, rcp45, rcp60 и rcp85 соответственно.

для дальнейшего исследования (см. табл. 3). В каждой из моделей присутствуют линейные и нелинейные функции. Модель для длины периода «посев-всходы» оказалась независящей от солнечной радиации, а для периода «всходы-цветение» — независящей от осадков. Модели показывают удовлетворительную точность.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДЕЛИ

Созданные погодные данные и построенные модели были использованы для прогнозирования длин периодов «посев-всходы», «всходыцветение», «цветение-созревание», а затем для прогнозирования урожайности и содержания



Рис. 4. Прогноз времени цветения сои, по группам образцов разного происхождения. Условные обозначения, как на рис. 3.

белка и масла в семенах для модельного посева 10 мая шести групп сортов сои в Кубани в 2019–2030 гг.

Результаты моделирования показывают, что время до всходов (см. рис. 3) сильно колеблется год от года в интервале примерно от -50% до +50% к значениям в данных. При этом максимальные и минимальные значения в большинстве случаев относятся к профилю гср85. Прогнозные значения длины периода «всходы–цветение» (см. рис. 4) имеют тенденцию к уменьшению, однако также подвержены колебаниям. В отличие от прогноза времени до всходов, верхняя граница колебаний существенно ниже значений в реальных данных, в то время как нижняя граница находится на уровне в три-четыре раза ниже. Модельные значения длины периода «цветение—созревание» (см. рис. 5) изменяются колебательно, однако не имеют выраженной тенденции к увеличению или уменьшению и лишь в



Рис. 5. Прогноз времени созревания сои, по группам образцов разного происхождения. Условные обозначения, как на рис. 3.

редких случаях отличаются от значений в экспериментальных данных больше чем на треть.

Результаты прогнозирования урожайности, содержания белка и масла в семенах сои показаны соответственно на рис. 6, 7 и 8. Для всех сортов, кроме группы ЕС, в которой данные получены для Ленинградской области, содержание масла прогнозируется значительно ниже значений в реальных данных. Сорта делятся на три группы по прогнозу содержания белка. Для сортов Севера, Швеции и Центра прогнозируется содержание белка на уровне примерно 40%, для сортов Сибири — на уровне 41%, для остальных сортов (ЕС и Канада) — на уровне 42%. При этом для Сибири и Центра прогноз показывает лишь слабые колебания и незначительный прирост, в то время как для остальных сортов прогнозируется прирост содержания белка. Прогноз урожайности показывает ее рост для всех групп сортов, кроме группы ЕС, при наличии ярко выраженных колебаний.

Такие результаты можно объяснить тем, что для моделей содержания белка в семенах и урожайности принадлежность образца к группе име-



Рис. 6. Прогноз содержания масла в семенах сои, по группам образцов разного происхождения. Условные обозначения, как на рис. 3.

ет сравнительно высокую относительную долю влияния (см. табл. 2), поэтому прогнозы отличаются по группам (см. рис. 7 и 8). Колебания прогнозируемых значений урожайности, белка и масла порождаются колебаниями прогнозируемых значений длин периодов, которые можно объяснить стохастической природой моделей генерации погоды, а также наличием нелинейности в моделях и сложным балансом погодных факторов. Одновременное снижение содержания масла в семенах сои и рост урожайности требует дополнительного объяснения. Мы предполагаем, что в условиях прогноза может формироваться больше семян. Однако скороспелые сорта попадают при созревании в условия избыточно высоких температур, при которых накопление масла понижено.



Рис. 7. Прогноз содержания белка в семенах сои, по группам образцов разного происхождения. Условные обозначения, как на рис. 3.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование математических моделей для прогнозирования хозяйственно-ценных характеристик растений, таких как длины периода «посев-всходы», «всходы-цветение», «цветениесозревание», а также урожайность, содержание белка и масла в семенах сои, должно являться научной основой селекционного улучшения сортов культуры в условиях глобальных изменений климата. В данной работе были построены модели для предсказания характеристик сортов сои, выведенных в шести регионах и фенотипированных в условиях Северо-Кавказского и Северо-Западного регионов. Разработанные модели используют новейшие подходы математического моделирования, такие как автоматическое машинное обучение, нейронные сети и грамматическую эволюцию, с помощью которой были подобраны



Рис. 8. Прогноз урожайности сои, по группам образцов разного происхождения. Условные обозначения, как на рис. 3.

функции погодных данных. Расчеты по имеющимся экспериментальным данным показали высокую точность моделирования. Прогноз роста содержания белка в семенах сои, не столь благоприятный прогноз для содержания масла, зависимость содержания белка от сорта совпадают с результатами, полученными по простым регрессионным уравнениям [31]. Однако новейшие подходы показали более высокие прогностические способности моделей. Модельные прогнозы показали различную реакцию групп сортов на изменение климата. Однако для большинства сортов прогнозируется рост урожайности, что указывает на благоприятные перспективы использования изменений климата.

Таким образом, показана пригодность модели фенологии сои, созданной методом искусственных нейронных сетей, для прогнозирования в изменяющемся климате.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы (проект №14.575.21.0136 от 26.09.2017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57517X0136).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Вычисления были поведены в Суперкомпьютером центре «Политехнический» СПбПУ и кластере Университета Южной Калифорнии.

Исходные данные получены на базе уникальной научной установки Коллекция генетических ресурсов растений ВИР.

#### 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

- А. Г. Папцов и др., Адаптация сельского хозяйства России к глобальным изменениям климата. Проект независимой международной организации Оксфам (2015). URL: http://www.oxfam.ru/upload/ iblock/f96/f9622b41f48549945438f2292f509d14.pdf (Электронный ресурс, режим доступа: 06.01.2019).
- 2. J. E. Olesen, et al., Eur. J. Agronomy 34 (2), 96 (2011).
- T. Carter and K. Mäkinen, Approaches to climate change impact, adaptation and vulnerability assessment: towards a classification framework to serve decision-making: ME-DIATION 2.1 (Finnish Environment Institute, Helsinki, Finland, 2011).
- 4. A. D. Richardson, et al., Global Change Biology **18** (2) 566 (2012).
- К. Н. Козлов, Л. Ю. Новикова, И. В. Сеферова и М. Г. Самсонова, Биофизика 63 (1), 175 (2018).
- 6. D. J. Major, et al., Crop Science 15, 174 (1975).
- 7. T. Hodges and V. French, Agronomy J. 77 (3), 500 (1985).
- 8. P. Pedersen, et al., Agronomy J. 96, 556 (2004).
- 9. T. D. Setiyono, et al., Field Crops Res. **100** (2–3), 257 (2007).
- Л. Ю. Новикова, И. В. Сеферова и К. Н. Козлов, Биофизика 63 (6) 1182 (2018).
- 11. M. Abdipour, et al., J. Am. Oil Chemists' Soc. **95** (3), 283 (2018).

- 12. M. Kaul, R. L. Hill, and C. Walthall, Agricult. Systems **85** (1), 1 (2005).
- 13. A. Bagherzadeh, et al., Modeling Earth Systems and Environment **2** (2), (2016).
- 14. D. A. Elizondo, R. W. McClendon, and G. Hoogenboom, Trans. ASAE **37** (3), 981 (1994).
- Н. И. Корсаков, О. П. Адамова и В. И. Будаова, Методические указания по изучению коллекции зерновых бобовых культур (ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова, Ленинград, 1975).
- 16. Л. Щелчко, Международный классификатор СЭВ рода Glycine Willd (Науч.-техн. совет стран-членов СЭВ по коллекциям диких и культурных видов растений, ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова, Ленинград, 1990).
- 17. О. Д. Таратухин, Л. Ю. Новикова, И. В. Сеферова и К. Н. Козлов, Биофизика **64** (3) 563 (2019).
- M. Feurer, et al. in *Advances in Neural Information Processing Systems*, Ed. by C. Cortes et al. (Curran Associates, Inc., 2015), pp. 2962–2970.
- M. Srinivasa Rao, et al., PLoS One 10 (2), e0116762 (2015).
- 20. P. G. Jones and P. K. Thornton, Agricult. Forest Meteorol. **86** (1–2), 127 (1997).
- 21. P. G. Jones and P. K. Thornton, Agricult. Forest Meteorol. **97** (3), 213 (1999).
- 22. P. G. Jones and P. K. Thornton, Agronomy J. **92**, 445 (2000).
- 23. P. G. Jones and A. L. Jones, *MarkSim: a computer tool that generates simulated weather data for crop modeling and risk assessment* (CIAT, 2002).
- 24. D. P. van Vuuren, et al., Climatic Change **109** (1–2), 5 (2011).
- 25. F. Pedregosa, et al., J. Machine Learning Res. **12**, 2825 (2011).
- 26. F. Chollet, et al., *Keras* (GitHub, 2015). URL: https:// https://github.com/keras-team/keras.
- M. Abadi, et al., in Proc. 12<sup>th</sup> USENIX Conf. on Operating Systems Design and Implementation (Savannah, GA, USA, 2016), pp. 265–283.
- K. Kozlov, A. M. Samsonov, and M. Samsonova, Peer J. Comp. Sci. 2, e74 (2016).
- 29. R. Storn and K. Price, J. Global Optimization 11, 341 (1997).
- 30. M. O'Neill and C. Ryan, IEEE Trans. Evolutionary Computation 5 (4), 349 (2001).
- Л. Ю. Новикова, И. В. Сеферова, А. Ю. Некрасов и др., Вавиловский журн. генетики и селекции 22 (6) 708 (2018).

# An Artificial Neural Network Model for Prediction of Phenology of Early Maturing Soybean Varieties in Relation to Climate Factors

# O.D. Taratuhin\*, L.Yu. Novikova\*, \*\*, I.V. Seferova\*\*, T.V. Gerasimova\*\*, S.V. Nuzhdin\*, \*\*\*, M.G. Samsonova\*, and K.N. Kozlov\*

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

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

\*\*\* University of Southern California, Los Angeles, CA, 90089 USA

Soybean phenology is strongly influenced by temperature and day length and phenological records clearly reflect changes in climatic conditions. We developed a model that includes four artificial neural networks for forecasting time intervals between sowing, emergence, flowering and maturity in relation to climatic factors and also formed assemblies of regression models to predict the yield, seed protein and oil content in soybean. We analyzed data on maturation of early ripening soybean accessions phenotyped at two experimental stations of N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources in North-Caucasian and North-Western districts of Russia. The model was implemented in Python using Keras and TensorFlow serving libraries.

Keywords: climatic factors, soybeans, artificial neural networks

УДК 595.76,51.76,532.22

# НЕПРЕРЫВНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ОСЦИЛЛИРУЮЩЕЙ ВСПЫШКИ ЧИСЛЕННОСТИ ЧЕШУЕКРЫЛОГО ФИТОФАГА Malacosoma disstria (Lepidoptera, Lasiocampidae)

## © 2020 г. А.Ю. Переварюха

Санкт-Петербургский институт информатики и автоматизации РАН, 199178, Санкт-Петербург, 14-я линия, 39 E-mail: temp\_elf@mail.ru Поступила в редакцию 27.05.2019 г. После доработки 17.11.2019 г. Принята к публикации 22.11.2019 г.

Вспышки численности отдельных популяций – важные во многих аспектах и многообразные с точки зрения теории динамических систем явления. Наиболее стремительно развиваются вспышки насекомых, имеющие длительные последствия для лесного хозяйства. Подобные события относятся к экстремальным несбалансированным переходным процессам. Механизмы запуска и фазы затухания различаются у разных таксономических групп вредителей. Отличны по продолжительности и фазе наступления повторной активности вспышки у псиллид и у бабочек, поражающих лиственные или хвойные насаждения в одном регионе. Их особенности динамики актуальная задача для вычислительного моделирования. Для математического описания помимо порогового варианта запуска вспышки интересно модифицировать непрерывные вычислительные модели для анализа колебательной динамики. В статье рассмотрено моделирование специфичного сценария вспышечной активности спонтанно затухающего осциллирующего характера в непрерывной модели с запаздывающей регуляцией и нелинейным противодействием со стороны биотического окружения. Описанный феноменологическим уравнением сценарий из серии разновеликих максимумов и итоговым затуханием пиков у балансового равновесия реализуется для бабочки-вредителя коконопряда Malacosoma disstria, поражающей лиственные массивы в Северной Америке и вызывающей масштабную дефолиацию леса. Новый сценарий качественно отличается от модели порогового развития и завершения вспышек у псиллид в Австралии.

Ключевые слова: экстремальная динамика экосистем, вспышки насекомых, затухающие флуктуации численности, модели колебательной динамики популяций, уравнения с запаздыванием, бифуркации, коконопряд Malacosoma disstria, дефолиация леса.

DOI: 10.31857/S0006302920010160

Вспышки численности одна из хрестоматийных проблем для экологии биосистем и математической биологии. Актуальность изучения вспышек как группы экстремальных явлений только возрастает в современных условиях «перемешивания» фаунистических комплексов. Глобализация сопровождается все более частыми случаями запуска агрессивных инвазионных процессов [1] после нежелательных вселений и быстрого размножения чужеродных видов. Иногда вселенец адаптируется многие годы до перехода к активности (как интродуцент краб Paralithodes camtschaticus в Баренцевом море [2], моллюск Dreissena polymorpha в озерах США). Катастрофическая для лесной растительности вспышка вредителя может стартовать немедленно, как было в 2014 г. с проникшей самшитовой огневкой Cydali*ma perspectalis* в Имеретинской долине [3].

Случаи стремительного размножения необходимо изучать, классифицировать и по возможности прогнозировать подобные ситуации. Вспышки наиболее характерны для насекомых-фитофагов. Наблюдаются случаи взрывного роста численности не только у инвазивных, но в том числе у ряда автохтонных видов. Подобные локальные явления с фазой бурного роста у популяций, издавна включенных в состав сообществ, под пристальным математическим взглядом выглядят несхожими нелинейными процессами с несколькими разнородными типами трансформаций фазового портрета.

Продолжаются исследования причин вспышек насекомых, эффекторах/ингибиторах внезапной активности вредителей. Дискуссия ведется о превалировании биотических [4] либо внешних факторов, например циклах солнечной активности и периодических климатических воздействиях на ключевые регуляторные механизмы. В литературе систематически описан ряд частных сценариев, как, например, в работе [5] для бабочки Dendrolimus sibiricus в засушливой Внутренней Монголии. По-видимому, главенствующей единой причины для явлений не существует. Мы обратим вниманием именно на вариативность подобных экстремальных явлений даже у одного вида, но в разных ареалах. В некоторых случаях удается отметить пороговый путь развития и окончания краткой вспышки. В других интерпретировать поведение в рамках бифуркационных изменений у осциллирующей динамики. Разграничение с точки зрения теории динамических систем типов наблюдаемых переходов между фазами процесса, связанных с ускоренным размножением, может помочь систематике экстремальных экологических явлений.

Участие автора в проекте совместно с группой энтомологов из Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений по анализу характеристик динамики смежных поколений локальной популяции кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* [6] привело к выводу, что иногда мы наблюдаем не некоторое выделенное событие с типичными признаками вспышки. Проявляются иррегулярные переходы между длительными периодами депрессии популяции мотылька и ее высокой репродуктивной активности. В частном случае оба состояния популяции отражаются колебательной динамикой, но с разной амплитудой внутри популяционного цикла.

Вспышки численности эпизодичны как особые переходные режимы функционирования экосистем, и при моделировании развития ситуации необходимо включать варианты их завершения. Известная модель в работе [7] – уравнение для вспышек насекомых – не покажет сценария спонтанного завершения явления, там требуется внешний импульс для переходов между устойчивыми состояниями, таких как занос насекомых ветром из других ареалов. Фазы экстремальных состояний численности для автохтонных и для инвазивных видов отличаются нюансами динамики ситуаций. В настоящей работе мы обсудим модель специфической формы вспышечной активности у насекомых - осцилляционного характера. Автохтонная популяция продуцирует длительную серию пиков. В таком режиме популяция все время между пиками существует при достаточно высокой численности. Рассмотрим моделирование явления серии разновеликих пиков как процесса при сложной регуляции с последействием. Ранее мы использовали для математического описания пороговой формы вспышки в вечнозеленом лесу итерационную гибридную системы, предложив специальный триггерный функционал для описания ее завершения. Каждый формализм имеет свои возможности для

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

описания конкретных изменений и переходов между режимами существования биосистем.

Интересным примером для интерпретации свойств новой математической модели является агрессивное поведение вредителей в лесах Северной Америки [8], например кольчатого коконопряда *Malacosoma disstria*. Выбор в качестве экологического примера для построения модели мотивирован наличием опубликованных долговременных систематизированных наблюдений лесного хозяйства в провинциях Квебек и Онтарио за проявлениями активности вредителей. Одна из актуальных задач для математического истолкования резких изменений у биологического процесса состоит в обоснованном выборе подходящей методики из конечного набора возможных динамических систем.

Для каждой разновидности нетривиальной популяционной динамики целесообразно подбирать и настраивать оригинальный математический аппарат, добиваясь принципиального качественного правдоподобия изменений. Рассуждать о преимуществах какого-то подхода для всего популяционного моделирования нет смысла, процессы в биосистемах имеют разные временные параметры. В работе [9] авторы предлагали представлять вспышки массового размножения насекомых как фазовые переходы второго рода, а в работе [10] строили модель со спектральным анализом временных рядов. Важно понимать, что лискретные, гибрилные или непрерывные динамические системы обладают отличаюасимптотическими множествами шимися траектории, набором их трансформаций (бифуркаций) и свойств у границ областей притяжения аттракторов. Для интересующей задачи выберем непрерывную запись феноменологической модели – форму дифференциальных уравнений с отклоняющимся аргументом, отличающуюся регуляционным и адаптационным запаздыванием.

# ВАРИАТИВНОСТЬ ПОРОГОВОГО РАЗВИТИЯ ВСПЫШКИ У ПСИЛЛИД

Рассмотрим наглядно вариативность экстремальных изменений численности. В предыдущей работе [11] мы предложили метод вычислительного моделирования порогового сценария единичной локальной вспышки на основе анализа регуляторов размножения монофага Cardiaspina albitextura из семейства Psyllidae. Развитие фаз типичной вспышки автохтонного вида псиллид в вечнозеленом эвкалиптовом лесу на восточном побережье Австралии было описано в работе [12]. Объяснимо, когда чужеродная дальневосточная бабочка, оснащенная химзащитой токсинами гемолимфы гусениц от потенциальных местных врагов, способна достигать уровня численности, уничтожающей самшитовый лес. Однако вспышки случаются у очень уязвимых мелких поливоль-

#### ПЕРЕВАРЮХА



Рис. 1. Пороговое развитие вспышки эвкалиптовых псиллид и смена фаз (согласно работе [11]).

тинных фитофагов отряда Hemiptera — кокцид и псиллид. По числу продуцируемых поколений за сезон активности насекомые (в своих локальных ареалах) разделяются на поли-, би- и моновольтинных, дающих единственное поколение в году.

Ситуация взрывообразного популяционного процесса у этих полужесткокрылых попала в качестве иллюстративного примера в известную книгу Ю. Одума [13] без многих необходимых пояснений, как хрестоматийный образец развития вспышек, который можно обобщить на другие примеры. В интерпретации у данного автора отсутствовала немаловажная на самом деле деталь. В исходном описании [12] был предусмотрен реже встречавшийся сценарий b на графике популяционного процесса псиллид (см. рис. 1). Отмечалось, что в некоторых специфических случаях после затухания вдруг наблюдался относительно скорый повторный пик численности. Вариант развития b связывался с замедленным перемещением псиллид в районах с менее плотным произрастанием пригодных для их питания эвкалиптов. Степень поражающего растительность воздействия от размножения этих насекомых обусловлена вторичными инфекциями.

В концептуальном сценарии, представленном на рис. 1, в фазе флуктуаций I при малой средней численности, которую мы математически интерпретировали апериодическим режимом хаотизации, использован другой хаотический переходный режим, чем в известном сценарии появления хаоса Фейгенбаума. После непредсказуемого преодоления порога процесс переходит в эруптивную фазу III. Взрывообразный рост популяции в фазе III останавливается на пике IV в момент исчерпания необходимых для размножения ресурсов - пригодных деревьев. Тут обычно службы учета фиксируют вспышку по масштабам дефолиации лесных массивов. Дефолиация при поражении растений полужесткокрылыми с ротовым аппаратом колюще-сосущего типа наступает в большей мере из-за развития вторичных грибковых инфекций, развивающихся в их липких выделениях, значит без необходимости полного уничтожения биомассы растительности непосредственно вредителем для завершения явления. В фазе V резко ухудшаются условия для откладки яиц и выживаемости нимф. Процесс локализован. После столь же резкого сокращения численности до минимума в фазе VI малочисленная популяция псиллид переходит в длительный режим хаотических флуктуаций. Самое интересное в сценарии – механизм образования порога численности. Обычно размножение этих фитофагов контролируется двумя-тремя видами мелких паразитических ос из семейства Encyrtidae [14].

Предложен подход в форме гибридной динамической системы. Идея строится на формализации роли этапности в жизни исходного поколения насекомых — убывающей численности на дробном интервале его существования  $t \in [0, T]$ . Изменения уравнения непрерывной системы в выделенные условиями моменты времени были соотнесены с переходами между тремя стадиями развития онтогенеза Psyllidae: яйца, нимфы, имаго. Для каждой из стадий учтено, что отличаются факторы смертности, как зависящей от плотности скопления псиллид, так и независимой от текущей численности.

Использующая непрерывно-дискретное время модель сформирована из дифференциального уравнения убыли начальной численности *N*(0)

поколения с переопределяемой правой частью, что происходит предикативно на трех последовательных временных субинтервалах. Алгоритмически реализуется модель в форме гибридного автомата. Набор условий включен в модель для определения момента остановки расчетов и перехода к следующей стадии непосредственно из времени для первой стадии или из расчета вспомогательного показателя развития для второй стадии:

$$\frac{dN}{dt} = \begin{cases} -(\alpha_1 w(t)N(t) + \Psi[N(0)]\beta)N(t), \ t < \rho \\ -(\alpha_2 N(\rho)\Theta[N(\rho)] / w(\rho) + \beta)N(t), \ t > \rho, \ w(t) < w_2 \\ -\alpha_3 w(t)N(t)N(t - \zeta), \ t < T, \end{cases}$$
(1)

где  $\rho$  — фиксированная длительность первой стадии, когда плотность яиц становится важным регулирующим фактором выживаемости, именно плотность скопления доступных жертв усиливает реакцию паразитов. При  $t > \rho$  расчет уравнения переходит на нимф, основную вредящую стадию насекомых, где достигнутый показатель развития  $w(\rho)$  уменьшает темп убыли. Расчет длительности стадии продолжается с использованием вычисления вспомогательной величины w(t) до достижения переходного уровня  $w_2$ .

Гибридная система (1) используется для вычисления итогового N(T). Используя гибридную вычислительную структуру, мы получили сложную зависимость  $N(T) = \phi(\lambda S)$  с двумя экстремумами для дискретной составляющей траектории в форме итераций, считая S = N(T):  $S_{n+1} = \varphi(S_n)$ ,  $N_{n+1}(0) = \lambda S_n$ , где  $\lambda$  – средняя популяционная плодовитость. Исследуем точки дискретной итерации  $S_0, S_1...S_n$  из расчета гибридных систем, связанных по начальным условиям на границах смежных непрерывных интервалов у дифференциальных уравнений. Итерации неунимодальной функциональной зависимости демонстрируют спонтанное преодоление порогового равновесия  $S_3^*$ из переходного хаотического режима, так как тах  $φ(\lambda S)$  лишь немного превосходит  $φ(S_3^*)$ . Длительность переходного хаоса до момента  $\varphi(S_n) > \varphi(S_3^*) + \varepsilon$  зависит от выбора начальной точки  $S_0$ .

Аспект вариативности на стадии завершения вспышки не был анализирован нами в предыдущей публикации. В работе [11] мы показали сценарий с одним продолжительным пиком. Рассмотрим модификацию сценария с двумя пиками для псиллид, чтобы показать гибкость предложенного метода с использованием дискретной составляющей траектории.

Вариативность можно отразить без принципиальной модификации в предикативной структуре и чрезвычайно трудоемкой перенастройки параметров (1), которая использует функции триггерного действия: Ψ,Θ. Можно вносить коррективы в эти функции, целенаправленно меняя их вклад в расчет выживаемости на нужной стадии развития. Функция Ч для формы правой части на субинтервале  $t < \rho$  «ответственна» за учет эффекта Олли и существование критической низкой численности L при ухудшении эффективности воспроизводства при малочисленном состоянии «бутылочного горлышка», когда возникает трудность с нахождением пар для размножения. Мы можем говорить о данном эффекте для малой группы [15] применительно к эффективности размножения у вредителя эвкалипта: для особей видов семейства Psyllidae партеногенез не характерен, в отличие от других надсемейств Неmiptera – тлей Aphidoidea или червецов Соссоіdea. Для большой численности N(0) функция единична и не влияет на результат расчетов:

$$\Psi(N(0)) = 1 + \exp(-\sigma_1 N^2(0)), \lim_{S \to \infty} \Psi(N(0)) = 1, \Psi(0) = 2.$$
 1a

Вторая функция-триггер  $\Theta$  определяет порог исчерпания ресурсов для стадии нимф:

$$\Theta(N(\rho)) = 1 + \frac{\mathbf{e}^{c_1 N(\tau)}}{l + c_2 \mathbf{e}^{c_1 N(\tau)}}, \lim_{N(\tau) \to \infty} \Theta(N(\rho)) = 1 + \frac{1}{c_2}.$$
 16

Действие  $\Theta$  можем сдвигать в интервале времени относительно фиксированного момента перехода ко второй стадии  $\Theta(N(\rho - \zeta))$ , усиливая (или ослабляя в случае  $\Theta(N(\rho + \zeta)))$  ее роль и тем самым меняя резкость перехода к фазе V падения численности после пика численности. Если максимум не был затяжным, то вероятность повторной вспышки увеличится. На рис. 2 представлен альтернативный вычислительный эксперимент со сценарием (1b) и с генерацией повторной



Рис. 2. Моделирование варианта повторной вспышки вредителя с краткими пиками.

вспышки через промежуток гибридного времени и нерегулярных колебаний.

Модификация опишет вариант скорого повторного преодоления порога. Обе вспышки происходят в течение одного года, пик первой приходится на август, второй – на ноябрь. Тут мы используем переходную хаотическую динамику, имитируя природную случайность. Переходный хаотический режим из-за фрактальных границ областей притяжения воспроизводит естественную стохастичность среды для флуктуаций численности в полностью детерминированной модели. Для описания завершения вспышки была использована редуцирующая устойчивую стационарную точку обратная касательная бифуркация. В рассмотренном примере бифуркация типа «backward tangent bifurcation» резко переводит популяцию в следующий интервал прохождения хаотических флуктуаций. Порог запуска вспышки не может быть монотонно достижим из любого состояния системы, все же вспышка численности с дефолиацией эвкалиптов эпизодическое явление, потому несвязные границы областей притяжения двух точек-аттракторов в нашей базовой непрерывно-дискретной модели (1) удачно описали данный экологический аспект.

Популяция в сценарии перед преодолением порога может не достигать на промежутке времени отчетливо наблюдаемых предпороговых значений, как это было в работе [11], и новый модельный сценарий менее доступен для прогнозирования признаков начала вспышки. Существование порога, отраженного в модели пограничным и неустойчивым  $S_3^*$  (имеющим слева и справа от себя только другие неустойчивые стационарные точки) положением равновесия  $\varphi(S_3^*) = S_3^*$ , объясняется сложными взаимоотношениями различных видов паразитических ос при выборе предпочтительного объекта для атак. После эпизодического повышения численности возрастает роль *Coccidoctonus psyllae* и других перепончатокрылых ос подсемейства Encyrtinae [16]. Эти микроскопические осы – гиперпаразиты. Они активно начнут паразитировать на личинках двух видов других размножившихся паразитических наездников из рода Psyllaephagus. В современной работе [17] подчеркивается зависящая от плотности жертв активность *Coccidoctonus psyllae*. Так, у первичных паразитов, как основных биологических врагов, уничтожающих яйца псиллид, создается верхний порог достижимой численности.

В контексте проблемы с очаговой дефолиацией эвкалиптовых лесов вредоносным инвазионным видом насекомых оказался именно гиперпаразит Coccidoctonus psyllae. После появления паразитической осы в Новой Зеландии в местных лесах участились вспышки фитофагов из большого семейства Psyllidae [18]. Видовое разнообразие паразитических перепончатокрылых подотряда Аросгіта велико и их систематика еще не полностью описана. В семействах Encyrtidae и Ichneumonidae встречаются сверхпаразиты даже третьего порядка. Осы находят личинки уже зараженных другими осами фитофагов и поражают на ранних стадиях развития особи других перепончатокрылых паразитов. В Австралии встречается гетерономный гиперпаразитоид рода Psyllaephagus, у которого развитие из личинок самок и самцов зависит от выбора хозяина: псиллиды или другого Psyllaephagus. Таксоны отряда Hymenoptera - одни из наименее изученных среди насекомых.

Нами разрабатывалась феноменологическая гибридная модель популяционного процесса, так

как вряд ли возможно описать традиционными методами математической биологии в системе уравнений нетривиальное и недостаточно исследованное взаимодействие мелких видов субмиллиметровых ос-паразитов. Экодинамика тут принципиально отлична от системы «хищник жертва». Так, большая убыль личинок хозяев в завершении вспышки ведет к гибели и личинок их паразитов. В настоящее время для описания вспышечных явлений осваиваются такие перспективные методы искусственного интеллекта, как мультиагентные системы и нечеткие клеточные автоматы [19].

У представителей других отрядов насекомых и в различных климатических зонах случаи массового размножения развиваются с отличительными особенностями. Итерационная модель в форме  $x_{n+1} = f(x_n) - Qx_n$  для бивольтинных насекомых столкнется с проблемой, что в бореальных условиях смежные поколения развиваются в разных условиях. Одно поколение зимующее, другое развивается в комфортных летних условиях, потому о единой зависимости  $\varphi(N(0)), N(0) > L$  говорить нельзя. Интервал онтогенеза  $t \in [0,T]$  у двух смежных поколений бабочек, очевидно, разный, у зимующего поколения почти в два раза больше. Зимуют лесные бабочки чаще на стадии яйца, которая у псиллид коротка.

## ОСОБЕННОСТИ КАНАДСКОГО ПУЛЬСИРУЮЩЕГО СЦЕНАРИЯ ВСПЫШКИ

Рассмотрим иные ситуации вспышек вредителей – двух видов бабочек в бореальных лесах и покажем модель качественного описания подобных явлений. Регуляция эффективности воспроизводства насекомых фитофагов посредством ос гиперпаразитов очень интересная для моделирования, но специфическая ситуация. Такая коллизия у паразитов из подсемейств Encyrtidae частная и актуальна для лесов с относительно постоянными сезонными условиями и богатым видовым разнообразием энтомофауны. Существование хаотического режима со спонтанным пороговым переходом к вспышке не может быть главенствующим сценарием механизма запуска вспышки там, где разнообразие насекомых не столь велико, а сезон вегетации существенно короче.

Вполне логично, что в бореальных лесах Северной Америки действуют некоторые другие механизмы, вызывающие не менее масштабные вспышки у таксономических групп отряда Lepidoptera [20], генерирующих единственное поколение за сезон.

В специфических и важных случаях вспышка численности насекомых выходит за рамки сценария с одиночным пиком на графике динамики поражения лесов и даже не ограничивается одним повторением. В работе [21] вспышки насекомых в Канаде рассмотрены как периодические возмущения лесных экосистем. Отметим, что в энтомологической литературе термин «цикличность» используется гораздо либеральнее, чем в математической, просто для указания повторяемости явлений. Если быть точным, то нужно говорить о квазипериодичности (phase-forgetting quasi-cycle). После долгого состояния при средней численности насекомых, не вызывающей повреждения леса и вполне равновесного с биотическим окружением, вдруг появляется серия очень многочисленных несмежных поколений. В отдельных ситуациях в динамике численности бабочек авторы говорят о «пилообразных осцилляциях» (sawtooth-like oscillations), подчеркивая нерегулярность явления. В состоянии пиков численность много превышает среднемноголетнюю за предшествующую декаду, в очаге гибнет лес и фиксируется локальная вспышка. Расстояния между пиками пульсирующей активности северных моновольтинных бабочек составляют не два месяца, как у эвкалиптовых псиллид в Австралии, а годы.

Характерна длительная осциллятивная динамика, но с разными характеристиками колебательной активности, для опасных вредителей, которые не являются конкурирующими. Несинхронные иррегулярные колебания активности отмечены в работе [22] и наблюдаются у бабочкилистовертки *Choristoneura fumiferana*, поражающей хвойные леса в восточных провинциях Канады и севере США, и особенно у кольчатого коконопряда *Malacosoma disstria*, вредящего лиственным деревьям в этих регионах.

Вспышка оценивается по площадям пораженного леса, учет которых в канадском лесном хозяйства многие десятилетия ведется для каждой провинции. Из сведений на графиках отчетности оказывается, что вспышки вредителей в регионах Северной Америки проходят различным образом. На рис. 3 показаны графики масштабов поражения леса от активности коконопряда в провинциях Онтарио и Квебек, где с математической точки зрения различен характер возникшей колебательной динамики [23].

Для Онтарио видим релаксационный цикл из серии пиков возрастающей амплитуды, который будет устанавливаться после общей формы бифуркации Андронова-Хопфа. Для проблем моделирования более интересен сценарий вспышек в лесах Квебека с затухающими колебаниями, для которого интересно предложить новую модель.

Учет и оценка состояния популяций насекомого во время вспышек бабочек проводится косвенным образом по площади пораженного леса, покраснению и опадению хвои. Для обоснования феноменологической модели смены фаз пульсирующей вспышки достаточно сведений о пораже-

ПЕРЕВАРЮХА

V I Π III IV VI 350 r Площадь дефолиации, тыс. кв. км 300 250 -- Онтарио - Квебек 200 150 100 50 0 1975 1945 1955 1965 1985 1995 2005 Годы

**Рис. 3.** Динамика осцилляционной вспышки коконопряда *Malacosoma disstria* в Онтарио и Квебеке в масштабах гибели леса (согласно работе [23]).

нии леса, но на не менее чем полувековом интервале времени. Вся вспышка с отдельно стоящими пиками колебания, которые демонстрируют тренд затухания амплитуды, может растягиваться на 30 лет. На рис. 4 показано развитие до 1991 г. запущенной в 1955 г. вспышки у листовертки в провинции Нью-Брансуик согласно отчету о состоянии экосистем и тенденций в рамках выполнения Федеральным правительством Канады обязательств Конвенции о биологическом разнообразии [24]. Публикуется отчетная документация на сайте проекта (http://biodivcanada.ca).

Мы видим моментальный стремительный переход к вспышке без околопороговых промежуточных значений. Образуются три отчетливых отстоящих пика, переходящих в состояние, когда численность бабочки больше не оказывает столь разрушительного (или обновительного) воздействия на экосистему. Воздействие исчисляется в миллионах гектаров. Максимальные значения численности тут не являются самостоятельными явлениями вспышек, как в случае Cardiaspina albitextura, но составляют часть долгого колебательного процесса в локальной популяционной динамике насекомых. Оба примера ситуаций вспышки затухают как волны и рябь после броска камня в воду. О том, что представляет собой образный «камень», вызывающий волны, есть несколько гипотез [25]. Сценарий схож с динамикой рецидивирующей инфекции, когда медленно включающийся адаптивный иммунный ответ не способен подавить хронический очаг возбудителя.

Качественный характер особенностей местной вспышки популяции не сохраняется по всему огромному ареалу *Choristoneura fumiferana* в Северной Америке. Выраженная пилообразная составляющая колебаний отмечена и для листовертки и характерна для Восточной Канады, но не для лесов в США [26], там пульсирующая вспышка не начинается, как в провинции Нью-Брансуик, а заканчивается наибольшим пиком, но это уже другой сценарий, требующей своей частной модели. Интересно, что для опасного инвазивного вредителя *Lymantria dispar* в новом ареале штата Висконсин подходит пороговый сценарий вспышки, но в родном европейском — демпфированный осцилляционный [27].

Столь интересное явление привлекало специалистов в области математической биологии. Предлагались модели вспышки с точки зрения формализма теории катастроф [28]. Описание резкого перехода к состоянию вспышки от минимального уровня входит в перечень классических задач прикладного применения концепций теории катастроф (для перехода использовали «Cusp catastrophe» - катастрофу «сборки»). Методы теории катастроф развивались из результатов топологии с основными представлениями «резиновой геометрии» о деформациях и проекциях искривлений трехмерных поверхностей. «Катастрофическое» описание в работе [29] носит наглядный, но качественно геометрический характер, не учитывающий череду фаз процесса и переходные режимы.

# ФОРМЫ ЗАПАЗДЫВАЮЩЕЙ РЕГУЛЯЦИИ В МОДЕЛЯХ ПОПУЛЯЦИЙ

Пилообразную вспышку необходимо рассматривать как отдельный сценарий взрывообразного
развития популяционного процесса. С точки зрения теории динамических систем ситуация не может быть разновидностью рассмотренного ранее порогового варианта модели запуска вспышки из временного хаотического режима. Методы стационарных точек с возможными триггерными воздействиями у дискретных итераций, развитые в предыдущей работе и усовершенствованные нами выше, подчиняются теоремам Шарковского и Гукенхеймера, потому не очень применимы для столь своеобразных перемен в лесах Канады, которые можно назвать самозатухающим релаксационным осциллятором. Необходимо обосновать другой вычислительный аппарат для описания и сравнения вариантов развития сценариев, где основная сложность – необходимость демпфирующихся бифуркационных изменений, соответствующих перемежающимся фазам пиковой активности и депрессии у вредителей в нашей залаче.

Так как ситуация имеет существенно больший временной масштаб развития, чем сжатая до семи-девяти итераций фаза вспышки псиллид, логично воспользоваться для подобной задачи представлениями о запаздывающем действии в регуляции составляющих факторов популяционного процесса (и не только репродуктивного цикла).

Известно из ряда экспериментов, например, из серии опытов Николсона с лабораторной популяцией мухи *Lucilia cuprina* при различном поступлении корма, что колебания с большой амплитудой могут возникать в случае изолированной популяции насекомых в ограниченном пространстве и при постоянных поддерживаемых условиях [30]. Помимо известных моделей популяции (модель Ферхюльста, модель Гомпертца) для монотонного роста численности к асимптотическому состоянию *K* балансового равновесия со средой  $N(t) \rightarrow K$  и с точкой перегиба максимальной скорости роста  $N''(\bar{t}) = 0$  предложены модели для объяснения колебательной динамики в одновидовом случае.

В работе [31] была предложена известная модификация уравнения Ферхюльста с включением запаздывания т для действия плотностной саморегуляции численности:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left( 1 - \frac{N(t-\tau)}{K} \right), \tag{2}$$

где K отражает уровень равновесия со средой для популяции с репродуктивным потенциалом r. Введенное в (2) запаздывание  $\tau$  является агрегированной характеристикой регуляции, зависящей от предшествующих состояний среды, процесса исчерпания/восстановления ресурсов и характеристик онтогенеза. Именно балансовое состояние K как емкость экологической ниши яв-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020



**Рис. 4.** Динамика пилообразной вспышки с затуханием осцилляций у листовертки в Нью-Брансуик в масштабах дефолиации леса (в млн га) из отчета ESTR [24].

ляется ключевым понятием моделей данного типа.

Для совсем малых значений запаздывания  $\tau$  и небольших *r* поведение решения (2) идентично модели Ферхюльста. До значений  $r\tau < \pi/2$  решение продемонстрирует затухающие колебания с  $N(t) \rightarrow K$ . При переходе значения произведения параметров через критическое  $r\tau < \pi/2$  происходит возникновение бифуркации Андронова-Хопфа, т. е. особая точка становится неустойчивым фокусом и от нее отделяется замкнутая траектория — типичное проявление устойчивого предельного цикла траектории [32]. Функциюпредысторию на интервале [ $-\tau$ , 0] тут и далее считаем тождественной единице.

Бифуркацией в современном анализе динамических систем называют любое качественное изменение поведения - метаморфоз фазового портрета. Редукция устойчивой точки или возникновение пары неустойчивых стационарных точек это тоже типы бифуркаций, которые фиксируются в пространстве параметров модели. Не все бифуркации имеют истолкование в биологии популяций. Появление орбитально устойчивой циклической траектории у непрерывной динамической системы - наиболее часто встречающееся и изученное бифуркационное изменение. Исследованию модели (2) посвящена обширная математическая литература, но нас интересуют биологические недостатки уравнения, от которых мы оттолкнемся для построения новых модификаний.

Дальнейшее увеличение параметров при значениях  $r\tau > \pi/2$  вызывает переход в режим колебаний негармонической формы — релаксационных циклов. Быстрое возрастание амплитуды колеба-



Рис. 5. Возникновение релаксационного цикла в уравнении (2).

ний выраженной конической формы при увеличении временного промежутка между максимумами и минимумы, стремящиеся к неотличимым от нуля значениям, приводят такой релаксационный цикл (рис. 5) к затруднениям при обосновании даже динамики насекомых. Минимумы становятся очень долгими и глубокими в ε-окрестности нуля, пики — резкими и разреженными. Подобная популяция в реальности бореальных лесов вымерла бы от случайных возмущений. Более оправдан для этой модели сценарий ошибки переполнения и завершение расчетов после чрезмерной вспышки — вариант гибели популяции после исчерпания ресурсов среды.

Для всех модификаций непрерывной модели Хатчинсона применительно к специфическим экологическим ситуациям актуален вопрос: что отражает и как трактовать действие величины емкости среды K во время такого нестационарного режима, как вспышка численности? Имеет смысл отказаться от априори заданной величины K для случаев, когда нарушаются принципы плотностной регуляции воспроизводства. Известно альтернативное дифференциальное уравнение для возникновения автоколебаний большой амплитуды, обходящееся без явного K-параметра емкости и дважды включающее  $\tau$ :

$$\frac{dN}{dt} = rN(t-\tau)\exp(-bN(t-\tau)) - \delta N(t), \qquad (3)$$

где присутствует экспоненциальная нелинейность. Параметр b отражает давление негативных факторов, зависящих от плотности. Уравнение (3) известно под названием «Nicholson's blowflies differential equation». Считается, что это уравнение лучше согласуется с данными экспериментов австралийского энтомолога Николсона. В лабораторных экспериментах он не наблюдал внешнего давления на популяцию. Колебания возникали из-за конкуренции между различными стадиями у мух за лимитированные пищевые ресурсы. Уравнение (3) аналогично дискретной модели пополнения запасов рыб Рикера:  $R_{n+1} = \Upsilon R_n \exp(-bR_{n-i}) - qR_n$ , где показатель *b* отражает влияние переполнения нерестилищ при высокой плотности, а  $q \in [0,1]$  – доля промыслового изъятия из нерестового запаса. Естественно, что бифуркации у моделей-аналогов в итерационной и в непрерывной форме различны [33]. Исследование поведения уравнения (3) оставляет несколько открытых проблем для математики [34].

### МОДИФИКАЦИЯ УРАВНЕНИЯ ХАТЧИНСОНА

Колебания колебаниям рознь в живых системах и могут быть сложно устроены, например, из быстрых и медленных составляющих, как траектории-утки [35]. Флуктуации с большой амплитудой и высокими пиками для моделирования динамики общей численности популяций не должны проходить окрестность нуля. Пусть действие на регуляцию численности насекомых при колебаниях оказывает некоторая масштабируемая разность между потенциальной емкостью экологической ниши и состоянием популяции в момент  $\phi^t = |t - \tau|$ . Идея с относительным положением емкости ниши и влияющей разностью *K* от  $N(t - \tau)$  ранее использовалась в модели Гополсами–Куленовича [36]:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left( \frac{K - N(t - \tau)}{K + jN(t - \tau)} \right).$$
(4)

Насекомые вредители не просто занимают доступную экологическую нишу, но при вспышке разрушают собственную среду, потому допустима терминальная интерпретация предельной численности в модели — завершение существования.



Рис. 6. Появление незатухающих треугольных осцилляций в модели (5).

Для новой модификации мы неравномерно увеличим степень нелинейности в числителе и знаменателе и предложим уравнение, где дважды включено  $N^k(t-\tau)$ ,  $C \le K$ :

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left( \frac{C - N^2(t - \tau)}{K + \gamma N^3(t - \tau)} \right).$$
(5)

Здесь мы переходим к представлениям об относительности для явной емкости экологической ниши, где K — только нижний возможный предел, ее инфинум. В новом уравнении (5) мы смогли преодолеть недостаток слишком глубоких минимумов у цикла. В вычислительных исследованиях для уравнения (5) после бифуркации Андронова-Хопфа при увеличении *r* получим реализацию несимметричных треугольных осцилляций большой амплитуды не вокруг неустойчивого равновесия как в уравнении (2), но над равновесием (рис. 6).

Основной значимый результат новой модификации (уравнение (5)) — очередной стремительный неконтролируемый рост численности начинается от значения, близкого к существовавшему перед бифуркацией равновесию, оптимального баланса со средой. Колебания получаются частые и с одинаковой амплитудой (впрочем, это можно компенсировать стохастическим возмущением). В реальной динамике локальной вспышки листовертки мы отмечали другую характеристику — самозатухание.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОИЗВОЛЬНО ЗАТУХАЮЩЕЙ ВСПЫШКИ

Поведение модификации модели (4) не закрывает проблемы для интерпретации осциллирующих экстремальных колебаний. Для пилообразной вспышки коконопряда в Канаде отмечено сокращение амплитуды у пиков колебаний. Для любого процесса массового размножения актуален переход в фазу его затухания, резкого или рас-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

тянутого. Модели популяционной динамики для неявного демпфирования вдруг возникших осцилляций не предлагались, рассматривались модели для определения внешнего управляющего воздействия по вынужденному переводу колебательной системы в стационарный режим в [37]. Модификации моделей (3) и (4) обычно были направлены на усложнение функций саморегуляции популяции, например, с введением периодически изменяющихся коэффициентов уравнений, однако независимое внешнее давление может быть выражено сложнее, чем пропорциональное изъятие с  $\delta$  = const.

Для описания специфического развития популяционного процесса более обосновано использование не степенной (как в уравнении (5)), а экспоненциальной нелинейности (как в уравнении (3)) в плотностной регуляции, когда значение понятия «емкость ниши» в условиях вспышек относительно. Предложим модель в предположении об относительно небольшой исходной группе особей вида N(0) > L с большим репродуктивным параметром, способной генерировать в отдельных условиях пилообразную вспышку, где важным будет функционал внешнего биотического сопротивления. Убыль численности от биотических факторов хищничества и паразитизма в реальности представляет нетривиальную зависимость, которая может включать пороговые значения эффективности подавления из-за усиления реакции паразитов на массовую доступную жертву [38]. Чем ближе численность разрушающего среду вредителя к предельному порогу А, тем больше будет возрастать противодействие. Сопротивление биологического окружения агрессивному размножению включается с запаздыванием и зависит от состояния биосистемы в прошлом, причем это запаздывание будет отличным (большим) по значению, чем то, которое используется в функции саморегуляции. Отложенная



**Рис.** 7. Затухающая пилообразная вспышка в модели (6) при изменении параметра r:  $r_1 = 5$ ,  $r_2 = 40$ , N(0) = 650,  $\tau = \tau_1 = 27$ ,  $b = 5 \cdot 10^{-2.7}$ , A = 5900, q = 27, n = 2.

реакция у фактора противоборства вторжению наглядна в аспекте запаздывающего антигенспецифического иммунного ответа на инфекцию.

Используем вместо  $-\delta N(t)$  из уравнения (3) функцию нелинейно-порогового сопротивления среды с запаздыванием в следующей форме ( $n \le 2$ ):

$$\frac{dN}{dt} = rN(t-\tau)\exp(-bN(t-\tau)) - q\frac{N(t-n\tau)}{A-N(t-\tau_1)}.$$
 (6)

Модель (6) демонстрирует переход к медленно затухающим осцилляциям на уровне некоторого не оказывающего давления на среду равновесия, форма колебаний зависит от N(0) и *n*. В вычислительном эксперименте, представленном на рис. 7, мы при резком изменении репродуктивного параметра от  $r_1 = 5$  до  $r_2 = 40$  и  $\tau = \tau_1$ , n = 2 в уравнении (6), что может вызываться аномально благоприятным климатическим фактором, вместо расходящихся колебаний в уравнениях (2) и (3) при обычной бифуркации увидим затухающий релаксационный цикл над равновесием. Итоговое балансовое равновесие с  $r_2$  только сдвинется несколько вверх.

Уменьшение коэффициента *q* демпфирует последующие осцилляции, увеличение *n* удлиняет интервал времени между уменьшающимися пиками. Интересно имитировать временное резкое увеличение *r*-параметра. В эксперименте, представленном на рис. 8, значение параметра с  $r_1 = 6$ мы увеличили до  $r_2 = 46$  и через время, равное t = 100 единиц времени вычислительной среды, вернули значения параметров в исходное состояние. Колебания не затухли моментально, но продолжились, сходясь к прежнему равновесию.

Изменения параметров и следующие за ними бифуркации – обычное математическое объяснение для резких популяционных явлений, но не самое достоверное. Иногда трудно обосновать резкое увеличение репродуктивного потенциала *r*, если вид не инвазионный. Модель (6) отличается тем, что может генерировать переход к непродолжительному интервалу колебаний численности и обратно к равновесию без изменения ее параметров. Для перехода к вспышке достаточно резко вывести популяцию из устоявшегося равновесия, например, сократив численность на 21%, как в имитационном сценарии, представленном на рис. 9.

Таким образом, мы получили реализацию сценария, где переход к масштабным, но затухающим колебаниям зависит не только от резких перемен популяционных характеристик, но и от быстрых перепадов состояния самой популяции. Если исходное значение N(0) приближается к балансовому равновесию, колебательную динамику мы не обнаружим. Для вспышки нужна некоторая группа особей, где минимальны конкурентные факторы саморегуляции, но при этом она больше, чем порог L эффекта Олли. При добавлении линейной убыли, как в уравнении (3), наряду с пороговой запаздывающей функцией мы получим возможность колебаний с неограниченно возрастающей амплитудой и с отрицательными значениями *N*. В модификации на основе уравнения (5) вместо прохождения минимальных значений можно наблюдать полное исчезновение популяции:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(\frac{C - N^2(t - \tau)}{K + \gamma N^3(t - \tau)}\right) - q \frac{N(t - 2\tau)}{A - N(t - \tau)}.$$
 (7)

Вариант (7) более сложен для согласования расчетов. В предложенном непрерывном варианте описания пульсирующей вспышки все трансформации поведения решения уравнения (6)



**Рис. 8.** Временное увеличение параметра *r* в модели (6):  $r_1 = 6$ ,  $r_2 = 46$ , N(0) = 650,  $\tau = \tau_1 = 27$ ,  $b = 5 \cdot 10^{-2.7}$ , A = 5900, q = 37, n = 2.

происходят без явно заданных пороговых состояний траектории и метаморфозов аттракторов. В модели при изменении основных характеристик меняется форма переходного циклического режима, колебания получаются над по-прежнему существующим притягивающим равновесием, а не вокруг потерявшей устойчивость особой точки, как было в уравнении (2). Как в любой нелинейной популяционной модели, в предложенных нами уравнениях (5), (6) или (7) необходимо разграничивать биологически обоснованные параметрические диапазоны интересного для экодинамики поведения траектории. Так, в имитационном эксперименте, представленном на рис. 8, при r > 48,  $\tau > 28$  существование популяции продолжить невозможно, также при N(0) > A,  $N(t) \rightarrow \infty$  вычисления закончатся сообщением

инструментальной среды о недопустимых значениях. Интерпретируемые с точки зрения динамики численности насекомых переходные режимы поведения могут присутствовать в моделях математической биологии вне зависимости от возникновения бифуркаций и существования альтернативных аттракторов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложена непрерывная модель локальной вспышки, развивающейся как серия затухающих пилообразных колебаний, которые характерны для кольчатого коконопряда в лесах Востока Канады. Режим пилообразных колебаний переходный для динамической системы — «transient mode». Для любого переходного режима его



**Рис. 9.** Повторное возникновение осцилляций в модели (6) после индуцированного извне нарушения равновесия:  $N_1(0) = 640, N_2(0) = 666, r = 48$ , равновесие K = 1067.

длительность и выраженность прохождения зависят помимо параметров от начальных условий. В предыдущей модели (1) переходный хаотический режим удачно имитировал действие комплекса случайных внешних факторов на достижение пороговой численности псиллид. Развитие сценария как вспышки произойдет при наличии исходной небольшой (но не околонулевой) группы особей. Моновольтинная популяция в исходном состоянии, близком к существующему балансу со средой, согласно сценарию не имеет потенциала для бурного роста. Рассмотрен в имитационных вычислительных экспериментах как параметрически зависимый сценарий запуска пульсируюшей вспышки, так и обходящийся без параметрических изменений. Достаточно временного, но аномального повышения репродуктивного параметра *r* в уравнении (6) на три сезона, чтобы пилообразные колебания сохранялись достаточно длительное время, как афтершоки после толчка землетрясения. Каждый пик в этом случае не самостоятельная вспышка, но часть процесса. Потом ситуация возвращается к равновесию, где насекомые уже не вызывают дефолиации леса.

Модель основана на учете проявления запаздывания и при регуляции, связанной с зависящей от конкуренции эффективностью воспроизводства и при формировании ответа со стороны биотического окружения. В результате после серии колебаний динамика затухает и переходит в устойчивое равновесие при обычной для среды численности. В уравнении (5), модификации модели (2), после бифуркации Андронова-Хопфа происходит появление устойчивых колебаний, где пик начинается около неустойчивого равновесия.

Спровоцировать следующую серию колебаний с дефолиацией в такой модели могут стремительные изменения состояния насекомых, в пределах четверти численности популяции. Вызвать изменения способны нарушения условий выживаемости при диапаузе или миграция насекомых между соседними областями, связанная, вероятно, с локальным исчерпанием ресурсов леса. Когда популяция насекомых становится еще меньше минимального баланса, то это немедленно негативно отражается на снижении численности паразитов, что нарушает на некоторое время механизмы регуляции. Полученные модели можно использовать в составе систем уравнений явного межвидового противоборства, они вычислительно менее сложны, чем современные модели трофодинамики «хищник-жертва» [39], но обладают качественным разнообразием поведения. Часто повышенная плотность насекомых сопровождается их физиологическими трансформациями и сменой экологической роли [40].

Вспышки автохтонных видов менее разнообразны по аспектам прохождения фаз, чем экстремальные варианты развития инвазионного процесса, потому полученные имитационные сценарии не исчерпывают всю возможную динамику. Особенно интересны различия, если посмотреть на хорошо документированные явления в экосистемах через призму математической теории динамических систем. Например, инвазионный вид после стремительной вспышки может проходить критическое состояние «бутылочного горлышка», с сохранением реликтовой популяции либо полным исчезновением из нового ареала. Полученный в уравнении переходный режим можно рассматривать также для задачи анализа случая специфического развития рецидивирующей инфекции. Интересно дальнейшее расширение уравнений для модельных исследований инвазионных процессов других видов с независимым противодействием, например динамика осциллирующей вспышки вредителей лесов в канадских провинциях Онтарио и Нью-Брансуик качественно схожа с изменениями численности при инвазии Mnemiopsis leidyi в Южном Каспии в 2000-2010 гг. после появления вредоносного гребневика у берегов Ирана [41].

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований (руководитель А.Ю. Переварюха) при частичном финансировании за счет бюджетной темы СПИИРАН АААА-А16-116051250009-8.

### 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. C. Lee and G. Gelembiuk, Evolutionary Applications 1 (3), 427 (2008).
- 2. M. Nilssen, Fisheries Research 82 (1), 319 (2006).
- 3. А. Н. Демидова, Наука и жизнь, № 10, 58 (2017).
- 4. N. Chapman, Ecological Monographs **9** (3), 261 (1939).
- 5. Q. Jin and L. Valsta, Inter. J. Forestry Res. 6 (3), 12 (2015).
- А. Н. Фролов и И. В. Грушевая, Вестн. защиты растений 98 (4), 18 (2018).
- D. Ludwig, D. Jones, and S. Holling, J. Animal Ecol. 47 (1), 315 (1978).
- M. A. Rozendaal and R. K. Kobe, PLoS One 11 (11), 167 (2016).
- 9. А. С. Исаев, В. Г. Суховольский и Р. Г. Хлебопрос, Лесоведение **2**, 3 (2010).

- В. Г. Суховольский, В. И. Пономарев и Г. И. Соколов, Журн. общ. биологии **76** (3), 179 (2015).
- 11. A. Y. Perevaryukha, Biophysics 61 (2), 334 (2016).
- 12. L. R. Clark, Austral. J. Zool. 12 (3), 362 (1964).
- 13. E. P. Odum, *Ecology* (Rinehart & Winston, N.Y., 1963).
- V. A. Trjapitzin and M. G. Volkovitsh, Entomol. Rev. 91 (5), 670 (2011).
- W. C. Allee and E. Bowen, J. Exp. Zool. 61 (2), 185 (1932).
- A. A. Hall, Ecology and evolution of Cardiaspina psyllids, their bacterial endosymbionts and parasitoid wasps (Doctor of Philosophy Thesis) (Western Sydney University, 2016).
- A. A. Hall, S. N. Johnson, and J. M. Cook, Insect Sci. 26 (2), 351 (2019).
- 18. J. Berry, Biosecurity New Zealand 68 (2), 18 (2006).
- 19. H. Myers, Am. Sci. 81 (3), 240 (1993).
- 20. C. Bone and S. Dragicevic, Ecol. Modelling **192** (1–2), 107 (2006).
- B. Cooke, S. V. Neali, and J. Regniere, in *Plant disturbance ecology: the process and the response* (Elsevier, Burlington, 2007), p. 487–525.
- 22. T. Royama, Ecol. Monographs 54 (4), 429 (1984).
- 23. B. J. Cooke, F. Lorenzetti, and G. Roland, J. Entomol. Soc. Ont. **140**, 3 (2009).
- 24. ESTR Secretariat Atlantic Maritime Ecozone evidence for key findings summary (Canadian Biodiversity: Ecosystem Status and Trends, 2010), Report № 3 (Canadian Councils of Resource Ministers, Ottawa, 2014).
- 25. X. Zhang, Ecol. Evol. 4 (12), 2384 (2014).

- R. Louis-Etienne, R. Brian, and J. Cooke, Ecography 41 (9), 1556 (2018).
- 27. T. Hlásny and J. Trombik, J. Pest Sci. 89 (2), 413 (2016).
- 28. C. Loehle, Ecol. Modelling 49 (2), 125 (1989).
- 29. Z. S. Ma and E. J. Bechinski, Entomol. Res. **39** (3), 175 (2009).
- 30. D. R. Brillinger, J. Time Series Analysis **33** (5), 718 (2012).
- 31. G. Hutchinson, Ann. N. Y. Acad. Sci. 50 (4), 221 (1948).
- Б. Хэссард, Н. Казаринов и И. Вэн, Теория и приложения бифуркации рождения цикла (Мир, М., 1985).
- Г. К. Каменев, Д. А. Саранча и В. О. Поляновский, Биофизика 63 (4), 758 (2018).
- 34. Т. Л. Сабатулина, Изв. вузов. Математика **47** (11), 50 (2010).
- 35. Е. В. Трошкина, Вестн. СамГУ. Естественнонаучн. сер. **9** (2) 215 (2013).
- 36. K. Gopalsamy, M. Kulenovic, and G. Ladas, Applicable Analysis **31** (3), 225 (1988).
- Г. Е. Колосов и М. М. Шаров, Автоматика и телемеханика 53 (6), 146 (1992).
- J. Grieshop, W. Flinn, and R. Nechols, J. Insect Sci. 10 (1), 99 (2010).
- А. В. Епифанов и В. Г. Цибулин, Биофизика 61 (4), 823 (2016).
- 40. В. Г. Суховольский, Биофизика 48 (2), 337 (2003).
- 41. A. Roohi and Z. Yasin, Marine Ecology **29** (4), 421 (2008).

# A Continuous Model for Oscillating Outbreak Population of the Phytophagous Moth, Tent Caterpillar, *Malacosoma disstria* (Lepidoptera, Lasiocampidae)

### A.Yu. Perevaryukha

St. Petersburg Institute for Informatics and Automation, Russian Academy of Sciences, 14-ya Linia 39, St. Petersburg, 199178 Russia

Outbreaks of individual species population are important phenomena in many aspects and not alike in terms of a theory of multispecies community dynamics. Outbreaks of insect population develop more quickly with long-lasting effects experienced by the forest industry. These events are considered extreme unbalanced and transient processes. The mechanisms of the development and subsidence of insect outbreaks differ in different taxonomic groups of pests. The duration and occurrence of repeated outbreaks of psyllids and forest moths, affecting deciduous or coniferous forests in the same region, are different. Computational simulation is needed for understanding the dynamics of insect outbreaks. For the mathematical description of the outbreaks of forest tent caterpillar, in addition to the threshold version of the development of the insect outbreak, it is interesting to modify the continuous computational models for the analysis of fluctuation dynamics. In this paper, we simulate dynamics of spontaneously damped oscillations under specific scenario during population outbreak using a continuous model with delayed regulation and nonlinear counteraction from the biotic environment. The scenario described by the new phenomenological equation, which consists of a series of different-sized maxima and with a final attenuation of peaks near balance, is realized for the pest tent caterpillar, Malacosoma disstria, which affects deciduous forests in North America leading to large-scale defoliation. The new scenario is qualitatively different from our model of the threshold development and subsidence of outbreaks of the psyllid, Cardiaspina albitextura, in Australia.

Keywords: extreme ecosystem dynamics, insect outbreaks, damped population fluctuations, models of oscillatory dynamics of populations, equations with delay, bifurcations, forest tent caterpillar Malacosoma disstria, forest defoliation

# **—— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —**

УДК 57.034:591.147.1:591.169.1:57.045

# ДИНАМИКА СМЕНЫ ПЕРВОСТЕПЕННОГО МАХОВОГО ОПЕРЕНИЯ У ВОРОБЬИНЫХ ПТИЦ, ВОЗМОЖНЫЕ ФАКТОРЫ СИНХРОНИЗАЦИИ

© 2020 г. М.Е. Диатроптов\*, В.А. Панчелюга\*\*, А.А. Станкевич\*\*

\*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33 \*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

*E-mail: panvic333@list.ru* Поступила в редакцию 08.11.2019 г. После доработки 08.11.2019 г. Принята к публикации 27.11.2019 г.

Проведено исследование динамики смены первостепенных маховых перьев у нескольких видов воробьиных птиц в естественных условиях и в лабораторных при содержании на разных фотопериодах, а также при раннем начале послебрачной линьки, вызванном переводом птиц зимой на пятнадцатичасовой эффективный для роста гонад фотопериод. За пять лет наблюдений во все исследуемые периоды в динамике начала роста новых маховых перьев для группы птиц в целом установлен околотрехсуточный биоритм. При режимах освещения свет : темнота, составляющих (в часах) 20 : 4, 17 : 7, 14 : 10 и 12 : 12, временные интервалы между сменой смежных первостепенных маховых перьев кратны трем суткам. При сопоставлении фазы трехсуточного биоритма с динамикой внешних атмосферных и гелиогеофизических процессов установлена наиболее значимая ее связь с экстремумами изменения скорости вращения Земли вокруг своей оси. Таким образом, внешние факторы, на которые влияют экстремальные значения изменения скорости вращения Земли, могут быть синхронизаторами исследуемого биоритма.

*Ключевые слова: инфрадианные биоритмы, синхронизаторы, линька, гормоны.* **DOI:** 10.31857/S0006302920010172

В настоящее время изучение временной организации биологических систем остается актуальной медико-биологической проблемой. По сравнению с суточными и сезонными, биологические ритмы в инфрадианном диапазоне (более 28 ч) и механизмы их синхронизации внутри одного организма и между разными особями недостаточно изучены.

По мнению ряда исследователей фактором, синхронизирующим инфрадианные биоритмы, являются вариации естественных низкочастотных электромагнитных полей, сопровождающие гелиогеофизические процессы [1]. В пользу этого утверждения приводятся факты совпадения околонедельной и околомесячной периодики физиологических показателей и индексов геомагнитной активности. Установлена связь среднесуточных значений  $B_z$ -компоненты межпланетного магнитного поля (ММП) с ежесуточным количеством вызовов скорой помощи по поводу инфаркта миокарда [2]. Выявлена реакция эпифиза к слабым переменным электромагнитным полям. Так, при экспериментальном воздействии электромагнитного поля частотой 50 Гц и магнитной индукцией 100 мкТл у самцов крыс Вистар снижается продукция мелатонина в эпифизе и уровень этого гормона в сыворотке крови [3]. При естественных геомагнитных бурях, сопровождающихся изменением магнитной индукции в 100— 200 нТл, также наблюдается снижение уровня мелатонина как у животных, так и у человека [4, 5].

Для выявления закономерностей инфрадианных биоритмов может быть использована оценка ритмичности процесса линьки у птиц. Замена первостепенных маховых перьев у воробьиных птиц происходит последовательно — от десятого, самого внутреннего, к первому, дистальному перу. Согласованность моментов начала роста новых маховых перьев в пределах одного крыла, а также синхронизация роста соответствующих маховых перьев на обоих крыльях во время линьки необходима для сохранения способности птицы к слаженному полету, что имеет важное значение для выживания птицы в естественной среде обитания [6].

Сокращение: ММП – межпланетное магнитное поле.

У скворцов, находящихся в процессе линьки, была установлена связь околотрехсуточной ритмичности выпадения первостепенных маховых перьев с динамикой концентрации тироксина в сыворотке крови [7]. Известно, что для обеспечения достаточного для синтеза нового оперения уровня метаболизма у птиц в период линьки в крови значительно повышается концентрация гормонов щитовидной железы [8]. Индивидуальное изучение динамики смены оперения показало, что между началом роста смежных первостепенных перьев проходило, в зависимости от интенсивности линьки, определяющейся в основном фотопериодом, либо шесть либо девять суток. При этом начало роста нового пера приходилось на акрофазу (момент времени в цикле, в котором наблюдается максимум показателя) трехсуточного ритма концентрации тироксина. Однако нельзя исключить возможные влияния на периодичность смены оперения и других ритмически изменяющихся факторов внутренней среды организма. Так, глюкокортикоидные гормоны, в отличие от тиреоидных, напротив угнетают пролиферацию эпителиальных клеток и рост пеpa [9, 10].

Работы, посвященные исследованию инфрадианных биоритмов концентрации гормона щитовидной железы, немногочисленны. Так, в исследовании на крысах показана ритмичность процессов метаболизма алкоголя с периодом 6 сут, которая обусловлена уровнем тироксина [11]. Нами был установлен околотрехсуточный биоритм концентрации гормонов щитовидной железы, достоверно выявляющийся в период интенсивного роста у самцов крыс Вистар и кроликов породы «Шиншилла» и в период линьки у обыкновенных скворцов (Sturnus vulgaris) [12]. Одновременное исследование динамики тиреоидных гормонов у перечисленных видов животных с учетом формы их суточной активности выявило синфазное проявление околотрехсуточного биоритма, что указывает на существование внешнего синхронизатора. Было установлено, что максимальный уровень гормонов щитовидной железы совпадал с экстремумами ежесуточного изменения скорости вращения Земли вокруг своей оси, что указывает на возможную роль этого фактора в синхронизации биоритма. Однако это исследование было кратковременным и выполнено на данных мониторинга в течение нескольких месяцев одного года.

Таким образом, целью исследования было установить возможные внешние синхронизаторы околотрехсуточного биоритма смены оперения у воробьиных птиц на основе продолжительных исследований, проведенных в разные годы.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование динамики линьки проводили в течение пяти лет (с 2013 по 2017 гг.).

В 2013 г. изучали влияние продолжительности светового дня на динамику смены оперения в процессе послебрачной линьки у самцов обыкновенной зеленушки (Chloris chloris) (19 особей), отловленных 22.06.2013 г. – 24.06.2013 г., и 12 первогодков полевого воробья (Passer montanus), взятых 25.06.2013 г. – 26.06.2013 г. из четырех разных гнезд второй кладки. Зеленушек содержали в отдельных клетках ( $40 \times 30 \times 30$  см). Были сформированны четыре экспериментальные группы с разными режимами свет : темнота (в часах): 12:12, 14:10, 17:7, 20:4. Полевых воробьев содержали группой по четыре особи в клетке  $(60 \times 60 \times 60 \text{ см})$  при различных режимах освещения (свет : темнота, в часах): 12 : 12, 14 : 10, 17 : 7. Птиц разных экспериментальных групп содержали в отдельных помещениях, но акустический канал связи между особями сохранялся.

Летом в течение 2014-2016 гг. проводили исследование динамики смены оперения у зеленушек, живущих в природе. В июне 2015-2016 гг. регистрировали динамику начала роста перьев у обыкновенных поползней (Sitta europaea). Отлов птиц проводили утром на прикормке. Датой начала роста пера считали момент появления пигментации и набухания в области перьевого зачатка, что наблюдается у воробьиных птиц за трое суток до выпадения старого первостепенного махового пера. Момент начала роста пера у пойманных птиц определяли после измерения длины трубочки нового пера, исходя из того, что выпадение махового пера наблюдается при достижении новым середины глубины перьевой сумки, после чего суточный прирост перьевой трубочки постоянен в течение последующих шести-восьми суток.

Данные по началу роста первостепенных маховых перьев за период с марта по май 2015 г. были получены от самцов зеленушек (n = 9) и щеглов Carduelis carduelis (n = 10), предварительно отловленных в природе, которые 3 января 2015 г. были переведены на пятнадцатичасовой искусственный световой режим, эффективный для развития гонад. Благодаря более раннему достижению готовности к размножению такие птицы также раньше положенного срока начинают послебрачную линьку [13]. На следующий год исследование было проведено на 22 самцах зеленушек, переведенных на пятнадцатичасовой фотопериод 22, 25, 26 и 28 декабря 2015 г. соответственно, в разной фазе двенадцатисуточного инфрадианного биоритма. Динамику начала роста первостепенных маховых перьев весной 2017 г. исследовали у самцов зеленушек (n = 24), переведенных на пятнадцатичасовой фотопериод

22, 23 и 24 декабря 2016 г. (по восемь особей в день) соответственно в разные фазы трехсуточно-го биоритма.

Всех задействованных в эксперименте птиц содержали в условиях искусственного освещения интенсивностью около 1000 лк на уровне жердочек от источника с цветовой температурой 4200 К. Во всех схемах автоматического включения и выключения света середина темнового периода приходилась на полночь.

Выпадение первостепенных маховых перьев у птиц в неволе регистрировали ежедневно в конце светового периода. У особей, проявляющих высокую двигательную активность, старые перья, не задерживаясь, выпадали сразу после достижения нового перьевого зачатка длины 3–4 мм (середина глубины перьевой сумки). У малоподвижных особей, в основном полевых воробьев, старое перо иногда не выпадало дольше, поэтому для более точного определения момента начала роста нового пера птиц брали в руки и измеряли длину растущих перьевых трубочек.

Нужно учитывать, что изменение тренда показателя количества перьев, начавших рост в определенную календарную дату, при регистрации в лабораторных условиях определяется числом птиц, вступивших в линьку. При регистрации в природе от одной пойманной птицы полученные даты начала роста новых перьев распределяются на восемь-девять предыдущих дней, так как оценка начала роста пера осуществляется ретроспективно, по длине трубочки нового пера. Таким образом, число птиц, пойманных в один день, не определяет увеличение исследуемого показателя в какой-либо определенный день, а распределяется равновероятно на окно в восемь-девять дней и определяет только увеличение тренда динамики количества перьев, начавших рост за предыдущую декаду. В 2014 г. и 2016 г. поимку птиц осуществляли более или менее равномерно, а в 2015 г. – сериями, что не привело к какому-либо изменению трехсуточной динамики исследуемого показателя, как будет описано в подразделе «Динамика смены первостепенных маховых перьев у разных видов воробьиных птиц».

Динамику двигательной активности регистрировали у находившихся в одной клетке трех самцов зеленушек и индивидуально содержавшегося в отдельном помещении самца поползня с помощью разработанной К.Л. Кравченко с соавторами системы [14], состоящей из камеры, персонального компьютера и программы анализа последовательных изображений на долю пикселей, изменивших свою интенсивность в интервале 10 с в выделенной области регистрации движения. Показатели суммарной суточной двигательной активности были получены путем суммации условных единиц двигательной активности за каждые 10 с.

Данные о смене знака среднего магнитного поля Солнца, определяемого как суммарный магнитный поток с диска Солнца, и смены секторов межпланетного магнитного поля брали с сайта Wilcox Solar Observatory (http://wso.stanford.edu). Ежесуточные данные об атмосферном давлении и о среднесуточной температуре воздуха были взяты из базы данных Всемирной метеорологической организации (WMO) (http://www.wmo.int). Показатели скорости вращения Земли вокруг своей оси даны на сайте Международной службы вращения Земли (http://www.iers.org). Значения *B*<sub>z</sub>-компоненты ММП и *A*<sub>p</sub>-индекса геомагнитной активности взяты с сайтов https://omniweb. gsfc.nasa.gov/ow.html и ftp://ftp.gfz-potsdam.de/ pub/home/obs/kp-ap/wdc cootветственно.

Для выявления связи ритмичности смены оперения с динамикой факторов внешней среды проводили их спектральный анализ, а также строили распределение числа случаев начала роста перьев относительно экстремума физического параметра, так как внешний синхронизатор биоритмов не обязательно должен строго коррелировать с динамикой биологического параметра, достаточно лишь совпадение его экстремальных значений с определенной фазой биоритма. Нужно отметить, что скорость вращения Земли вокруг своей оси очень хорошо прогнозируется (http://www.iers.org), а реально измеренные значения иногда имеют «случайные» выбросы. Поэтому анализ проводили как относительно прогнозных дат экстремума изменения скорости вращения Земли, так и относительно реально зарегистрированных. В случае если два смежных дня имели одинаковые пиковые значения изменения скорости вращения Земли, экстремумом считали первый из них. Вероятность неслучайного совпадения экстремумов изменений скорости вращения Земли с максимумами динамики количества перьев, начавших рост, оценивали по z-тесту для оценки двух выборочных долей.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика смены первостепенных маховых перьев у разных видов воробьиных птиц. На рис. 1 представлены календарные даты начала роста первостепенных маховых перьев в процессе линьки у разных видов птиц.

На рис. 2 приведена гистограмма, построенная на основе представленных на рис. 1 данных и дающая представление о распределении амплитуд флуктуаций числа случаев начала роста пера, определяемых как  $\Delta_i = |x_{i+1} - x_i|$ , где  $x_i - i$ -е значение временного ряда.



БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020



**Рис. 1.** Календарные даты начала роста первостепенных маховых перьев в процессе линьки у птиц разных видов. По оси абсцисс – календарная дата, по оси ординат – число случаев начала роста пера. (а) – Зеленушки и полевые воробьи в неволе, 2013; (б) – зеленушки в природе, 2014; (в) – зеленушки и щеглы в неволе, 2015; (г) – поползни в июне и зеленушки в июле-августе в природе, 2015; (д) – зеленушки в неволе, 2016; (е) – поползни в июне и зеленушки в июле в природе, 2015; (ж) – зеленушки в неволе, 2017.

Полученная зависимость хорошо аппроксимируется степенной функцией вида

$$N(x) = 243.2x^{-1.69},\tag{1}$$

где x — амплитуда флуктуаций. Данная аппроксимирующая кривая на рис. 2 обозначена как N(x). Там же для сравнения дана кривая, соответствующая распределению Пуассона с параметром, равным 1.3, которая наиболее близка к исходному распределению.

Для нахождения спектра динамики количества начал роста первостепенных маховых перьев для каждого из временных массивов (рис. la—ж) на основе быстрого преобразования Фурье были рассчитаны индивидуальные спектры, которые после этого почленно суммировали, в результате был получен суммарный спектр, представленный на рис. 3.

Координаты пика спектра, представленного на рис. 3, равны 3.06 суток. Основываясь на том, что частотное разрешение по периоду примерно равно величине, обратной временному интервалу, на котором получены отсчеты сигнала и равному 40–60 суток, мы можем получить оценку точности определения представленного на рис. 1 периода как  $3.06 \pm 0.1$  суток.

Динамика смены оперения у группы зеленушек и воробьев, содержавшихся в разных помещениях, представлена на рис. 4. Для определения синхронности представленных на рис. 4 кривых использовали функцию

$$S(x_i, y_i | i = 1...N) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} \operatorname{sgn}\left\{ (x_{i+1} - x_i)(y_{i+1} - y_i) \right\},$$
(2)

Данная функция в общем случае позволяет оценить степень сонаправленности двух кривых, а в случае, если *x<sub>i</sub>* и *y<sub>i</sub>* являются функциями времени, — синхронность изменений их динамики. В

$$\operatorname{sgn}(z) = \begin{cases} 1, z \ge 0\\ 0, z < 0 \end{cases}$$
(3)

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

где



**Рис. 2.** Суммарное распределение амплитуд флуктуаций, построенное на основе временных рядов, представленных на рис. 1. По оси абсцисс даны значения величин амплитуд флуктуаций, определяемых как  $\Delta_i = |x_{i+1} - x_i|$ , где  $x_i - i$ -е значение временного ряда; по оси ординат – число случаев встречаемости данного значения амплитуды флуктуаций ( $\Delta_i$ ).

случае полной синхронности хода двух кривых S = 1. В случае полной асинхронности S = 0. Очевидно, что для реальных кривых полная синхронность и полная асинхронность реализуются достаточно редко. Для рассматриваемых нами кривых, показанных на рис. 4, S = 0.9, что говорит об очень высокой степени их синхронности. Таким образом, околотрехсуточный ритм, наблюдающийся в процессе смены первостепенных маховых перьев, у разных видов синхронен.

Известно, что темп смены оперения при линьке зависит от длины светового дня: чем короче фотопериод, тем интенсивней обновляется перьевой покров птицы. Этот феномен объясняется работой приспособительного механизма фотопериодического контроля смены оперения у птицы, благодаря которому обеспечивается подстройка сроков окончания линьки до наступления осенних неблагоприятных условий [15]. В нашем исследовании у птиц, содержавшихся на длинном фотопериоде (освещение 20 ч в сутки), медиана временного интервала между сменой смежных первостепенных маховых перьев составила 15 суток, а у особей, содержавшихся при 14- и 17-часовом фотопериоде — 9 суток, тогда как при 12-часовом фотопериоде — 6 суток (рис. 5). Все эти временные интервалы кратны трем суткам, что указывает на общность регуляции ритма смены оперения в широком диапазоне фотопериодов, вероятно, связанной с трехсуточным биоритмом



Рис. 3. Суммарный спектр, полученный суммированием индивидуальных спектров, построенных на основе временных рядов, представленных на рис. 1.



**Рис. 4.** Динамика смены первостепенных маховых перьев у группы зеленушек и воробьев, содержавшихся в разных помещениях, в период с 10 июля по 21 августа 2013 г. По оси абсцисс – календарная дата, по оси ординат – число перьев начавших рост.

изменения концентрации гормонов щитовидной железы.

Однако нужно отметить, что после резкого сокращения светового дня (перевод птиц с постоянного освещения на 12-часовой фотопериод и с 17-часового на 8-часовой режим освещения) между сменой смежных первостепенных маховых перьев проходило либо 1.5–2, либо 4–4.5 суток. Полагаем, что этот факт поможет более глубоко разобраться в механизмах формирования и синхронизации инфрадианных биоритмов смены оперения и концентрации гормонов щитовидной железы. Таким образом, установленный нами факт синхронного проявления околотрехсуточного ритма смены оперения у двух видов птиц и наблюдающаяся при разной интенсивности линьки кратность интервала между сменой последовательных первостепенных маховых перьев трем суткам могут указывать на существование у птиц очень точно поддерживаемого эндогенного ритма, который синхронизируется внутри популяции посредством взаимодействия отдельных особей между собой и даже между разными видами. Однако исследованные виды птиц отличаются по образу жизни, кормовой базе, а также срокам и продолжительности периода размножения, поэтому трудно предположить возможную целесо-



**Рис. 5.** Продолжительность временных интервалов между сменой смежных первостепенных маховых перьев при содержании птиц в условиях разного фотопериода. По оси абсцисс – продолжительность интервала (в сутках), по оси ординат – количество случаев.

образность синхронизации эндогенного ритма между этими видами. Более того, нами был показан синфазный характер околотрехсуточного ритма концентрации гормонов щитовидной железы у кроликов и скворцов [12]. Эволюционно класс млекопитающих разошелся с классом птиц 310 млн лет назад [16], поэтому крайне маловероятно, что синфазность этого ритма у кроликов и скворцов сохранилась только на основе эндогенных механизмов. С большой степенью вероятности можно утверждать, что существуют один или несколько внешних синхронизаторов этого биоритма. В настоящей работе мы предприняли попытку установить эти внешние синхронизаторы.

Связь фазы околотрехсуточного биоритма смены оперения с экстремумами скорости вращения Земли и сменой знака межпланетного магнитного поля. Для всех серий наблюдений, среди рассмотренных внешних факторов, нами установлена связь моментов начала роста первостепенных маховых перьев с расчетными прогнозируемыми экстремумами изменения скорости вращения Земли вокруг своей оси (рис. 6а). Представленные на данном рисунке графики получены путем распределения методом наложенных эпох количества случаев начала роста новых перьев относительно прогнозируемых дат экстремумов изменения скорости вращения Земли.

Максимальное количество зарегистрированных моментов начала роста первостепенных перьев наблюдается за трое суток, в момент и через трое суток относительно прогнозируемого экстремума изменения скорости вращения Земли вокруг своей оси. На рис. 6б (кривая 2) приведен график, полученный суммированием кривых, представленных на рис. 6а. Так, в нулевой день получено 219 случаев начала роста новых перьев, а в среднем на каждый день полученного распределения приходится 129 событий. Так как при подсчете суммировали данные и по отловленным в природе птицам, мы представляем распределение числа отловленных птиц относительно дат экстремума изменения скорости вращения Земли (рис. 6в).

Также мы выполнили распределение методом наложенных эпох количества случаев начала роста новых перьев относительно реальных дат экстремумов изменения скорости вращения Земли (рис. 6б, кривая *I*). Можно заметить, что численные различия между максимумами и минимумами сократились, но характер распределения сохранился: на нулевой день приходится 205 случаев начала роста новых перьев, а в среднем на каждый день полученного распределения приходится 150 событий.

Мы выполнили оценку вероятности совпадения экстремумов изменения скорости вращения Земли с максимумами динамики количества начавших рост перьев, имеющей околотрехсуточный ритм. Методом наложенных эпох выполнено распределение максимумов динамики числа начавших рост перьев относительно экстремума изменения скорости вращения Земли. Оказалось, что за сутки до прогнозного экстремума изменения скорости вращения Земли зарегистрировано 11 максимумов, в день экстремума – 35 максимумов, а через сутки после дня экстремума – 8 максимумов динамики числа начавших рост перьев. Таким образом, совпадения прогнозируемых экстремумов изменений скорости вращения Земли с максимумами динамики количества начавших рост перьев зарегистрированы в 35 случаях (65%) при средней вероятности совпадения 33%; по *z*-тесту для оценки двух выборочных долей, эти доли статистически значимо различаются между собой с p = 0.002. Совпадения реально измеренных экстремумов скорости вращения Земли с максимумами в динамике количества начавших роста перьев отмечены в 55% случаев. По *z*-тесту для оценки долей эта доля статистически значимо отличается от средней с p = 0.03. Таким образом, нами установлены совпадения максимумов в динамике числа перьев, начавших рост, как с прогнозными, так и с реальными экстремумами изменения скорости вращения Земли вокруг своей оси, однако для прогнозных эта закономерность более выражена и имеет большую степень достоверности.

Также для всех серий наблюдений с использованием метода наложенных эпох установлена связь моментов начала роста нового пера с моментами смены знака с минуса на плюс среднего магнитного поля Солнца (рис. 7а). Максимальное число случаев начала роста новых перьев, равное 98 случаям, отмечено через сутки после смены знака этого физического параметра (рис. 7б, кривая *I*) при среднем уровне в 61 случай и общем количестве случаев 606.

Аналогичная связь динамики начала роста первостепенных маховых перьев выявлена с моментами смены границ секторной структуры ММП с минуса на плюс (рис. 76, кривая 2). Так, максимальное число случаев начала роста перьев (53 случая) отмечено через сутки после смены знака ММП с минуса на плюс при среднем уровне 33 случая в сутки и общем количестве случаев, равном 333.

Тем не менее использование методики, которая привела к результатам, представленным на рис. 6 и 7, для исследования околотрехсуточной ритмичности в динамике атмосферного давления, температуры воздуха,  $A_p$ -индекса геомагнитной активности и  $B_z$ -компоненты ММП не выявило связи моментов начала роста первостепенных маховых перьев с перечисленными параметрами.



**Рис. 6.** Распределение методом наложенных эпох количества случаев начала роста первостепенных маховых перьев относительно прогнозных дат экстремума изменения скорости вращения Земли вокруг своей оси в разные годы (а), суммарно за 2013 – 2017 гг. (б, кривая 2) и числа отловленных птиц (в), а также количества случаев начала роста первостепенных маховых перьев относительно реальных дат экстремума изменения скорости вращения Земли б, кривая 1). По оси абсцисс – сдвиг (в сутках) относительно экстремума изменения скорости вращения Земли бо, кривая 1). По оси оси ординат: (а) и (б) – число случаев зарегистрированных моментов начала роста пера, (в) – число отловленных птиц. Указаны стандартные ошибки.



**Рис.** 7. Распределение методом наложенных эпох количества случаев начала роста первостепенных маховых перьев относительно даты смены знака среднего магнитного поля Солнца с минуса на плюс за разные годы (а), суммарно за 2013 – 2017 гг. (б, кривая *I*) и относительно даты смены границы секторной структуры ММП с минуса на плюс (б, кривая *2*). По оси абсцисс – сдвиг (в сутках) относительно даты смены знака; по оси ординат – число случаев зарегистрированных моментов начала роста пера. Указаны стандартные ошибки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами установлено, что динамика смены первостепенных маховых перьев у особей разных видов как в природных условиях, так и содержавшихся в широком диапазоне фотопериодов (от 20 до 12 часов) имеет период, равный  $3.06 \pm 0.1$  суток. Применение метода наложенных эпох позволило выявить связь околотрехсуточного биоритма смены первостепенных маховых перьев с экстремумами скорости вращения Земли вокруг своей оси и с изменением знака с минуса на плюс среднего магнитного поля.

Нужно отметить, что экстремумы изменения скорости вращения Земли наблюдаются примерно каждые пять-девять суток, тогда как смена знака ММП с минуса на плюс происходит реже, один-два раза в месяц. Таким образом, более вероятно, что синхронизатором этого биоритма является физический фактор, тесно связанный с изменением скорости вращения Земли вокруг своей оси.

Ранее установлена система 12.175- и 4.058-суточных биоритмов митотической активности эпителия пищевода и концентрации глюкокортикоидных гормонов и связанной с ней локомоторной активности у млекопитающих и птиц [17, 18]. Также 12.175- и 4.058-суточная периодичность установлена в ряде гелиогеофизических и погодных факторов [19]. С целью установления общности природы синхронизатора инфрадианных ритмов представляется важным сопоставить фазы 4.058-суточных и околотрехсуточных биоритмов.

Исследование взаимосвязи этих инфрадианных биоритмов проводили с 26 февраля по 30 ап-



**Рис. 8.** Динамика суммарной суточной двигательной активности самца поползня и трех самцов зеленушек. По оси абсцисс – календарные даты; по оси ординат – двигательная активность, усл. ед.

реля 2017 г. Фазу околочетырехсуточных биоритмов определяли по динамике интенсивности суточной двигательной активности птиц. Подходящими объектами оказались содержащийся в индивидуальной клетке самец поползня и три совместно живущих самца зеленушки. Вероятно, у зеленушек социальные контакты с проявлением доминирующего поведения одних особей над другими благоприятствуют проявлению околочетырехсуточной ритмичности суммарной двигательной активности. Динамики интенсивности суточной двигательной активности у группы зеленушек и одного поползня, содержавшихся в разных помещениях, имели четырехсуточную периодичность, синхронную между собой – коэффициент сонаправленности равен S = 0.7(рис. 8). Максимумы активности отмечались 1-2, 5-6, 10, 15, 19, 23, 26-28 и 31 марта, 4, 8, 11-12, 16, 20, 25 и 28 апреля 2017 г. В период 14-15 марта наблюдалось смещение акрофазы околочетырехсуточного биоритма на сутки вперед, а с 19 марта по 30 апреля четырехсуточный ритм двигательной активности сохранял свою фазу. При этом параллельно регистрируемый у группы зеленушек (n = 24) околотрехсуточный биоритм смены первостепенных маховых перьев (рис. 1ж) в период с 26 февраля по 13 апреля, напротив, не изменял своей фазы. Таким образом, фазовая взаимосвязь околотрехсуточного и околочетырехсуточного ритмов отсутствует, что указывает на разную природу синхронизаторов инфрадианных ритмов двигательной активности и смены оперения. Аналогичный вывод был получен при исследовании взаимосвязи инфрадианных биоритмов глюкокортикоидных и тиреоидных гормонов у кроликов [12].

Следует отметить, что при раздельном содержании в индивидуальных клетках после помещения на эффективный для развития гонад 15-часовой фотопериод молодые тусклоокрашенные самцы зеленушек начали линять через 77-83 суток, средние через 89-93 суток, а яркие доминантные особи – через 101-102 суток. Однако при содержании по три особи в клетке наиболее супрессированные особи начали линьку через 65-68 суток, средние через 78-80 суток, а доминантные – через 89–93 суток, что в среднем на 12 суток раньше соответственных сроков для птиц, содержавшихся в индивидуальных клетках [20]. Таким образом, в разности индивидуальных продолжительностей репродуктивного периода четко прослеживается кратность 12 суткам. Вероятно, данный факт указывает на то, что отсчет продолжительности репродуктивного периода в организме птиц осуществляется 12-суточными временными интервалами, механизм которого пока неизвестен.

В рамках настоящего исследования прямая связь между ежесуточным изменением скорости вращения Земли и количеством первостепенных перьев, начавших рост, отсутствует. Связь этих показателей определяется через совпадение экстремумов изменения скорости вращения Земли с отдельными акрофазами околотрехсуточного биоритма смены оперения. На графике распределения количества перьев, начавших рост относительно экстремума изменения скорости вращения Земли (рис. 6), максимальное значение отмечается не только в данный день, но и за трое суток до и после этого события, что указывает именно на явление синхронизации околотрехсуточного биоритма этим внешним фактором, а не на прямую зависимость количества перьев, начавших

рост от изменения скорости вращения Земли. Подобно тому, как циркадианная система биоритмов синхронизуется режимом смены дня и ночи, околотрехсуточные биоритмы синхронизированы внешним фактором, сопряженным с изменением скорости вращения Земли вокруг своей оси.

Как отмечалось выше, в качестве основного ритмозалаюшего периода мы рассматриваем околотрехсуточный ритм. Обнаружение связи данного периода с экстремумами флуктуаций скорости врашения Земли ставит задачу рассмотрения спектра периодов таких флуктуаций для анализируемого в настоящей работе инфрадианного диапазона. Эта задача была изучена в работе [21], где было показано сушествование набора периодов 9.1, 13.7 и 27.3 суток. Первые два из них можно рассматривать, как третьмесячную и полумесячную гармоники периода 27.3 суток. Найденный нами период, как легко видеть, в пределах точности близок к девятой гармонике периода 27.3 суток, составляющей 3.03 суток. В то же время в исследованных нами спектрах периоды 9.1 и 13.7 суток как правило отсутствуют. Изредка встречаются близкие к ним периоды, но их амплитуда как минимум на порядок меньше периода  $3.06 \pm 0.1$  суток.

Несмотря на то что околотрехсуточный период хорошо вписывается в рассматриваемый спектр, предположение о прямом воздействии лунно-солнечных приливных сил, обуславливающих неравномерное вращение Земли и ответственных за появление рассматриваемого спектра периодов, кажется маловероятным в силу их чрезвычайной малости. Рассмотрим возможный механизм опосредованного действия околотрехсуточного периода на биосистемы.

Как отмечается в работе [22], неравномерность скорости вращения Земли является механизмом, который поддерживает и служит энергетической «подпиткой» собственных колебаний Земли. В свою очередь, как показано в ряде работ [23–28], собственные колебания Земли модулируют практически все параметры биосферы: микрофлуктуации электрического и магнитного полей Земли, атмосферного давления, уровня грунтовых вод и т.д. Спектры периодов, совпадающие со спектральными составляющими спектра собственных колебаний Земли, найдены во временных рядах флуктуаций скорости α-распада [29], шумов в электронных приборах [30]. Частоты, принадлежащие спектру собственных колебаний Земли, обнаружены также при исследованиях различных биологических систем [31].

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что предполагаемый механизм проявления рассматриваемого околотрехсуточного периода, связан с периодическим влиянием неравномерно-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

стей в скорости вращения Земли на амплитуды спектральных компонент ее собственных колебаний, которые, в свою очередь, через параметры среды обитания воздействует на динамику исследуемых биосистем. Однако выявить, какой именно внешний фактор является синхронизатором исследуемого биоритма, можно только путем постановки эксперимента с экранированием от возможных вторичных физических посредников, влияющих на биологические системы.

### выводы

1. В динамике смены оперения у особей разных видов, как в природных условиях, так и при содержании в широком диапазоне фотопериодов (от 20 до 12 часов), проявляется период, равный  $3.06 \pm 0.1$  суток.

2. Методом наложенных эпох выявлена связь околотрехсуточного биоритма смены первостепенных маховых перьев с экстремумами скорости вращения Земли вокруг своей оси и с изменением знака с минуса на плюс среднего магнитного поля Солнца и межпланетного магнитного поля.

3. Фазовая взаимосвязь околочетырехсуточного биоритма двигательной активности и околотрехсуточной ритмичности смены оперения отсутствует, что указывает на то, что внешние синхронизаторы этих биоритмов различны.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ИПЭЭ РАН АААА-А18-118042690110-1.

### 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. В. С. Мартынюк и Н. А. Темурьянц, Геофизические процессы и биосфера **8** (1), 36 (2009).
- Т. К. Бреус, Ф. Халберг и С. Ж. Корнелиссен, Биофизика 40 (4), 737 (1995).
- 3. B. Selmaoui and Y. Touitou, Life Sci. **64** (24), 2291 (1999).
- С. И. Рапопорт, Н. Д. Большакова, Н. К. Малиновская и Т. К. Бреус, Биофизика 43 (4), 632 (1998).

- 5. A. Weydah, R. B. Sothern, G. Cornelissen, and L. Wetterberg, Biomed. Pharmacotherapy **55**, 57 (2001).
- 6. В. Д. Ильичев, Н. Н. Карташев и И. А. Шилов. Общая орнитология (Высш. шк., М., 1982)
- М. Е. Диатроптов, Журн. общей биологии 74 (5), 379 (2013).
- N. E. Cyr, M. Wikelski, and L. M. Romero, Physiol. Biochem. Zool. 81 (4), 452 (2008).
- 9. И.А.Алов, Очерки физиологии митотического деления клеток. (Медицина, М., 1964)
- L. M. Romero, D. Strochlic, and J. C. Wingfield, Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol. 142 (1), 65 (2005).
- 11. J. Li, V. Nguyen, B. A. French, et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **279** (1), 118 (2000).
- М. Е. Диатроптов и М. А. Диатроптова, Бюл. эксперим. биологии и медицины 162 (12), 770 (2016).
- В. Р. Дольник, Миграционное состояние птиц (Наука, М., 1975).
- 14. К. Л. Кравченко, А. А. Баженов, В. А. Воронов и М. В. Прикоп, в сб. Космос и биосфера: тезисы докладов Х Международной крымской конференции (АРИАЛ, Симферополь, 2013).
- В. Р. Дольник, Н. В. Виноградова и В. М. Гаврилов, Популяционная экология зяблика (Наука, Л., 1982).
- 16. S. Kumar and S. B. Hedges, Nature 392, 917 (1998).
- М. Е. Диатроптов, О. В. Макарова и М. А. Диатроптова, Геофизич. процессы и биосфера 13 (4), 82 (2014).

- 18. М. Е. Диатроптов, Дис. ... д-ра биол. наук (М., 2015).
- 19. А. А. Станкевич, Д. Ш. Джалилова и М. Е. Диатроптов, Биофизика, **63** (2), 392 (2018).
- 20. М. Е. Диатроптов, Рус. орнитол. журн. **25** (1345), 3699 (2016).
- 21. Н. С. Сидоренков, Физика нестабильностей вращения Земли (Наука, М., 2001).
- 22. Е. И. Селюков и Л. Т. Стигнева, *Краткие очерки* практической микрогеодинамики (Питер, СПб., 2010).
- 23. Е. М. Линьков. *Сейсмические явления* (Изд-во ЛГУ, Л., 1987).
- 24. Е. М. Линьков, Л. Н. Петрова, Н. Г. Савина и Т. Б. Яновская, ДАН СССР **262** (2) 321 (1982).
- 25. Е. М. Линьков, Л. Н. Петрова и Д. Д. Зурошвили, ДАН СССР **306** (2) 314 (1989).
- 26. Л. Н. Петрова, Биофизика 37 (3), 508 (1992).
- 27. В. В. Александров, Экологическая роль электромагнетизма (Изд-во Политехн. ун-та, СПб., 2006).
- Ю. В. Баркин, Нелинейный мир 5 (1-2), 101 (2007).
- В. А. Панчелюга и М. С. Панчелюга, Биофизика 60 (2), 395 (2015).
- 30. Б. М. Владимирский и А. А. Конрадов, Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского, сер. «Биология, химия» **20** (59), № 1, 92 (2007).
- Ю. П. Малышков и С. Ю. Малышков, Биофизика 60 (3), 589 (2015).

# Dynamics of the Replacement of the Primary Flight Feathers of Passerine Birds, Possible Factors in Synchronization

## M.E. Diatroptov\*, V.A. Panchelyuga\*\*, and A.A. Stankevich\*\*

\*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

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

The study to be reported here was undertaken to investigate the dynamics of the replacement of the primary flight feathers in several passerine bird species under natural and laboratory conditions. Birds were kept under different photoperiods in early stages of molting after breeding. The early onset of molting occurred when birds were moved in winter to the chamber with a 15-hour photoperiod, which was effective for gonadal development. Based on observations over five-year period of the birds subjected to all photoperiods under study, it was shown that in general, periodicity in the beginning of new flight feather development during passerine bird molting was about 3 days. Under a light-dark schedule (hrs), 20 light (L) : 4 dark (D), 17L : 7D, 14L : 10D and 12L : 12D, the time intervals between the replacement of adjacent primary flight feathers were multiples of 3 days. After a comparison of the phase of a 3-day biorhythm and the dynamics of external atmospheric and heliogeophysical processes, it was found that there is more significant relation between the extremums of changing the rotational speed of the Earth, can be considered synchronizers of the biorhythm of interest.

Keywords: infradian biorhythms, synchronizers, molting, hormones

———— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 612.085.4

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЗАКРУЧЕННОГО ПОТОКА В ПОЛОСТИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА У ЖИВОТНЫХ РАЗЛИЧНОГО РАЗМЕРА НА ОСНОВАНИИ КОНЦЕПЦИИ СМЕРЧЕОБРАЗНЫХ ТЕЧЕНИЙ ВЯЗКОЙ ЖИДКОСТИ

© 2020 г. М.М. Тхагапсова, Е.А. Талыгин, Ш.Т. Жоржолиани, А.В. Агафонов, А.В. Дорофеев, А.Ю. Городков, Г.И. Кикнадзе, Л.А. Бокерия

Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева Минздрава России, 121552, Москва, Рублевское шоссе, 135

> *E-mail: mthagapsova@mail.ru* Поступила в редакцию 29.11.2018 г. После доработки 10.05.2019 г. Принята к публикации 21.08.2019 г.

Целью работы являлось обоснование единого механизма обтекания проточного канала левого желудочка сердца независимо от принадлежности виду на основании анатомического исследования принципов ориентации трабекул в полости левого желудочка экспериментальных животных разного размера (крыс, кроликов, собак) и человека. Измерение внутрисердечного трабекулярного рельефа производили на слепках полости левого желудочка животных разного размера и человека. Слепки каждого вида животных и человека выбирали примерно одинакового размера, что позволило повысить достоверность измерений. В качестве гидродинамической модели для количественной оценки параметров внутрисердечного кровотока были использованы точные решения нестационарных уравнений гидродинамики для класса смерчеобразных закрученных потоков вязкой жидкости. Построение графической зависимости степени закрутки от объемного показателя струи показало непрерывность гиперболической функции на всех слепках с высокой точностью аппроксимации полученных данных ( $R^2$  варьирует от 0.7963 до 0.9081), то есть все точки, принадлежащие этим зависимостям, соответствуют условию сходимости  $Z_i R_i^2 =$  const и могут принадлежать сингулярной закрученной струе, образуя ограничивающую ее поверхность. Графическое отображение зависимости объемного показателя струи от продольной координаты при различных углах фиксации слепков во всех случаях носит линейный характер. Высокая точность аппроксимации массива полученных данных ( $R^2$  варьирует от 0.7882 до 0.8853) позволяет судить об идентичном принципе закрутки и аккумуляции энергии движения доминантной струи как у животных, так и у человека. Таким образом, доказано, что ориентация и координированное сокращение группы трабекул играют определяющую роль в формировании закрученного внутрисердечного потока крови и соответствуют общему механизму транспорта крови у животных и человека, независимо от размеров проточного канала сердца.

Ключевые слова: левый желудочек, трабекулы, смерчеобразные потоки. **DOI:** 10.31857/S0006302920010184

Анализ гидродинамической структуры потока крови в сердце и магистральных сосудах с точки зрения традиционной гидродинамики, основанной на анализе ламинарно-турбулентного перехода, содержит ряд имманентных противоречий. Эти противоречия заключаются в том, что при увеличении калибра сосудов от мелких к крупным животным или в результате роста, в определенных участках русла ламинарное течение должно становиться турбулентным при той же скорости течения. Однако из соображений физиологического единообразия трудно себе представить, что движение крови осуществляется поразному у особей разного размера. Кроме того, изменение структуры течения по мере увеличения просветов проточного канала сердца и сосудов в результате роста животного или человека должно быть связано со скачкообразным ростом энергозатрат и гидродинамического сопротивления [1–3].

Многочисленные исследования, в которых структура внутрисердечного потока крови была описана с помощью методов вычислительной гидродинамики, позволяют воспроизвести картину течения в узком диапазоне состояний и не раскрывают механизмов регуляции или компенсации кровообращения. Попытки учета этих факторов в подобных моделях, как правило, приводили к потере устойчивости модели или к неоправданному усложнению соотношений и структуры результирующего течения [4].

Многими авторами, начиная с 30-х годов XX века, показано, что движение крови в камерах сердца и в магистральных сосудах осуществляется вдоль определенных закрученных линий тока [1, 5, 6]. Такой механизм движения крови должен способствовать минимизации возмущений в потоке, которые неизбежно связаны с риском активации биологически активных компонентов крови и сосудистой стенки. Однако вплоть до последнего времени отсутствовала подходящая гидродинамическая модель для анализа закрученного ламинаризированного течения, что делало невозможным выбор адекватных экспериментальных подходов к исследованию потока крови.

В ранее опубликованных работах [6-8] в качестве такой гидродинамической модели были предложены течения, описываемые точными решениями нестационарных уравнений гидродинамики для класса самоорганизующихся смерчеобразных потоков вязкой жидкости [2]. Эти решения были успешно использованы для описания геометрической конфигурации левого желудочка сердца и аорты и позволили доказать, что продольно-радиальный профиль проточного канала в этом сегменте системы кровообращения соответствует направлениям линий тока смерчеобразного течения. Также анализ архитектоники трабекулярного слоя в полости левого желудочка позволил из общей массы трабекул и папиллярных мышц выделить две спирально ориентированные группы, играющие роль направляющих лопаток при обтекании кровью внутреннего рельефа левого желудочка. Их пространственное расположение также соответствует направлениям линий тока течения, описываемого точными решениями. При этом в фазу диастолического наполнения левого желудочка основную роль играют трабекулы свободной стенки, формирующие структуру наполняющего потока, а поток, изгоняемый во время систолы, формируется вдоль направлений папиллярных мышц и трабекул передне-перегородочного угла [6-8].

Координированная экспрессия указанных мышечных структур в полости левого желудочка сердца в зависимости от фазы сокращения обеспечивает условия структурной организации внутрижелудочкового закрученного потока крови в течение всего сердечного цикла и может быть проанализирована с помощью указанных точных решений.

Цель данного исследования заключалась в обосновании единого механизма обтекания проточного канала левого желудочка сердца на основании анатомического исследования принципов ориентации трабекул в полости левого желудочка экспериментальных животных разного размера и человека.

## ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВНУТРИСЕРДЕЧНОГО КРОВОТОКА

Для количественной оценки параметров внутрисердечного кровотока в рамках исследования были использованы точные решения нестационарных уравнений гидродинамики для класса смерчеобразных закрученных потоков вязкой жидкости. После ряда преобразований точные решения для смерчеобразной струи с единственной циркуляцией [2] имеют следующий вид:

$$V_{r} = -C_{0}(t)r$$

$$V_{z} = 2C_{0}(t)z$$

$$V_{\varphi} = \frac{\Gamma_{0}(t)}{2\pi r} \left(1 - e^{-\frac{C_{0}(t)r^{2}}{2v}}\right),$$
(1)

где  $V_z$  – продольная,  $V_r$  – радиальная, а  $V_{\varphi}$  – азимутальная компоненты скорости;  $C_0(t)$  – произвольная функция времени, соответствующая по физическому смыслу радиальному градиенту скорости, с<sup>-1</sup>;  $\Gamma_0(t)$  – произвольная функция времени, соответствующая по физическому смыслу циркуляции среды, м<sup>2</sup>/с; r – расстояние по нормали от продольной оси Z до радиальной границы потока; v – кинематическая вязкость среды, м<sup>2</sup>/с.  $C_0(t)$  и  $\Gamma_0(t)$  зависят от времени в силу нестационарности потока и в случае сердца циклически изменяются в соответствии с пульсационными изменениями поля скоростей.

Точные решения выражены в цилиндрической системе координат, положение которой зависит от мгновенного состояния и расположения закрученной струи. При этом точка начала координат соответствует точке, в которой все составляющие скорости равны нулю и может перемещаться вместе со струей [2, 8]. Тогда в соответствии с точными решениями, начиная от этой точки, в каждый момент времени вдоль канала должно выполняться соотношение:

$$Z_i R_i^2 = \text{const}, \tag{2}$$

где  $Z_i$  и  $R_i$  — текущие значения продольной и радиальной координаты. На бьющемся сердце положение начала координат и величина const, пропорциональная мгновенному значению объема закрученной струи, являются время-зависимыми функциями и циклически меняются в соответствии с динамикой сердечного сокращения.

Преимущественная спиральная ориентация внутрижелудочковых анатомических структур,

несмотря на сложности их идентификации и измерения, позволяет восстановить оси симметрии отдельно для диастолической и систолической групп трабекул, измерить радиус круглых каналов, ограниченных соответствующим семейством спирально ориентированных трабекул, и определить расстояние любой точки на каждой оси относительно неподвижного топографического ориентира. Зная хотя бы два значения радиуса вдоль оси симметрии проточного канала, можно вычислить положение точки начала координат в соответствии с соотношением  $Z_i R_i^2 = \text{const.}$  При этом значение продольной координаты для каждой точки будет равно величине  $Z_i + Z_0$ , где  $Z_i - Z_i$ измеренное расстояние до выбранного анатомического ориентира, а Z<sub>0</sub> – вычисленное расстояние от этого анатомического ориентира до начала цилиндрической системы координат, в которой может быть описана смерчеобразная струя, формируемая под действием рассматриваемого сегмента рельефа.

Для минимизации ошибок, неизбежных при исследовании посмертных слепков, были введены следующие условия, вытекающие из точных решений и ограничивающие выбор данных:

1. Вдоль выбранной оси с увеличением величины  $Z_i$  по направлению течения величина  $R_i$  всегда уменьшается.

2. Угол наклона отдельной трабекулы ( $\alpha_i$ ) к оси симметрии, построенной относительно группы трабекул вдоль направления течения крови в определенную фазу сердечного цикла, всегда уменьшается.

Введение этих условий позволяет вычислить значения следующих структурных параметров потока, формируемого вдоль исследуемого трабекулярного профиля [8]:

$$Q(t) = (Z_i + Z_0)R_i^2,$$
 (3)

$$\frac{C_0(t)}{\Gamma_0(t)} = \frac{\operatorname{ctg}\alpha_i R_i}{4\pi Q(t)}.$$
(4)

Эти параметры имеют конкретный физиологический смысл. Величина  $Z_i + Z_0$  соответствует значению полной продольной координаты вдоль потока и определяет мгновенное положение начала цилиндрической системы координат при каждом состоянии струи. Величина Q(t) соответствует константе в соотношении (2) и пропорциональна объему закрученной струи на отрезке от начала координат до соответствующего значения  $Z_i + Z_0$ .

В соответствии с точными решениями (1) величина  $[C_0/\Gamma_0](t)$  пропорциональна отношению продольной и азимутальной составляющих скорости и отражает степень закрученности потока.

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

Как видно из соотношений (3) и (4), величины  $(Z_i + Z_0), Q(t)$  и  $[C_0/\Gamma_0](t)$  функционально связаны друг с другом. Величина  $[C_0/\Gamma_0](t)$  обратно пропорциональна величине Q(t), а величина  $Z_i + Z_0$  прямо пропорциональна величине Q(t).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из большого количества изготовленных слепков полости левого желудочка сердца были выбраны шесть слепков левого желудочка сердца человека, пять слепков левого желудочка сердца собак, четыре слепка левого желудочка сердца кроликов и шесть слепков левого желудочка сердца крыс. Этот выбор был обусловлен возможностью идентифицировать трабекулы диастолической и систолической групп на одном слепке. Слепки каждого вида животных и человека выбирали примерно одинакового размера. Это позволило объединить все данные в единый массив, чтобы повысить статистическую достоверность полученных результатов.

Для получения слепков подопытных животных полость левого желудочка до извлечения из трупа заполняли жидкой протакриловой массой и оставляли затвердевать на сутки. Далее выделяли сердце вместе с окружающими тканями и помещали в концентрированный раствор соляной кислоты или едкого калия на двое суток до полного растворения биологических тканей. Готовые слепки промывали под проточной водой, высушивали и измеряли. Слепки левого желудочка сердца человека были получены по аналогичной методике с соблюдением правил патологоанатомического исследования у лиц, умерших от причин, не связанных с сердечно-сосудистой патологией.

По данным предыдущих исследований трабекулы левого желудочка сердца были разделены на две группы. Диастолические трабекулы, отвечающие за наполнение полости левого желудочка, расположены преимущественно на свободной и передней стенках полости левого желудочка и образуют осесимметричную спиральную структуру, ось которой проходит между центром митрального клапана и верхушкой левого желудочка. Расположенные в передне-перегородочной части систолические трабекулы и папиллярные мышцы образуют семейство кривых, составляющих спиральную систему линий вокруг оси, соединяющей условную точку, расположенную в нижней трети свободной стенки левого желудочка, и центр аортального клапана [6-8]. Относительно этой оси полость левого желудочка вместе с аортальным конусом легко представляется в виде сходящегося канала, основанием которого является свободная стенка левого желудочка сердца, а сужающаяся часть соответствует выходу в аорту.

Учитывая, что выбранные посмертные слепки левого желудочка позволяют визуализировать как систолические, так и диастолические трабекулы, независимо от фазы сердечного цикла, восстановление преимущественных направлений ориентации трабекул обеих групп относительно соответствующего начала координат позволяет проследить весь процесс эволюции смерчеобразной струи в полости сердца. Для каждой группы спирально ориентированных трабекул были измерены значения продольной координаты от указанных анатомических ориентиров, соответствующие им значения радиуса и углы наклона трабекулярных линий к соответствующей оси (рис. 1а).

Морфометрические измерения крупных слепков (человек, собака) проводили с помощью специально разработанного устройства, позволяющего закреплять слепки в определенном положении, и координаты каждой точки на поверхности фиксировали в цилиндрической системе координат. Измерения мелких слепков (кролик, крыса) производили по фотографическим изображениям, сделанным при фиксированном угле поворота (рис. 16). Трабекулы маркировали.

Исходя из предполагаемых направлений движения крови, выбирали две группы спирально ориентированных трабекулярных линий, соответствующие наполнению или изгнанию из левого желудочка. Затем для обеих групп трабекул выбирали направление оси с учетом возможности ее проецирования на поверхности при любом положении слепка в поворотном устройстве. Положение оси должно удовлетворять условиям симметрии каждой группы трабекул. Правильность выбора оси проверяли по углу наклона параллельных трабекулярных линий в каждой проекции слепка при его повороте вокруг соответствующей оси. При этом измеряли следующие величины: расстояние от выбранного начала оси (центр митрального клапана для диастолических трабекул и точка в нижней трети свободной стенки левого желудочка для систолических трабекул), расстояние от оси до трабекулы (это расстояние соответствует радиусу проточного канала в соответствующей проекции полости) и угол наклона трабекулы относительно оси. В зависимости от визуальной доступности трабекулярных структур, слепок поворачивали вокруг оси с шагом от 30° до 60° и фотографировали для получения плоского изображения. Затем с помощью транспортира и линейки (рис. 1в) измеряли углы наклона доступных пар трабекул при фиксированных значениях Z вдоль выбранной оси в точке пересечения трабекулярных линий и проекции оси на поверхность слепка, а также радиусы полости в этих точках. После обнаружения такого положения оси, при котором выполнялись условия равенства угла наклона трабекул при одном и том же значении продольной координаты и условие уменьшения радиуса вдоль продольной координаты, результаты измерений использовали для расчета значений структурных параметров потока крови  $C_0/\Gamma_0$ , Q и Z по соотношениям (2)–(4). Измерения проводили в максимально возможном количестве точек на каждом слепке и объединяли в один массив для каждого вида, считая, что для слепков примерно одинакового размера положение трабекул изменяется мало. Обработка полученных данных была выполнена в программе MS Excel.

Статистический анализ. Экспериментально полученные данные  $[C_0/\Gamma_0](Q)$  аппроксимировали к степенной функции с показателем степени -1, а Q(Z) – к линейной функции. Точность полученной аппроксимации оценивали по величине достоверности  $R^2$  ( $R^2 > 0.7$  свидетельствует о высокой точности аппроксимации).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках рассматриваемой гипотезы поток крови в полости левого желудочка должен формироваться под действием координированного движения стенок левого желудочка и экспрессии трабекулярного рельефа. При этом поток не может быть направлен поперек трабекул, т.е. положение трабекул в каждой фазе сердечного цикла должно соответствовать направлениям линий тока и, в случае соответствия структуры потока течению, описываемому точными решениями, эти направления должны соответствовать зависимостям, вытекающим из точных решений.

В соответствии с точными решениями движение среды в смерчеобразных потоках происходит вдоль линий тока, направленных по конвергентной спирали относительно оси потока. Если движение жидкости осуществляется в канале, имеющем подвижные стенки и направляющий профиль, повторяющий структуру закрученной струи, то точные решения могут быть использованы для установления связи пространственной конфигурации канала с полем скоростей струи [6–8].

Для оценки соответствия анатомического строения полости левого желудочка сердца условиям самоорганизации и эволюции смерчеобразной струи были построены графические зависимости  $[C_0/\Gamma_0](Q)$  и Q(Z) для слепков левых желудочков крыс, кроликов, собак и человека. Построение этих зависимостей отдельно для диастолических и систолических трабекул не позволило выявить какую-либо определенную законо-



**Рис. 1.** (а) — Слева показаны линии преимущественного направления трабекул левого желудочка сердца («дт» — диастолические, «ст» — систолические трабекулы); в центре — показан принцип измерения продольной координаты, соответствующего этой координате радиуса вихря — расстояния от продольной оси по нормали к ближайшей трабекуле, а также угол наклона касательной для расчета структурных параметров внутрисердечного потока крови для диастолической системы трабекул. (б) — Принцип маркировки и расчета параметров для диастолических (слева) и систолических (справа) трабекул слепка левого желудочка кролика, фиксированного в вертикальном положении. (в) — Расчет параметров маркированных диастолических (слева) и систолическому изображению слепка левого желудочка сердца крысы.

мерность. Однако построение данных зависимостей в виде объединенного массива данных, полученных как с диастолических, так и с систолических трабекул, однозначно указывает на наличие тесной функциональной связи между параметрами, причем зависимость  $[C_0/\Gamma_0](Q)$  по внешнему виду более всего напоминает гиперболу, а зависимость Q(Z) – близка к линейной. Однако следует отметить увеличение степени погрешности измерений геометрических характеристик и положения трабекул на слепках левых желудочков кроликов и крыс. Это связано с невозможностью избежать перерастяжения полости сердца в базальных отделах при заполнении протакриловой массой вследствие малой толщины стенок левого желудочка. Для коррекции погрешности в исходные данные были внесены поправки, необходимые для вычисления вышеуказанных параметров, что позволило получить такой же внешний вид зависимостей, как для человека и собаки.

Проведение корреляционного анализа позволило подтвердить это наблюдение. Построение графической зависимости степени закрутки струи от ее объемного показателя ( $[C_0/\Gamma_0](Q)$ ) показало непрерывность гиперболической функции на всех слепках с высокой точностью аппроксимации полученных данных ( $R^2$  варьирует от 0.7963 до 0.9081). Иными словами, все точки, принадлежащие зависимостям на рис. 2, соответствуют мгновенному значению радиуса полости левого желудочка сердца и степени сходимости при условии, что  $Z_i R_i^2$  = const. Значит, эти точки могут принадлежать сингулярной доминантной струе, образуя ограничивающую ее поверхность.

Графическое отображение зависимости объемного показателя струи от продольной координаты при различных углах фиксации слепков во всех случаях носит линейный характер (рис. 3). Высокая точность аппроксимации массива полученных данных ( $R^2$  варьирует от 0.7882 до 0.8853) позволяет судить об идентичном принципе закрутки и аккумуляции энергии движения доминантной струи как у животных, так и у человека.

Данные, представленные на рис. 2 и 3, согласуются с точными решениями нестационарных гидродинамических уравнений для класса смерчеобразных закрученных потоков вязкой жидкости и свидетельствуют об идентичном принципе организации потока с наличием одного доминантного вихря в полости левого желудочка независимо от размеров слепков и фазы сердечного сокращения. Полученные графические отображения зависимостей Q(Z) и  $[C_0/\Gamma_0](Q)$  во всех случаях имеют тождественный вид и отражают общий механизм транспорта крови у животных и

человека, независимо от пространственной конфигурации проточного канала сердца. Таким образом, несмотря на различные размеры полости левого желудочка, принцип организации внутрисердечного потока одинаков как у животных крыс, кроликов, собак, так и у человека.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки роли трабекул во внутрисердечном кровотоке авторами работы [9] были созданы эллипсоидные математические модели левого желудочка с гладкой и «трабекулярной» внутренней поверхностью (в эпикардиальном слое трабекулы располагались по углом  $-80^\circ$ , в толще миокарда — под углом  $0^\circ$  и в эндокардиальном слое за счет вращения — под углом  $+80^\circ$ ). Сравнительный анализ этих моделей продемонстрировал важное функциональное значение трабекул в транспорте крови, поскольку их наличие увеличивает величину ударного объема на 21.8% при идентичных значениях давления в левом предсердии, массы миокарда и объема левого желудочка.

Также на количественные параметры внутрисердечного кровотока влияют углы наклона миокардиальных волокон. В работе [10] с помощью математического анализа цилиндрической модели было показано, что при обычном сжатии исключительно в продольном направлении или по окружности фракция выброса составит 15 и 28% соответственно, тогда как при ориентации мышечных волокон под углом 60° фракция выброса может составлять > 60%.

В работе [11] с помощью магнитно-резонансного внутрисердечного 4D-картирования у здоровых лиц авторы продемонстрировали мгновенные закрученные линии тока с разными скоростными показателями в зависимости от фазы диастолического наполнения или систолического изгнания. Кроме того, ниже митрального и трикуспидального клапанов были зафиксированы кольцевидные линии тока крови в конечную фазу диастолического наполнения, что доказывает стабильность циркуляции и может обеспечивать дальнейшую эволюцию течения в виде смерчеобразной струи.

Точные решения нестационарных гидродинамических уравнений для класса смерчеобразных закрученных потоков вязкой жидкости устанавливают однозначную связь между полем скоростей потока крови и геометрией проточного канала, что позволяет судить о структуре потока по геометрии канала. Направляющее действие трабекул левого желудочка определяет структуру формирующегося потока. Смерчеобразная струя



**Рис. 2.** Зависимости  $C_0/\Gamma_0$  (1/м<sup>2</sup>) от Q (м<sup>3</sup>) и аппроксимирующие множество точек гиперболы для слепков левых желудочков сердца: (а) – крыс (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.8139$ ); (б) – кроликов (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.9018$ ); (в) – собак (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.8156$ ); (г) – человека (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.7963$ ).



**Рис. 3.** Зависимости  $Q(m^3)$  от Z(m) и аппроксимирующие множество точек прямые для слепков левых желудочков сердца: (а) – крыс (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.7882$ ); (б) – кроликов (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.8353$ ); (в) – собак (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.8853$ ); (г) – человека (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.8853$ ); (г) – человека (величина достоверности аппроксимации  $R^2 = 0.8795$ ).

в процессе эволюции преодолевает митральный и аортальный клапаны сердца, с соответствующим перемещением точки начала координат. Благодаря этому радиус кривизны оси закрученного потока неизменно больше величины радиуса самой струи при сохранении условия осевой симметрии на всем протяжении проточного канала [7, 8].

В нашем исследовании показана достоверная близость зависимостей структурных параметров потока, отражающих объемный показатель струи Q(Z) и степень закрутки  $[C_0/\Gamma_0](Z)$ , с теоретическим видом этих зависимостей, вытекающих из точных решений. Непрерывность гиперболической функции для всех видов исследованных слепков свидетельствует об общем принципе ориентации систолических и диастолических трабекул и позволяет говорить о едином механизме формирования и эволюции внутрисердечной сингулярной доминантной струи у животных и человека.

Доминантная струя относится к классу смерчеобразных течений и по своей конфигурации соответствует мгновенной анатомии полости левого желудочка сердца, представленной внутренним трабекулярным рельефом. Однако это не исключает наличие внутрижелудочковых возвратных и вторичных течений, обусловленных участками локальной асимметрии проточного канала. Гипотетически эти течения имеют сходную с доминантным вихрем структуру, а вязкие взаимодействия между ними неизбежно приводят к дополнительным потерям энергии. Соотношение мощности доминантной сердечной струи и мощности возвратных и вторичных течений определяет эффективность процесса самоорганизации потока в сердце, что важно для накопления момента движения в этой струе и последующего изгнания в аорту [6-8].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют об идентичном принципе организации внутрисердечного кровотока независимо от размера полости левого желудочка и фазы сердечного цикла. Применение точных решений нестационарных уравнений гидродинамики для класса смерчеобразных закрученных потоков вязкой жидкости продемонстрировало наличие одного доминантного вихря в полости левого желудочка независимо от видовой принадлежности слепков. Результаты исследования согласуются с современными представлениями об анатомии и функции сердца и в перспективе могут стать новым шагом в оптимизации индивидуального подхода при выборе

тактики лечения пациентов, планировании хирургического вмешательства и динамическом послеоперационном наблюдении, так как открывают возможности количественной оценки состояния внутрисердечной гемодинамики при патологических состояниях, сопровождаемых снижением сердечного выброса.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №16-15-00109).

### 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. И. Бураковский, Н. Б. Доброва, Н. Б. Кузьмина и др., Эксперим. хирургия и анестезиология **3**, 13 (1976).
- 2. G. I. Kiknadze and Yu. K. Krasnov, Sov. Phys. Dokl. **10**, 799 (1986).
- 3. L. H. Back, D. W. Crawford, and R. Barndt, J. Appl. Physiol. 41 (6), 910 (1976).
- Е. А. Талыгин и А. Ю. Городков, Бюл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева 19 (4), 416 (2018).
- 5. J. Bremer, Am. J. Anatomy 49, 409 (1932).
- 6. L. A. Bockeria, G. I. Kiknadze, I. A. Gachechiladze, et al., Cardiometry **3**, 5 (2013).
- Л. А. Бокерия, А. Ю. Городков, Г. И. Кикнадзе и М. В. Соколов, Бюл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева 3 (7), 99 (2002).
- Е. А. Талыгин, Н. А. Зазыбо, Ш. Т. Жоржолиани и др., Успехи физиол. наук 47 (1), 48 (2016).
- 9. M. Serrani, M. L. Costantino, and R. Fumero, Computing in Cardiology **40**, 811 (2013).
- 10. E. A. Sallin, Biophys. J. 9, 954 (1969).
- 11. M. Markl, P. J. Kilner, and T. Ebbers, J. Cardiovasc. Magn. Reson. 13, 7 (2011).

# Comparative Anatomical Study of the Parameters for Swirling Flow in the Left Ventricular Cavity in Animals of Different Size Based on the Concept of Tornado-Like Flows of Viscous Liquids

## M.M. Tkhagapsova, E.A. Talygin, Sh.T. Zhorzholiani, A.V. Agafonov, A.V. Dorofeev, A.Yu. Gorodkov, G.I. Kiknadze, and L.A. Bockeria

A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Roublyevskoe Shosse 135, Moscow, 121552 Russia

The aim of the study was to substantiate a single mechanism of the flow around the flow channel of the heart left ventricle regardless of the species based on anatomical study of orientation of trabeculae in the left ventricular cavity in man and study animals of different size like rats, rabbits, dogs. The relief parameters of the intracardiac trabecular complexes were measured using the cavity casts of the left ventricle of the heart of man and animals of different size. The casts of the left ventricle of the heart of man and each animal species of approximately the same size were selected that helped increase the reliability of measurements. For quantitative evaluation of the parameters of the intracardiac blood flow, the exact solutions of the nonstationary hydrodynamics equations for the class of Tornado-like swirling flows of viscous fluids were used as a hydrodynamic model. Graphical dependencies of the degree of twisting on the volumetric index of the intracardiac Tornado-like jet have shown the continuity of the hyperbolic functions in all casts with high accuracy of data fitting ( $R^2$  varies from 0.7963 to 0.9081). Therefore, all dependency points correspond to the condition of convergence  $Z_i R_i^2$  = const and may belong to a singular swirling jet, which form the boundary layer. Graphs of the volumetric change of the jet vs. the longitudinal coordinate at different angles of cast fixation are linear in all cases. Due to high accuracy approximation to an array of data obtained ( $R^2$  varies from 0.7882 to 0.8853) it might be supposed that the pattern of twisting and accumulation of the energy of moving dominant flow are similar in man and animals. Therefore, our results demonstrate that the orientation and coordinated contractility of trabecular meshwork play a crucial role in the formation of intracardiac blood swirling and mechanisms that ensure adequate blood flow in man and animals, regardless of the size of the heart's cavity are similar.

Keywords: left ventricle, trabeculae, swirling flow

# ——— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 612.17:519.5

# НЕСТАЦИОНАРНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ВО ВРЕМЯ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

© 2020 г. С.В. Божокин\*, Е.М. Лесова\*\*, В.О. Самойлов\*\*, К.А. Баранцев\*

\*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

\*\*Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, б

*E-mail: bsvjob@mail.ru* Поступила в редакцию 07.05.2019 г. После доработки 08.09.2019 г. Принята к публикации 15.11.2019 г.

Предложен новый метод обработки нестационарной ритмограммы во время антиортостатической пробы. Метод основан на применении непрерывного вейвлетного преобразования сигнала сердечного ритма, имеющего частотную модуляцию. Показано, что сигнал ритмограммы представляет собой систему вспышек активности в различных частотных диапазонах. Для анализа такой системы вспышек разработана система количественных показателей. Метод трансляционного переноса сигнала использован для устранения граничных эффектов, возникающих при рассмотрении низкочастотных компонент сигнала ритмограммы.

*Ключевые слова: нестационарная ритмограмма сердца, отрицательная ортостатическая проба.* **DOI:** 10.31857/S0006302920010196

Анализ ритмограммы сердца очень важен для оценки функционального состояния сердца и реакции вегетативной системы человека при проведении различных функциональных проб [1-9]. Среди многих функциональных проб (велоэргометрия, бегущая дорожка, дыхательные, фармакологические и психоэмоциональные пробы) пассивные ортостатические пробы обладают возможностью стандартизировать внешние воздействия на сердечно-сосудистую систему человека. Пассивная ортостатическая проба (тилт-тест) выполняется на специальном автоматическом поворотном столе, который по компьютерной программе изменяет положение тела человека из горизонтального положения в вертикальное. Автоматическая смена положений человека в гравитационном поле может осуществляться как для положительных углов подъема испытуемого к горизонту (положительная ортостатическая проба (Head-Up Tilt Test, HUT) - проба на наклонном столе, в положении головой вверх), так и для отрицательных углов наклона испытуемого к горизонту (антиортостатическая проба (Head Down Tilt Test, HDT) - проба на наклонном столе в положении головой вниз).

Антиортостатическая проба (антиОП) с углом наклона головного конца от -15 до  $-30^{\circ}$  нашла широкое применение в космической и авиационной медицине для имитации гемодинамических изменений, возникающих в процессе космического полета [10]. Кратковременная антиОП может быть использована у больных кардиологического профиля для определения функциональных резервов сердечно-сосудистой системы, для выявления компенсаторных сосудистых реакций, направленных на стабилизацию гемодинамики у больных ишемической болезнью сердца [11].

Регуляция ритма сердца во время проведения антиОП осуществляется с помошью быстрых адаптационных реакций (барорефлексы, хеморефлексы). Вслед за такими быстрыми процессами включаются механизмы, характеризующиеся большей продолжительностью во времени (воздействие гормонов, изменение транскапиллярного обмена, ренин-ангиотензин-альдостероновая система). К механизмам длительного действия относят регуляцию внутрисосудистого объема крови и емкости сосудов [12, 13]. Адаптационные реакции организма человека на антиОП, обусловленные действием многоуровневой системой обратной связи, характеризуются сильным разбросом параметров многих переходных процессов. Все это приводит к тому, что ритм сердца не является стационарным процессом, что

Сокращения: антиОП – антиортостатическая проба, LF – низкие частоты, HF – высокие частоты, ЧМС – частотномодулированный сигнал, DCWT – повторное вейвлет преобразование.

подразумевает повторяемость его статистических и спектральных характеристик на различных отрезках времени проведения антиОП, имеющих одинаковую продолжительность.

Результаты, приведенные в работе [14], показывают, что при проведении антиОП частота сердечных сокращений во многих случаях снижается, при этом увеличиваются размеры полостей сердца и систолический объем, артериальное, венозное и пульсовое давление, систолический и минутный объемы (на 30-60%). Сердечный выброс (минутный объем сердца) возрастает вследствие действия различных механизмов. Такими механизмами являются гетерометрическая саморегуляция сердца, рефлекс Бейнбриджа, который заключается в увеличении частоты и силы сердечных сокращений в ответ на повышение объема крови в устьях полых вен и предсердиях. В целом характер изменения частоты сердечных сокращений, вызванного изменением объема крови, является результатом антагонистического влияния рефлекса Бейнбриджа и барорецепторного рефлексов.

Депонирование крови при антиОП при положении головой вниз происходит в сосудах верхней части тела человека. Тонус сосудов малого круга кровообращения изменяется, что приводит к изменению функции внешнего дыхания: увеличивается длительность вдоха, снижается частота дыхания и увеличивается сопротивление дыхательных путей [15]. При антиОП наблюдается вазодилатация сосудов и кровенаполнение полостей сердца увеличивается. Скорость кровотока в мозговых артериях в начальной стадии антиОП также увеличивается. В работе [16] были выполнены исследования спектральных характеристик вариабельности сердечного ритма в диапазоне низких частот (LF - low frequency) и высоких частот (HF - high frequency). Было показано, что отношение LF/HF уменьшается во время антиОП. Несколько иные результаты при изучении спектральных характеристик ритмограмм были получены в работе [17].

Однако характер описанных изменений зависит от продолжительности антиОП, величины отрицательного угла наклона к горизонту, от возраста пациента, а также от тонуса сосудов нижних конечностей. В обзоре [14] показано, что при антиОП (угол наклона равен  $-30^{\circ}$ ) отмечено снижение пульса у 50% испытуемых, учащение пульса наблюдалось у 25% испытуемых и еще у 25% испытуемых изменения пульса были незначительными. В работах [18–22] было показано, что для антиОП в каждой конкретной ситуации осуществляется включение различных механизмов, которые и определяют многообразие физиологических реакций системы кровообращения в ответ на ортостатическое воздействие.

Целью исследования является разработка новых параметров нестационарной вариабельности ритма сердца во время антиОП. Для анализа нестационарной вариабельности ритма сердца вместо амплитудно-модулированного сигнала в данной статье используется частотно-модулированный сигнал (ЧМС) Z(t), зависящий от времени t, который представляет собой совокупность одинаковых гауссовых пиков, центры которых находятся на неравномерной сетке времен и совпадают по времени с истинными моментами ударов сердца  $t_n = t_{n-1} + RR_n$ ,  $n = 1, 2, 3..., t_0 = RR_0$  [8, 9, 23, 24]. Для такой модели все гауссовы пики, центры которых разделены промежутками времени RR<sub>n</sub> между ударами сердца, имеют одинаковую амплитуду и одинаковую ширину, совпадающую с шириной QRS комплекса сердца.

Предлагаемая в статье модель ЧМС ритмограммы дает возможность найти истинные частоты колебаний сердечного ритма, что отличает ее от часто используемой модели амплитудно-модулированного сигнала ритмограммы, в которой пики разной высоты RR<sub>n</sub> находятся на равноотстоящей сетке времен, разделенных промежутком времени  $\Delta t = RRNN$ , где величина RRNN представляет собой среднюю длительность RR<sub>n</sub> интервалов за весь период наблюдения. Особенно сильно отличия традиционной модели амплитудно-модулированного сигнала и предлагаемой в статье модели ЧМС заметны при анализе нестационарной вариабельности ритма сердца при антиОП, в которой сильно заметен сильный тренд ритмограммы по всему периоду испытаний. Отличия этих двух моделей были продемонстрированы на моделях ритмограммы, имеющих сильный тренд мгновенной частоты ударов сердца.

Преимущество введения новых количественных параметров ЧМС ритмограммы становится актуальным при изучении различных аритмий сердца, когда нарушается нормальный синусовый ритм и становятся важны истинные моменты сердечных сокращений сердца, происходящие в моменты времени  $t_n = t_{n-1} + RR_n$ . В этом случае традиционный метод исследования амплитудномодулированного сигнала ритмограммы становится неприменимым, так как он основан на сигнале  $z_n(t_n) = RR_n$  с равноотстоящими точками по времени  $t_{n+1} - t_n = \Delta t$ , где t = RRNN. Еще одним применением разрабатываемых в данной статье количественных методов анализа ЧМС ритмограммы является изучение экстрасистол, связанных с появлением эктопического очага триггерной активности, а также с существованием повторного обратного входа возбуждения (механизм «re-entry»).

### МЕТОДИКА

Автоматизированный комплекс динамического позиционирования (механургический стол) позволил проводить изучение физиологических реакций человека при проведении антиОП. Ритмограмма человека непрерывно измерялась в течение трех этапов  $S = \{A, B, C\}$ . В исследованиях принимали участие десять практически здоровых юношей и девушек в возрасте от 18 до 20 лет. Каждого испытуемого плотно закрепляли относительно ложа механургического стола. На этапе покоя А (0-600 с) испытуемый находился в горизонтальном положении в течение 10 мин. На этапе В (антиОП) (600-900 с) продолжительностью 5 мин головную часть стола опускали на отрицательный угол 30° относительно горизонта. Скорость поворота механургического стола составляла 4° в секунду. В положении головой вниз испытуемый находился в течение 5 мин. На этапе С (900-1500 с) длительностью 10 мин происходило возвращение стола в горизонтальное положение. Время подъема механургического стола в начале этапа С составляло примерно 10 с.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕСТАЦИОНАРНОЙ РИТМОГРАММЫ

Вычисление спектральных свойств нестационарной вариабельности ритма сердца проводится в два этапа. На первом этапе сигнал математической модели ритмограммы Z(t) представляет собой суперпозицию одинаковых гауссовых пиков, центры которых расположены на неравномерной сетке времен  $t_n$ :

$$Z(t) = \frac{1}{2\tau_0 \sqrt{\pi}} \sum_{n=0}^{N-1} \exp\left[-\frac{(t-t_n)^2}{4\tau_0^2}\right]$$
(1)

Именно в эти моменты времени  $t_n$  происходят удары сердца реальной ритмограммы человека, причем промежуток времени  $RR_n$  между двумя гауссовыми пиками равен  $RR_n = t_n - t_{n-1}$ . Характерная ширина гауссового пика  $\tau_0 = 20$  мс выбрана так, что она соответствует ширине QRS комплекса сердечного ритма, примерно равного 80 мс. Применение материнского вейвлета Морле [25] к такому сигналу Z(t) (1) дает возможность получить аналитическое выражение для непрерывного вейвлетного преобразования V(v,t) (continиоиs wavelet transform, CWT), зависящего от частоты v и времени t. Затем для каждого момента времени t по максимальному значению величины |V(v,t)| рассчитывается максимальная частота  $F_{max}(t)$ , лежащая в интервале 0.4 Гц  $< F_{max}(t) < 2.5$  Гц.

На втором этапе выполняется повторное вейвлет-преобразование (DCWT – double continuous

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

wavelet transform)  $|V_{\text{DCWT}}(v,t)|$  по отношению к сигналу  $F_{\text{max}}(t)$  [23, 24]. Весь спектральный диапазон  $\mu$  изменений  $F_{\max}(t)$  может быть разбит на область сверхмедленных колебаний ULF (ultra low frequency) с частотами  $v = (v_{\min}; 0.003)$  Гц; область малых частот VLF (very low frequency) с v = (0.003 - 0.040) Гц; низкочастотную область LF с v = (0.04 - 0.15) Гц, и высокочастотную область HF с v = (0.15 - 0.40) Гц. Значение минимальной частоты v<sub>min</sub>, надежно определяемой из наблюдений реальной ритмограммы, будет определено при рассмотрении граничных эффектов DCWT. Для величины  $F_{\text{max}}(t)$  могут быть характерны медленные изменения локальной частоты (ULF-диапазон) и высокие колебания частоты (HF-диапазон). Сверхнизкие частоты ( $\mu = ULF$ ) соответствуют тренду локальной частоты  $F_{\max}(t)$ , при котором эта величина допускает как монотонное увеличение, так и монотонное уменьшение в течение характерного масштаба времени, примерно равного 400 с. Высокие частоты изменений  $F_{\max}(t)$  $(\mu = HF)$  означают быстрые флуктуации  $F_{max}(t)$  относительно своего среднего значения, с характерными временами колебаний порядка 3 с.

Рассмотрим локальную плотность спектра  $\epsilon(v,t)$ 

$$\varepsilon(\mathbf{v},t) = \frac{2}{C_{\psi}} \frac{\left| V_{DCWT}(\mathbf{v},t) \right|^{2}}{\mathbf{v}}, \qquad (2)$$

которая характеризует мгновенное распределение энергии сигнала по частотам v, вычисленное в момент времени t, где константа  $C_{\psi} \approx 1$  представляет собой интеграл от Фурье-компонент материнского вейвлета. Детали вычисления  $V_{\text{DCWT}}(v,t)$  с материнским вейвлетом Морле рассмотрены в работе [25].

Задачей данной работы является нахождение изменений спектральных свойств сигнала  $F_{max}(t)$ в некотором заданном интервале частот  $\mu = [v_L; v_R]$ . Вместо левой  $v_L$  и правой  $v_R$  границ диапазона  $\mu = \{ULF, VLF, LF, HF\}$  удобно ввести среднюю частоту диапазона  $v_{\mu} = (v_L + v_R)/2$  и его ширину  $\Delta v = v_R - v_L$ . Количественным показателем, характеризующим динамику нарастания и спадания различных частот  $\mu$  для величины  $F_{max}(t)$ , являются мгновенные спектральные интегралы  $E_{\mu}(t)$ , зависящие от времени *t*:

$$E_{\mu}(t) = \frac{1}{\Delta v} \int_{\nu_{\mu} - \Delta \nu/2}^{\nu_{\mu} + \Delta \nu/2} \varepsilon(\nu, t) d\nu.$$
(3)

Спектральный интеграл  $E_{\mu}(t)$  представляет собой среднее значение локальной плотности спектра энергии сигнала  $\varepsilon(v,t)$ , проинтегрированное по рассматриваемому интервалу частот  $\mu = \{ULF, VLF, LF, HF\}$ . В качестве параметров, характеризующих поведение величины  $F_{max}(t)$ , будут рассматриваться усредненные по времени t интегралы  $\langle E_{\mu}(S) \rangle$  на этапах функциональной пробы  $S = \{A, B, C\}$ . К таким количественным параметрам для каждого испытуемого i = 1, 2...K относятся также величины  $d_{\mu}(t) = E_{\mu}(t) / \langle E_{\mu}(A) \rangle$ , представляющие собой относительные мгновенные значения спектральных интегралов  $E_{\mu}(t)$ , отнесенные к своим средним значениям  $\langle E_{\mu}(A) \rangle$  на этапе A, а также различные перекрестные мгно-

венные средние  $d_{\mu/\lambda}(t) = \frac{E_{\mu}(t) < E_{\lambda}(A) >}{E_{\lambda}(t) < E_{\mu}(A) >}$ , отне-

сенные к своим средним значениям на этапе A (спектральный параметр  $\lambda$  также принимает значения  $\lambda = \{ULF, VLF, LF, HF\}.$ 

Кроме таких динамических характеристик как  $d_{\mu}(t)$ , зависящих от времени t, для каждого испытуемого i = 1, 2...K вводятся усредненные по времени различных этапов  $S = \{A, B, C\}$  коэффициенты усвоения ритмов

$$d_{\mu}(B|A) = \langle E_{\mu}(B) \rangle \langle E_{\mu}(A) \rangle,$$
 (4)

показывающие, во сколько раз усредненный интеграл  $\langle E_{\mu}(B) \rangle$  на этапе В в спектральном диапазоне  $\mu$  превосходит аналогичный спектральный интеграл на этапе *A*. Аналогичным образом для каждого испытуемого *i* = 1,2...*К* вводится усредненный коэффициент

$$D_{\mu/\lambda}(B/A) = \frac{\langle E_{\mu}(B) \rangle \langle E_{\lambda}(A) \rangle}{\langle E_{\lambda}(B) \rangle \langle E_{\mu}(A) \rangle},$$
(5)

показывающий, во сколько раз отношение средних интегралов на этапе B больше среднего отношения этих же спектральных интегралов на этапе A.

### УСТРАНЕНИЕ ГРАНИЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ПОВТОРНОГО ВЕЙВЛЕТ-ПРЕОБРАЗОВАНИЯ

Естественно, что при выполнении второго этапа нахождения  $V_{\text{DCWT}}(v,t)$  для максимальной частоты  $F_{\text{max}}(t)$  используются численные методы. Особенностью численных методов является появление граничных эффектов  $V_{\text{DCWT}}(v,t)$ , проявляющиеся на границах промежутка наблюдения сигнала. Граничные эффекты проявляются как на левой ( $0 < t < t_{\text{off}}$ ), так и на правой границе ( $T - t_{\text{off}} < t < T$ ) промежутка наблюдения сигнала T. Для этих двух граничных интервалов численная реализации  $V_{\text{DCWT}}(v,t)$  приводит к значительным ошибкам. Для устранения этих ошибок результаты  $V_{\text{DCWT}}(v,t)$  на этих граничных участках обнуляются. Естественно, что при этом теряется ценная информация о частотно-

временном поведении сигнала Z(t) в этих граничных интервалах.

Причина появления граничных эффектов при вычислении непрерывного вейвлетного преобразования состоит в конечном значении протяженности материнского вейвлета Морле  $\Delta_x \approx 1$  [25], причем минимальная частота vmin, входящая в определение спектрального интервала ULF  $v = (v_{\min}; 0.003)$  Гц, связана с величиной  $\Delta_x$  соотношением  $t_{\text{off}} = 2\Delta_x / v_{\text{min}}$ . Для правильного определения частоты v<sub>min</sub> необходимо, чтобы на оставшемся интервале времени, равном  $T - 2t_{\text{off}}$ , помещалось п периодов колебаний частоты, равных  $1/v_{\min}$ , причем величина n >> 1. Промежуток наблюдения сигнала Т складывается из суммы двух граничных участков, равной  $4\Delta_x/v_{min}$ , и длины корректного определения непрерывного вейвлетного преобразования, равной *n*/v<sub>min</sub>, поэтому имеем

$$v_{\min} = \frac{n + 4\Delta_x}{T}.$$
 (6)

Учет граничных эффектов приводит к тому, что величина  $v_{\min}$  примерно в  $n + 4\Delta_x$  раз больше, чем минимальная частота  $f_{\min} = 1/T$ , используемая в Фурье-анализе [7]. Зная  $v_{\min}$  (6), можно вычислить протяженность граничного эффекта  $t_{\rm off}$  =  $2\Delta_x/v_{min}$  как на левой, так и на правой границе промежутка наблюдения сигнала Т. Для сохранения информации о низкочастотном поведении сигнала на границах интервала его наблюдения предложим алгоритм трансляционного переноса сигнала. По известной величине v<sub>min</sub> (6) можно расширить интервал изучения сигнала  $F_{\rm max}$ , увеличив его с величины T до величины T<sub>1</sub>. Начало интервала T(t=0) переносится в точку  $t_{\min}$ , и весь начальный промежуток (0, t<sub>min</sub>) нового интервала наблюдения сигнала T<sub>1</sub> заполняется постоянными значениями сигнала  $F_{\max}(t=0)$  в начальный момент времени. В качестве величины  $t_{\min}$  =  $2.5\Delta_x/v_{min} = 1.25t_{off}$ выбирается величина, немного большая, чем начальный участок  $t_{\rm off}$ , где наблюдаются граничные эффекты DCWT.

Конечный промежуток нового интервала  $(T_1 - t_{\min}; T_1)$  также заполняется постоянными значениями сигнала в конечный момент времени наблюдения  $F_{\max}(t = T)$ . В этом случае центральный интервал  $(t_{\min}; T_1 - t_{\min})$  промежутка  $T_1 > T$ , имеющий продолжительность T, в точности повторяет все значения исследуемого сигнала  $F_{\max}(t)$ , заданного на этом же промежутке наблюдения (0, T). Таким образом, все значения исследуемого сигнала  $F_{\max}(t)$  находятся в центральной части нового интервала  $T_1$ , вне области действия граничных эффектов непрерывного вейвлетного преобразования.



**Рис. 1.** Зависимости  $F_{\max}(t)$ , измеряемой в герцах, от времени t, измеряемого в секундах, для испытуемого NN со слабым воздействием антиОП (тонкая линия), и испытуемого PP с сильным воздействием антиОП (толстая линия).

Приравняем значения минимальной частоты  $v_{\min}(T) = v_{\min}(T_1)$  для периода наблюдения сигнала *T* и расширенного периода  $t_1 = T + 5\Delta_x / v_{\min}$ . В этом случае число периодов n(T) и  $n_1(T_1)$  для корректного определения частоты v<sub>min</sub> связаны соотношением  $n_1(T_1) = n(T) + 5\Delta_x$ . Следующим этапом метода трансляционного переноса сигнала является численная реализация DCWT на интервале времени (0, T<sub>1</sub>). После выполнения этой процедуры отбрасываются значения  $V_{\text{DCWT}}(v,t)$ , расположенные в начале интервала (0, t<sub>min</sub>), и в конце интервала ( $T_1 - t_{min}; T_1$ ). Последующий перенос начала отсчета времени из точки  $t = t_{\min}$  в точку t = 0 восстанавливает первоначальный интервал наблюдения по времени t = (0, T) и позволяет сравнивать значения  $V_{\text{DCWT}}(v,t)$  с учетом граничных условий с истинным поведением сигнала  $F_{\max}(t)$ .

Таким образом, метод трансляционного переноса сигнала, примененный для численной реализации DCWT, позволяет сохранить важную информацию о низкочастотном поведении сигналов вблизи начала ( $0 < t < t_{off}$ ) и вблизи конца интервала наблюдения ( $T - t_{off} < t < T$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА НЕСТАЦИОНАРНОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ РИТМА СЕРДЦА ВО ВРЕМЯ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

Обозначим через NN (negative) – испытуемого со слабым воздействием антиОП на ритмограмму сердца, а PP (positive) – испытуемого с сильным воздействием. Малое влияние антиОП на ритмограмму сердца представлено на рис. 1 (испытуемый NN – тонкая линия). На этапе *B* антиОП (600–900 с) видно, что средняя частота ритма сердца  $F_{max}(t)$  испытуемого NN практически не

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

изменяется. Средние значения  $F_{\max}(t)$  на этапе A и на этапе *B* примерно совпадают ( $\langle F_{max}(A) \rangle \approx$  $\approx \langle F_{\max}(B) \rangle$ ). Однако на этапе *B* в ритмограмме сердца NN появляется незначительное увеличение низкочастотных компонент. Большое влияние антиОП на ритмограму сердца (испытуемый РР) представлено толстой линией на рис. 1. Средняя частота на этапе В заметно выше, чем на этапе A. Кроме того, у испытуемого PP на этапе Bнаблюдается значительное возрастание низкочастотных компонент. На рис. 2 для испытуемого РР наблюдается значительное увеличение коэффициента  $d_{\text{ULF}}(t) = E_{\text{ULF}}(t) / \langle E_{\text{ULF}}(A) \rangle$  для спектрального диапазона  $\mu = ULF$  и практически неизменное поведение этого коэффициента для испытуемого NN. На рис. 3 для испытуемого PP на этапе В также заметно превышение коэффициента  $d_{\text{ULF}}(t) = E_{\text{ULF}}(t) / \langle E_{\text{ULF}}(A) \rangle$  по сравнению с испытуемым NN. Особенно это отличие видно на временах  $t \approx 1100$  с (рис. 1), при которых заметны сильные колебания частоты  $F_{\max}(t)$  для испытуемого РР.

На рис. 4 и рис. 5 заметны резкие всплески активности испытуемого PP, обозначенные жирной линией, как в LF-, так и в HF-диапазонах после прекращения этапа *B* (антиОП) в интервале времени t = (1020-1150) с. Эти всплески активности коррелируют с поведением  $F_{max}(t)$  (рис. 1) для испытуемого PP в этот интервал времени. Однако для испытуемого NN (тонкая линия) заметен всплеск активности в HF-диапазоне интервале времени ( $t \approx 1370$  с). Такой резкий всплеск активности в этот момент времени для испытуемого NN также можно обнаружить на рис. 1 (смотри два разнополярных пика высокочастотной активности на графике  $F_{max}(t)$ ).

Выполним кластеризацию всех испытуемых по силе воздействия антиОП на организм человека. В этом случае все введенные



**Рис. 2.** Зависимости коэффициента  $d_{ULF}(t) = E_{ULF}(t) / \langle E_{ULF}(A) \rangle$  от времени для испытуемого NN (тонкая линия) и испытуемого PP (толстая линия).

количественные коэффициенты приобретут индекс испытуемого i = 1, 2...K (K = 10). В качестве параметров, характеризующих силу воздействия антиОП, выберем две величи- $X_i = D_{\rm LF}^i \left( B/A \right) / << D_{\rm LF} \left( B/A \right) >>$ ны: И  $Y_i =$  $= D_{\rm LF/HF}^{i} (B/A) / \leq D_{\rm LF/HF} (B/A) >>.$ Двойными скобками <<...>> обозначено усреднение по всем испытуемым, причем для коэффициента (4)  $<< D_{LF}(B/A)>> = 1.64$ , а для коэффициента  $(5) << D_{LF/HF}(B/A) >> = 2.09.$  Заметим, что такие усредненные значения для антиОП примерно в два-три раза меньше, чем соответствующие значения для дыхательной пробы [9]. Это означает, что антиОП для отрицательных углов 30° относительно горизонта имеет меньшее воздействие на сердечный ритм, по сравнению с проведением интенсивной дыхательной пробы. Заметим, что статистически значимое различие в значениях параметров *X<sub>i</sub>* и *Y<sub>i</sub>* между юношами и девушками установить не удалось.

Величины параметров  $X_i$  и  $Y_i$ , показывающих, насколько индивидуальный параметр для *i*-го испытуемого превосходит тот же параметр, усредненный по всем испытуемым, представлены на рис. 6. Сплошной линией обозначена кривая  $X^2 + Y^2 = 1$ , разделяющая всех испытуемых на область слабого воздействия антиОП ( $X^2 + Y^2 < 1$ ) и область сильного воздействия ( $X^2 + Y^2 > 1$ ). Левой стрелкой на рис. 6 обозначен испытуемый NN (( $X_i; Y_i$ ) = (0.48; 0.57)), правой стрелкой – испытуемый PP (( $X_i; Y_i$ ) = (0.75; 2.67)).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе реализуется новый подход к вычислению нестационарной вариабельности ритма сердца во время функциональных проб.



**Рис. 3.** Зависимости коэффициента  $d_{VLF}(t) = E_{VLF}(t) / \langle E_{VLF}(A) \rangle$  от времени для испытуемого NN (тонкая линия) и испытуемого PP (толстая линия).


**Рис. 4.** Зависимости коэффициента  $d_{LF}(t) = E_{LF}(t)/\langle E_{LF}(A) \rangle$  от времени для испытуемого NN (тонкая линия) и испытуемого PP (толстая линия).

Этот подход использует анализ спектральных ЧМС ритмограммы, при котором свойств удары сердца расположены в моменты времени  $t_n = t_{n-1} + RR_n, n \ge 1$ , в которых происходят истинные удары сердца (RR<sub>n</sub> – промежутки времени между ударами сердца). Прежний подход анализировал амплитудно-модулированный сигнал ритмограммы сердца, при котором сердечные удары с разными значениями *RR<sub>n</sub>* находились на равномерной сетке времен  $t_{i+1} - t_i = \Delta t$ , причем время дискретизации сигнала  $\Delta t = RRNN$ , где RRNN — среднее значение  $RR_n$  за весь интервал наблюдения Т. Если в сигнале ритмограммы заметен значительный тренд изменения частоты сердечных ударов, который обычно встречается во многих функциональных пробах, то в этом случае подход амплитудно-модулированный сигнал дает неправильные спектральные свойства сигнала ритмограммы, в то время как наш подход ЧМС правильно воспроизводит его спектральные свойства.

В качестве примера рассмотрена антиОП, при которой осуществляется опускание головной части стола на угол, равный 30°, и удержание такого положения в течение 5 мин. Предложен новый метод устранения граничных эффектов (метод трансляционного переноса сигнала), с помощью которого можно правильно воспроизвести сверхнизкочастотные компоненты сигнала на левой и правой границе исследуемого сигнала ритмограммы. Главной особенностью рассматриваемого метода является использование повторного непрерывного вейвлетного преобразования, с помощью которого изучаются спектральные свойства ЧМС ритмограммы. Анализ спектральных свойств максимальной частоты  $F_{max}(t)$  позволяет представить сигнал нестационарной ритмограммы как совокупность вспышек активности различных спектральных диапазонов, которые



**Рис. 5.** Зависимости коэффициента  $d_{\rm HF}(t) = E_{\rm HF}(t)/\langle E_{\rm HF}(A) \rangle$  от времени для испытуемого NN (тонкая линия) и испытуемого PP (толстая линия).



**Рис. 6.** Диаграмма рассеяния параметров испытуемых  $(X_i, Y_i)$ .

возникают и исчезают в некоторые моменты времени. Система таких вспышек спектральной активности проиллюстрирована на примере построения спектральных интегралов  $E_{\mu}(t)$  в различных спектральных диапазонах  $\mu = \{ULF, VLF, LF, HF\}$ . Показано, что характерные продолжительности вспышек  $\tau_{\mu}$  в этих диапазонах равны:  $\tau_{ULF} \approx 300$  с,  $\tau_{VLF} \approx 100$  с,  $\tau_{LF} \approx 60$  с,  $\tau_{HF} \approx 7$  с.

Введенные количественные характеристики нестационарной ритмограммы показывают, что проведенная антиОП вызывает усиление вспышек спектральной активности испытуемых в спектральных диапазонах ULF, VLF и LF. Такие вспышки активности могут проявляться и после возвращения ортостатического стола в исходное горизонтальное положение (этап релаксации *C*). Проведена классификация испытуемых по силе воздействия антиОП на организм человека.

Предлагаемый метод изучения перестройки спектральной активности сердечного ритма во время переходных этапов дает возможность количественно описать динамику взаимодействия парасимпатического и симпатического отделов вегетативной нервной системы человека. Количественные параметры  $d_{\mu}(t)$  и  $d_{\mu/\nu}(t)$  позволяют оценить адаптивные возможности организма человека во время проведения различных физических, ортостатических, дыхательных, психоэмоциональных и лекарственных проб. Модель нестационарной ритмограммы как системы вспышек, возникающих и исчезающих в определенные моменты времени в определенных спектральных диапазонах, может найти свое применение для описания корреляций пространственно-временных структур во многих областях биофизики и техники. Данный метод может быть применен для описания многих нестационарных сигналов в кардиологии и нейрофизиологии, а

также для описания различных процессов в физике: вспышки в астрофизике и физике плазмы, сигналы в метрологии (демодуляция сигнала ошибки в квантовых стандартах частоты), нестационарные шумы в квантовой радиофизике, интерференционные процессы для ультракоротких источников излучения.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 18-32-20022\_мол\_а\_вед.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. .Д. М. Аронов и В. П. Лупанов, *Функциональные* пробы в кардиологии (МЕДпресс-информ, М., 2007).
- Р. М. Баевский Г. Г. Иванов, Л. В. Чирейкин и др., Вестн. аритмологии, № 24, 65 (2002).
- Г. В. Рябыкина и А. В. Соболев, Мониторирование ЭКГ с анализом вариабельности сердца (Медпрактика-М., М., 2009).
- А. Н. Флейшман, Т. В. Кораблина, С. А. Петровский и И. Д. Мартынов, Прикладная и нелинейная динамика 22, 55 (2014).
- 5. В. А. Машин, Биофизика 52 (2), 344 (2007).
- 6. U. R. Acharya, O. Faust, V. Sree, et al., Computer Method and Program in BioMedicine **113** (1), 55 (2014).
- 7. P. S. Addison, Physiol. Meas. 25, 155 (2005).
- С. В. Божокин, Е. М. Лесова, В. О. Самойлов и П. И. Толкачев, Биофизика 57 (4), 696 (2012).
- С. В. Божокин, Е. М. Лесова, В. О. Самойлов и Д. Е. Тараканов, Физиология человека 44 (1), 39 (2018).
- Х. Х. Ярулин, В. А. Горнаго, Т. Д. Васильева и др., Космич. биология и авиакосмич. медицина, № 3, 48 (1980).
- Г. Г. Иванов, Автореф. дис. ... д-ра мед. наук (М., 1990).
- А. К. Колюцкий, Г. Г. Иванов, В. Е. Дворников и др., Вестн. РУДН, сер. Медицина, № 2, 113 (2001).

- Ю. М. Ишбулатов, А. С. Караваев, В. И. Пономаренко и др., Нелинейная динамика 13 (3), 381 (2017).
- Г. А. Софронов, Н. Б. Суворов, П. И. Толкачев и Т. В. Сергеев, Мед. акад. журн. 14 (3), 38 (2014).
- М. О. Сезизбаева, М. А. Погодин, И. Н. Лаврова и др., Физиология человека 37 (2), 52 (2011).
- D. Malini, M. Kalpana, J. Med. Sci. Clin. Res. 3 (5), 5697 (2015).
- A. Martin-Yebra, E. G. Caianil, and V. Monasterio, in Proc. 8th Conf. Eur. Study Group on Cardiovasc. Oscillations (Trento, 2014), pp. 115–116, DOI: 10.1109/ESGCO.2014.6847546, https://ieeexplore. ieee.org/abstract/document/6847546.
- С. В. Яхонтов, А. В. Кулемзин и О. Н. Чуфистова, Вестн. ТГПУ 3 (43), 149 (2010)

- 19. G. Ferrettia, F. Iellamoc, P. Pizzinellie, et al., J. Hypertension 27 (3), 551 (2009).
- J. Liu, Y. Li, B. Verheyden, et al., BioMed Res. Int., 2015, Article ID 896372 (2015). DOI: 10.1155/ 2015/896372.
- 21. J. K. Shoemaker, C. W. Usselman, A. Rothwell, et al, Exp. Physiol. **97** (12), 1249 (2012).
- 22. S. Vashisth, M. Khan, R. Vijay, et. al., Int. J. Appl. Biomed. Engineer. 6 (1), 32 (2013).
- 23. С. В. Божокин и И. М. Суслова, Журн. техн. физики **83** (12), 26 (2013)
- 24. S. V. Bozhokin and I. B. Suslova, Biomed. Signal Processing and Control **10**, 34 (2014).
- 25. С. В. Божокин, С. В. Жарко, Н. В. Ларионов и др., Журн. техн. физики **87** (6), 822, (2017). .

# Non-Stationary Heart Rate Variability During Head-Down Tilt Test S.V. Bozhokin\*, E.M. Lesova\*\*, V.O. Samoilov\*\*, and K.A. Barantsev\*

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

\*\*Military Medical Academy named after S.M. Kirov, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

A new method for processing a non-stationary rhythmogram signal during head-down tilt test is proposed. The method is based on continuous wavelet transformation of the heart rate signal with a frequency modulation component. It is shown that the rhythmogram signal is a system of heart rhythm bursts in different frequency ranges. Quantitative indices for analyzing these bursts have been developed. The method of translational signal transfer is used to eliminate the boundary effects that arise when considering the low-frequency components of the rhythmogram signal.

Keywords: non-stationary cardiac rhythmogram, head down tilt test

УДК 612.13

# АНАЛИЗ ФАЗОВЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ КОЛЕБАТЕЛЬНЫМИ ПРОЦЕССАМИ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. А.В. Танканаг, А.А. Гриневич, И.В. Тихонова, Н.К. Чемерис

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

> *E-mail: tav@icb.psn.ru* Поступила в редакцию 28.11.2019 г. После доработки 28.11.2019 г. Принята к публикации 06.12.2019 г.

Проанализированы фазовые взаимосвязи между вариабельностью сердечного ритма, дыханием, колебаниями объемной скорости кровотока кожи предплечья (по данным лазерной допплеровской флоуметрии) и кровенаполнения мягких тканей подушечки пальца (по данным фотоплетизмографии) у условно-здоровых добровольцев в покое. Степень синхронизации фаз оценивали по величине функции фазовой вейвлет-когерентности. Обнаружена значительная фазовая синхронизация между колебаниями объемной скорости кровотока кожи предплечья и колебаниями кровенаполнения мягких тканей подушечки пальца в области низких частот (0.0095–0.1 Гц) и на частоте сердечных сокращений (~1 Гц). На частоте дыхания (~0.3 Гц) выявлены различия в фазовой синхронизации колебаний периферической гемодинамики (кровенаполнение и объемная скорость) как с вариабельностью сердечного ритма, так и с дыханием. Для колебаний кровенаполнения мягких тканей пальца наблюдалась высокая фазовая синхронизация как с вариабельностью сердечного ритма, так и с частотой дыхания, а для колебаний объемной скорости кровотока – низкая фазовая синхронизация как с вариабельностью сердечного ритма, так и с частотой дыхания, а для колебаний объемной скорости кровотока – низкая фазовая синхронизация как с вариабельностью сердечного ритма, так и с частотой дыхания, а для колебаний объемной скорости кровотока – низкая фазовая синхронизация в обоих случаях.

Ключевые слова: микроциркуляция, вариабельность сердечного ритма, фазовая синхронизация, колебания объемной скорости кровотока, колебания кровенаполнения, фазовая вейвлет-когерентность. **DOI:** 10.31857/S0006302920010202

Известно, что в сердечно-сосудистой системе человека существуют колебания различной природы. Некоторые колебания имеют центральное происхождение, в то время как другие регулируются не только центральными, но и локальными (местными) механизмами. Известно, что интервал между двумя последовательными сердечными сокращениями не является постоянной величиной. Это явление было впервые обнаружено Альбрехтом фон Галлером в 1760 г. и названо вариабельностью сердечного ритма (ВСР). В настоящее время анализ ВСР является одним из широко используемых неинвазивных методов оценки вегетативной регуляции сердечной деятельности [1]. Кроме того, для оценки функционирования системы микроциркуляции как важного звена сердечно-сосудистой системы широко используются различные неинвазивные методики. Двумя основными технологиями для исследований периферической гемодинамики в коже являются лазерная допплеровская флоуметрия (ЛДФ) и

фотоплетизмография (ФПГ). Метод ЛДФ позволяет оценить параметры микроциркуляторного кровотока в коже исследуемого участка [2], тогда как фотоплетизмограмма, с одной стороны, несет информацию о регуляции в периферических сосудах кожи (локальный уровень), а с другой - отражает влияние системных процессов вегетативной регуляции, поскольку основным фактором, модулирующим кровенаполнение, является сердечный выброс [3]. При этом как для ЛДФ-сигналов, так и для ФПГ-сигналов характерно наличие колебаний, которые обусловлены изменением давления крови в сосудах за счет сердечного выброса и движения легких во время дыхания, а также колебаний, отражающих функционирование механизмов локальной регуляции периферической гемодинамики. Таким образом, в функционировании сердечно-сосудистой системы человека принимают участие различные процессы, которые могут быть синхронизованы между собой. В настоящее время наиболее изученной является синхронизация между сердечным ритмом и частотой дыхания [4-9], а фазовые взаимосвязи между ВСР, дыханием и гемодинамическими па-

Сокращения: ВСР – вариабельность сердечного ритма, ЛДФ – лазерная допплеровская флоуметрия, ФПГ – фотоплетизмография, ФВК – фазовая вейвлет-когерентность.

раметрами периферических сосудов (объем и скорость движения крови) остаются мало исследованными. Мы полагаем, что анализ ВСР, ЛДФи ФПГ-сигналов, зарегистрированных одновременно, позволит получить новые диагностические критерии для оценки состояния сердечнососудистой системы, поскольку фазовые соотношения между колебательными процессами при патологиях могут существенно изменяться по сравнению с физиологической нормой.

Целью настоящего исследования было выявить и количественно оценить фазовые взаимосвязи между колебаниями в сердечно-сосудистой системе человека в состоянии покоя по данным фотоплетизмографии, лазерной допплеровской флоуметрии и электрокардиографии.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники и протокол исследования. В исследовании принимали участие 22 условно здоровых испытуемых (9 женщин и 13 мужчин) нормального телосложения без острых и хронических патологий (средний возраст  $33 \pm 8$  лет, рост –  $172 \pm 4$  см, вес –  $68 \pm 11$  кг, артериальное давление –  $109 \pm 13/74 \pm 10$  мм рт. ст., частота сердечных сокращений –  $68 \pm 11$  уд/мин). Исключающим критерием было наличие острых и хронических сердечно-сосудистых и дыхательных заболеваний, диабета и других патологий. Испытуемые воздерживались от курения, приема вазоактивных препаратов, алкогольных и кофеиносодержащих напитков по меньшей мере за 12 ч до исследования.

Регистрацию проводили в тихой комнате при 20–24°С после двадцатиминутной предварительной адаптации. Во время измерений участники находились в положении лежа на спине. Для каждого испытуемого одновременно регистрировали четыре записи – электрокардиограмму, дыхательный ритм, ЛДФ-грамму и фотоплетизмограмму. Длительность всех сигналов составляла 15 мин.

Изменения объемной скорости кожного кровотока регистрировали при помощи допплеровского флоуметра ЛАКК-02 («ЛАЗМА», Россия; длина волны 1.06 мкм, мощность излучения 1.2 мВт) на наружной поверхности правого предплечья вблизи лучезапястного сустава. Частота дискретизации ЛДФ-грамм составляла 20 Гц.

При помощи аппаратно-программного комплекса «ВНС-Микро» («Нейрософт», Россия) регистрировали электрокардиограмму во II стандартном отведении и дыхательный ритм посредством температурного датчика, расположенного в области рта и носа. Частота дискретизации для электрокардиограммы и ритма дыхания составляла 1 кГц. Зарегистрированные электрокардиограммы подвергали математической обработке в программе «Поли-Спектр» («Нейро-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

софт», Россия) с целью обнаружения QRS-комплексов и преобразования в последовательности RR-интервалов (интервалограммы).

Динамику кровенаполнения мягких тканей регистрировали на указательном пальце правой руки при помощи фотоплетизмографа «Ангиоскан» («Ангиоскан-Электроникс», Россия; длины волн 665 и 935 нм) с частотой 2 кГц.

Для последующего анализа интервалограммы записи дыхательного ритма и ФПГ-сигналы пересемплировали с частотой 20 Гц. На рис. 1 представлены фрагменты анализируемых сигналов для одного из участников.

Анализ фазовых взаимосвязей. Степень скоррелированности фаз анализируемых сигналов определяли по величине функции фазовой вейвлеткогерентности (ФВК) [10–12], которую рассчитывали следующим образом. Для каждого сигнала находили комплексную спектральную функцию  $X(\omega_k, t_n) = a_{k,n} + ib_{k,n}$ , которая описывает спектральные свойства сигнала x(t) в частотновременной области. Для пары сигналов  $x_1(t)$  и  $x_2(t)$  вычисляли разность фаз и находили коэффициенты

$$\cos(\Delta \varphi_{k,n}) = \frac{a_{1k,n}a_{2k,n} + b_{1k,n}b_{2k,n}}{\sqrt{a_{1k,n}^2 + b_{1k,n}^2} \sqrt{a_{2k,n}^2 + b_{2k,n}^2}}$$

И

$$\sin(\Delta \varphi_{k,n}) = \frac{b_{1k,n}a_{2k,n} - a_{1k,n}b_{2k,n}}{\sqrt{a_{1k,n}^2 + b_{1k,n}^2} \sqrt{a_{2k,n}^2 + b_{2k,n}^2}}$$

Затем рассчитывали усредненную по времени функцию

$$C_{\varphi}(\omega_k) = \sqrt{\left\langle \cos(\Delta \varphi_{k,n}) \right\rangle^2 + \left\langle \sin(\Delta \varphi_{k,n}) \right\rangle^2},$$

которая принимает значения от 0 до 1 и несет информацию о степени фазовой когерентности двух сигналов  $x_1(t)$  и  $x_2(t)$  на частоте  $\omega_k$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного исследования обнаружена значительная фазовая синхронизация между колебаниями скорости микроциркуляторного кровотока кожи предплечья и динамикой кровенаполнения мягких тканей подушечки пальца в области низких частот (0.0095-0.1 Гц) и на частоте сердечных сокращений (~1 Гц) (рис. 2). Медианные значения ФВК для этих частотных областей равны ~ 0.5. Известно, что колебания микроциркуляторного кровотока в области низких частот обусловлены различными физиологическими процессами: активностью гладкомышечных клеток стенок сосудов, нейрогенным контролем и сосудодвигательной активностью эндотелия [13]. Для колебаний кровенаполнения тканей подушечки пальца, регистрируемых мето-



**Рис. 1.** Фрагменты анализируемых сигналов для одного участника: (а) – дыхание, (б) – ВСР, (в) – объемный кровоток кожи предплечья, (г) – кровенаполнение подушечки указательного пальца.

дом ФПГ, также выделяют несколько частотных интервалов, колебания в которых имеют различное физиологическое происхождение. Однако трактовка их генезиса, особенно в области низких частот, у разных авторов отличается. Так, например, некоторые исследователи [14-16] придерживаются границ частотных интервалов, принятых при исследовании кожной микрогемодинамики. Другие авторы склоняются к частотным диапазонам, характерным для анализа спектрального состава ВСР [2, 17] и выделяют среди низкочастотных колебаний в ФПГ-сигналах колебания симпатического тонуса и эфферентной вагусной активности, колебания, обусловленные функционированием энергосберегающих механизмов и механизмов терморегуляции, а также колебания, вызываемые миогенным ответом на изменение

давления в сосудах. Кроме того, как для колебаний кожной микрогемодинамики, так и для колебаний кровенаполнения общими являются диапазоны, связанные с респираторной и сердечной активностью. Таким образом, наблюдаемая фазовая синхронизация колебаний скорости кожного кровотока и кровенаполнения тканей на частоте сердечного ритма обусловлена общим механизмом генерации колебаний — сердечным выбросом, а в области низких частот — общими механизмами, регулирующими как объемную скорость кожного кровотока, так и кровенаполнение мягких тканей подушечки пальца.

Анализ фазовых взаимосвязей между колебаниями периферической гемодинамики (по данным ЛДФ и ФПГ) и частотой дыхания показал следующие результаты (рис. 3). На частоте дыха-



**Рис. 2.** Значения функции ФВК между колебаниями кровенаполнения подушечки указательного пальца и колебаниями кожного кровотока предплечья. Приведены медианы, 25-й и 75-й процентили.

ния (~ 0.3 Гц) наблюдается высокая фазовая синхронизация ( $Me \sim 0.7$ ) между дыхательным ритмом и колебаниями кровенаполнения мягких тканей и низкая фазовая синхронизация ( $Me \sim 0.2$ ) между дыханием и колебаниями скорости кожного кровотока.

Сходные результаты наблюдались и для фазовых взаимосвязей колебаний периферической гемодинамики с ВСР (рис. 4). На частоте дыхания (~ 0.3 Гц) обнаружена значительная фазовая синхронизация ( $Me \sim 0.6$ ) между ВСР и колебаниями кровенаполнения мягких тканей и низкая фазовая синхронизация ( $Me \sim 0.2$ ) между ВСР и колебаниями скорости кожного кровотока. Кроме того, как для колебаний объемной скорости кровотока, так и для колебаний кровенаполнения мягких тканей пальца наблюдается значительная фазовая синхронизация ( $Me \sim 0.5$ ) с ВСР на частотах ~ 0.01 Гц и ~ 0.1 Гц (рис. 4).

Наблюдаемые различия в фазовой синхронизации колебаний объемной скорости кожного кровотока и кровенаполнения мягких тканей пальца с ВСР и дыхательным ритмом на частоте дыхания могут быть объяснены следующим обра-



Рис. 3. Значения функции ФВК между частотой дыхания и колебаниями кровенаполнения подушечки указательного пальца («ЧД–ФПГ»), а также между частотой дыхания и колебаниями кожного кровотока предплечья («ЧД–ЛДФ»). Приведены медианы, 25-й и 75-й процентили.



**Рис. 4.** Значения функции ФВК между ВСР и колебаниями кровенаполнения подушечки указательного пальца («ВСР–ФПГ»), а также между ВСР и колебаниями кожного кровотока предплечья («ВСР–ЛДФ»). Приведены медианы, 25-й и 75-й процентили.

зом. Известно, что респираторно-связанные колебания периферической гемодинамики более выражены в венулярной части сердечно-сосудистого русла. В нашей работе был использован пальцевой вариант регистрации кровенаполнения, т. е. ФПГ-зонд закрепляли на дистальной фаланге, и в зондируемый объем попадали все сосуды, в том числе вены, мелкие артерии, артериовенозные анастомозы и микрососуды. Напротив, при регистрации кожной перфузии методом ЛДФ в измеряемый объем попадали преимущественно микрососуды (артериолы, капилляры и венулы). Поэтому в состоянии покоя респираторно-связанные колебания в ФПГ-сигналах могут быть выражены в большей степени, чем в ЛДФ-сигналах. Кроме того, следует также отметить, что на полученные результаты может оказывать влияние различная плотность симпатической иннервации в месте регистрации ФПГ- и ЛДФ-сигналов. Известно, что существует связь между дыханием и активностью симпатического отдела вегетативной нервной системы. В частности, паттерн симпатической активности возрастает во время вдоха и достигает пика во время позднего вдоха и начала постинспираторной активности [18-20]. В настоящем исследовании регистрация ФПГ- и ЛДФ-сигналов осуществлялась с подушечки пальца и кожи предплечья соответственно, т. е. с участков, имеющих различную выраженность иннервации симпатическими волокнами вегетативной нервной системы. Кожа предплечья характеризуется меньшей плотностью симпатической иннервации по сравнению с кожей пальца [21]. Таким образом, респираторная активность через симпатически опосредованную вазоконстрикцию может по-разному модулировать ФПГ-

и ЛДФ-сигналы [22]. Однако высказанные предположения требуют проведения дополнительных исследований с использованием различных функциональных тестов, например, дыхательных проб.

Выявленная значительная фазовая синхронизация между ВСР и колебаниями периферической гемодинамики (по данным ФПГ и ЛДФ) на частотах ~ 0.01 Гц и ~ 0.1 Гц также свидетельствует в пользу гипотезы об общих механизмах, регулирующих объемную скорость кожного кровотока и кровенаполнение мягких тканей пальца, но это предположение нуждается в дополнительном экспериментальном подтверждении.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование фазовых взаимоотношений между ВСР, частотой дыхания, колебаниями объемной скорости кровотока кожи предплечья (по данным ЛДФ) и колебаниями кровенаполнения мягких тканей пальца (по данным ФПГ) у условно здоровых добровольцев в состоянии покоя. В области низких частот (0.0095-0.1 Гц) обнаружена значительная фазовая синхронизация между колебаниями объемной скорости кровотока кожи предплечья и колебаниями кровенаполнения мягких тканей. Кроме того, выявлена значительная фазовая синхронизация между ВСР и колебаниями кожной гемодинамики (объемная скорость и кровенаполнение) на частотах ~ 0.01 Гц и ~0.1 Гц. На частоте дыхания (~ 0.3 Гц) выявлены различия в фазовой синхронизации колебаний периферической гемодинамики (по данным ЛДФ и ФПГ) как с ВСР, так и с частотой дыхания. Для колебаний кровенаполнения мягких тканей пальца наблюда-

лась высокая фазовая синхронизация как с ВСР, так и с частотой дыхания, а для колебаний объемной скорости кровотока — низкая фазовая синхронизация в обоих случаях. Полученные результаты могут послужить основой для создания новых диагностических критериев оценки состояния микрососудистого русла при различных патологиях.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00292).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2002 г. Каждый испытуемый был проинформирован о протоколе и целях исследования и дал свое согласие на участие в исследовании.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Л. А. Бокерия, О. Л. Бокерия и И. В. Волковская, Анналы аритмологии, № 4, 21 (2009).
- Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем. Колебания, информация, нелинейность: Руководство для врачей, под ред. А. И. Крупаткина и В. В. Сидорова (Либроком, М., 2013).

- 3. J. Allen, Physiol. Meas. 28, R1 (2007).
- 4. C. Schafer, M. G. Rosenblum, J. Kurths, and H.-H. Abel, Nature **392**, 239 (1998).
- C. Schafer, M. G. Rosenblum, H.-H. Abel, and J. Kurths J. Phys. Rev. E. 60, 857 (1999).
- 6. A. Bracic-Lotric and A. Stefanovska, Physica A 283, 451 (2000).
- N. B. Janson, A. G. Balanov, V. S. Anishchenko, and P. V. E. McClintock. Phys. Rev. Lett. 86, 1749 (2001).
- S. Rzeczinski, N. B. Janson, A. G. Balanov, and P. V. E. McClintock, Phys. Rev. E 66, 051909 (2002).
- R. Bartsch, J. W. Kantelhardt, T. Penzel, and S. Havlin, Phys. Rev. Lett. 98, 054102 (2007).
- A. Bandrivskyy, A. Bernjak, P. McClintock, and A. Stefanovska, Cardiovasc. Eng. 4, 89 (2004).
- 11. A. V. Tankanag, A. A. Grinevich, T. V. Kirilina, et al., Microvasc. Res. **95**, 53 (2014).
- А. В. Танканаг, А. А. Гриневич, И. В. Тихонова и др., Биофизика 62 (4), 769 (2017).
- 13. A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo, IEEE Trans. Biomed. Eng. **46**, 1230 (1999).
- 14. A. A. Sagaidachnyi, A. V. Skripal, A.V. Fomin, and D. A. Usanov, Physiol Meas. **35** (2), 153 (2014).
- 15. I. Mizeva, C. Di Maria, P. Frick, et al., J. Biomed. Optics **20** (3), 037007 (2015).
- L. M. Rodrigues, C. Rocha, H. Ferreira, and H. Silva. Sci. Rep. 9, 16951 (2019).
- 17. L. M. Nilsson, Anesth. Analg. 117 (4), 859 (2013).
- T. Miyawaki, J. Minson, L. Arnolda, et al., Am. J. Physiol. 271 (5, Pt 2), R1221 (1996).
- D. B. Zoccal, A. E. Simms, L. G. H. Bonagamba, et al., J. Physiol. 586 (13), 3253 (2008).
- 20. J. H. Costa-Silva, D. B. Zoccal, and B. H. Machado. J. Neurophysiol. **103** (4), 2095 (2010).
- M. E. Muck-Weymann, H. P. Albrecht, D. Hager, et al., Microvasc. Res. 52, 69 (1996).
- M. Nitzan, I. Faib, and H. Friedman. J. Biomed. Optics 11 (4), 040506 (2006).

# Analysis of Phase Interactions between Oscillatory Processes in Human Cardiovascular System

#### A.V. Tankanag, A.A. Grinevich, I.V. Tikhonova, and N.K. Chemeris

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

The phase interactions between heart rate variability, respiration, forearm skin blood flow oscillations (with laser Doppler flowmetry) and finger-pad tissue blood volume oscillations (with photoplethysmography) in healthy subjects at rest were analyzed. The degree of synchronization between phases of analyzed signals was estimated with the value of wavelet phase coherence function. High phase synchronization between tissue blood volume oscillations and skin blood flow ones was found in low frequency band (0.0095-0.1 Hz) and at frequency of the heart rate ( $\sim 1$  Hz). At frequency of respiration ( $\sim 0.3$  Hz) there are differences in phase synchronization between peripheral hemodynamic oscillations (blood volume and blood flow) and heart rate variability or respiration. High phase synchronization was found between finger-pad blood volume oscillations and heart rate variability or respiration. On the contrary, low phase synchronization was observed between forearm skin blood flow oscillations and heart rate variability or respiration.

Keywords: microcirculation, heart rate variability, phase synchronization, skin blood flow oscillations, tissue blood volume oscillations, wavelet phase coherence

## — БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 573.7.017.6+519.711.3

## СМЕРТНОСТЬ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СТАРЕНИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

#### © 2020 г. В.Н. Крутько, В.И. Донцов

Институт системного анализа Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 9

> *E-mail: dontsovvi@mail.ru* Поступила в редакцию 04.05.2019 г. После доработки 26.11.2019 г. Принята к публикации 28.11.2019 г.

С использованием данных по 40 странам в исторический период за два с половиной века изучены особенности возрастных изменений скорости старения для стран мира, а также возможности и ограничения метода количественной оценки старения по показателям, связанным с анализом смертности популяций. Интенсивность смертности и ее производные показатели – коэффициенты формулы Гомперца ( $m(t) = R_0 \exp(k \times t)$ , где m – интенсивность смертности для возраста t,  $R_0$  – начальный уровень смертности, k – скорость нарастания смертности; считается, что оба компонента связаны со старением), и формулы Гомперца-Мейкема (дополняется коэффициентом А, отражающим неизменяемый уровень смертности, зависимый от внешних условий), в реальности испытывают на себе все внешние влияния на смертность, поэтому они лишь косвенно отражают старение. Компоненты A и  $R_0$  не обязательно равномерны для разных возрастов и влияют друг на друга, изменяясь в противофазе, как и компоненты  $R_0$  и k. Для характеристики внешних влияний на смертность лучше использовать компонент  $R_0$  формулы Гомперца, а для оценки собственно старения — ее компонент k для высоких значений внешних влияний на смертность; в то же время для низких значений А лучше использовать компонент k формулы Гомперца–Мейкема. При этом абсолютное сравнение компонентов формул Гомперца и Гомперца–Мейкема часто не правомерно, так как они могут различаться в разы. Приращение смертности d(m) – наилучший показатель, отражающий собственно биологическую природу старения и отражающий изменения ее для данного возраста, но он может отражать и частные изменения общей смертности для определенных возрастов. Использование последнего показателя позволяет видеть, что основные закономерности процесса старения сохраняются на протяжении всех исторических периодов и для всех стран. Цикличность и изломанность кривых смертности в ранние периоды истории – недостатки методов регистрации первичных данных, а не действительное явление. В целом следует заключить, что придание компонентам формул биологического значения следует проводить осторожно, проверяя математические выводы собственно биологическими данными и методами.

Ключевые слова: старение, смертность, формула Гомперца—Мейкема, скорость старения, изменение смертности в истории, изменение скорости старения.

DOI: 10.31857/S0006302920010214

Резкое и продолжающееся постарение населения в XX веке на фоне снижающейся рождаемости создает выраженные социально-экономические трудности, что определяет возрастающий интерес к проблемам старения во всем мире и возможностям влияния на него [1]. При этом возрастает значение методов количественной оценки процесса старения, особенно на уровне популяций — стран. Анализ возрастной смертности является таким общепризнанным методом оценки старения на уровне популяций [2] еще со времени исследований Б. Гомперца [3] (экспоненциальное нарастание интенсивности смертности с возрастом как основной закон старения). Однако использование этого метода до сих пор не позволило ответить на ряд вопросов: о природе старения, интерпретации самого метода, о биологическом пределе продолжительности жизни [4, 5], изменении скорости старения на протяжении жизни, изменении в истории и для разных стран скорости старения, о наличии снижения скорости старения долгожителей, об увеличении максимальной продолжительности жизни в истории [6, 7], сохраняется ли экспоненциальное и равномерное увеличение смертности в течение жизни или в возрасте долгожителей снижается вплоть до и выхода на плато [7] и ряд других. Цель исследования — изучить особенности возрастных изменений скорости старения для стран мира в истории и определить возможности и ограничения метода оценки старения по показателям, связанным с оценкой смертности популяций.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучали изменения возрастной смертности для 40 стран мира за период 1750—2014 гг. по данным Human Mortality Database [8]: таблицам выживаемости для когорты в 100000 человек с дожитием за каждый год с 1 до 110 лет для исторических периодов в 10 лет.

По данным таблиц дожития рассчитывали показатели формулы Гомперца и Гомперца—Мейкема (в последнем случае формула Гомперца дополнена коэффициентом Мейкема A), используя известные методы [2, 9]:  $m = A + R_0 \exp(k \cdot t)$ , где A — константа, показатель внешних влияний на смертность;  $R_0$  и k — коэффициенты, которые, как принято считать, отражают биологическую природу смертности, т. е. скорость старения. Строили графики изменения общей возрастной интенсивности смертности m и ее приращения d(m), а также графики разницы общей смертности и внешних влияний на нее (m - A).

Сравнивали истинную интенсивность смертности с расчетной, вычисленной по параметрам формулы Гомперца—Мейкема, и оценивали коэффициент корреляции *г*. Для нивелирования случайных выбросов значений кривой приращения интенсивности смертности использовали линейное сглаживание по трем-пяти точкам.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Хотя формула Гомперца (В. Gompertz, 1825) первоначально была получена чисто эмпирически, исходя из статистики смертности [3], в настоящее время она может быть выведена теоретически. Из общепринятого определения «старение — это снижение общей жизнеспособности с возрастом» и представления о том, что это является самопроизвольным, вероятностным процессом, можно рассматривать снижение жизнеспособности Х с возрастом как процесс, аналогичный процессу радиоактивного распада, когда количество элементов уменьшается с течением времени и зависит только от их присутствия в данный момент:  $dX/dt = -k \cdot X$ , где *k* – коэффициент пропорциональности. Соответственно для времени t количество оставшихся жизнеспособных элементов будет следующим:  $X(t) = X_0 \exp(-k \cdot t).$ 

В то же время общая уязвимость и в конечном счете общая смертность для популяции обратно пропорциональна жизнеспособности: m = 1/X,

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020



Рис. 1. Изменения интенсивности смертности с возрастом (Нидерланды, 1950–59 гг.). По оси ординат – интенсивность смертности (логарифмический масштаб), по оси абсцисс – возраст доживших. Реальная кривая – жирная линия, расчетная кривая при обработке данных по формуле Гомперца–Мейкема – тонкая линия.

что приводит нас к известной формуле Гомперца-Мейкема с общепринятыми коэффициентами и поправкой – коэффициентом Мейкема:  $m(t) = R_0 \exp(k \cdot t) + A.$ 

Для оценки скорости старения используют показатель m - A (интенсивность смертности без фонового внешнего компонента А), коэффициент возрастной смертности k, определяющий скорость нарастания смертности, зависимой от старения, и коэффициент R<sub>0</sub>, определяющий начальный уровень смертности и характеризующий «начальный уровень старения». Также можно использовать приращение интенсивности смертности d(m), которое нивелирует константу A; при этом показатель d(m) лучше отражает собственно скорость старения, чем m - A, так как в последнем случае используется среднее значение коэффициента А, который в реальности может значительно меняться для различных возрастных периодов.

Наконец, снижение скорости старения позволяет дожить до более поздних возрастов, что позволяет для оценки старения использовать возраст полного вымирания для стандартной когорты (100000 человек) — максимальную продолжительность жизни.

Идеальным примером графика Гомперца-Мейкема можно считать график для Нидерландов за 1950 г. (рис. 1): близкий к прямой график, совпадающий с реальной кривой интенсивности смертности *m* для 20–90 лет и с отклонением вниз от расчетной кривой Гомперца–Мейкема для ре-



**Рис.** 2. Изменения интенсивности смертности с возрастом для разных стран в 1930–39 гг. По оси ординат – интенсивность смертности (логарифмический масштаб), по оси абсцисс – возраст доживших. Снизу вверх: Австралия (жирная линия), Канада, Франция, Финляндия.

альной кривой смертности для возрастов долгожителей.

В большинстве случаев, однако, имеют место графики интенсивности смертности самой разной формы для разных стран и разных возрастных периодов (рис. 2). Принято считать, что различия связаны с различием внешних влияний на



Рис. 3. Изменения различных показателей интенсивности смертности с возрастом (Дания, 1930–39 гг.). По оси ординат – параметры (логарифмический масштаб), по оси абсцисс – возраст доживших. Сверху вниз: расчетная и реальная кривые интенсивности смертности (тонкая и жирная линии); разница общей интенсивности смертности смертности и внешней компоненты: m - A (средняя линия); приращение интенсивности смертности d(m) (нижняя линия).



Рис. 4. Изменения различных показателей интенсивности смертности с возрастом (Россия, 2014 г.). По оси ординат — параметры, логарифмический масштаб, по оси абсцисс — возраст доживших. Сверху вниз: расчетная и реальная кривые интенсивности смертности (тонкая и жирная линии); разница общей интенсивности смертности и внешней компоненты: m - A (средняя линия); приращение интенсивности смертности d(m) (нижняя линия).

смертность, что отражает коэффициент *А* формулы Гомперца-Мейкема.

Использование показателей смертности без внешнего коэффициента (m - A) и использование приращения смертности d(m), также убирающего внешние влияния на смертность, показывает (рис. 3), что если для графика общей смертности m линейный участок наблюдается для 55–75 лет, то для графиков m - A и d(m) - для 20–90 лет.

Другие отмечаемые особенности: вклад внешнего коэффициента A в общую смертность m с возрастом резко снижается, так как она не может уже «соперничать» с экспонентой нарастания смертности по причинам собственно старения; кроме того, «ступенька» в 20–40 лет для общей смертности определяется также во многом константой A.

Графики m - A и d(m) параллельны, так как отражают одно и то же — собственно скорость старения и имеют прямую форму на гораздо большем возрастном периоде, чем график реальной интенсивности смертности m. Однако параллельность и прямая форма графика наблюдаются далеко не всегда (рис. 4), и «ступенька» может не нивелироваться константой A.

Колебания графика d(m) также могут быть не связаны с изменениями собственно старения (рис. 4), а отражают, видимо, частные особенности изменения общей интенсивности смертности для ряда возрастов.



**Рис. 5.** Избирательное влияние внешних условий на смертность в узком диапазоне возрастов (Италия, 1910–1919 гг.). По оси ординат – возраст доживших; по оси абсцисс: (а) – вероятность смерти (за год), сверху вниз – 1910–1919 гг. (жирная кривая), 1900–1909 гг. (тонкая линия) и 1920–1929 гг. (пунктир); (б) – интенсивность смертности, логарифмический масштаб, те же обозначения кривых.

Для России в 2014 г. график m - A показывает инверсию (повышение) общей смертности долгожителей, что обычно для конца XX — начала XXI веков, но график d(m) показывает снижение, что указывает на сохранение отмечаемого всегда в истории для всех стран феномена замедления старения для возрастов долгожителей [10].

Также, исходя из природы показателей, одинаковая скорость старения для m - A выражается горизонтальной прямой, как и для графика общей смертности m, но для графика d(m) это 0, а снижение скорости старения регистрируется как отрицательные значения.

Оценка старения по компонентам формулы Гомперца—Мейкема (A,  $R_0$  и k) также имеет свои ограничения. Так, для времен Первой мировой войны график для Италии (1910—1919 гг.) показывает «горб» смертности для молодых и средних возрастов (рис. 5а), что делает невозможным вычисление обычными методами формулы Гомперца—Мейкема (рис. 5б).

Таким образом, показатель *А* может резко различаться для разных возрастов, кроме того, вполне вероятно, что одинаковые влияния оказываются не одинаковыми для лиц разного возраста ввиду того же процесса старения.

Также можно видеть, что все три показателя формулы тесно связаны между собой. На примере Франции 1850—2000 гг. видно (рис. 6), что компоненты A и  $R_0$  фактически дополняют друг друга, реагируя в противофазе на изменение другого; значительные, в разы, изменения близких значений  $R_0$  вряд ли означают изменения в разы в ближайшие годы и начального уровня старения: это чисто математический феномен. Аналогичным образом изменяются в противофазе коэффициенты  $R_0$  и k.

График Гомперца в ряде случаев оказывается предпочтительнее, чем график Гомперца—Мейкема, так как его компонент k практически не реагирует на внешние влияния. Однако для низких значений A (и  $R_0$ ), характерных в современности для всех развитых и большинства развивающихся стран, отмечается повышение k для графика Гомперца, чего нет для графика Гомперца—Мейкема, что также отражает, видимо, математические особенности вычисления компонентов формулы, а не собственно факт ускорения старения для современности.

Таким образом, для характеристики внешних влияний на смертность лучше использовать компонент  $R_0$  формулы Гомперца, а для оценки старения — компонент k для высоких значений внешних влияний на смертность; в то же время для низких значений внешних влияний на смертность лучше использовать компонент k формулы Гомперца—Мейкема. Следует также отметить, что прямое абсолютное сравнение компонентов формул Гомперца и Гомперца-Мейкема неправомерно, так как они могут различаться в разы.

Если все компоненты формул отражают средние значения для всего возрастного периода (1– 110 лет), то показатель приращения интенсивности смертности реагирует на изменение собственно старения и для настоящего момента и поэтому является наиболее предпочтительным для оценки собственно скорости старения. На рис. 7 видно, что графики данного показателя практически



Рис. 6. Изменение компонентов формулы Гомперца–Мейкема в истории (Франция, 1850–2000 гг.). По оси ординат – значения параметров, по оси абсцисс – годы; (а) – компоненты  $A^*10$  и  $R_0^*1000$ , логарифмический масштаб; (б) – компоненты  $R_0^*1000$  и  $k^*2$ , обычный масштаб.

совпадают для разных стран (рис. 6а) и разных исторических периодов для одной и той же страны (рис. 6б).

Использование этого показателя позволяет также видеть сохранение эффекта снижения скорости старения для возрастов долгожителей во все исторические периоды.

Еще одной особенностью графиков интенсивности смертности для ранних исторических периодов (до 1850-х гг.) является цикличность всех показателей; десятилетний период циклов, совпадающий с периодом представления данных, указывает, что это — феномен регистрации смертности, что резко затрудняет анализ закономерностей изменения смертности и старения для этих периодов. Аналогично затрудняет исследования изломанность графика для ряда стран, сменяющаяся к концу XX века на прямую форму графика, что также является результатом недостаточной корректности регистрации данных.

Резкое повышение средней продолжительности жизни на протяжении 200 лет (за 1750–1950 гг. – с 35–40 до 70–75 лет) не сопровождается повышением максимальной продолжительности жизни (она колеблется в пределах 102–105 лет для разных стран, не имея тенденции к повышению в течение



**Рис. 7.** Приращение интенсивности смертности для разных стран (а) и в истории одной страны (б). По оси ординат – приращение интенсивности смертности d(m), логарифмический масштаб; по оси абсцисс – возраст доживших. (а) – Ирландия, Канада, Португалия, Финляндия, 2000–2010 гг.; (б) – Франция, 1816, 1850, 1900 и 1950 гг.

200 лет). Однако с середины XX века средняя продолжительность жизни выходит в область долгожителей (возраст более 80 лет). Это резко увеличивает количество доживших до возрастов долгожителей (для 1850 и 2010 гг. для Франции: до 80 лет – с 7.8% до 65.6%, до 100 лет – с 0.5% до 14.3%, до 105 лет: с 0 до 0.9%) и, видимо, чисто статистически повышает максимальную продолжительность жизни (со 105 до 114 лет соответственно для Франции 1850 и 2010 гг.).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественной оценки скорости старения человека оптимальными считаются демографические методы — повозрастная оценка интенсивности смертности на основании таблиц дожития; график Гомперца—Мейкема остается важнейшим, коэффициентам которого придается определенное биологическое значение: A — константа Мейкема, отражающая внешние влияния на смертность;  $R_0$  и k, отражающие соответственно начальный уровень старения и величину его экспоненциального нарастания с возрастом [2, 3, 9].

Оценка старения по коэффициентам формулы Гомперца—Мейкема имеет, однако, свои ограничения. Так, пример времен Первой мировой войны, когда вероятность смерти для узкого диапазона возрастов была резко повышена, отражает возможную неравномерность внешних влияний на смертность разных возрастов, что не учитывает компонент *A*, являющийся константой. Кроме того, вполне вероятно, что одинаковые влияния оказываются не одинаковыми для лиц разного возраста ввиду того же процесса старения.

Все три показателя формулы оказываются к тому же тесно связанными между собой и фактически дополняют, влияя друг на друга и изменяясь в противофазе: A и  $R_0$ ,  $R_0$  и k. При этом резкие и частые колебания компонентов для ближайших возрастов показывают, что это, видимо, чисто математический феномен, а не реальные изменения биологического старения. На протяжении двух с половиной веков и на примере 40 стран можно легко видеть, что все компоненты формулы реагируют на внешние влияния — голод, войны, эпидемии, являющиеся чисто внешними причинами изменения смертности.

Кроме того, компоненты формул Гомперца и Гомперца—Мейкема оказываются не идентичны и по-разному реагируют на внешние влияния на смертность. Для характеристики внешних влияний на смертность лучше использовать  $R_0$  формулы Гомперца, а для оценки старения — k для высоких значений внешних влияний на смертность, в то же время для низких значений лучше использовать компонент k формулы Гомперца—Мейкема. При этом абсолютное сравнение компонен-

тов формул Гомперца и Гомперца—Мейкема не правомерно, так как они могут различаться в разы.

Важно, что все компоненты формул отражают средние значения для всего возрастного периода 1-110 лет, в то время как показатель приращения интенсивности смертности реагирует на изменение собственно старения и для настоящего момента; кроме того, этот показатель не требует специальных сложных вычислений, являясь просто разностью соседних значений интенсивности смертности *m*.

Таким образом, показатель приращения интенсивности смертности d(m) является наиболее предпочтительным для оценки собственно скорости старения, что давно отмечено в литературе [9]. Интересно, что графики данного показателя практически совпадают для разных стран и разных исторических периодов для одной и той же страны вплоть до середины XX века. Этот показатель также позволяет видеть сохранение отмечаемого всегда в истории и для всех стран феномена замедления старения для возрастов долгожителей: феномен инверсии смертности для этих возрастов для современности — результат внешних влияний на смертность [10].

Для всех показателей также важна точность регистрации данных для таблиц дожития. Отмечаемая для ранних исторических периодов (до 1850х годов) цикличность всех показателей и десятилетний период циклов, совпадающий с периодом представления данных, указывает, что это – феномен регистрации смертности, как и наблюдаемая для ряда стран изломанность графика смертности. Все это резко затрудняет анализ закономерностей изменения смертности и старения для ранних исторических периодов.

В целом, однако, можно заключить, что на протяжении всех исторических периодов и всех стран сохраняются типичные закономерности старения — линейное повышение скорости старения (в логарифмическом масштабе, отражающем экспоненциальный закон нарастания скорости старения с возрастом) с периода окончания роста и развития до возрастов долгожителей, и снижение скорости старения в возрастах долгожителей.

Снижение скорости старения для возраста долгожителей отражает неоднородность популяции, так как наследственность может вносить, видимо, до 25% изменений в длительность жизни, формируя феномен долгожителей [9, 11].

Влияние внешних условий на скорость старения также вполне вероятно и отмечается в литературе при использовании различных методов оценки старения [12–15].

Кроме того, мы предложили взгляд на старение, сближающий патологические изменения при естественном старении и изменения при возрастных заболеваниях [16]. Изменения общей жизнеспособности эквивалентно влиянию на биологическое старение вне зависимости от причин, поэтому можно ожидать, что профилактика возрастных заболеваний и высокий уровень медико-социальной помощи окажут значимые влияния на видимую скорость старения [16]. В то же время в более старших возрастах долгожителей выраженные изменения физиологических показателей при естественном старении нивелируют этот эффект для доживших до этих возрастов обычных лиц и ведут к инверсии сниженной смертности в возрастах долгожителей на повышенную.

Резкое повышение средней продолжительности жизни на протяжении 200 лет (1750-1950 гг.) не сопровожлается повышением максимальной продолжительности жизни, однако, с середины XX века средняя продолжительность жизни выходит в область долгожителей (возраст более 80 лет), что резко увеличивает количество доживших до самых старших возрастов и чисто статистически повышает максимальную продолжительность жизни, которая, таким образом, уже не является показателем только биологического старения. Максимальная продолжительность жизни признается важнейшим показателем старения как для человека, так и в экспериментах по влиянию геропротекторов на продолжительность жизни животных, однако, как можно видеть, применять этот показатель также нужно осторожно.

В целом геронтологический анализ популяционных изменений исторической динамики продолжительности жизни и причин смерти в различных странах является в настоящее время одним из наиболее актуальных научнопрактических вопросов [17], как и моделирование количественного анализа продолжительности жизни [18], однако зачастую этот метод проводится не достаточно аккуратно, не учитывая ограничения показателей старения при анализе смертности популяций.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение изменений возрастной смертности является давним общепринятым методом изучения скорости старения как в эксперименте на животных при изучении влияния средств продления жизни, так и для человека. Обработка данных таблиц дожития с вычислением коэффициентов формулы Гомперца–Мейкема – важнейший метод оценки старения, так как коэффициентам формулы придается биологический смысл, связанный со старением организма.

Однако сравнение коэффициентов формулы Гомперца-Мейкема для разных стран в течение

больших исторических периодов показывает, что все компоненты формулы могут быть математически связаны между собой и отражать влияния внешних условий на смертность, что требует осторожности в интерпретации их показателей. Кроме того, следует учитывать возможность неточности регистрации первичных данных для таблиц дожития.

Наилучшим показателем скорости старения является, видимо, показатель приращения интенсивности смертности, отражающий изменения ее для данного возраста. Его использование позволяет видеть, что основные закономерности процесса старения сохраняются на протяжении всех исторических периодов и для всех стран: скорость старения изменяется линейно (в логарифмическом масштабе) в пределах 20–90 лет, с последующим снижением скорости старения долгожителей, что носит, видимо, наследственный характер.

#### 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. Т. М. Смирнова и В. Н. Крутько, Клинич. геронтология **24** (9–10), 63 (2018).
- V. Canudas-Romo, S. Mazzuco, and L. Zanotto, in *Integrated population biology and modeling*, part A, vol. 39 of Handbook of Statistics, Ed. by A. S. S. Rao and C. Rao (Elsevier, Amsterdam, 2018), pp. 405–442.
- 3. B. Gompertz, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A **115**, 513 (1825).
- 4. X. Dong, B. Milholland, and J. Vijg, Nature **538** (7624), 257 (2016).
- 5. A. Lenart and J. W. Vaupel, Nature **546** (7660), E13 (2107).
- J. De Beer, A. Bardoutsos, and F. Janssen, Nature 546 (7670), E16 (2017).
- E. Barbi, F. Lagona, M. Marsili, et al., Science 362 (6412), pii: eaav3229 (2018).
- 8. *The Human Mortality Database*. http://www.mortality.org (Last modified: Jun-2013 Year, Available 25.01.2019).
- L. A. Gavrilov and N. S. Gavrilova, *The Biology of Life* Span: A Quantitative Approach (Harwood Acad. Publ., N.-Y., 1991).
- 10. В. И. Донцов, Здравоохранение Российской Федерации **63** (1), 42 (2019).

- 11. S. Dato, G. Rose, P. Crocco, et al., Mech. Ageing Dev. **165** (Pt B), 147 (2017).
- 12. L. Hayflick, PLoS Genet. 3 (12), 220 (2007).
- 13. A. I. Ribeiro, E. T. Krainski, M. S. Carvalho, et al., Geospat. Health **12** (2), 581 (2017).
- C. E. Finch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (1), 1718 (2010).
- 15. А. А. Гриневич, А. В. Танканаг и Н. К. Чемерис, Биофизика **64** (1), 140 (2019).
- V. N. Krut'ko, V. I. Dontsov, V. A. Khalyavkin, et al., Frontiers Biosci., Landmark 23, 909 (2018).
- 17. В. Б. Мамаев, Биофизика 63 (5), 1035 (2018).
- Н. Л. Векшин и М. С. Фролова, Биофизика 64 (1), 162 (2019).

## Mortality as an Indicator of Aging: Possibilities and Limitations

#### V.N. Krut'ko and V.I. Dontsov

Institute for Systems Analysis, Federal Research Center «Computer Science and Control» of Russian Academy of Sciences, prosp. 60-letiya Oktyabrya 9, Moscow, 117312 Russia

Using data gathered on 40 countries throughout a historical period covering two and a half centuries, we studied the features of age-related changes in the rate of aging for the countries in the world and elucidated the possibilities and limitations of the method for quantitatively measuring the aging effect by the parameters related to the analysis of population mortality. Mortality rate and its derivatives are the variables of the Gompertz formula:  $m(t) = R_0 \exp(k \times t)$ , where *m* is the mortality rate at time *t* (age),  $R_0$  is basic reproductive rate, k is mortality rate increase; both components are believed to be associated with aging), and of the Gompertz-Makeham formula (supplemented by the coefficient A as an immutable mortality rate dependent on external conditions). A and  $R_0$  components are not necessarily uniform for different ages and affect each other, changing in antiphase, as components  $R_0$  and k. To characterize the external effects on mortality, it is better to use the  $R_0$  of the Gomperetz formula, and when the values of external effects on mortality are high, the component k of the Gomperetz formula can be used to evaluate aging; at the same time, when the coefficient A is low, it is better to use the component k of the Gompertz–Makeham formula. In this case, the absolute comparison of the components of the Gompertz and Gompertz-Makeham formulas is not reasonable because these components may differ considerably. Mortality increment d(m) is the best indicator reflecting the biological nature of ageing. Using this indicator, it is possible to observe that the main patterns of the aging process persist throughout all historical periods and for all countries. The curves of mortality for early periods of history are discontinuous and distorted not because of a reflection of actual events but on account of the demerits of the methods for collecting primary data. Hence, it is necessary to remember that the components of the formulas may have biological meaning only when mathematical proof is supported by biological data and methods ..

Keywords: aging, mortality, Gompertz–Makeham formula, aging rate, mortality change in in history, aging rate change

## — БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 573.7.017.6+519.711.3

# МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛНОЙ КРИВОЙ СМЕРТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА: РЕГУЛЯТОРНАЯ МОДЕЛЬ СТАРЕНИЯ

#### © 2020 г. В.И. Донцов, В.Н. Крутько

Институт системного анализа Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 9

> *E-mail: dontsovvi@mail.ru* Поступила в редакцию 04.05.2019 г. После доработки 21.11.2019 г. Принята к публикации 25.11.2019 г.

Моделирование процесса старения организма человека основывалось на связи общей жизнеспособности организма с процессами роста и самообновления тканей, регулируемых предположительно центрами вегетативного мозга. Наличие двух регуляторных центров, стимулирующих и ингибирующих такой рост, и спонтанная гибель клеток таких центров с различающейся для каждого скоростью позволяют моделировать этапы роста, остановки и снижения скорости роста-самообновления тканей. Получаемая кривая соответствует реальной полной кривой интенсивности смертности для популяций, что, как известно, наилучшим образом описывает процессы роста и старения. Такое соответствие модели и кривой смертности, обычно описываемой формулой Гомперца только для средней части кривой, получено впервые. Модель соответствует регуляторной теории старения и связывает процессы старения с процессами регуляции роста и самообновления тканей

*Ключевые слова: развитие, старение, смертность, модели старения, рост тканей.* **DOI:** 10.31857/S0006302920010226

Исследователями было предложено немало моделей старения, однако до настоящего времени наилучшей и практически используемой является феноменологическая модель Б. Гомперца (B. Gompertz, 1825), описывающая возрастную смертность популяций [1]. Однако эта модель описывает только смертность средних возрастов экспоненциальное повышение монотонное смертности – и не способна моделировать начальные и конечные формы реальной кривой смертности человека и млекопитающих, а также не имеет четкого биологического содержания связи с конкретными физиологическими механизмами.

Целью данной работы является построение модели старения, описывающей все этапы реальной кривой смертности человека и связывающей старение и смертность с основными жизненными процессами — ростом и самообновлением тканей организма.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для моделирования использовали дифференциальные уравнения, которые моделировали на компьютере и отображали в виде графика, построенного в программе Excel. Для сравнения модели с реальной кривой смертности была выбрана оптимальная страна в период наиболее благоприятных исторических условий, для минимизации влияния внешних факторов на кривую смертности. Были рассчитаны величины интенсивности смертности. Данные смертности для различных стран были взяты на общедоступном сайте http://www.mortality.org, отражающем динамику смертности для 40 стран на протяжении двух с половиной веков. Использовали величину интенсивности смертности, так как именно этот показатель рассматривается геронтологами как оптимальный для описания изменения скорости старения с возрастом.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модель построена на представлениях о взаимосвязи старения с процессами роста и развития организма и самообновлением его тканей как главной силе жизнеспособности, противостоящей старению [2–7], и объединяет теории стохастических повреждений и регуляторные теории старения [2–4, 6–14].

В основу модели положены максимально простые допущения, имеющие ясный биологический смысл:  – рост и самообновление организма управляется двумя типами взаимодействующих регуляторных клеток (стимулирующих и ингибирующих, аналогично центральной регуляции гормонов гипоталамусом и гипофизом) с различными скоростями спонтанной гибели;

 жизнеспособность эквивалентна скорости самообновления тканей за счет механизмов клеточного роста и деления;

 смертность рассматривается как обратная величина жизнеспособности.

На основе данных допущений возможно объяснить как регуляцию роста живой системы, так и прекращение этого развития в нужный момент с последующим спонтанным старением.

Учитывая упомянутые допущения, возрастная динамика регуляторных клеток может описываться системой двух простых линейных дифференциальных уравнений, используемых для описания любых стохастических процессов распада элементов (например, радиоактивный распад происходит по тем же фундаментальным механизмам и общим причинам и законам):

$$dh/dt = -k_h \cdot h, \tag{1}$$
$$ds/dt = -k_s \cdot s.$$

где h и s — соответственно количество стимулирующих (хелперных) и ингибирующих (супрессорных) клеток;  $k_h$  и  $k_s$  — коэффициенты интенсивности вероятностной гибели соответствующих типов клеток.

Исходя из наиболее простого допущения о том, что продукция некого конечного регуляторного фактора F в организме пропорциональна разности между количеством стимулирующих и ингибирующих клеток, получаем соотношение:

$$F = k_f(h - s) + C, \tag{2}$$

где  $k_f$  – коэффициент, C – некоторая константа.

Если считать регуляторный фактор главным фактором жизнеспособности, обеспечивающим интегральное функционирование организма как системы, в частности, обеспечивающей регенерацию тканей, то можно допустить, что величина *F* характеризует жизнеспособность организма и в простейшем случае пропорциональна ей. Тогда для смертности как для величины, обратной жизнеспособности, получим выражение:

$$m = k_m \cdot (1/F), \tag{3}$$

где  $k_m$  – коэффициент пропорциональности.

Для практических целей компьютерного моделирования использовали следующие количественные значения коэффициентов:  $m = 1/(F \cdot 375 + C)$ ; при C = 1;  $k_h = 0.1$ ;  $k_s = 0.13$ . Для учета смертности от внешних причин, всегда влияющих на уровень

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020



Рис. 1. Модель регуляторного старения как возрастной дистрофии тканей при изменении регуляции клеточного роста. По вертикали – значения параметров, по горизонтали – время в условных единицах. I – Количество клеток-стимуляторов (h) для начального h = 100 при спонтанной гибели 10% за единицу времени; 2 – количество клеток-ингибиторов (s) для начального s = 100 при спонтанной гибели 13% клеток за единицу времени; 3 – содержание итогового регуляторного фактора (F = h - s), с коэффициентом пропорциональности 5F.

смертности населения, была добавлена константа *A*, равная 0.0007 для выбранной страны.

Если предположить, что ингибирующие клетки быстрее разрушаются с возрастом (их функция исчерпывается периодом развития: они предназначены для растормаживания при их гибели стимулирующих влияний в период быстрого роста организма, когда масса тканей увеличивается по сравнению с массой тела при рождении более чем на порядок), то из полученных уравнений можно получить динамику моделируемых переменных, показывающую очень хорошее качественное соответствие с реальной кривой смертности человека (рис. 1 и 2).

В отличие от первого, чисто стохастического механизма гибели жизнеспособных элементов организма в целом, позволяющего моделировать только среднюю часть кривой смертности с помощью уравнения Гомперца, данная модель отражает все части кривой истинной смертности – высокую начальную смертность с последующим снижением и некоторым минимумом в период роста организма, последующее экспоненциальное повышение смертности в течение основного периода жизни и некоторое снижение в самых старших возрастах.

Для сравнения модели с реальной кривой смертностью были выбраны несколько стран в период относительно благоприятных исторических условий (Австралия, Дания, Канада, Нидер-



**Рис. 2.** Математическая модель регуляторной теории смертности и реальная интенсивность смертности в Австралии (1940 г.). По оси абсцисс – время в годах, по оси ординат – интенсивность смертности (в логарифмическом масштабе). 1 – Расчетная величина смертности согласно предлагаемой модели с указанными в тексте коэффициентами, 2 – реальная интенсивность смертность смертности (данные представлены на сайте http://www.mortality.org, 15.11.2019), 3 – график по формуле Гомперца: m = 7,95E-4 + 6,13E-5\*exp(9,37E-2\*t).

ланды и др. в 1910—1940 гг., а также в 1950 г.). На рис. 2 показаны для примера графики для Австралии (1940 г.): реальный график интенсивности смертности, расчетный график по формуле Гомперца (отклоняющийся от реального графика в начальной и конечной части) и расчетный график по предлагаемой нами формуле, совпадающий с реальной кривой наилучшим образом во всех возрастных интервалах (коэффициент корреляции r = 0.999).

Качественное соответствие модели с имеющимися реальными демографическими кривыми интенсивности смертности и является результатом моделирования, оно адекватно поставленной задаче, носящей прежде всего биологический характер. Реальным морфологическим субстратом (параметры *h* и *s* клетки) описываемого механизма могут быть регуляторные неделящиеся клетки гипоталамуса, продуцирующие факторы регуляции роста тканей; для периферийных механизмов — разнообразные растущие и самообновляющиеся делением соматические клетки.

Особую роль могут иметь некоторые механизмы регулирования клеточного роста соматических клеток: некоторые типы Т-лимфоцитов регулируют не иммунитет, а рост соматических клеток, которые, по нашему мнению, могут составлять отдельную специальную систему иммунного контроля роста соматических клеток [2– 4], а их возрастной иммунодефицит может лежать в основе иммунной теории старения [2].

Все это может указывать на определяющую роль процессов регуляции для старения человека. Давно известные эффекты гипофизэктомии на возрастную инволюцию тимуса [15] и разработанные методы трансплантации мозговой эмбриональной ткани [5] позволяют влиять на восстановление истощенных регуляторных программ у старых животных. Альтернативой являются методы фармакологической или физиотерапевтической активации соответствующих ядер гипоталамуса, а также создание новых функциональных регуляторных центров и водителей ритмов, в том числе с применением (ауто)психотерапевтических техник, гипноза и пр. На уровне периферических механизмов наиболее перспективным представляются иммунофармакологические средства, влияющие на лимфоциты – регуляторы роста соматических клеток, а также выделенные из крови молодых растущих животных факторы роста, количество которых выраженно снижается с возрастом [2, 16].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана математическая модель регуляторного механизма старения, с описанием полной кривой смертности человека и ясной биологической интерпретацией, связанная с представлениями о старении как этапе роста и развития организма. В основе модели лежит взаимодействие влияющих на рост тканей регуляторных клеток вегетативных центров регуляции мозга стимулирующего и ингибирующего типа, с различной скоростью спонтанной гибели, что позволяет моделировать периоды роста, его окончания и процесс старение. Смертность рассматривается как обратная величина жизнеспособности, а жизнеспособность принимается пропорциональной скорости клеточного роста как основы самообновления тканей.

Предложенная модель регуляторного старения впервые позволяет описать одновременно характерные изменения начальной, средней и конечной частей кривой смертности человека, совпадающие с реальной картиной, и может быть физиологически интерпретирована.

Модель указывает на возможную важную роль регуляторных механизмов снижения самообновления (клеточного деления) тканей с возрастом в процессе старения человека и животных.

Так как регуляторные влияния, в отличие от стохастических механизмов, легко поддаются внешним управляющим воздействиям, это открывает принципиально новые возможности радикального влияния на старение человека и млекопитающих.

#### 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

- B. Gompertz, Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. A 115, 513 (1825).
- 2. В. И. Донцов, *Новая иммунная теория старения:* лимфоциты как регуляторы клеточного роста (Lambert Acad. Publ., Saarbrucken, 2011).
- 3. В. И. Донцов и В. Н. Крутько, Системный анализ и управление в биомедицинских системах **11** (3), 657 (2012).
- 4. В. Н. Крутько и В.И. Донцов, *Системные* механизмы и модели старения (ЛКИ, М., 2008).

- 5. Ф. А. Атамурадова и В. И. Донцов, ДАН СССР **297** (1), 237 (1987).
- 6. T. B. Kirkwood and S. Melov, Curr. Biol. 21, 701 (2011).
- 7. R. F. Walker, Rejuvenation Res. 14, 429 (2011).
- 8. В. Н. Крутько, В. И. Донцов, О. А. Мамиконова и др., Мед. новости **2**, 25 (2015).
- 9. В. Н. Крутько, В. И. Донцов, О. В. Захарьящева и др., Авиакосмическая и экологическая медицина **48** (3), 12 (2014).
- 10. L. Hayflick, PLoS Genet. 3, 220 (2007).
- 11. I. M. van Leeuwen, J. Vera, and O. Wolkenhauer, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **365**, 3443 (2010).
- 12. M. P. Murphy and L. Partridge, Annu. Rev. Biochem. **77**, 777 (2008).
- 13. T. A. Rando and H. Y. Chang, Cell 148, 46 (2012).
- R. S. Sohal and W. C. Orr, Free Radic. Biol. Med. 52, 539 (2012).
- 15. D. E. Harrison, J. R. Archer, and C. M. Astie, J. Immunol. **129**, 2673 (1982).
- А. Я. Чижов, Е. С. Зенчук, В. Н. Крутько и В. И. Донцов, Технологии живых систем 10 (1), 41 (2013).

# Postnatal Ontogeny and Aging: Regulatory Model Full Curve of Human Mortality

### V.I. Dontsov and V.N. Krut'ko

Institute for Systems Analysis, Federal Research Center «Computer Science and Control» of Russian Academy of Sciences, prosp. 60-letiya Oktyabrya 9, Moscow, 117312 Russia

A mathematical regulatory model of aging, that allows for the first time to receive the full curve of mortality in humans and mammals and to have a clear biological interpretation has been created. The model can be classified as a regulatory model related to ideas about the connection between ageing and processes of growth and development of the organism. Interaction stimulating and inhibiting regulatory cells with different speed spontaneous degradation allows to simulate a period of growth and development. Mortality is considered the reciprocal of the viability, and viability speed is equivalent to cell growth and tissue self-renewal. The model indicates the importance of regulatory mechanisms in tissues growth and self-renewal reduction with age, during the aging process in humans and animals. As regulatory impacts, unlike stochastic mechanisms, are susceptible to external influences, this opens up entirely new possibilities of radical influence on human aging and mammals.

Keywords: development, aging, mortality, aging patterns, tissue growth

— ДИСКУССИИ —

УДК 577.3

# К ВОПРОСУ О РАЗЛИЧИИ МЕЖДУ ИСКУССТВЕННЫМ И ЕСТЕСТВЕННЫМ ИНТЕЛЛЕКТОМ

#### © 2020 г. В.А. Намиот

Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: vnamiot@gmail.com

Поступила в редакцию 11.10.2019 г. После доработки 11.10.2019 г. Принята к публикации 18.10.2019 г.

Обсуждается вопрос о том, может ли, хотя бы в принципе, кибернетическая система, функционирующая на основе алгоритмов, моделировать поведение естественного интеллекта. Ответить на этот вопрос математически строго пока что невозможно. Тем не менее в работе приводятся достаточно убедительные соображения, показывающие, что любые существующие в настоящее время кибернетические системы в принципе не могут моделировать поведение естественного интеллекта, причем изменить эту ситуацию с помощью каких-либо программных ухищрений также невозможно. Для этого нужны принципиально новые подходы, некоторые из которых также обсуждаются в настоящей статье.

Ключевые слова: естественный и искусственный интеллект, универсальная машина Тьюринга, оракул. **DOI:** 10.31857/S0006302920010238

Прежде всего, следует отметить, что самое очевидное различие между искусственным и естественным интеллектом, которое сразу же бросается в глаза (искусственный интеллект реализуется в настоящее время в электронных вычислительных устройствах, например, компьютерах или нейросетях, в то время как естественный интеллект является атрибутом биологических систем), само по себе не является принципиальным. Устройства, о которых можно сказать, что они вроде бы демонстрируют наличие интеллекта, могут быть изготовлены из самых разных материалов, включая биологические. Это не имеет особого значения в том случае, если в основе их функционирования лежат одни и те же принципы работы [1]. Поэтому чтобы ответить на вопрос, поставленный в заглавии, нужно в первую очередь разобраться с тем, может ли компьютерное устройство, хотя бы в принципе, моделировать происходящее в биосистемах и соответственно «вести себя» как они. Если компьютерное устройство в состоянии это делать, то все имеющиеся различия между искусственным и естественным интеллектом заведомо не являются принципиальными.

Но прежде чем отвечать на этот вопрос, предварительно нужно сформулировать критерий, выполнение которого позволяет признать подоб-

ное моделирование успешным. Например, в качестве подобного критерия предполагалось проведение некоего испытания (своего рода экзамена), прохождение которого позволяет признать, что искусственный интеллект не уступает естественному. 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. И 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, отличается плохим характером, 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.

Начнем с искусственного интеллекта. Обсудим самые основы существующих систем такого 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. Существует по крайней мере несколько математически строгих определений понятия «алгоритм», причем в математической логике доказывается, что все эти определения эквивалентны друг другу. На практике, например, при доказательстве теорем, очень удобным является определение алгоритма, данное А. Тьюрингом. Это определение использует понятие так называемой «универсальной машины Тьюринга» [2], которая при соответствующей введенной в нее программе оказывается в состоянии моделировать работу любого другого существующего в настоящее время логического устройства.

Машина Тьюринга, 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 сим-

БИОФИЗИКА том 65 № 1 2020

волов 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. Действитель-HO. если алгоритм существует, то лля 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 алгоритма 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 удается 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 «не существовании алгоритма» является теорема об «останове» [2], т. е. о том, что в принципе не может существовать алгоритма, способного определить, остановится ли хоть когда-нибудь «универсальная машина 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 могут дать 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 тоже 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 решена быть 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. Например, к машине Тьюринга можно добавить датчик случайных чисел (машина Тьюринга в состоянии вычислять псевдослучайные числа, но, строго говоря, «истинно случайных» чисел 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» [3]. 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 [3].

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 биологии имеется ряд фундаментальных вопросов, в частности, связанных с эволюцией биосферы, на которые там до сих пор нет убедительных ответов. Если же существует возможность обратиться к «оракулу» и «получить у него подсказку, позволяющую найти хорошее (с эволюционной точки зрения) решение», то многие, если не все из этих вопросов, могли бы быть «сняты»...

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. Соответственно, по-прежнему остается неизвестным и ответ на вопрос о том, в чем же конкретно, т. е. на уровне устройства и принципов работы, состоит различие между искусственным и естественным интеллектом.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Н. Винер, Творец и робот (Прогресс, М., 1966).
- 2. М. Минский, Вычисления и автоматы (Мир, М., 1971).
- 3. С. Ааронсон, *Квантовые вычисления со времен Демокрита* (АНФ, М., 2018).

# On the Question Regarding the Difference between Artificial and Natural Intelligence

## V.A. Namiot

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

There is some debate as to whether a cybernetic system built with the use of algorithms is theoretically able to model the behavior of natural intelligence systems. A valid answer to this question, from a mathematical view-point, can not be given. Meanwhile, in this paper we provide rather convincing reasoning that there is still no cybernetic systems potentially which could model the behavior of natural intelligence systems. It is also impossible even with the help of any program tricks meaning that fundamentally new approaches some of which are discussed in this paper are needed.

Keywords: natural and artificial intelligence, universal Turing machine, Oracle

УДК 519.876.5

# ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СОИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

© 2020 г. М.В. Грецова, М.Г. Самсонова

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29 E-mail: m.samsonova@spbstu.ru Поступила в редакцию 18.11.2019 г. После доработки 18.11.2019 г. Принята к публикации 22.11.2019 г.

Разработан метод паспортизации сортов сои на основе однонуклеотидных полиморфизмов. Генетический алгоритм был использован для выбора оптимального набора, состоящего из 28 однонуклеотидных полиморфизмов, который затем был применен для паспортизации 243 сортов. Для всех сортов получены уникальные сигнатуры однонуклеотидных полиморфизмов, отличающиеся от сигнатур любого другого сорта хотя бы в трех позициях.

*Ключевые слова: генетическая идентификация, однонуклеотидные полиморфизмы, соя.* **DOI:** 10.31857/S000630292001024X

Генетическая паспортизация является востребованным инструментом для защиты прав селекционеров при регистрации, сертификации и коммерческом распространении сортов [1, 2]. На сегодняшний день наиболее перспективными представляются методы паспортизации, использующие ДНК-сигнатуры на основе молекулярных маркеров, таких как однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), микросателлитные последовательности и другие [3-5]. Преимуществами ОНП по сравнению с остальными типами ДНКмаркеров являются их высокая частота встречаемости в популяции, плотность и эволюционная стабильность, а также наличие широкого спектра подходов для их выявления [6]. Сочетание значений ОНП, характерное для некоторого сорта, называется ОНП-сигнатурой этого сорта. Организмы разных сортов отличаются друг от друга в большом количестве позиций ДНК, поэтому использовать все найденные ОНП для идентификации сорта неудобно [6]. Так возникает задача поиска такого небольшого набора ОНП, с помощью которого можно идентифицировать сорта. Как правило, набор ОНП для построения сигнатуры находится в результате фильтрации исходного набора ОНП, в соответствии с некоторым набором критериев. При фильтрации необходимо учитывать степень гомозиготности ОНП. Кроме того, поскольку ОНП искомого набора не должны сильно коррелировать друг с другом, представляется разумным для каждого гаплоблока рассматривать не более одного ОНП.

Поиск набора ОНП был реализован для выборки из 243 сортов сои, состоящей из 110 образцов коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и 133 образцов коллекции компании «СоКо» (Краснодар). Ранее эти образцы были генотипированы по технологии GBS [7]. Были взяты следующие критерии фильтрации ОНП: 1) ОНП должны принадлежать гаплоблокам; 2) частота, с которой ОНП находится в каждом из гомозиготных состояний, должна быть не менее 0.2 – этот критерий задает степень полиморфизма позиции, в которой регистрируется ОНП; 3) результирующий набор не должен содержать двух ОНП, принадлежащих одному гаплоблоку. Для подбора оптимального набора ОНП использовался генетический алгоритм.

Среди всех найденных в результате генотипирования были выбраны 14745 ОНП, для которых частота встречаемости в выборке сортов составляла не менее 0.8. Поиск гаплоблоков для имеющегося набора ОНП был реализован отдельно для каждой хромосомы в программе Haploview [8]. Были найдены 12729 ОНП, принадлежащих 1947 гаплоблокам. После этого среди них были отобраны 5718 ОНП, удовлетворяющие второму критерию, — частота нахождения ОНП в каждом из гомозиготных состояний должна составлять не менее 0.2. Наконец, для каждого гаплоблока был выбран единственный ОНП, по которому разли-

Сокращение: ОНП — однонуклеотидные полиморфизмы.



Результат работы генетического алгоритма. (а) — Пример полученных ОНП-сигнатур для десяти сортов сои. Черным и белым цветом обозначены гомозиготные состояния локусов, серым цветом обозначены гетерозиготные состояния локусов. (б) — Распределение количества ОНП, по которым отличается пара сортов.

чается наибольшее количество сортов. Таким образом, в результате фильтрации был получен набор из 1332 ОНП.

Для поиска оптимального набора ОНП был запущен генетический алгоритм; в качестве индивидуумов в генетическом алгоритме были взяты наборы ОНП; каждый набор содержал от 20 до 40 ОНП так, что каждая хромосома сои была представлена в индивидууме одним или двумя ОНП. Начальная популяция, содержавшая 1000 индивидуумов, была сгенерирована случайным образом. Отбор индивидуумов для формирования следующего поколения проводили в соответствии с функцией приспособленности индивидуума *x*:

$$f(x) = \min_{i,j\in S} \left(\frac{d_{ij}}{N}\right),\,$$

где  $d_{ij}$  — расстояние между сортами *i* и *j*, которое измеряется как количество ОНП в наборе *x*, по которым эти сорта различаются, т.е. находятся в противоположных гомозиготных состояниях, N — количество ОНП в наборе, S — множество сортов. Каждое следующее поколение популяции формировали из 500 наиболее приспособленных индивидуумов и их 500 потомков, полученных в результате скрещиваний так, чтобы в каждом потомке каждая хромосома была представлена одним или двумя ОНП. Генетический алгоритм на 2000 поколений был запущен четыре раза. Для каждого сорта была найдена сигнатура, состоящая из 28 ОНП и отличающаяся от сигнатуры любого другого сорта хотя бы в трех позициях (см. рисунок).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы (проект №14.575.21.0136 от 26.09.2017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57517X0136).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Вычисления были проведены в суперкомпьютерном центре «Политехнический» СПбПУ и кластере Университета Южной Калифорнии.

Авторы выражают благодарность А.А. Иголкиной за ценные советы, рекомендации и помощь при выполнении исследования.

#### 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. M. Agarwal, N. Shrivastava, and H. Padh., Plant Cell Rep. 27, 617 (2008).
- N. K. Korir, J. Han, L. Shangguan, et al., Biotech. 33, 2 (2013).
- 3. M. W. Ganal, T. Altmann, and M. S. Röder, Curr. Opin. Plant Biol. **12**, 2 (2009).
- D. L. Hyten, Y. Zhu, P. B. Cregan, et al., Crop Sci. 50, 5 (2010).
- 5. D. I. Pacurar, M. L. Pacurar, N. Street, el al., J. Exp. Bot. 63, 7 (2012).
- 6. Y. Lee, N. Jeong, J. H. Kim, et al., Plant J. 81, 4 (2015).
- А. Канапин, А. Самсонова, А. Соколкова и др., Биофизика (2020) (в печати).
- 8. J. C. Barrett, B. Fry, J. Maller, and M. J. Daly, Bioinformatics 21, 2 (2005).

# Genetic Identification of Soybean Varieties Using Single Nucleotide Polymorphism Markers

#### M.V. Gretsova and M.G. Samsonova

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

The seed certification method for soybean varieties has been developed based on single nucleotide polymorphisms. The genetic algorithm was employed to find optimal set consisting of 28 single nucleotide polymorphisms, which was then used to certify 243 varieties. For all varieties, unique signatures of single nucleotide polymorphisms were determined. The signatures which were different from those of any other varieties were considered to be unique if they differed at least in three positions.

Keywords: genetic identification, single nucleotide polymorphisms, soybean