

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 67, номер 4, 2022

---

---

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Лев Александрович Блюменфельд и современная биохимическая физика.  
«Решаемые» и «нерешаемые» проблемы

*С.Д. Варфоломеев* 629

Архитектура конденсированной днк в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli*

*Ю.Ф. Крупянский, В.В. Коваленко, Н.Г. Лойко, А.А. Генералова, А.В. Моисеенко,  
Э.В. Терешкин, О.С. Соколова, К.Б. Терешкина, Г.И. Эль-Регистан, А.Н. Попов* 638

Исследование *in vitro* агрегационных свойств мышечного  $\alpha$ -белка

*Л.Г. Бобылёва, А.Г. Габдулхаков, Н.Н. Салмов, И.М. Вихлянцева, А.Г. Бобылёв* 652

Биологическая активность растворов веществ в малых и сверхмалых концентрациях

*В.И. Лобышев* 658

---

## БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Натрий- $\mu$ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрат повышает  
эффективность работы дыхательной цепи митохондрий проростков гороха

*И.В. Жигачева, Н.И. Крикунова, И.П. Генерозова, П.А. Буцанец, Н.Ю. Герасимов,  
О.В. Неврова, С.В. Васильев, А.Н. Голощапов* 671

Ингибирующее действие водного извлечения из йерба мате (*Plex paraguayensis*)  
на процесс липидной перекисидации липосомальных мембран

*Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, А.А. Кочетова, А.Н. Осипов* 680

Математическое моделирование акустического поля для воздействия  
на репродуктивные клетки рыб в криозащитном растворе при эквilibрации

*Е.Н. Пономарева, А.Н. Соловьев, А.А. Матросов, В.А. Чебаненко, Д.А. Нижник,  
А.А. Егорова, А.А. Красильникова* 689

Яйцеклетки серых морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* как тест-объект  
и источник гипометаболических веществ

*Л.И. Крамарова, Р.Х. Зиганшин, В.К. Утешев, Т.В. Крамарова, Э.Н. Гахова* 700

Цитотоксичность соединений серебра

*Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина* 707

Наночастицы серебра – цитотоксическая активность и механизм действия

*Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина* 715

Модели, описывающие генерацию и проведение нервного импульса

*Х.Л. Эрнандес Касерес, С.С. Джимаков, Д.А. Семенов,  
М.И. Дроботенко, Ю.Д. Нечипуренко* 728

---

## БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Энтропия и информация в описании биосистем

*В.В. Аристов, А.В. Карнаухова, В.Ф. Левченко, Ю.Д. Нечипуренко* 741

Возможности применения низкоинтенсивного красного света для модуляции постаритмических процессов в сердце крыс	
<i>О.В. Другова, А.П. Баврина, Н.В. Тиунова, В.В. Борзиков, С.Л. Малиновская</i>	749
Частотно-временной анализ колебаний показателей внешнего дыхания и сердечного ритма человека при физической нагрузке	
<i>В.Г. Гришин, О.В. Гришин, В.С. Никульцев, В.В. Гультяева, М.И. Зинченко, Д.Ю. Урюмцев</i>	755
Численное моделирование работы левого желудочка сердца в системе кровообращения: эффекты изменения частоты сокращений и апикального инфаркта миокарда	
<i>Ф.А. Сёмин, А.Р. Хабибуллина, А.К. Цатурян</i>	763
Изменение антиоксидантных свойств крови при терапии травмы ахиллова сухожилия у крыс мезенхимальными стволовыми клетками	
<i>С.В. Пинчук, И.Б. Василевич, А.Ю. Молчанова, А.А. Басалай, И.Д. Волотовский</i>	776
Пероксиредоксин 6 предотвращает реперфузионное поражение изолированной почки крысы	
<i>А.Е. Гордеева, М.Г. Шарпов, Р.Г. Гончаров, В.И. Новоселов</i>	783
Анализ действия экзогенного никотинамида на биоэнергетические процессы в головном мозге при острой гипоксии	
<i>М.В. Васин, Л.А. Ильин, И.Б. Ушаков</i>	792
Противоопухолевая эффективность сочетанного применения полиакрилата золота (аурумакрил) и облучения в эксперименте	
<i>Л.А. Островская, Д.Б. Корман, А.Б. Шевелев, А.В. Шibaева, А.А. Липенгольц, Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.А. Рыкова, Т.К. Лобжанидзе, Н.В. Позднякова, В.А. Скрибицкий, В.В. Спиридонов, В.А. Кузьмин</i>	798
Микрогемодинамика кожи и механизмы ее регуляции при сахарном диабете 2 типа	
<i>И.В. Тихонова, А.А. Гриневич, А.В. Танканаг, В.Г. Сафронова</i>	805
Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии в анализе противоглаукомных препаратов	
<i>Л.М. Балашова, Н.А. Бакунина, В.А. Намиот, И.И. Колесниченко, Ю.Д. Кузнецова, А.А. Балашов, Ж.М. Салмаси, С.Н. Удальцов</i>	819
Нетканые сосудистые протезы малого диаметра на основе нановолокон из ароматического полиимида	
<i>А.Е. Чирятьева, Н.А. Завражных, П.В. Попрядухин, Г.Ю. Юкина, А.В. Кривенцов, Е.М. Иванькова, В.Е. Юдин</i>	827

---



---

# Contents

---

---

Vol. 67, No. 4, 2022

---

---

## Molecular Biophysics

Lev Aleksandrovich Blumenfeld and Modern Biochemical Physics.

«Solvable» and «Unsolvable» Problems

*S.D. Varfolomeev* 629

Architecture of Condensed DNA in the *Escherichia coli* Nucleoid

*Y.F. Krupyanskii, V.V. Kovalenko, N.G. Loiko, A.A. Generalova, A.V. Moiseenko,  
E.V. Tereshkin, O.S. Sokolova, K.B. Tereshkina, G.I. El'-Registan, and A.N. Popov* 638

*In vitro* Study of Aggregation Properties of Muscle X-Protein

*L.G. Bobyleva, A.G. Gabdulkhakov, N.N. Salmov, I.M. Vikhlyantsev, and A.G. Bobylev* 652

Biological Activity of Solutions of Substances in Low and Ultra Low Concentrations

*V.I. Lobyshev* 658

---

## Cell Biophysics

Sodium  $\mu$ 2-Dithiosulfate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate Increases the Efficiency of the Respiratory Chain Activity in Mitochondria of Pea Seedlings

*I.V. Zhigacheva, N.I. Krikunova, I.P. Generozova, P.A. Butsanets, N.Yu. Gerasimov,  
O.V. Nevrova, S.V. Vasiliev, and A.N. Goloshchapov* 671

Inhibitory Effect of Aqueous Extract from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on the Process of Lipid Peroxidation of Liposomal Membranes

*Yu.O. Teselkin, I.V. Babenkova, A.A. Kochetova, and A.N. Osipov* 680

Mathematical Simulation of Acoustic Effect on Cryoprotector with Fish Sperm at Equilibration

*E.N. Ponomareva, A.N. Soloviev, A.A. Matrosov, V.A. Chebanenko, D.A. Nizhnik,  
A.A. Egorova, and A.A. Krasilnikova* 689

Eggs of Gray Sea Urchins *Strongylocentrotus intermedius* as a Test-Object and a Source of Hypometabolic Factors

*LI. Kramarova, R.Ch. Ziganshin, V.K. Uteshev, T.V. Kramarova, and E.N. Gakhova* 700

Cytotoxicity of Silver Compounds

*D.B. Korman, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluhterova, V.A. Rikova, and M.M. Fomina* 707

Silver Nanoparticles – Cytotoxic Activity and Mechanism of Action

*D.B. Korman, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluhterova, V.A. Rikova, and M.M. Fomina* 715

Models Describing Nerve Impulse Generation and Conduction

*J.L. Hernandez Caceres, S.S. Dzhimak, D.A. Semionov,  
M.I. Drobrotenko, and Yu.D. Nechipurenko* 728

---

## Complex Systems Biophysics

Entropy and Information in the Description of Biosystems

*V.V. Aristov, A.V. Karnaukhov, V.F. Levchenko, and Yu. D. Nechipurenko* 741

Possibilities of Using Low-Intensity Red Light for Modulation of Post-Arrhythmia Processes in the Rat Heart	
<i>O.V. Drugova, A.P. Bavrina, N.V. Tiunova, V.V. Borzikov, and S.L. Malinovskaya</i>	749
Time Frequency Analysis of Variability in External Respiration and Heart Rate in Humans during Exercise	
<i>V.G. Grishin, O.V. Grishin, V.S. Nikultsev, V.V. Gulyaeva, M.I. Zinchenko, and D.Yu. Uryumtsev</i>	755
Numerical Modeling of Heart Left Ventricle Work in the Circulatory System: the Effects of Changes in the Frequency of Contractions and Apical Myocardial Infarction	
<i>F.A. Syomin, A.R. Khabibullina, and A.K. Tsaturyan</i>	763
Changes in Blood Antioxidant Parameters in Rats with Achilles Tendon Injury Treated by Mesenchymal Stem Cell Therapy	
<i>S.V. Pinchuk, I.B. Vasilevich, A.Y. Molchanova, A.A. Basalai, and I.D. Volotovskii</i>	776
Peroxiredoxin 6 Prevents Reperfusion Injury to Isolated Rat Kidney	
<i>A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, R.G. Goncharov, and V.I. Novoselov</i>	783
Analysis of Exogenous Nicotinamide Effects on Bioenergy Processes in Brain during Acute Hypoxia Exposure	
<i>M.V. Vasin, L.A. Ilyin, and I.B. Ushakov</i>	792
Antitumor Efficacy of the Combined Use of Aurum Polyacrylate (Aurumacril) with Radiation Therapy in the Experiment	
<i>L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, A.B. Shevelev, A.V. Shibaeva, A.A. Lipengolts, N.V. Bluhterova, M.M. Fomina, V.A. Rykova, T.K. Lobganidze, N.V. Pozdniakova, V.A. Skribitsky, V.V. Spiridonov, and V.A. Kus'min</i>	798
Skin Microhemodynamics and Its Regulatory Mechanisms in Type 2 Diabetes Mellitus	
<i>I.V. Tikhonova, A.A. Grinevich, A.V. Tankanag, and V.G. Safronova</i>	805
A Multisensory Stripping Voltammetry Method for Analysis of Anti-Glaucoma Drugs	
<i>L.M. Balashova, N.A. Bakunina, V.A. Namiot, I.I. Kolesnichenko, Yu.D. Kuznetsova, A.A. Balashov, G.M. Salmasi, and S.N. Udaltsov</i>	819
Small Diameter Nonwoven Vascular Prostheses Based on Aromatic Polyimide Nanofibers	
<i>A.E. Chiriateva, N.A. Zavrazhnykh, P.V. Popryadukhin, G.Yu. Yukina, A.V. Kriventsov, E.M. Ivankova, and V.E. Yudin</i>	827

---

УДК 544.43

## ЛЕВ АЛЕКСАНДРОВИЧ БЛЮМЕНФЕЛЬД И СОВРЕМЕННАЯ БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА. «РЕШАЕМЫЕ» И «НЕРЕШАЕМЫЕ» ПРОБЛЕМЫ

© 2022 г. С.Д. Варфоломеев\*, \*\*, \*\*\*, #

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

\*\*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия

\*\*\*Институт физико-химических основ функционирования сетей нейронов и искусственного интеллекта  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Россия

#E-mail: sdvarf@bk.ru

Поступила в редакцию 30.04.2022 г.

После доработки 30.04.2022 г.

Принята к публикации 06.05.2022 г.

Статья посвящена анализу и развитию проблем, сформулированных Л.А. Блюменфельдом – выдающимся представителем советской науки. Рассмотрены достижения в описании природы ферментативного катализа методами молекулярной механики белков и квантово-химического суперкомпьютерного моделирования каталитического цикла с демонстрацией определяющей роли конформационных изменений функциональных групп активного центра. Предложена и детально анализируется теория предбиологической эволюции на первичных стадиях, объясняющая возможность синтеза и эволюции протополимеров. Эволюционную комбинаторику и возможности «размножения» макромолекул в процессах поликонденсации мономеров обеспечивает термоцикл с преодолением точки фазового перехода воды (процесс «синтез–гидролиз» с адсорбцией мономера на матрице первичного полимера). Приближением к решению «нерешаемой» задачи: «как материя становится сознанием», является предложенная и анализируемая теория записи и хранения нейронной информации, основанная на кинетическом моделировании холинергических синапсов (протонный механизм записи информации).

*Ключевые слова:* ферментативный катализ, КМ/ММ моделирование, конформационная подвижность активного центра, протополимеры, термоцикл, эволюционная комбинаторика, кинетическая модель синапса, холинергические синапсы, протонный механизм записи информации.

DOI: 10.31857/S0006302922040019, EDN: ISHIID

Лев Александрович Блюменфельд – выдающийся представитель советской науки. Период творчества Л.А. Блюменфельда связан с формированием и активным развитием в мировой науке физико-химической биологии, биофизики, химической биологии. Его жизнь и творчество – удивительная иллюстрация триединства наук: физики, химии и биологии. Будучи выпускником химического факультета МГУ, Л.А. Блюменфельд большую часть жизни проработал в Институте химической физики РАН, в медицинских научных учреждениях, создал на физическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова кафедру биофизики. Творческая судьба Л.А. Блюменфельда демонстрирует единство различных направлений естествознания, взаимопроникновение наук друг в друга и эффективность развития пограничных областей.

Целью данной статьи является иллюстрация развития некоторых задач и идей, над которыми работал Л.А. Блюменфельд, с применением к их решению современных методов биохимической физики, получивших развитие в ближайшие десятилетия. Речь идет о природе и механизмах ферментативного катализа, о проблемах происхождения жизни на первых стадиях и о молекулярных основах интеллекта. Если первая проблема, привлекая Л.А. Блюменфельда, представлялась ему как проблема категории «решаемых», две последние он относит к «нерешаемым» проблемам биофизики [1]. Современный прогресс науки обеспечивает в определенной степени решение и этих «нерешаемых» проблем.

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ. ФЕРМЕНТ КАК «МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ СТАНОК»

Феномен биологического катализа — ускорение ферментами скоростей химических реакций — удивительное по своей физико-химической сути явление. Наблюдаемые эффекты ускорения реакций ферментами по сравнению с традиционными «химическими» катализаторами колоссальны —  $10^{12}$ – $10^{14}$  раз [2]. При этих условиях, если ферментативная реакция протекает в течение одной секунды, процесс, катализируемый, например, ионом водорода, будет протекать сотни тысяч лет. Если принять во внимание специфичность, селективность выбора ферментом молекулы реагента, то становится очевидным, что ферментативный катализ — суть и базовая основа феномена жизни.

Физическая природа функционирования ферментов — научная загадка, вызов, который заинтересовал многих исследователей в середине — конце прошлого века. Концепция, которую внес в обсуждение этого феномена Л.А. Блюменфельд, заключается в том, что белок как макромолекулярная система обладает возможностями конформационных изменений и подвижности отдельных фрагментов, и это может и должно играть роль в эффективности катализа. Детальное исследование молекулярных изменений в активных центрах ферментов в процессе каталитического акта подтвердило это, на первый взгляд не очевидное, предположение.

Основой современных исследований молекулярных механизмов функционирования макромолекулярных систем является моделирование с использованием физических принципов молекулярной механики и квантовой молекулярной механики [3–5].

В настоящее время методами суперкомпьютерного моделирования исследованы сотни ферментов. Если известна трехмерная структура белка на атомарном уровне, то открывается возможность с использованием методов молекулярной механики и квантовой химии построить полную детализированную картину трансформации исходных молекул в конечные продукты с участием функциональных групп активного центра белка.

Процессы химических изменений имеют многостадийный характер, при этом экстремумы на профиле свободной энергии отражают структуру и энергетические уровни промежуточных метастабильных соединений (минимумы) и переходных состояний (максимумы). На рис. 1 представлен профиль свободной энергии реакции гидролиза N-ацетиласпарагиновой кислоты под действием N-ацетиласпартилгидролазы — ключевого фермента центральной нервной системы человека [6]. На этом примере, как и на всех остальных примерах, которые построены на суперком-

пьютерном моделировании молекулярного механизма катализа методами квантовой молекулярной механики, видно, что лимитирующей стадией реакции предшествуют быстрые равновесные стадии переноса протона и конформационного изменения функциональной группы макромолекулярной структуры белка. Таким образом, можно сделать общий вывод, что физико-химической основой белкового катализа является использование быстрых равновесных стадий (перенос протона и конформационные изменения) для понижения энергетического барьера на лимитирующей стадии реакции.

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЖИЗНИ: ПРЕДБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ И ЭВОЛЮЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ. ТЕРМОЦИКЛ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ КОМБИНАТОРИКА

Одной из важнейших проблем современного естествознания является вопрос о происхождении жизни. Два абсолютно неоспоримых факта характеризуют живые системы.

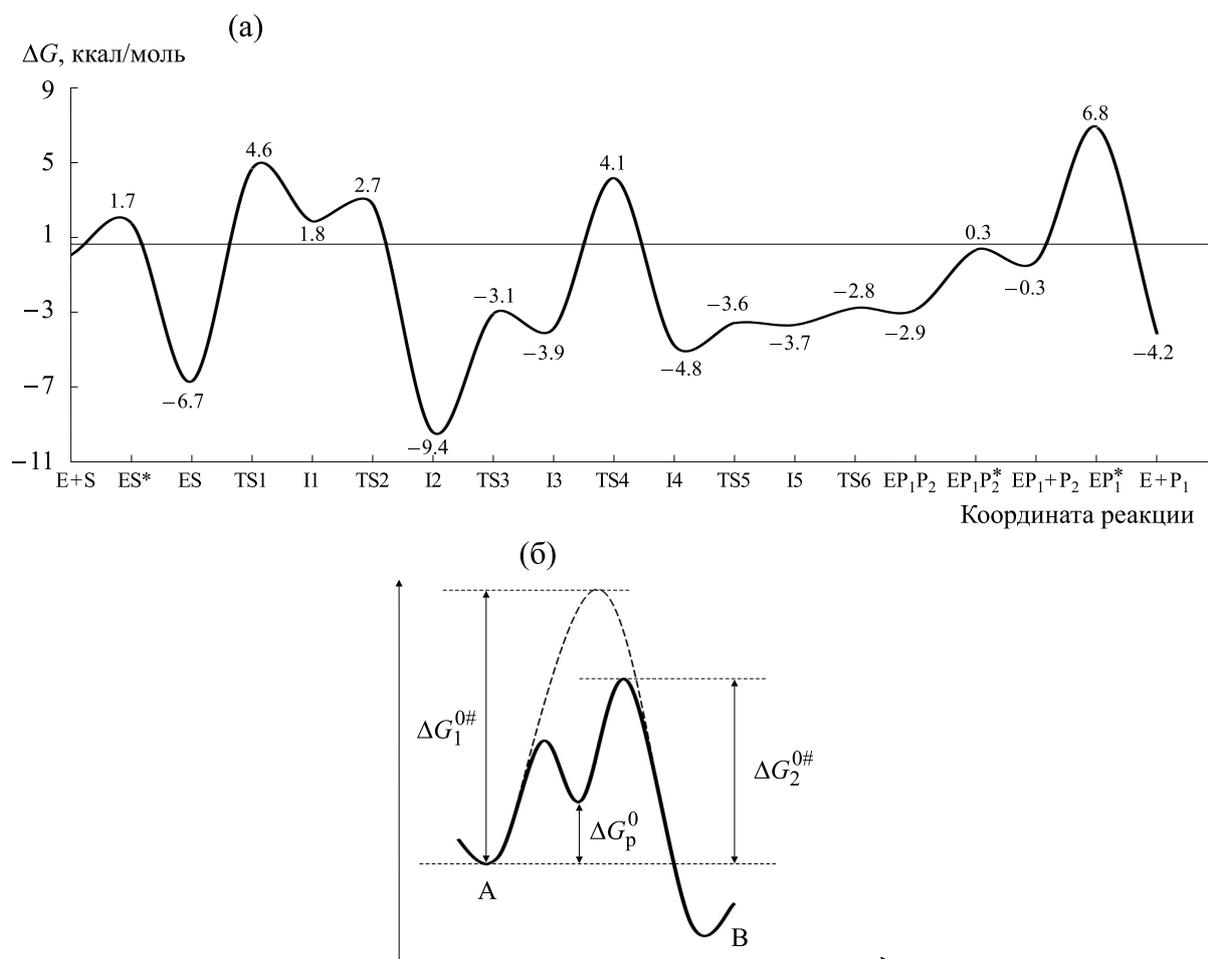
1. Все биополимеры — продукты полимеризации трифункциональных мономеров. Две химические группы (функции) участвуют в образовании химических мономер-мономерных связей. Третья функциональная группа — это структурная группа мономера, отличающая один мономер от другого (заместители в  $\alpha$ -положении аминокислот, пиримидин-пуриновые основания в нуклеотидах).

2. В условиях предбиологической полимеризации в водной среде пептиды и фосфодиэфирные связи самопроизвольно образоваться не могут. Более того, все функциональные полимеры живых систем — белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды — это хорошо водорастворимые соединения, плохо растворимые в гидрофобных жидкостях. Их полная деструкция с расщеплением на мономеры в водной среде — это вопрос времени.

Очевидно, что синтез предбиологических макромолекул требует специальных условий. Эти условия обеспечивает гипотеза о термоцикле как движущей силе предбиологического синтеза и отбора макромолекул. Теоретическое описание и экспериментальная проверка этой гипотезы представлены в работах [7–9].

В условиях термоцикла возникают уникальные возможности синтеза и комбинаторного отбора макромолекул.

1. При температуре выше температуры фазового перехода создаются термодинамические (перенос образовавшейся воды в газовую фазу) и кинетические (ускорение химических реакций) условия образования пептидных и фосфодиэфирных



**Рис. 1.** (а) – Профиль свободной энергии каталитического цикла N-ацетиласпартатгидролазы; (б) – быстрая равновесная стадия (перенос протона и конформационные изменения) – механизм понижения энергетического барьера на лимитирующей стадии ферментативного катализа.

связей и реализации процессов твердофазной поликонденсации мономеров.

2. При обратном переходе системы в условия ниже температуры фазового перехода имеет место образование водной фазы и сосуществование образованного полимера в растворе с мономерами.

3. Повышение температуры на следующем этапе ведет к уменьшению в среде воды и существенному концентрированию растворов полимеров и мономеров вплоть до образования твердой фазы. В этих условиях при высоких температурах происходят два конкурирующих процесса:

а) полимерные молекулы не являются индифферентными участниками процесса. При условии сродства за счет супрамолекулярных взаимодействий могут и должны образовываться водородные, кулоновские и ван-дер-ваальсовы связи между функциональными группами полимерной цепи и мономерами. Это приводит к концентри-

рованию мономеров, облегчая процессы полимеризации и комплементарной селекции мономеров на полимерной матрице. Полимер всегда оказывает влияние на состав продуктов в силу супрамолекулярного взаимодействия мономера с полимером. Адсорбция мономера на полимере может характеризоваться очень слабой степенью селекции, но за счет большого числа циклов это может привести к образованию комплементарных цепей и «размножению» молекул определенной структуры (см. работы [7, 8]);

б) при высоких температурах, приближающихся к точке кипения растворителя, активизируются процессы гидролиза и разрушения полимерной цепи на фрагменты и мономеры. Этот процесс имеет два следствия:

– макромолекулярные структуры, более устойчивые к процессам гидролиза, переходят в твердую фазу с последующим процессом полимеризации на матрице;

**Таблица 1.** Времена эволюционного отбора макромолекул в режиме термоцикла при переходе доли «позитивных» молекул от  $10^{-100}$  до 1 при различных значениях «конкурентного преимущества»

Конкурентное преимущество ( $a_p/a_n$ )	Число циклов	Время, млн лет
1.000000006	$3.65 \cdot 10^{10}$	100
1.000000008	$2.75 \cdot 10^{10}$	75
1.000000015	$1.8 \cdot 10^{10}$	50
1.000000025	$9.1 \cdot 10^9$	25

– система обогащается мономерами за счет гидролиза «неудачных» структур с последующим использованием мономеров в реакции комбинаторного синтеза.

Принцип отбора и конкурентные преимущества чрезвычайно просты. Критерии отбора основаны на кинетических характеристиках процесса и имеют кинетическую природу:

1) преимущества имеют структуры, более эффективно концентрирующие и сорбирующие мономеры и тем самым реализующие более быстрый синтез полимерной цепи на матрице первичного полимера;

2) преимущества имеют структуры, более устойчивые к гидролитическому расщеплению на мономеры (комплексы полимеров с мономерами, более устойчивы к процессам гидролиза). Побеждает более «быстрый» и «устойчивый».

Колоссальным конкурентным преимуществом является появление каталитических свойств в гидролизе «неудачных» макромолекул, в синтезе полимеров или в синтезе мономеров.

Экспериментальные работы [9] подтвердили основные положения развитой теории. Работа была сделана на примере синтеза олигопептидов ограниченной длины цепи, позволяющем детальное масс-спектрометрическое изучение последовательности аминокислот в цепи.

Проблемам эволюции макромолекул на предбиологическом уровне уделено большое внимание [10–13]. В частности, следует отметить выдающуюся монографию М. Эйгена [10], давшего кинетическое описание процессам селекции макромолекул с использованием представления о «конкурентном преимуществе». Однако за рамками этих исследований остается открытым вопрос о механизме процессов саморазмножения макромолекул, о движущей силе, обеспечивающей упорядочение и «конкурентное преимущество», а в конечном итоге – молекулярную конвергенцию разнообразия полимеров к ограниченному числу типов биомолекул.

Представляется, что этот механизм связан с поведением систем «мономер–полимер» в режиме термоцикла. В частности, механизм может быть основан на использовании энергии Солнца и глобальном вращении Земли вокруг своей оси. В результате вращения любая точка земной поверхности испытывает циклические колебания температуры. На первичной Земле при достаточно слабой атмосфере эти колебания имели весьма высокую амплитуду. В зависимости от конкретных условий (радиации, теплообмена, теплопроводности) эти колебания характеризуются широким спектром амплитуд в пределах от  $+200$  до  $-100^\circ\text{C}$ . Термоцикл является абсолютно естественным процессом для любого космического тела (планеты и их спутники, кометы, астероиды). В этих условиях имеют место разнообразные химические реакции и фазовые переходы.

Таким образом, необходимыми базовыми условиями обсуждаемой модели являются:

1) трифункциональность мономеров, содержащих несколько (по крайней мере два) типов заместителей;

2) избыток мономеров;

3) термоцикл – циклическое изменение температуры, обеспечивающее обратимый фазовый переход воды из жидкого в газообразное состояние и обратно.

Была разработана кинетическая модель, основанная на этих принципах. Анализ модели демонстрирует, что термоцикл – способ превращения абсолютно невозможных событий (вероятность равна  $10^{-100}$ ) в абсолютно достоверные (вероятность равна единице) (табл. 1) [7].

Базовым кинетическим принципом эволюции является экспоненциальный характер развития системы. Только в режиме экспоненциального роста по всем ключевым переменным система может набрать необходимое количество материала и стать доминирующей. Переход в устойчивый стационарный режим по любому из ключевых компонентов лишает систему принципиального

эволюционного преимущества — экспоненциального роста [14].

1. Можно представить, что на первичных этапах развития полимерных систем синтезируются и сосуществуют три основных типа макромолекул, а именно, протопептиды — продукт поликонденсации разнообразных аминокислот, протоаналоги РНК и ДНК — продукты поликонденсации углеводов с образованием фосфодиэфирных связей. Полимеризационные процессы идут при высоких температурах выше температуры фазового перехода воды. Реакции поликонденсации абсолютно неспецифичны и все три основных класса полимеров характеризуются бесконечным набором вариантов структур.

2. Термоциклический процесс обеспечивает возможности частичного матричного синтеза во всех классах протополимеров. Синтез амидной и фосфодиэфирной связи в системе «полимер—мономер» не может протекать без взаимодействия полимерных молекул с мономером. При приближении к точке фазового перехода и элиминировании воды происходит существенное концентрирование растворов и взаимодействие (адсорбция) мономера с полимером за счет трифункционального характера мономеров. Частичное селективное мономера на полимере за счет водородных, ионных и гидрофобных связей обеспечивает при переходе точки фазового перехода частично селективный матричный синтез. В силу большого числа циклов (1 млрд лет —  $3.65 \cdot 10^{11}$  циклов) даже очень незначительное селективное приводит к существенному сужению распределения молекул по разнообразию структур (см. табл. 1). При этом все три типа протополимеров могут существовать независимо в «первичном протополимерном бульоне».

3. Одним из физико-химических факторов первичного отбора может быть кинетическая устойчивость протомолекулы в водной среде. При повышенных температурах, особенно при приближении к точке фазового перехода, существенную роль могут играть гидролитические процессы. Это обеспечивает преимущественное существование более кинетически устойчивых протополимерных молекул. Принципиально важным фактором отбора является тот факт, что комплексы более защищены от агрессивного, деполимеризующего действия воды. Это относится к комплексам «полимер—аминокислота», «полимер—нуклеотид», «пептид—РНК», «пептид—ДНК». В результате этих процессов популяции протополимеров обогащаются макромолекулами, хорошо адсорбирующими мономеры и образующими интерполимерные комплексы.

4. Качественный скачок эволюции — освоение возможностей экспоненциального роста. Три типа макромолекул, сосуществующих в «протопо-

лимерном бульоне», характеризуются принципиально разными свойствами. Пептиды способны образовывать глобулярные структуры и обладать ярко выраженными каталитическими свойствами. Прото—РНК могут проявлять каталитические свойства, формировать нелинейные трехмерные структуры, взаимодействовать с пептидами и селективно комплексообразоваться с ДНК. Для ДНК характерны комплементарные связи с РНК и одноцепочечными ДНК. Возможный переход к экспоненциально-эволюционному развитию определяется в первую очередь каталитическими свойствами протопептидов. Протопептиды (протобелки) способны участвовать как на стадиях полимеризации, так и на стадиях гидролитического расщепления кинетически неустойчивых макромолекул. В соответствии с принципами микроскопической обратимости один и тот же активный центр способен ускорять как прямой, так и обратный процесс. При низких концентрациях воды и высоких температурах катализатор может участвовать в синтезе мономер—мономерной связи, при низких температурах — в гидролизе и отборе нестабильных структур. При этом гидролитические процессы приводят к регенерации мономеров, способных при следующем термоцикле участвовать в образовании новых макромолекул. Это одно из главных качеств эволюционной комбинаторики.

Биополимерные молекулы, составляющие суть жизни на Земле, — продукт всего лишь одной химической реакции — реакции поликонденсации, или образования связи «мономер—мономер» с выделением молекулы воды. При этом «биополимерная жизнь» базируется на предельно ограниченном наборе химических элементов — углеводе, кислороде, фосфоре, водороде и азоте. Остальные элементы (железо, медь, селен, калий, натрий, кальций и др.) представлены в биоматериалах в следовых количествах и не входят в состав участников, образующих полимерные молекулы. Вместе с тем современная химия полимеров иллюстрирует гигантское разнообразие возможностей с участием кремния, бора, фосфора, металлов (алюминия, титана, олова и др.).

Полимеры на базе этих структур могут быть основой принципиально отличной от земной эволюционной комбинаторики с созданием саморазмножающихся (пролиферирующих) полимерных молекул. Гигантские возможности в этом плане лежат в области химии кремния. При этом кремний-органические полимеры обладают рядом выдающихся физических свойств и термостабильностью [15]1. Разнообразие возможностей химии полимеров позволяет надеяться, что в других условиях, отличных от планеты Земля, жизнь может иметь принципиально другую химическую основу.

Температурные пределы функционирования систем на основе полимеров имеют два принципиальных ограничения.

1. При высоких температурах макромолекулы нестабильны и деградируют на осколки различной химической природы. Одна из задач, которая решалась в области химии полимеров — создание материалов с высоким эксплуатационными характеристиками, способными «работать» при высоких температурах. В работе [14] приведены данные по изучению стабильности полимеров различной структуры, взятые из монографии [15]. Исследовалась потеря веса образца от температуры. Видно, что предельные условия, при которых полимеры сохраняют структуру, составляют 500–700°C. Вывод, который следует из этих данных, заключается в том, что «полимерная жизнь» на основе термостабильных полимеров, возможна на любой планете солнечной системы: Меркурий (350°C), Венера (450°C), Земля (0°C), Марс (–50°C), Юпитер (–120°C), Сатурн (–120°C).

2. Принципиальное ограничение возникновения «полимерной жизни» заключается в зависимости скорости химических реакций от температуры. Ограничения отсутствуют для реакций полимеризации на Земле, Венере и Меркурии. Для Меркурия и Венеры в силу высоких температур процессы полимеризации могут идти существенно быстрее, чем на Земле. При переходе от 150°C (полимеризация в пике термоциклов на Земле) к 300°C (полимеризация на Венере и Марсе) процесс ускорения приблизительно в 35000 раз.

Полимеризационные процессы драматически замедляются при переходе к низким температурам Марса, Юпитера или Сатурна. Если принять температуру поверхности Марса –50°C, а Сатурна (Юпитера) –150°C, то кинетика полимеризации замедляется в  $10^6$ – $10^9$  раз. Расчеты показывают, что стадия протополимерной эволюции на Земле заняла ~100 млн лет (см. табл. 1). С учетом температурного замедления эти процессы на Марсе, Сатурне или Юпитере должны были бы протекать  $10^{14}$ – $10^{17}$  лет. Если принять возраст Солнечной системы  $5 \cdot 10^9$  лет, становится очевидным, что «полимерная жизнь» на «холодных планетах» Марс, Юпитер, Сатурн возникнуть не могла. При этом локальные изменения температуры типа вулканической деятельности существенно на возникновение «протополимерной жизни» повлиять не могут, поскольку главная черта развиваемой концепции — устойчивый термоцикл. Длительность термоцикла определяется частотой вращения планеты вокруг своей оси.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ИНТЕЛЛЕКТА. ПРОТОННЫЙ МЕХАНИЗМ ЗАПИСИ ИНФОРМАЦИИ

Проблема исследования молекулярных основ нейробиологической памяти и связанная с этим проблема молекулярных основ интеллекта — одна из наиболее сложных и вызывающих проблем современного естествознания. Мозг как сложное молекулярное структурное образование обеспечивает многоканальное управление биохимическими процессами в организме, восприятие сенсорно-рецепторной информации, запись, хранение и считывание этой информации.

В рамках сенсорно-рецепторного функционирования мозг представляет собой эффективно функционирующую электро-механическую систему, в которой сопряжены процессы ионного транспорта и механические реакции вазодилаторного-вазоконстрикторного обеспечения энергией (кислородом) зоны возбуждения (нейро-васкулярное сопряжение). Нами экспериментально и на уровне кинетического моделирования детально исследованы процессы нейроваскулярного сопряжения [16, 17]. Важную роль в функционировании нейронных сетей играют ключевые метаболиты, такие как N-ацетиласпартат, N-ацетиласпартилглутамат, характерные только для нервной системы, а также ферменты, обеспечивающие метаболизм ключевых агентов [18–21].

Принципиальной по сложности и важности проблемой является вопрос о природе и механизмах записи и считывания информации, записанной на молекулярном уровне в сетях нейронов. Развиваемая нами концепция базируется на следующих положениях.

1. Основой нейробиологической памяти является нейросеть с пересекающейся нейронной трехмерной системой синапсов, обеспечивающей контакты между нейронами и создающей систему проведения нервного возбуждения. Синапсы представляют собой «химические полупроводники», обеспечивающие по принципу «открыт-закрыт» проведение ионного сигнала возбуждения. Ранее были сделаны расчеты, демонстрирующие, что объем нейронной сети и контактов (синапсов) между нейронами достаточен для записи всей информации, которая характерна для мозга человека. Согласно работе [22] потенциальный объем памяти человека составляет  $I = 10^9$  бит. Потенциально за счет синаптических контактов в мозге человека может быть записано  $10^{10}$  бит информации.

2. Существует экспериментально обоснованный факт, согласно которому ацетилхолин и ацетилхолиновые синапсы играют ключевую роль в механизмах обучения и памяти [23]. Одним из ре-

зультатов и доказательств этого положения является использование ингибиторов ацетилхолинэстеразы — фермента, определяющего поведение ацетилхолиновых синапсов, для улучшения памяти у больных деменцией и болезнью Альцгеймера.

3. Нами проведено детальное кинетическое описание процесса функционирования ацетилхолинового синапса [24–26]. Механизм катализа ацетилхолинэстеразой, исследованный на основе суперкомпьютерного молекулярного моделирования, представлен в работах [18, 19]. Как все сериновые гидролазы, каталитическая функция которых определяется имидазольной группой гистидина, фермент ингибируется ионами водорода с  $pK_a \sim 7$ . Параметры макромолекулярной структуры синапса следующие: толщина синаптической щели, представляющей собой гель, насыщенный ацетилхолинэстеразой, 20–100 нм; концентрация холина в вазикле, инъектируемой в синаптическую щель, высока и достигает 0.1–1.0 М [27–29] при «разряде» нескольких вазикул с переносом ацетилхолина в щели достигает 10–300 мМ. Это в высшей степени высокая концентрация. Для того чтобы гидролизовать нейромедиатор практически полностью и не дать ему возможность «заселить» ацетилхолиновые рецепторы постсинаптической мембраны, в миллисекундные интервалы времени (время «разряда» синапса) необходима исключительно высокая концентрация фермента — 0.5–50 мМ. Принципиальной особенностью функционирования холинэргического синапса является продукция в синаптической щели ионов водорода в результате образования уксусной кислоты ( $pK_a \sim 4$ ). Образование кислоты в условиях высокой концентрации субстрата и фермента в макрокинетических условиях геля синаптической щели вносит принципиально важный вклад в динамику функционирования синапса. Протон взаимодействует с имидазольной группой гистидина 447 в равновесном режиме, полностью блокируя каталитическую активность ацетилхолинэстеразы. Это делает синапс проводящим сигнал нейронального возбуждения. В обзоре [30] детально описаны динамические закономерности функционирования холинэргического сигнала с учетом процессов синтеза и диссипации ионов водорода в синаптической щели при различных концентрациях фермента и субстрата.

Ключевым положением концепции является предположение о том, что запись информации происходит путем формирования структуры проводящих синаптических контактов (формирование «нейрообраза») за счет создания структуры переноса возбуждения по «открытым» синаптическим цепям. Функционирование ацетилхолинового синапса обеспечивает этот механизм эф-

фективным средством реализации проводимости (открытости) синапса — протонированием ацетилхолинэстеразы в процессе синаптического «разряда» и переноса возбуждения. В общем случае можно представить несколько механизмов реализации формирования сигнал-проводящих цепей и «нейрообраза». Это может быть реализовано путем увеличения частоты возбуждения, изменения скорости распада ацетилхолинэстеразы, изменения вязкости мембраны синаптической щели, электромеханического уменьшения толщины мембраны (электро-констрикционный процесс). Наиболее эффективным является создание устойчивого сигнал-проводящего канала путем увеличения частоты импульсов. В работе [19] показано, что при прочих равных условиях переход от частот 100 Гц к 150 Гц может полностью заблокировать активность ацетилхолинэстеразы в синаптической щели за счет протонирования активного центра. Это — протонный механизм записи информации.

Процессы переноса протона играют важную роль в функционировании нейросетей. Разнообразные эффекты, связанные с изменением pH, анализируются в работах [31–37].

Хранение информации в виде «нейрообраза» может быть связано с pH блокировкой ацетилхолинэстеразы в синаптической щели, обеспечивающей каждому синапсу «нейрообраза» непрерывное участие в передаче сигнала. Этот механизм может работать как при афферентном пути (запись информации), так и при эфферентном пути (считывание информации). Косвенным доказательством протонного механизма формирования памяти является экспериментальная работа, демонстрирующая увеличение кратковременной памяти при «закислении» мозга животных до pH 6.9 путем временной ингаляции газовой смесью, содержащей 10% углекислоты [31].

4. Переход от функционирования отдельного синапса к функционированию цепи позволяет оценить величину «элементарной» ячейки памяти, способной записать (считать) один бит информации. Элементарные расчеты показывают, что для записи одного бита информации достаточно цепь длиной восемь-десять синаптических контактов.

Трехмерная структура матрицы памяти, реализуемая в нейрональной сети путем проводящих сигнал контактов ( $H^+$ -блокировка ацетилхолинэстеразы синапса) может быть достаточно разнообразной. Это могут быть линейные цепи с «элементарной» ячейкой памяти в один бит (восемь-десять синапсов); цепи, сформированные в виде нейронального «куста» или «дерева»; «щетки», представленные в виде трехмерного  $Q_R$ -шаблона.

«Разряд» синапса с передачей сигнала от одного синапса к другому – относительно медленный процесс. Проведенные выше расчеты показывают, что в записи-хранении одного бита информации участвуют восемь-десять синаптических контактов («элементарная цепь» памяти). Функционирование элементарной цепи предполагает последовательную передачу сигнала. С учетом того, что «разряд» синапса происходит приблизительно за 1 мс, один бит информации может быть записан-считан соответственно за ~10 мс. Таким образом, «элементарная» ячейка памяти имеет производительность ~100 бит в секунду.

Как известно, в науке наиболее важная задача – формирование и формулирование проблемы. Л.А. Блюменфельд обладал удивительными способностями постановки вопросов и инициирования интереса к наиболее сложным задачам естествознания, включая как «решаемые», так и «нерешаемые» проблемы.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Л. А. Блюменфельд, *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики* (URSS, М., 2002).
- С. Д. Варфоломеев, *Химическая энзимология* (Научный мир, М., 2019).
- A. Warshel and M. Levitt, *J. Mol. Biol.*, **103**, 227 (1976).
- H. M. Senn and W. Thiel, *Angew. Chem. Int.*, **48**, 1198 (2009).
- V. Voevodin, A. Antonov, D. Nikitenko, et al., *Supercomputing Frontiers and Innovations*, **6** (2), 4 (2019).
- M. G. Khrenova, B. D. Kotz., S. D. Varfolomeev, et al., *J. Phys. Chem.*, **121**, 9381 (2017).
- S. D. Varfolomeev, *Mendeleev Commun.*, **17** (1), 7 (2007).
- S. D. Varfolomeev and S. V. Lushchekina, *Geochem. Int.*, **52** (13), 1197 (2014).
- O. V. Demina, A. S. Kononikhin, A. V. Laptev, et al., *Russ. Chem. Bull.*, **61** (2), 422 (2012).
- M. Eigen, *Self-Organization of Matter and the Evolution of Biological Macromolecules* (Springer Verlag, Berlin, 1971).
- S. W. Fox, *The Emergence of Life: Darwinian Evolution from the Inside* (Basic Books, New York, 1988).
- S. A. Kauffman, *The Origin of Order: Self-Organization and Selection in Evolution*. (Oxford University Press, Oxford, 1993).
- L. E. Orgel, *The Origin of Life: Molecules and Natural Selection* (John Wiley, New York, 1973).
- С. Д. Варфоломеев и И. В. Гачок, *Геохимия*, **66** (11) 1042 (2021).
- В. В. Коршак, *Термостабильность полимеров* (Наука, М., 1969).
- S. D. Varfolomeev, N. A. Semenova, M. V. Ublinsky, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **729**, 843 (2019).
- S. D. Varfolomeev, V. I. Bykov, N. A. Semenova, and S. V. Tsybenova, *ASC Chem. Neurosci.*, **12**, 2202 (2021).
- С. В. Лушекина, П. Массон, Г. Ф. Махаева и др., *Фосфорорганические нейротоксины* (М., 2020).
- A. V. Nemukhin, S. V. Lushchekina, A. V. Bochenko, et al., *J. Mol. Modeling*, **14**, 409 (2008).
- E. D. Kotz, M. G. Khrenova, S. D. Varfolomeev, et al., *J. Phys. Chem.*, **20** (18), 4221 (2016).
- Е. В. Котц, М. Г. Хренова, А. В. Немухин и С. Д. Варфоломеев, *Успехи химии*, **88** (1), 1 (2019).
- С. А. Титов, *Нейрохимические основы памяти* (Нейрохимия, М., 1996).
- M. E. Hasselmo, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **16** (6), 710 (2006).
- С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков и С. Б. Цыбенкова, *Докл. РАН*, **491**, 184 (2020).
- С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков и С. Б. Цыбенкова, *Докл. РАН*, **492**, 305 (2020).
- С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков и С. Б. Цыбенкова, *Изв. РАН. Сер. хим.*, № 8, 1585 (2020).
- M. C. Peld, A. Lieb, and F. Nijhout, *Bioessays*, **32**, 422 (2010).
- J. P. Colletier, D. Fournier, and H. M. Greenblatt, *EMBO J.*, **25** (12), 2746 (2006).
- V. P. Whittaker, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **493**, 77 (1987).
- С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков и С. Б. Цыбенкова, *Фосфорорганические нейротоксины* (М., 2020).
- J. Du, M. P. Price, R. J. Tagher, et al., *E-life*, 22564 (2017).
- O. A. Krishtal, Y. Y. Osipchuk, and T. N. Shelest, *Broun Res.*, **436** (9), 352 (1987).
- J. A. Cottfried and M. Chester, *J. Neurophysiol.* **76** (4), 2804 (1996).
- M. J. Palmer, C. Hull, and J. Vigh, *J. Neurosci.*, **23** (36), 11332 (2013).
- C. J. Dietrich, *J. Neurosci.*, **30** (47), 16044 (2010).
- M. Chester, *Physiol. Rev.*, **83** (4), 1183 (2003).
- M. Chester and K. Kaila, *Trends Neurosci.*, **15** (10), 396 (1992).

**Lev Aleksandrovich Blumenfeld and Modern Biochemical Physics.  
«Solvable» and «Unsolvable» Problems****S.D. Varfolomeev\*, \*\*, \*\*\****\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia**\*\*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia**\*\*\*Institute of Physicochemical Foundations of the Functioning of Neural Networks and Artificial Intelligence, Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

The work is devoted to the analysis and development of the problems formulated by L.A. Blumenfeld, an outstanding representative of Soviet science. This paper discusses achievements in the description of the nature of enzymatic catalysis by methods of molecular mechanics of proteins and supercomputer-rescued quantum-chemical modeling of the catalytic cycle with the demonstration of the determining role of conformational changes in the functional groups of the active center. A theory of prebiological evolution at primary stages is proposed and analyzed in detail, this theory explains the possibility of synthesis and evolution of protopolymers. Evolutionary combinatorics and the possibility of "multiplication" of macromolecules in the processes of polycondensation of monomers are provided by a thermal cycle with overcoming the phase transition point of water ("synthesis-hydrolysis" process with adsorption of the monomer on the matrix of the primary polymer). One possible way of solving the "unsolvable" problem such as "how matter becomes consciousness" is to consider a proposed and analyzed theory of recording and storing neuroinformation based on kinetic modeling of cholinergic synapses (proton mechanism for recording information).

*Keywords: enzymatic catalysis. KM/MM modeling, conformational mobility of the active site, protopolymers, thermal cycle, evolutionary combinatorics, kinetic model for a synapse, cholinergic synapses, proton mechanism for recording information*

## АРХИТЕКТУРА КОНДЕНСИРОВАННОЙ ДНК В НУКЛЕОИДЕ БАКТЕРИИ *Escherichia coli*

© 2022 г. Ю.Ф. Крупянский\*,#, В.В. Коваленко\*, Н.Г. Лойко\*, \*\*, А.А. Генералова\*,  
А.В. Моисеенко\*, \*\*\*, Э.В. Терешкин\*, О.С. Соколова\*\*\*, К.Б. Терешкина\*,  
Г.И. Эль-Регистан\*\*, А.Н. Попов\*\*\*\*

\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,  
ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, Россия

#E-mail: yufk@chph.ras.ru

\*\*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
Ленинский проспект, 33/2, Москва, 119071, Россия

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

\*\*\*\*European Synchrotron Radiation Facility, avenue des Martyrs 71, CS 40220, 38043 Grenoble Cedex 9, France

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 11.04.2022 г.

Принята к публикации 06.05.2022 г.

3D-архитектура генома определяет функцию клетки. Изучение конденсации ДНК в клетке важно для понимания механизмов выживания бактерий и для медицины, поскольку упорядоченная конденсация ДНК обеспечивает устойчивость патогенных бактерий к действию антибиотиков. В разбавленном растворе длина ДНК составляет несколько сантиметров. Длина бактерии *Escherichia coli* составляет около 2.0 мкм. Столь драматичное уменьшение объема, занимаемого ДНК – следствие ее конденсации. Обнаружено, что ДНК организована в нуклеоиде иерархически с тремя уровнями компактизации ДНК: нижний уровень (малый масштаб  $\geq 1$  кб п.о.) обеспечивается гистоноподобными NAP-белками. Бактерии при стрессе голодания, в отличие от активно растущих бактерий, используют энергонезависимый механизм поддержания порядка и защиты жизненно важных структур (ДНК), как в неживой природе. Изучение структуры ДНК в нуклеоиде бактерии *E. coli* проводили с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии. Экспериментальные результаты позволили визуализировать структуры нижнего иерархического уровня компактизации ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток. Впервые проведенная серия дифракционных экспериментов свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации ДНК во всех изученных бактериях. Просвечивающая электронная микроскопия позволила извлечь более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерии *E. coli*. Обнаружены внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомо-подобные структуры ДНК. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась впервые, она является результатом множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг белка Dps и его ассоциатов.

**Ключевые слова:** ДНК, бактерия *Escherichia coli*, стресс голодания, внутриклеточные нанокристаллическая, жидкокристаллическая, свернутая нуклеосомоподобная структуры.

DOI: 10.31857/S0006302922040020, EDN: ISJNCS

*Светлой памяти Льва Александровича Блюменфельда посвящается*

3D-архитектура генома определяет функцию клетки. Изучение конденсации ДНК в клетке важно также для понимания механизмов выживания бактерий и для медицины, поскольку упорядоченная конденсация ДНК обеспечивает устойчивость патогенных бактерий к действию анти-

биотиков. Устойчивость к антибиотикам на сегодняшний день является одной из важнейших медицинских проблем в мире.

Бактерии *Escherichia coli*, как и другие микроорганизмы, находятся в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, часто неблаго-

**Сокращения:** ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, Dps – ДНК-связывающий белок [впервые выделенный] из голодающих клеток (DNA-binding protein from starved cells).

приятных. Изменения параметров среды воспринимаются ими как стресс. В ответ на любые стрессовые воздействия клетки *E. coli* включают универсальные наследственные стратегии адаптации, основанные на структурных, биохимических и генетических перестройках, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях [1]. В первую очередь эти стратегии направлены на защиту генетического материала клетки. Стресс голодания и переход бактерий в покоящееся состояние представляет особый интерес, поскольку покоящиеся клетки существенно более устойчивы к воздействию антибактериальных препаратов, кроме этого, бактерии приобретают способность выживать в самых агрессивных условиях.

Данный обзор посвящен последним оригинальным (2017–2022 гг.) и литературным результатам экспериментальных исследований структурной организации ДНК в покоящихся клетках *E. coli* с помощью дифракции синхротронного излучения, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) при действии на бактерию стресса голодания. Приведены результаты молекулярно-динамического моделирования кристаллов Dps-ДНК. Обсуждаются изменения в архитектуре нуклеоида при переходе от активно растущих к покоящимся клеткам, образующимся при стрессе голодания. Для лучшего понимания происходящих изменений обсуждается архитектура нуклеоида в активно растущей клетке. Обсуждаются последние методические успехи в нано-визуализации и нано-томографии клеток с помощью синхротронного излучения и электронной микроскопии, которые позволят в обозримом будущем определять архитектуру нуклеоида с высоким разрешением как в активно растущих, так и покоящихся бактериях.

### КОНДЕНСАЦИЯ ДНК В АКТИВНО РАСТУЩИХ КЛЕТКАХ. ФРАКТАЛЬНАЯ ГЛОБУЛА

*E. coli* – широко распространенная грамотрицательная бактерия, являющаяся одним из важнейших инструментов биологической науки [2]. *E. coli* в этом смысле является аналогом атома водорода для микробиологии.

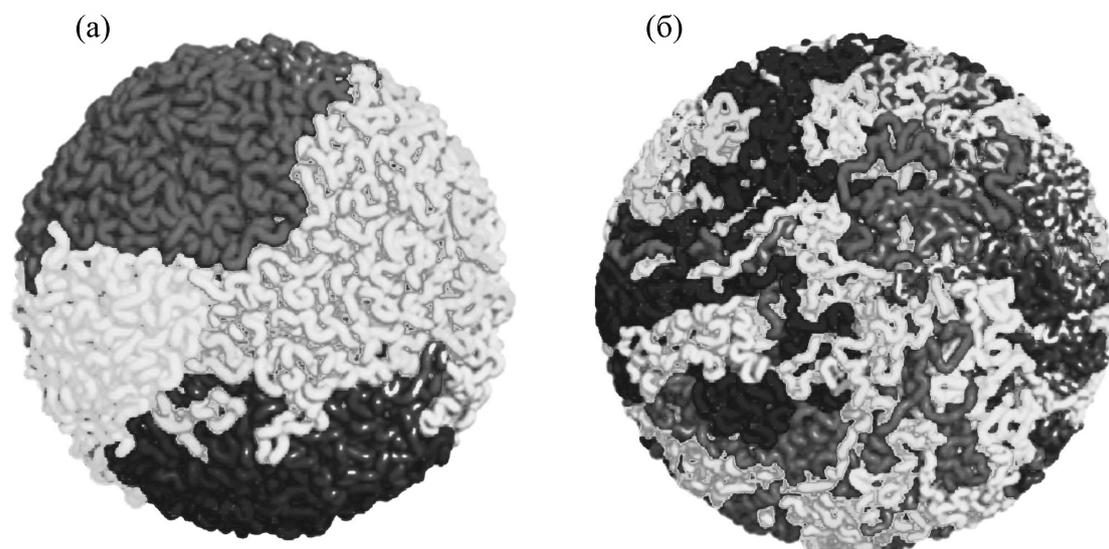
Бактериальная геномная ДНК и ассоциированные с ней белки (nucleoid-associated proteins, NAP-белки) расположены в клетке в сильно конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде. ДНК – длинный, сильно заряженный гетерополимер. В разбавленном растворе при термодинамическом равновесии ДНК бактерии *E. coli* образует стохастический клубок [3] объемом около  $500 \text{ мкм}^3$ . Объем нуклеоида *E. coli*, где располагается ДНК, в клетке не превы-

шает  $1 \text{ мкм}^3$ . Для размещения в нуклеоиде ДНК должна дополнительно компактизоваться [4]. Кроме этого, конденсированная в нуклеоиде ДНК должна быть функциональной. Конденсированная ДНК должна быть способна осуществлять такие процессы как репликация, рекомбинация, сегрегация и транскрипция. Структура бактериального нуклеоида с высоким разрешением еще не определена. Однако исследования, начавшиеся еще в 1971 г., показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру и что конденсация ДНК имеет некоторое сходство с фолдингом (самоорганизацией) белка [4, 5]. Можно грубо выделить следующие уровни структурной организации компактной бактериальной ДНК [6]. Низший уровень (малый масштаб  $\sim 1$  килобайт пар оснований (п.о.)) обеспечивается взаимодействием ДНК с ДНК-связывающими белками. На промежуточном уровне (средний масштаб  $\sim 10$  килобайт п.о.) ДНК образует сверхспиральные петли. На самом высоком уровне (мега-масштаб  $\sim 10^6$  п.о.) ДНК образует шесть пространственно-организованных макродоменов с четкой территориальной организацией (как у фрактальной глобулы), на которые разделен бактериальный нуклеоид.

Фрактальная (или складчатая) глобула – это компактное полимерное состояние, которое возникает при конденсации полимера в результате топологических ограничений, препятствующих переходу одной области цепи в другую. Это долгоживущее промежуточное состояние было введено в 1988 году А.Ю. Гроссбергом с соавт. [7]. Экспериментальное исследование свойств пространственной организации хроматина в ядре клетки человека с использованием набора новых методов молекулярной биологии, сокращенно называемых 3С (chromosome conformation capture) и Hi-C, привлекли внимание к фрактальной глобуле как к структурной модели хроматина на крупном масштабе  $\sim 10 \text{ Мб}$  [8, 9].

Согласно работе [10], коллапс длинного полимера из-за топологических ограничений происходит с образованием складок все увеличивающихся размеров. В первую очередь появляются мелкие складки. Это приводит к образованию эффективно более толстого складчатого полимера, который затем уже сам образует более крупные складки и т. д. [7]. Авторы работы [7] продемонстрировали, что этот процесс должен приводить к образованию долгоживущего состояния, которое они назвали складчатой (впоследствии ее стали называть фрактальной) глобулой. Было предположено, что такая глобула характеризуется иерархией складок, образуя самоподобную структуру [7].

На рис. 1 показаны конформации фрактальной и равновесной глобул. Фрактальная глобула



**Рис. 1.** Конформации фрактальной (а) и равновесной (б) глобул. Фрактальная глобула имеет четкую территориальную организацию, которая сильно контрастирует со смешением, наблюдаемым в равновесной глобуле.

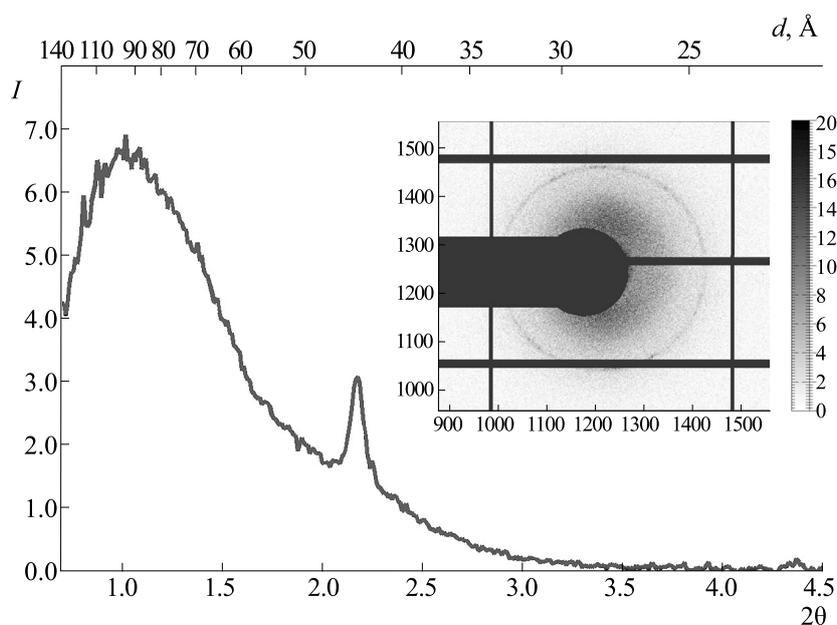
имеет поразительную территориальную организацию цепочки, которая сильно контрастирует с перемешанной организацией цепочки, наблюдаемой в равновесной глобуле. Хромосомные контакты в клетках человека были охарактеризованы с помощью экспериментов Hi-C. При сравнении с экспериментом было решено, что фрактальная глобула достаточно хорошо описывает свойства хромосомы человека на мега-масштабах, или третьем уровне структурной организации ДНК. Поэтому фрактальная глобула была предложена в качестве модели сворачивания ДНК внутри клетки на крупном масштабе. Фрактальная глобула обладает несколькими важными свойствами, которые делают ее привлекательным способом организации хроматина. У фрактальной глобулы нет узлов. Динамика раскрытия хроматина в незаузленной конформации фрактальной глобулы очень сильно отличается от динамики раскрытия ДНК в чрезвычайно запутанной конформации равновесной глобулы [9].

Для осуществления функции нужен легкий доступ к каждому кусочку цепочки ДНК. Очевидно преимущество модели, описываемой фрактальной глобулой, поскольку эта глобулярная структура позволяет практически безболезненно открыть любую петлю ДНК, открывая доступ к любому сайту ДНК [9]. В работе [9] моделировалось флуктуационное открытие области размером около 3 Мб в двух глобулах — складчатой и равновесной. Во фрактальной глобуле область раскрывается, образуя большую петлю. В равновесной глобуле такая же область не открывается из-за перепутывания цепи. В модели хроматина, описываемого равновесной глобулой, заузленная

цепочка ДНК не позволяет открыть петлю достаточного размера и доступ к сайтам ДНК ограничен.

#### РОСТ БАКТЕРИЙ. СТРЕСС ГОЛОДАНИЯ. БЕЛОК Dps

Бактериальный рост — это деление клетки бактерии на две дочерние клетки. Если не происходит мутационного события, полученные дочерние клетки генетически идентичны исходной клетке. Динамику роста бактериальной популяции подразделяют на четыре фазы [11]. Первая фаза роста называется лаг-фазой, это период медленного роста, когда клетки адаптируются к среде, богатой питательными веществами. За лаг-фазой следует логарифмическая или экспоненциальная фаза, во время которой происходит быстрый экспоненциальный рост популяции. В ходе экспоненциальной фазы питательные вещества потребляются с максимальной скоростью до тех пор, пока одно из необходимых соединений не закончится и не начнет подавлять рост. Третья фаза роста называется стационарной, она начинается при нехватке питательных веществ для быстрого роста. Скорость метаболизма падает, и клетки начинают расщеплять белки, не являющиеся строго необходимыми. Финальная фаза роста — фаза смерти, при которой запас питательных веществ исчерпывается и бактерии погибают. В экспоненциальной фазе роста меняется относительное содержание ДНК-ассоциированных гистоноподобных белков (NAP-белков). Например, если в фазе роста содержание белка Dps (DNA-binding protein from starved cells, ДНК-свя-



**Рис. 2.** Зависимость интенсивности рассеяния от угла  $2\theta$  для образца голодающих бактерий *E. coli* штамма BL21-Gold(DE3). На врезке – дифракционная картина для этого образца. Повышенная интенсивность свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации (близкой к нанокристаллической) ДНК с ДНК-ассоциированными белками.

зывающий белок [впервые выделенный] из голодающих клеток) составляет около 6000 молекул белка на клетку, то в стационарной и в поздней стационарной фазе содержание белка Dps становится подавляющим по сравнению с другими белками и составляет 180000–200000 молекул белка на клетку. В поздней стационарной фазе решающим для конформации ДНК (архитектуры бактериального нуклеоида) становится взаимодействие ДНК с Dps. Dps играет регулируемую и защитную роль в клетках *E. coli* [12–15]. При голодании Dps очень активен и может сильно изменять структуру бактериальной ДНК. Его структура [16] и взаимодействие с ДНК недавно были изучены *in vitro* [16, 17] и *in silico* [18, 19]. Dps представляет собой додекамер и состоит из 12 идентичных цепей [16]. Структура депонирована в Protein Data Bank (1dps.pdb).

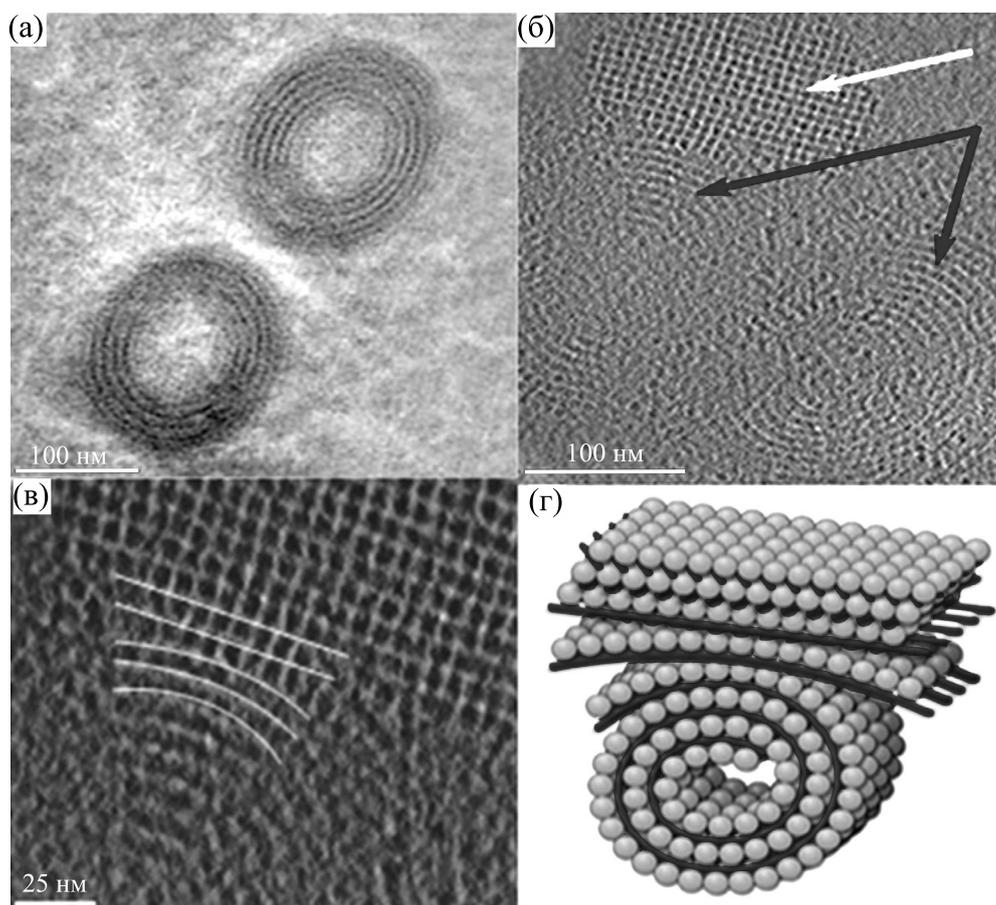
#### ПОКОЯЩИЕСЯ КЛЕТКИ. СТРУКТУРНЫЙ ОТВЕТ НА СТРЕСС. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ НАНОКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ НУКЛЕОИДА

При стрессе голодания поддержание упорядоченности динамическим способом становится невозможным (практически отсутствует метаболизм), и бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (ДНК) – создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [20]. Клетки

становятся покоящимися. Большинство клеток (до 99.98%) в голодающих долгое время популяциях подвергаются автолизу. Остальные клетки развиваются в покоящиеся формы, которые существенно отличаются по структурной организации от растущих клеток [21].

Для покоящихся клеток можно ожидать обнаружение совершенно новых структур конденсированной ДНК по сравнению с активно растущими клетками. Одним из механизмов структурного ответа на стресс голодания является внутриклеточная нано(био)кристаллизация ДНК с Dps. Внутриклеточная нано(био)кристаллизация позволяет защитить ДНК от повреждений и потенциальную способность возобновления метаболической активности бактериальных клеток в свежей среде. Другие виды структурного ответа на стресс голодания изложены в разделе «АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВИДЫ КОНДЕНСАЦИИ ДНК В КЛЕТКЕ».

Были проведены эксперименты по измерению рассеяния синхротронного излучения на образцах, содержащих клетки бактерий *E. coli* штамма BL21-Gold (DE3), трансформированного плазмидой pET-Dps и подвергнутого индукции повышенной экспрессии белка Dps [22, 23]. Для популяции клеток под действием стресса голодания зарегистрированы дифракционные картины вида, показанного на врезке на рис. 2. С целью детального анализа этих данных построены зависимости интенсивности рассеяния от угла рассе-



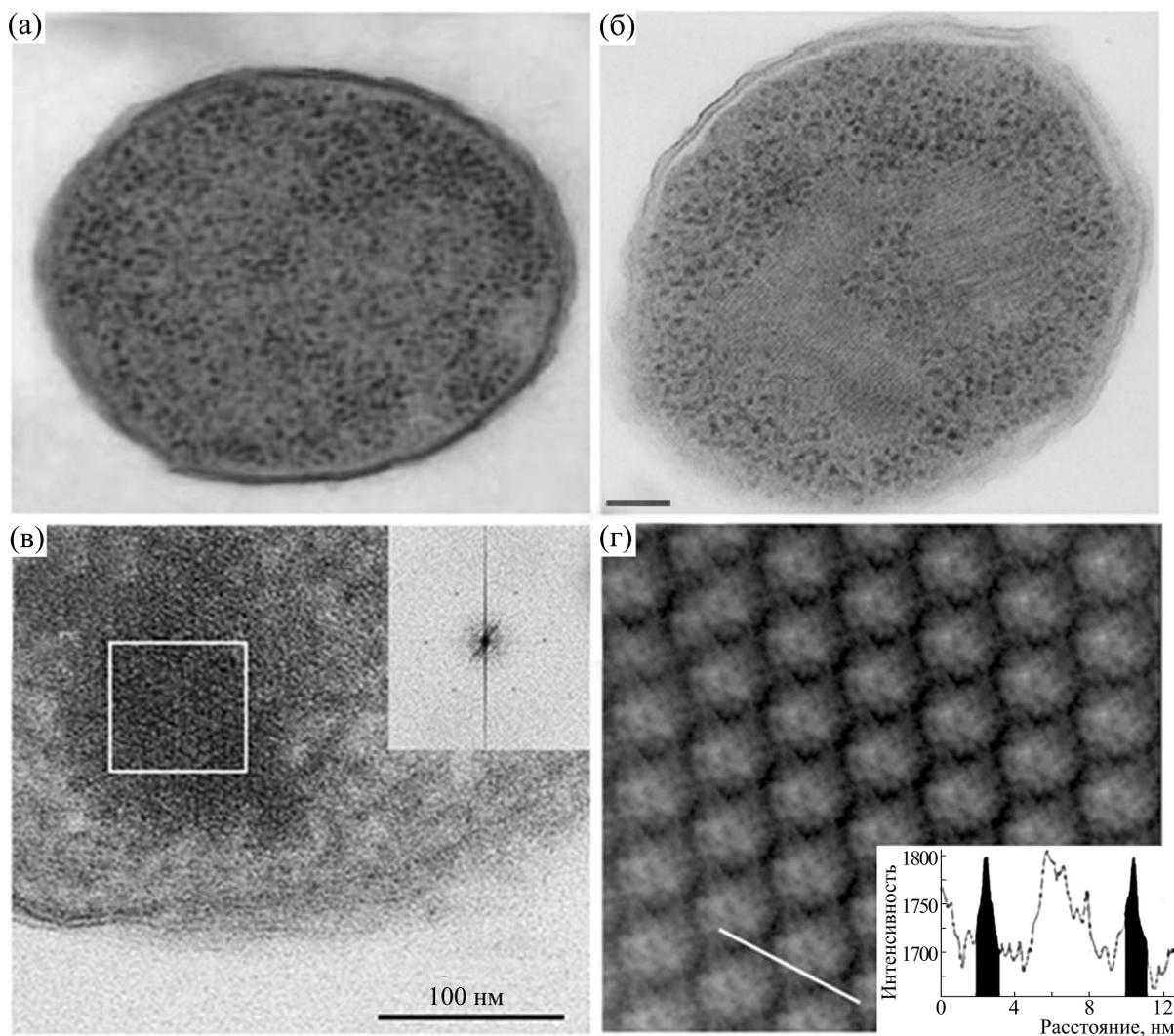
**Рис. 3.** ПЭМ. Последовательная внутриклеточная кристаллизация ДНК–Dpsv клетках *E. coli* при стрессе голодания: (а) — при 24-часовом голодании (образование тороидов); (б) — при 36-часовом голодании, наблюдаются структуры ДНК (черные стрелки) в непосредственной близости от растущего кристалла ДНК–Dps (белая стрелка); (в) — сильно увеличенная область из рис. (б), показывающая рост кристаллов (белые линии); (г) — модель внутриклеточной сборки ДНК–Dps, которая изображает первоначально сформированную тороидальную структуру, действующую как шаблон для кристалла ДНК–Dps. Взято с разрешения из работы [25].

яния  $2\theta$  с помощью усреднения 2D-дифракционных картин по азимутальному углу. Обнаружены зоны повышенной интенсивности с периодами кристаллической структуры приблизительно 90 и 45 Å, в отличие от контрольных образцов растущих клеток, где области повышенной интенсивности не были замечены. Первый широкий пик лежит в области 90–93 Å. Диаметр Dps-додекамера около 90 Å, поэтому этот пик может соответствовать расстоянию между слоями Dps. Второй пик в 45 Å может соответствовать второму порядку дифракции Dps–Dps или расстояниям ДНК–ДНК в плотно упакованном ансамбле ДНК [24].

Приведенные на рис. 2 результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего нанокристаллической) нуклеоида бактерий с указанными выше периодами.

**Просвечивающая электронная микроскопия** позволяет визуализировать структуру конденсированной в нуклеоиде ДНК. Ниже приведены результаты исследований, полученные на сверхтонких срезах с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (Jeol, Япония) с ускоряющим напряжением 200 кВ. Томограммы получали на полутолстых (300–400 нм) срезах. Аналитическую электронную микроскопию (энергодисперсионные рентгеновские спектры и элементный анализ) проводили на аналитическом просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (Jeol, Япония).

Электронная микроскопия и электронно-микроскопическая томография позволили добиться существенного прогресса в визуализации упорядоченных ДНК–Dps образований *in vivo*. В стационарной фазе при 24-часовом стрессе голодания ДНК образует тороидальные структуры (рис. 3а). Для тороидов, возникающих в клетках



**Рис. 4.** Данные ПЭМ для клеток *E. coli*. (а) – Экспоненциально растущие клетки *E. coli*. Темные частицы – рибосомы; пространство, свободное от рибосом, содержит ДНК. (б) – Просвечивающая электронная микроскопия клетки после 48 ч голодания, выявляющая плотно упакованные кристаллы ДНК–Dps; Взято с разрешения из работы [25]. (в) – Полутолстый срез томограммы клетки *E. coli* с нанокристаллической структурой, на врезке – Фурье-преобразование области с белой рамкой. (г) – Отфильтрованный кристалл ДНК–Dps, на врезке – профиль интенсивности вдоль белой линии на основном изображении. Черным выделены плотности, соответствующие межслойным цепям ДНК.

*E. coli*, данные методы позволили определить форму и размеры тороидальных структур (внешний диаметр – около 150 нм, внутренний диаметр – около 50 нм (рис. 3а) [25]. Далее (при 36-часовом стрессе голодания) наряду с тороидальными структурами появляются кристаллические структуры ДНК–Dps (рис. 3б,в). Это позволило предположить, что тороиды играют роль подложки для последующего образования кристаллов ДНК–Dps. Авторы работы [25] выдвинули гипотезу о том, что ДНК локализована между гексагонально упакованными слоями Dps в кристалле (рис. 3г). Это означает, что характерное расстояние между цепочками ДНК–ДНК будет около 90 Å, а не 45 Å, как предполагалось выше.

На рис. 4а приведены результаты, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) для экспоненциально растущей клетки. Темные частицы обозначают рибосомы. Место, свободное от рибосом, содержит хроматин [25]. На рис. 4б представлены результаты для клетки, испытавшей стресс 48-часового голодания. Тороидальные структуры исчезают, наблюдаются достаточно большие кристаллы ДНК–Dps [25]. На рис. 4в показан срез томограммы клетки с нанокристаллической структурой; на врезке на рис. 4в – результат Фурье-анализа нанокристаллической области клетки, очерченной белой каймой [21], свидетельствующий о наличии нанокристалла в этой области клетки [21].

Отфильтрованный кристалл ДНК–Dps представлен на рис. 4г; на вставке к рис. 4г изображен профиль интенсивности электронной плотности вдоль белой линии основного изображения. Черным выделены плотности, видимо, соответствующие межслойным цепям ДНК [21]. Вопрос о точной локализации и форме укладки ДНК в нанокристаллах в комплексе с Dps остается открытым. Приведенные результаты электронно-микроскопических исследований не визуализируют ДНК напрямую, поэтому предполагаемая конформация ДНК в нанокристаллах является гипотетической.

Экспериментальные данные, полученные с помощью дифракции синхротронного излучения и ПЭМ, не согласованы друг с другом полностью и не дают четкого ответа на вопрос о конформации ДНК в нанокристаллических областях клетки. Для того чтобы найти ответ на этот вопрос, было решено действовать следующим образом. Мы предположили, что ДНК–Dps легко образуют кристаллы *in vitro* и что конформация ДНК в этих кристаллах идентична конформации ДНК во внутриклеточных кристаллах. Для изучения конформации ДНК в кристаллах *in vitro* были выбраны две методики: рентгеновская кристаллография, использующая в качестве источника синхротронное излучение и электронно-микроскопические исследования.

Опишем результаты, полученные методом макромолекулярной кристаллографии [26]. Для проведения экспериментов были синтезированы кристаллические комплексы ДНК (длиной 3000 п.о.) с белком Dps. Синтезированные кристаллы оказались небольшими по размеру ( $\approx 3\text{--}7$  мкм). Полученные малые монокристаллы плохо отражали излучение, обладали низкой симметрией и неизвестной пространственной группой. Из-за этого автоматическая обработка данных, хорошо работающая в случае больших кристаллов, в данном случае оказалась неуспешной. Автоматическая обработка данных для синтезированных кристаллов выдала шесть пространственных групп, более или менее подпадающих под экспериментальные данные. Поэтому основной задачей стала задача определения пространственной группы кристалла. Для продвижения дальше и определения пространственной группы пришлось объединять общие рефлексы от разных малых монокристаллов. Первым шагом вперед являлось определение кластера, состоящего из наиболее изоморфных монокристаллов данных. Для выбора удобного набора данных и их объединения был использован иерархический кластерный анализ с помощью программы ccCluster [27]. Оказалось, что объединение данных, принадлежащих группе P1, наиболее успешно.

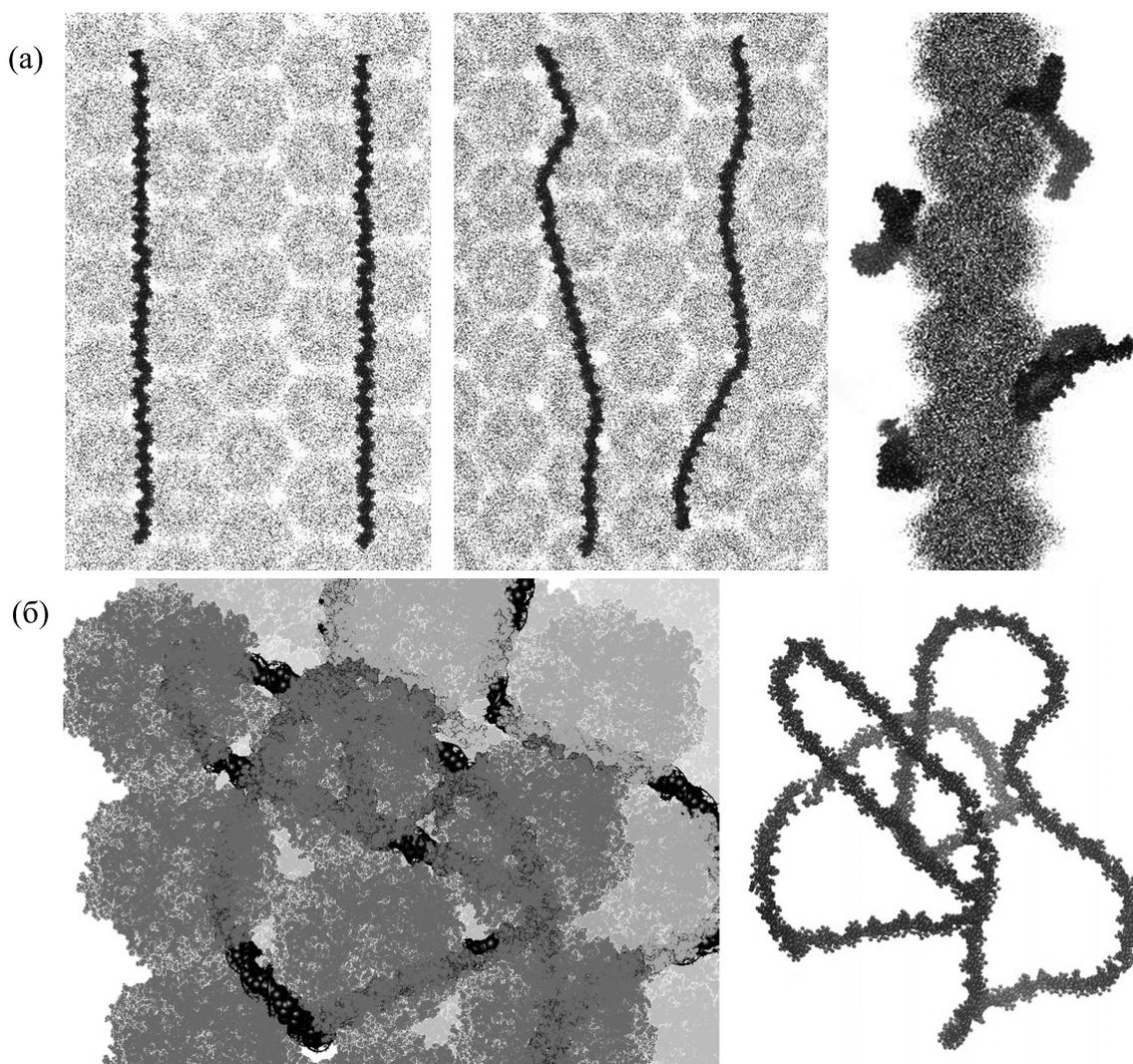
Таким образом, несмотря на малость размеров монокристаллов, низкую симметрию (P1), относительно большие параметры решетки и слабые рефлексы, программные комплексы Mesh&Collect и ccCluster, позволили определить структуру белка Dps [26] (в процессе определения структуры оказалось, что ДНК не образовала комплекс ДНК–Dps, а вышла из кристалла). Структура депонирована в Protein Data Bank как 6QVX [26].

Для проведения электронно-микроскопических исследований *in vitro* были выращены тонкие монокристаллические комплексы из небольшой ДНК (длиной 165 п.о.) с белком Dps. Были изучены проекционные структуры кристаллов Dps–Dps и Dps–ДНК [28]. Электронно-микроскопические исследования позволяют увидеть следы ДНК в тонких (2D) кристаллах ДНК–Dps. Чтобы объяснить противоречие с данными рентгеноструктурного анализа на массивных монокристаллах, мы предположили, что тонкие 2D-кристаллы ДНК–Dps имеют увеличенную по сравнению с массивным кристаллом постоянную решетки, поэтому в тонких кристаллах есть пространство для ДНК.

Также было предпринято молекулярно-динамическое моделирование, с помощью которого изучались однослойные и многослойные кристаллы белка Dps [18, 19, 28, 29] на траекториях 0.6 мкс, адсорбция ДНК (длиной 165 п.о.) на поверхности однослойных двумерных (2D) и конденсация в трехмерных (3D) кристаллах. Показано, что механизм адсорбции ДНК на поверхности двумерного кристалла зависит от его локальных свойств (область N-концов, область остова) и расположения ДНК относительно главных направлений кристалла. Нити ДНК распределяются на поверхности кристаллов неупорядоченно, образуя изгибы в процессе укладки (рис. 5а).

В многослойных (трехмерных, 3D) кристаллах белка Dps за счет шарообразной формы молекул белка формируются многочисленные каналы. Предположительно, в этих каналах может укладываться ДНК. Скорее всего, кристалл ДНК–Dps образуется постепенно, поэтому ДНК внутри кристалла располагается нелинейно, изгибаясь и проходя через каналы различных направлений. Для проверки этой гипотезы была построена модель участка геномной ДНК *E. coli* (513 пар оснований, ген *dps*). На основании проведенных молекулярно-динамических расчетов было показано, что кристаллы белка Dps остаются стабильными в присутствии ДНК (рис. 5б). Образование изгибов внутри при переходе между каналами кристалла не нарушает структуру ДНК. Значит, ДНК в кристаллах Dps может располагаться и, скорее всего, располагается неупорядоченно.

Таким образом, изучение кристаллов *in vitro* не оправдало ожиданий. Четкого ответа о конфор-



**Рис. 5.** 2D- и 3D-кристаллы белка Dps *E. coli*: (a) – линейные молекулы ДНК на поверхности 2D-кристалла белка Dps в начальный момент времени (слева), образование изгибов ДНК на поверхности 2D-кристалла Dps в процессе динамики (посередине – вид сверху, справа – вид сбоку); (б) – участок 3D кристалла Dps с изогнутой нитью ДНК внутри каналов (слева), конформация ДНК внутри кристалла (справа). Серые сферы – молекулы белка Dps, темные линии – нити ДНК.

мации ДНК в монокристаллах ДНК–Dps получить не удалось. Молекулярно-динамические расчеты подтверждают этот вывод. Поэтому пока что остаются лишь гипотетические модели укладки ДНК как в нанокристаллах Dps *in vitro*, так и в клетках бактерий.

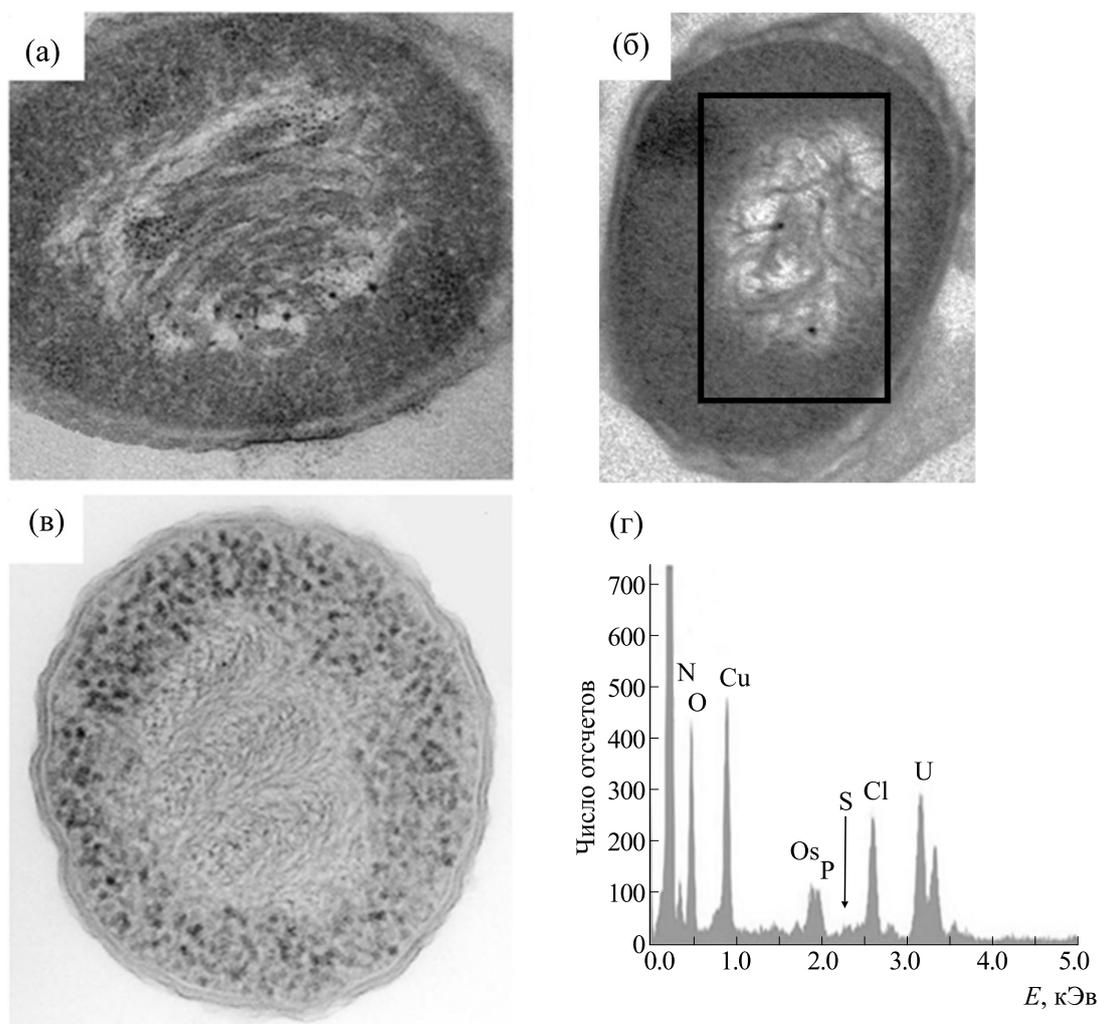
#### АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВИДЫ КОНДЕНСАЦИИ ДНК В КЛЕТКЕ

До сих пор был рассмотрен один из основных механизмов структурного ответа, каким является внутриклеточная нано(био)кристаллизация ДНК с Dps. Рассмотрим другие конденсированные состояния ДНК в клетке. Вспомним, что конденсация ДНК в нуклеоиде бактерий является проме-

жуточным инженерным решением между практически свободной от белка упаковки ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковки ДНК в эукариотах [30].

Несколько слов об упаковке ДНК в вирусах. Обнаружено [31], что в вирусе-бактериофаге ф6 двойная спираль ДНК (dsDNA) хранится внутри капсида в виде катушки, которая имеет различные типы намотки, приводящие к различным типам жидкокристаллической упаковки. Упаковки могут меняться от гексагональной к холестерической и изотропной на разных этапах функционирования бактериофага ф6 [31].

Перейдем к покоящимся бактериальным клеткам. Примечательно, что жидкокристаллические



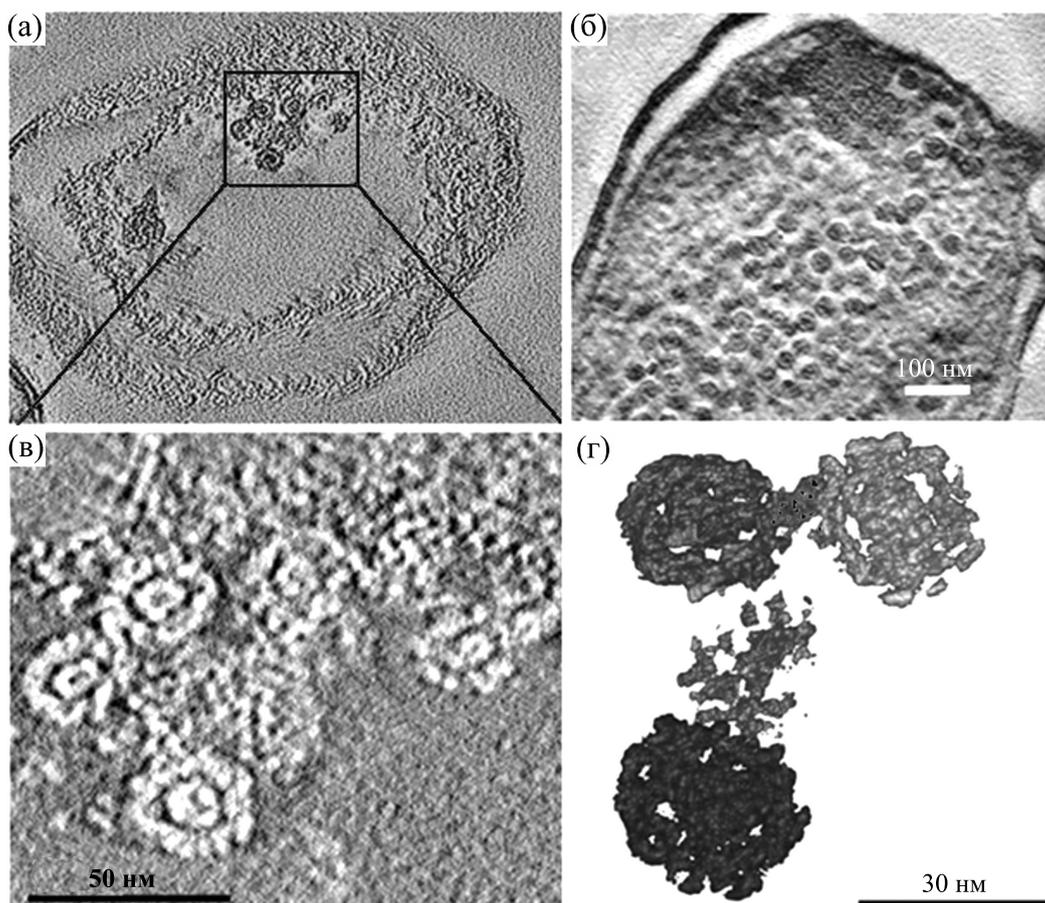
**Рис. 6.** (а)–(в) – Жидкокристаллические ансамбли ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*; (г) – видно, что содержание фосфора (P) сильно превышает концентрацию серы (S).

структуры были обнаружены во всех популяциях клеток *E. coli* – как с геном *dps*, так и без гена *dps* (Dps-null), то есть в отсутствие белка Dps в клетке. В некоторых клетках ДНК имеет вид холестерического жидкого кристалла (рис. 6а,в). ДНК расположена в виде вложенных дуг, характерных для холестерической фазы, рибосомы выглядят как темные частицы и находятся на периферии клетки [20, 21]. Упаковка ДНК в жидкокристаллической фазе снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нуклеазы [20, 21].

Особый интерес представляет третий тип упорядоченной структуры: свернутая нуклеосомоподобная структура, обнаруженная в покоящихся клетках *E. coli* впервые в работе [21]. Во всех изученных популяциях (кроме мутанта Dps-null) как

с избыточной продукцией Dps, так и без нее, цитоплазма от 5 до 25% клеток наполнена множеством сферических структур (рис. 7а–в) со средним диаметром 30 нм. Томографические исследования (рис. 7г) демонстрируют, что эти структуры не являются тороидами (см. рис. 3а), а представляют собой почти сферические образования. С учетом того, что бактериальный нуклеоид представляет собой промежуточное инженерное решение между свободной от белка упаковкой ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковкой ДНК в эукариотах, данный тип конденсации ДНК был назван нами «свернутой нуклеосомоподобной структурой».

Элементный анализ показал [21], что сферические агрегаты действительно содержат пики, соответствующие сере и фосфору и указывающие



**Рис. 7.** Свернутая нуклеосомоподобная структура ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*. (а) – Томограмма клетки *E. coli* (штамм Top10/pBAD-Dps), растущей на среде M9, без индукции производства Dps, возраст 7 месяцев. (б) – Томограмма клетки *E. coli* (штамм BL21-Gold (DE3) /pET-Dps), растущей на среде M9, с индуцированной продукцией Dps в фазе линейного роста, возраст 7 месяцев. (в) – Часть рисунка (а) с большим увеличением. (г) – Трехмерная реконструкция сферических ассоциатов Dps.

на присутствие ассоциатов ДНК–Dps. В бактериальных клетках сферические образования молекул Dps (см. рис. 8) могут действовать аналогично гистонам, на которые накручивается ДНК (гистоноподобное поведение). ДНК может также проходить сквозь сферические образования бусинок Dps, образуя «бусинки на нитке» (рис. 8). Для противодействия внешним стрессовым факторам эти образования должны располагаться на бактериальной ДНК достаточно плотно. Кроме того, как и в случае эукариотических клеток, где нуклеосомы сворачиваются, чтобы образовать фибриллы, которые, складываясь дальше, образуют хроматин хромосомы, «бусинки на нитке» могут путем множественного складывания образовать компактную структуру, похожую на складчатую глобулу (рис. 8). Схематическое изображение образования свернутой нуклеосомоподобной

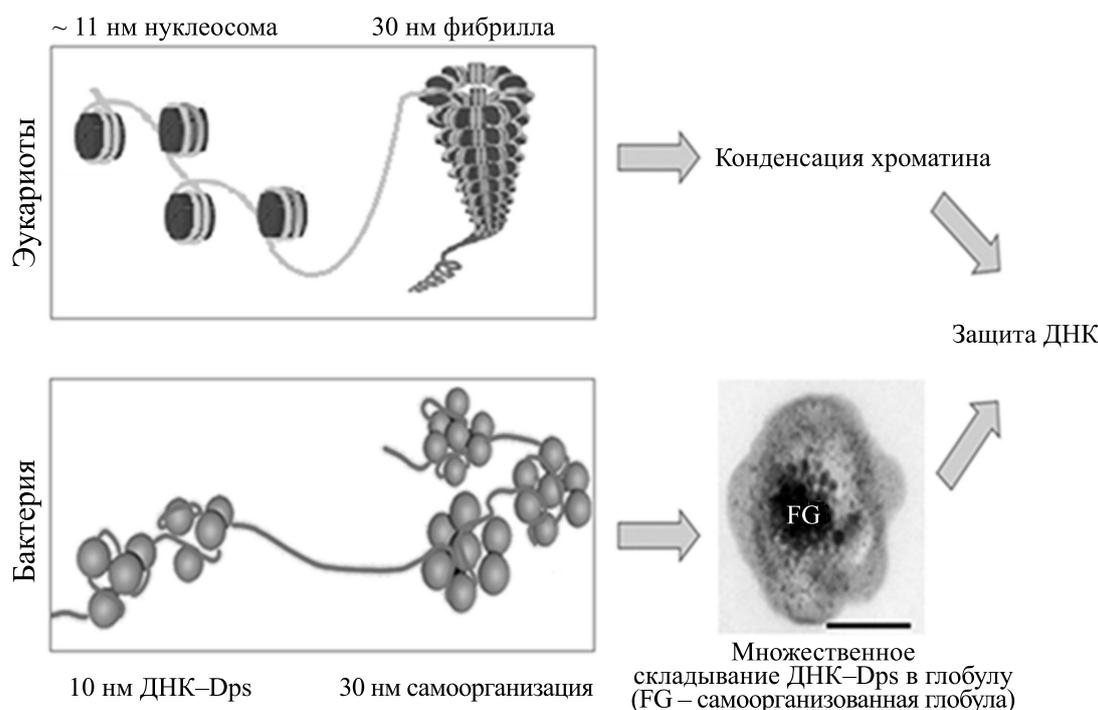
структуры можно увидеть на рис. 8. Внешние молекулы Dps могут налипать на глобулу и дополнительно защищать ДНК [21].

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

В данном кратком обзоре представлены оригинальные и литературные результаты по изучению архитектуры нуклеоида покоящихся клеток с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии.

Результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего нанокристаллической) в нуклеоиде бактерий *E. coli*.

Более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде дает просвечивающая электронная микроскопия. В результате



**Рис. 8.** Сравнение схем компактизации ДНК в прокариотических и эукариотических клетках. Верхняя схема – нуклеосомы эукариот (гистоновые белки, обернутые ДНК) складываются в 30-нанометровые фибриллы, которые, в свою очередь, складываются, образуя волокна и хроматин, тем самым защищая ДНК от внешних факторов. Нижняя схема – прокариоты не имеют гистонов, но ДНК обвивается вокруг молекул Dps или проходит через ассоциаты белков Dps, чтобы сначала сформировать «бусинки на нитке», которые затем могут складываться в сферические агрегаты диаметром 30 нм и далее, путем множественного складывания, переходит в глобулу ДНК–Dps – структуру, которая эффективно защищает нуклеоидную ДНК от внешних воздействий.

исследований с помощью ПЭМ удалось показать, что нет единого способа конденсации ДНК в популяции покоящихся клеток *E. coli*. В эксперименте наблюдались внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомоподобные структуры ДНК. Доля специфической структуры зависит от штамма и условий культивирования. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась и описана в оригинальных исследованиях авторов впервые в работе [21]. Конформация ДНК хорошо визуализируется в жидкокристаллических структурах, где нет экранирования ДНК белком Dps. В нанокристаллических и свернутых нуклеосомоподобных структурах ДНК визуализируется плохо, белок Dps не только снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нуклеазы [20], но и мешает визуализации ДНК.

В первом разделе описаны результаты пятидесятилетнего экспериментального изучения архитектуры нуклеоида бактерий, находящихся в стадии активного экспоненциального роста. Эти ис-

следования не могли дать и не дали сведения с хорошим пространственным разрешением о структуре нуклеоида [6]. Однако они показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру [6], состоящую из трех уровней организации. Первый, низший уровень структурной организации, обеспечивается взаимодействием ДНК с ДНК-ассоциированными белками. На втором уровне структурной организации образуются плектонемичные сверхспиральные петли ДНК. На мега-масштабе ДНК образует шесть пространственно организованных доменов (макродоменов) с четкой территориальной организацией, на которые разделен бактериальный нуклеоид. Описана популярная теоретическая модель пространственной организации ДНК в клетке – фрактальная глобула, которая обладает поразительной территориальной организацией цепочки, как и ДНК в клетке на мега-масштабе (шесть пространственно организованных доменов). Кроме этого, упаковка ДНК, описываемая фрактальной глобулой, позволяет практически безболезненно открыть любую петлю ДНК,

открывая доступ к любому сайту ДНК, что важно для ее функционирования.

При переходе от активно растущих клеток к покоящимся, образующимся при стрессе голодания, ситуация радикально меняется. Химия и структура живых систем поддерживаются исключительно энергозависимым динамическим порядком [20, 32]. В растущей клетке (наличие метаболизма) упорядоченность поддерживается динамическим способом. При стрессе голодания поддерживать упорядоченность динамическим способом становится невозможным (практическое отсутствие метаболизма) и бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (в частности, ДНК) — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [20]. Клетки становятся покоящимися. Изменения в окружающей среде должны влиять на архитектуру нуклеоида. Поэтому мы ожидали обнаружить в покоящихся клетках совершенно новые по сравнению с растущими клетками устойчивые молекулярные структуры, подобные тем, что встречаются в неживой природе. В эксперименте действительно обнаружены три новых вида стабильной конденсации ДНК в покоящихся клетках *E. coli*, отличные от структуры ДНК в растущих клетках. Первые две — нанокристаллическая и жидкокристаллическая структуры — типичны для неживой природы (рис. 4–6). Третий тип — свернутая нуклеосомоподобная структура — может быть результатом сложного взаимодействия и множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг додекамеров Dps и их ассоциатов (рис. 7 и 8). Таким образом, обнаружены новые структуры в покоящихся клетках [17, 20–23]. Изменения в окружающей среде повлияли на архитектуру нуклеоида. Однако эти изменения, скорее всего, не затрагивают саму иерархию структуры ДНК в нуклеоиде. Возникает вопрос, структуры какого уровня наблюдались в описанных экспериментах и приведены на рис. 3–8. Можно ли обнаружить структуры второго и третьего уровней компактизации методами, изложенными в данной работе? Методом ПЭМ изучается структура ДНК, находящаяся в тонких 2D-срезах. Этого, конечно, недостаточно, чтобы описать объемную 3D-структуру нуклеоида. Методом ПЭМ, использованным в работе, видимо, можно визуализировать лишь структуры, принадлежащие нижнему первому уровню компактизации ДНК.

С помощью синхротронного излучения извлекается информация о структуре целой клетки, однако эта информация бедна, она говорит лишь о

наличии или отсутствии упорядочения в клетке, позволяет грубо оценить размеры нанокристаллов. Затрагивают ли обнаруженные нанокристаллы макромолекулы? На эти многочисленные вопросы исследования, приведенные в обзоре, не дают ответа.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

XX век был веком рентгеноструктурного анализа. С помощью рентгеноструктурного анализа была определена структура многих молекул, в том числе макромолекул белков и ДНК. Все молекулы, которые можно было закристаллизовать в сравнительно большие кристаллы, исследованы и их структура определена. Однако для макромолекул, образующих малые кристаллы размерами в несколько микрон, определение структуры уже представляет трудную задачу. Сейчас на первое место выходят исследования структур некристаллических объектов: вирусов и клеток. Последние достижения в методике визуализации дают надежду, что путь к трехмерной (3D) визуализации архитектуры нуклеоида *in vivo* с высоким разрешением будет найден и пройден в обозримое время. Методы нановизуализации и нанотомографии, используемые на синхротроне ESRF-EBS (Гренобль, Франция), позволяют количественно оценивать 3D-структуру и элементный состав образцов в их естественном состоянии [33]. С помощью наноплуоресцентной спектроскопии и нанотомографии можно изучать 3D-распределение фосфора, а, следовательно, и ДНК по всей клетке [34]. К сожалению, пространственное разрешение этого метода в настоящий момент не превышает 20 нм. Развитие метода нановизуализации ведет к созданию рентгеновского микроскопа. Пока это картина будущего, но исследователи в данной области уже сейчас вместо термина «рентгеновская дифракция» употребляют термин «рентгеновская микроскопия».

Быстро развиваются методы электронной микроскопии. В них начинают использовать замораживание образцов под высоким давлением для сохранения естественной структуры. Такие образцы можно разделить на замороженные гидратированные срезы и анализировать их с помощью криоэлектронной микроскопии [35]. Срезы можно также изготавливать сфокусированным ионным пучком, после чего (срез за срезом) визуализировать архитектуру клетки в трех измерениях (3D-архитектуру) [36]. В работе [37] для визуализации хроматина *in situ* был использован улучшенный метод обнаружения ДНК с помощью флуоресцентного красителя. Метод получил название томография ChromEM или ChromEMT. ChromEMT позволил определить структуру и трехмерную организацию нитей хроматина, ор-

ганизацию крупномасштабных (мегабазных) доменов.

Очевидно, что наибольший успех принесет использование комбинации методов, использующих синхротронное излучение и электронную микроскопию. Описанные выше методические успехи обещают в ближайшем будущем визуализировать архитектуру нуклеоида с высоким разрешением. Сначала это будет сделано для активно растущей клетки. Далее будет дан ответ на один из наиболее интересных вопросов, каким образом внешняя среда (например, стресс голодания) влияет на 3D-архитектуру нуклеоида.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ESRF за предоставленную возможность проведения экспериментов. Аналитическая электронная микроскопия и двухосная томография были выполнены в Центре пользователей «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ имени М.В. Ломоносова. Расчеты проводили на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре РАН.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Авторы благодарят за финансовую поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации. Работа выполнена в рамках Госзадания для ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН (№ государственной регистрации 122040400089-6).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О. В. Бухарин, А. Л. Гинцбург, Ю. М. Романова и Г. И. Эль-Регистан, *Механизмы выживания бактерий* (Медицина, М., 2005).
2. К. Циммер, *Микрокосм: E. coli и новая наука о жизни* (ООО «Альпина нон-фикшн», М., 2013).
3. A. Y. Grosberg and A. R. Khokhlov, *Statistical physics of macromolecules* (AIP, New York, 1994).
4. V. A. Bloomfield, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 334 (1996).
5. Ю. Ф. Крупянский и В. И. Гольданский, *Успехи физ. наук*, **172** (11), 1247 (2002).
6. S. C. Verma, Z. Qian, and S. L. Adhya, *PLoS Genet.*, **15** (12), e1008456 (2019).
7. A. Y. Grosberg, S. K. Nechaev, and E. I. Shakhnovich, *J. Phys.*, **49**, 2095 (1988).
8. E. Lieberman-Aiden, N. L. Van Berkum, L. Williams, et al., *Science*, **326**, 289 (2009).
9. L. A. Mirny, *Chromosome Res.*, **19**, 37 (2011).
10. P. G. D. Gennes, *Scaling concepts in polymer physics* (Cornell University Press, Ithaca, 1979).
11. M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. T. Riet, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56** (6), 1875 (1990).
12. E. Chiancone, *Front. Biosci.*, **15**, 122 (2010).
13. M. de Martino, D. Ershov, P. J. van den Berg, et al., *J. Bacteriol.*, **198**, 1662 (2016).
14. M. Almirón, A. J. Link, D. Furlong, and R. Kolter, *Genes. Dev.*, **6**, 2646 (1992).
15. L. N. Calhoun and Y. M. Kwon, *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 375 (2011).
16. R. A. Grant, D. J. Filman, S. E. Finkel, et al., *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 294 (1998).
17. D. Frenkiel-Krispin and A. Minsky, *J. Struct. Biol.*, **156**, 311 (2006).
18. E. Tereshkin, K. Tereshkina, N. Loiko, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **37**, 2600 (2019).
19. Э. В. Терешкин, К. Б. Терешкина, В. В. Коваленко и др., *Хим. физика*, **38** (40), 48 (2019).
20. A. Minsky, E. Shimoni, and D. Frenkiel-Krispin, *Nat. Rev. Mol. Cell.*, **3**, 50 (2002).
21. N. Loiko, Y. Danilova, A. Moiseenko, et al., *PLoS One*, **15** (10), e0231562 (2020).
22. Y. F. Krupyanskii, N. G. Loiko, D. O. Sinitsyn, et al., *Crystallogr. Reports*, **63**, 594 (2018).
23. D. O. Sinitsyn, N. G. Loiko, S. K. Gularyan, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B*, **11**, 833 (2017).
24. Z. Reich, E. Wachtel, and A. Minsky, *Science*, **264** (5164), 1460 (1994).
25. D. Frenkiel-Krispin, I. Ben-Avraham, J. Englander, et al., *Mol. Microbiol.*, **51**, 395 (2004).
26. V. Kovalenko, A. Popov, G. Santoni, et al., *Acta Cryst.*, **F76**, 568 (2020).
27. G. Santoni, U. Zander, Ch. Muellet-Dieckmann, et al., *J. Appl. Crystallography*, **50**, 1844 (2017).
28. A. Moiseenko, N. Loiko, K. Tereshkina, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **517** (3), 463 (2019).
29. E. V. Tereshkin, K. B. Tereshkina, and Y. F. Krupyanskii, *J. Physics: Conf. Ser.*, **2056** (1), 012016 (2021).
30. V. B. Teif and K. Bohinc, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **105**, 208 (2011).
31. S. L. Ilca, X. Sun, K. El Omari, et al., *Nature*, **570**, 252 (2019).
32. Э. Шрёдингер, *Что такое жизнь с точки зрения физики?* (РИМИС, М., 2009).
33. A. Procopio, E. Malucelli, A. Pacureanu, et al., *ACS Central Sci.*, **5**, 1449 (2019).
34. S. Santos, Y. Yang, M. Rosa, et al., *Sci. Rep.*, **9**, 17217 (2019).
35. D. Vanhecke, W. Graber, and D. Studer, *Methods Cell Biol.*, **88**, 151 (2008).
36. K. Narayan and S. Subramaniam, *Nat. Methods*, **12** (11), 1021 (2015).
37. H. D. Ou, S. Phan, T. J. Deerinck, et al., *Science*, **357** (6349), eaag0025 (2017).

**Architecture of Condensed DNA in the *Escherichia coli* Nucleoid****Y.F. Krupyanskiy\*, V.V. Kovalenko\*, N.G. Loiko\*, \*\*, A.A. Generalova\*, A.V. Moiseenko\*, \*\*\*, E.V. Tereshkin\*, O.S. Sokolova\*\*\*, K.B. Tereshkina\*, G.I. El'-Registan\*\*, and A.N. Popov\*\*\*\***

\**Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina, 4, Moscow, 119991 Russia*

\*\**Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

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

\*\*\*\**European Synchrotron Radiation Facility, 71, avenue des Martyrs, CS 40220, 38043 Grenoble Cedex 9, France*

Three-dimensional (3D) architecture of the genome determines the function of the cell. Condensation studies of DNA in a cell can provide important information about the mechanisms that enable the bacteria to survive. This information can be also valuable for medicine, since ordered DNA condensation ensures the resistance of pathogenic bacteria to antibiotics. The length of DNA in dilute solution is a few centimeters long. *Escherichia coli* cell is about 2.0  $\mu\text{m}$  long. Such a dramatic decrease in the volume occupied by DNA is a consequence of its condensation. It was found that DNA in the nucleoid is hierarchically organized folding into a three-level compact structure: the primary level (on the scale of  $\geq 1$  kbp) is provided by histone-like NAP proteins. Unlike actively growing bacteria, bacteria upon stress starvation use an energy-independent mechanism to maintain the order and protect vital structures (DNA), as in nature inspired inorganic material. The study of the DNA structure in the *E. coli* nucleoid was carried out using synchrotron X-ray diffraction and transmission electron microscopy (TEM). The experimental results made it possible to visualize the structures of the primary organizational level in the hierarchical process by which DNA is packaged in the nucleoid of dormant cells. A series of diffraction experiments performed for the first time provide evidence of the presence of a periodic ordered organization of DNA in all studied bacteria. TEM was used for providing detailed information about the type of DNA condensation in the *E. coli* nucleoid. Intracellular nanocrystalline, liquid-crystalline and folded nucleosome-like structures of DNA were visualized. The folded nucleosome-like structure was observed for the first time and is the result of multiple folding of long DNA molecules around the Dps protein and its associates.

*Keywords: DNA, Escherichia coli, stress starvation, intracellular nanocrystalline, liquid crystalline, folded nucleosome-like structures*

УДК 577.353.2

## ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* АГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МЫШЕЧНОГО X-БЕЛКА

© 2022 г. Л.Г. Бобылёва\*, А.Г. Габдулхаков\*\*, Н.Н. Салмов\*,  
И.М. Вихлянцев\*, А.Г. Бобылёв\*.\*

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: bobilev1982@gmail.com

\*\*Институт белка РАН, Институтская ул., 4, Пущино Московской области, 142290, Россия

Поступила в редакцию 31.05.2022 г.

После доработки 31.05.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Особенностью агрегации X-белка (паралога миозин-связывающего C-белка) скелетных мышц является образование спирально-скрученных ленточных фибрилл, которые были ранее показаны методом электронной микроскопии. Для изучения полиморфизма агрегатов X-белка мы провели электронно-микроскопические исследования его агрегации в различных условиях. Был обнаружен агрегационный полиморфизм X-белка, формировавшего различные типы агрегатов – аморфные, протофибриллы, пучки линейных фибрилл, спирально-скрученные ленточные фибриллы, имеющие, предположительно, амилоидную природу. Для проверки этого предположения были проведены структурные исследования спирально-скрученных ленточных фибрилл X-белка методом рентгеновской дифракции, которые выявили наличие сильно размытых рефлексов 4.6 и 10 Å. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фибриллы X-белка не имеют четвертичной кросс-β структуры, свойственной амилоидным фибриллам известных белков и пептидов, таких как, например, инсулин, амилоидный β-пептид и титин. Эти результаты противоречат полученным ранее данным об амилоидной природе агрегатов X-белка, интерпретация которых была основана на результатах о связывании с его фибриллами «амилоидных» красителей Конго красного и тиофлавина Т. Обнаруженная способность X-белка формировать неамилоидные агрегаты *in vitro* является, возможно, следствием защитного механизма, выработанного в ходе эволюции и направленного на предотвращение формирования в клетках токсичных нерастворимых амилоидных агрегатов.

*Ключевые слова:* мультидоменные мышечные белки, миозин-связывающий белок C, X-белок, агрегация, амилоиды.

DOI: 10.31857/S0006302922040032, EDN: ISNWQL

Известно, что пептиды и белки обладают способностью переходить из нативной формы, обеспечивающей заложенную в них функцию, в амилоидную форму [1]. На сегодняшний день амилоиды определяются как агрегаты «неправильно» свернутого пептида или белка, которые имеют кросс-β-структуру, что способствует их повышенной устойчивости к протеолитической деградации [1, 2]. Такие белковые агрегаты могут образовываться в различных тканях человека и животных, что связывают с развитием целого ряда заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабет II типа и другие [1]. Однако амилоиды привлекают внимание не только из-за связи с болезнями, но также благодаря их функциональной роли в организме [3]. Например, амилоиды, формируемые протеолитическими фрагментами белка Pmel17 в меланосомах, защи-

щают клетки от токсического действия предшественников меланина [4].

К настоящему времени механизмы формирования амилоидных агрегатов в организме изучены недостаточно. Модели амилоидообразования *in vitro* являются хорошим инструментом для изучения процесса амилоидной агрегации, поскольку формирование белками и пептидами амилоидо-подобных структур является универсальным свойством полипептидных цепей [5, 6]. Выявлен целый ряд белков, способных при определенных условиях *in vitro* образовывать амилоидо-подобные агрегаты или фибриллы, которые не обнаруживаются *in vivo* [7, 8]. Такими белками являются гладкомышечный титин и миозин-связывающий белок C (C-белок), формирующие амилоидо-подобные агрегаты *in vitro* [9]. Учитывая ряд особенностей агрегации титина и C-белка, таких как вы-

сокая скорость образования агрегатов, отсутствие изменений во вторичной структуре, данные белки представляют интерес для изучения механизмов агрегации.

Известно, что три паралога миозин-связывающего белка С кодируются отдельными генами с разными профилями экспрессии в поперечнополосатых мышцах. Так называемый медленный скелетный миозин-связывающий белок С (Х-белок) кодируется *MYBPC1*, а быстрый скелетный миозин-связывающий белок С (С-белок) кодируется *MYBPC2*, в то время как *MYBPC3* кодирует миозин-связывающий белок С сердечной мышцы [10]. Данные паралоги имеют значительную гомологию последовательностей и состоят из иммуноглобулин-подобных и фибронектин III-подобных доменов [10, 11]. Основной отличительной особенностью гена *MYBPC1* по сравнению с *MYBPC2* и *MYBPC3* является высокий уровень сплайсинга, которому может подвергаться его транскрипт [12]. У людей и мышей описано не менее 14 транскриптов, кодирующих Х-белок, при этом молекулярные массы его изоформ составляют ~126 кДа и 132 кДа [12, 13].

В данной работе методом электронной микроскопии изучены агрегационные свойства Х-белка — наиболее высокомолекулярного паралога миозин-связывающего белка С. Для выявления амилоидной природы агрегатов Х-белка проведены структурные исследования его спирально-скрученных ленточных фибрилл методом рентгеновской дифракции с целью выявления кросс- $\beta$ -структуры.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение и очистка Х-белка.** Х-белок был очищен из скелетных мышц кролика (мышцы туловища и задних конечностей) согласно методу, описанному в работе [14]. Мышцы гомогенизировали и миозин экстрагировали трехкратным (по отношению к весу мышц) объемом раствора Губа—Штрауба, содержащего 0.3 М КСl, 0.15 М К-фосфатный буфер, 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, 20 мкг/мл ингибитора трипсина, рН 6.5. Экстракцию проводили при 4°C в течение 10–15 мин при непрерывном перемешивании, затем центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g. Супернатант переосадили 14-кратным объемом охлажденной бидистиллированной воды, содержащей 0.1 мМ ДТТ и 0.1 мМ NaN<sub>3</sub>. Через 40–60 мин осадок миозина собирали центрифугированием в течение 30 мин при 2500 g. К осадку добавляли раствор, содержащий 2 М КСl, 0.2 М К-фосфатный буфер, 4 мМ ЭДТА, рН 7.0, до достижения конечной концентрации в 0.5 М КСl, 0.05 М К-фосфатного буфера, 1 мМ ЭДТА, рН 7.0. После растворения осадка его разбавляли раствором, содержащим 0.5 М КСl, 0.05 М К-

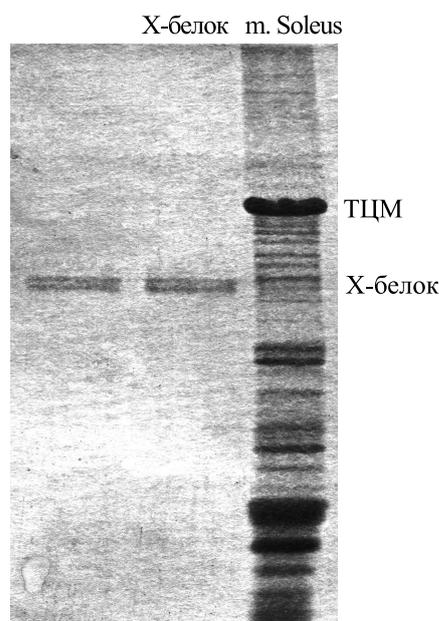
фосфатный буфер, 1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ NaN<sub>3</sub>, рН 7.0, до концентрации белка 12 мг/мл для последующего фракционирования сульфатом аммония.

К белковому раствору добавляли равный объем охлажденного до 4°C 2.8 М сульфата аммония (до 36%-го насыщения) в растворе, содержащем 0.5 М КСl, 0.05 М К-фосфатный буфер, 1 мМ ЭДТА, рН 7.0, оставляли на 20–30 мин для формирования актомиозинового осадка и затем центрифугировали в течение 1 ч при 2500 g. Осадок отбрасывали, а к супернатанту добавляли насыщенный при 4°C раствор сульфата аммония до достижения 43%-го насыщения. Через 30 мин образовавшийся осадок, содержащий преимущественно миозин и два паралога миозин-связывающего белка С (С-белок и Х-белок) собирали центрифугированием в течение 1 ч при 2500 g. Затем осадок растворяли в 0.15 М К-фосфатном буфере, рН 7.5, содержащем 10 мМ ЭДТА, 0.1 мМ ДТТ и 0.1 мМ NaN<sub>3</sub> («колоночный» буфер), и диализовали против этого же буфера до полного удаления сульфата аммония.

Миозин, полученный после осветления центрифугированием в течение 1 ч при 100000 g («доколоночный» миозин), содержал около 5% Х-белка и С-белка. Для их разделения от миозина «доколоночный» миозин подвергали ионообменной хроматографии на колонке с носителем DEAE-Sephadex A-50, уравновешенным колоночным буфером. Х-белок и С-белок элюировали в свободном объеме колонки и собирали для последующей очистки. В дальнейшем фракции этих двух белков концентрировали сульфатом аммония до степени насыщения 2.08 М и осаждали центрифугированием в течение 1 ч при 3000 g. Осадок растворяли в буфере, содержащем 0.3 М КСl, 4.8 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ NaN<sub>3</sub>, рН 7.0, и диализовали против этого же буфера до полного удаления сульфата аммония. Разделение Х-белка и С-белка проводили на колонке с гидроксипатитом, уравновешенным в этом же буфере. Для снятия белков с колонки использовали фосфатный градиент.

Концентрацию Х-белка определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Cary 100 (Varian, США), используя значение коэффициента экстинкции ( $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}}$ ), равное 1.09 [15].

**ДСН-гель-электрофорез.** Чистоту Х-белка проверяли с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле по методу [16] с модификациями. Согласно нашей методике, разделяющий гель содержал 7% полиакриламида вместо 15% (соотношение акриламида к бис-акриlamиду 199:1), а также 0.75 М трис-НСl буфер, рН 8.8, 0.1% ДСН, 10% глицерина, 0.05% тетраметилэтилендиамина и 0.05% персульфата аммония. Кроме этого, вместо концентрирующего геля с содер-



**Рис. 1.** ДСН-гель-электрофорез препарата очищенного X-белка (две левые дорожки). Правая дорожка – *m. soleus* кролика (контроль). Молекулярный вес X-белка скелетных мышц кролика на основании его электрофоретической подвижности оценивается в 145–152 кДа [18, 19]. ТЦМ – тяжелые цепи миозина.

жанием полиакриламида 5% (согласно работе [16]), мы применяли концентрирующий гель, использованный в работе [17] и содержащий 2.6–2.8% полиакриламида (соотношение акриламида к бис-акриламиду 36.5:1). Эти модификации способствовали лучшему фокусированию белковых полос в геле. Концентрирующий гель также содержал 0.125 М трис-НСl буфер, pH 6.8, 0.1% ДСН, 0.05% тетраметилэтилендиамина и 0.05% персульфата аммония.

Электродный буфер при проведении электрофореза содержал 0.192 М глицина, 0.025 М триса и 0.1% ДСН, pH 8.3. Электрофорез проводили при токе 3–5 мА в течение первых 30–60 мин, затем поднимали силу тока до 12–15 мА. По окончании электрофореза гели фиксировали 20–30 мин в растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты, и окрашивали в течение 30–40 мин в растворе, содержащем 0.1% кумасси G-250 и R-250 (смешанных в пропорции 1:1), 45% этанола и 10% уксусной кислоты. Отмывку окрашенных гелей проводили в 7%-й уксусной кислоте при постоянном перемешивании на качалке.

**Электронная микроскопия и условия формирования амилоидных агрегатов.** Агрегаты X-белка формировали диализом в течение 24 ч при 4°C против следующих растворов: 1) 30 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 2) 30 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 3) 30 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ имида-

зола, pH 7.0; 4) 10 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 5) 50 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 6) 500 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Каплю суспензии белка в концентрации 0.1 мг/мл наносили на покрытую углеродом пленку коллодия на медной сетке и окрашивали 2%-м водным раствором уранилацетата. Образцы исследовали на электронном микроскопе JEM-100B (Jeol, Япония).

**Рентгеновская дифракция.** Для исследования методом рентгеновской дифракции агрегаты X-белка, сформированные в растворе, содержащем 30 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0, 24 ч при 4°C, в концентрации 0.5 мг/мл и объеме 5 мл, были лиофилизированы с помощью лиофилизатора FreeZone 1L (Labconco, США). Затем лиофильно высушенные образцы были растворены в деионизированной воде до конечной концентрации ~100 мг/мл и помещены между двумя стеклянными палочками, покрытыми парафином.

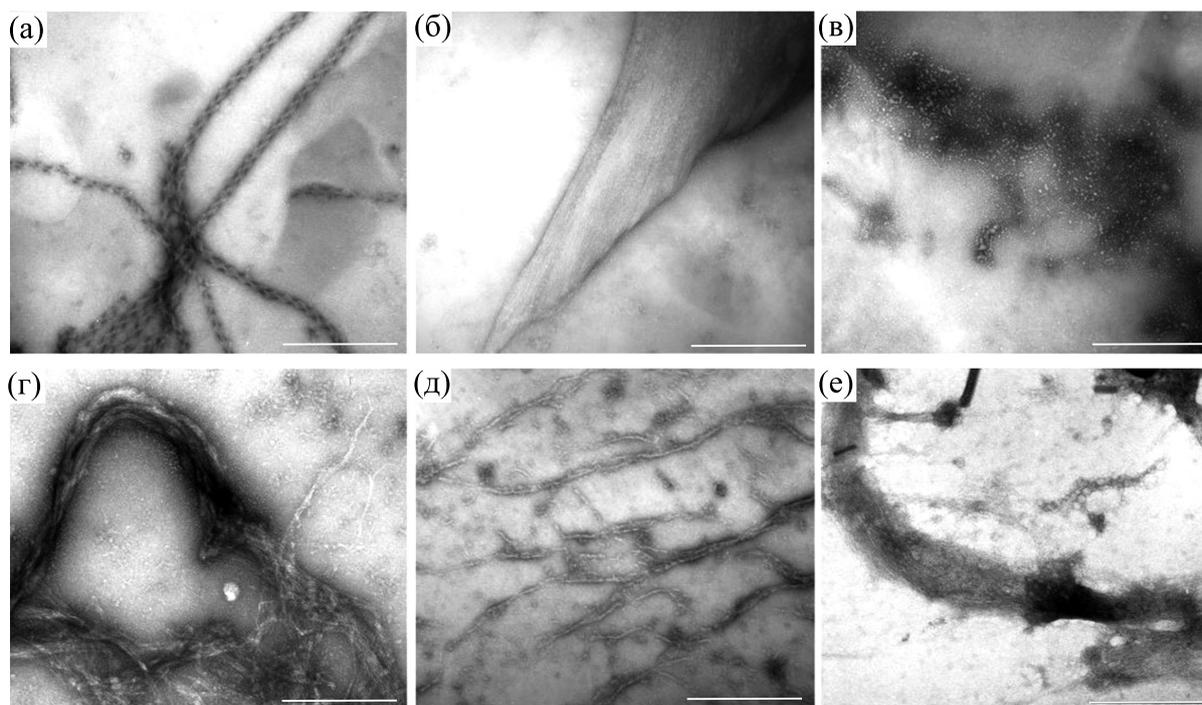
Дифракционные изображения были получены с использованием генератора Microstar X-ray с оптикой HELIOX, оснащенный детектором Platinum135 CCD (X8 Proteum system, Bruker, Германия). Использовали Cu K $\alpha$ -излучение с  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ . Образцы располагали под прямым углом к рентгеновскому лучу с применением четырехосного каппа-гонометра.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты ДСН-ПААГ-электрофореза препаратов очищенного X-белка, а также экстракта белков *m. soleus* в качестве контроля. На геле видны две белковые полосы, которые, по всей вероятности, являются изоформами X-белка или изоформой (верхняя полоса) и ее протеолитическим фрагментом (нижняя полоса).

Известно, что X-белок способен формировать высокоупорядоченные спирально-скрученные ленточные фибриллы с осевой периодичностью ~60–70 нм, шириной ~40 нм и длиной более 1 мкм [20]. Ранее также было показано, что X-белок формирует разные типы агрегатов. В частности, в проведенных нами исследованиях было показано, что X-белок формирует аморфные агрегаты, протофибриллы, линейные фибриллы и пучки линейных фибрилл в следующих растворах: 1) 50 мМ NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7.0; 2) 25 мМ NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7.0; 3) 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 4) 30 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ имидазола, pH 7.0; 5) 0.15 М глицин-КОН, pH 7.5 [21].

В данном исследовании мы расширили список условий для формирования X-белком разных типов агрегатов. Результаты электронно-микроскопического исследования представлены на рис. 2. Обнаружены пучки фибрилл, полученные в рас-



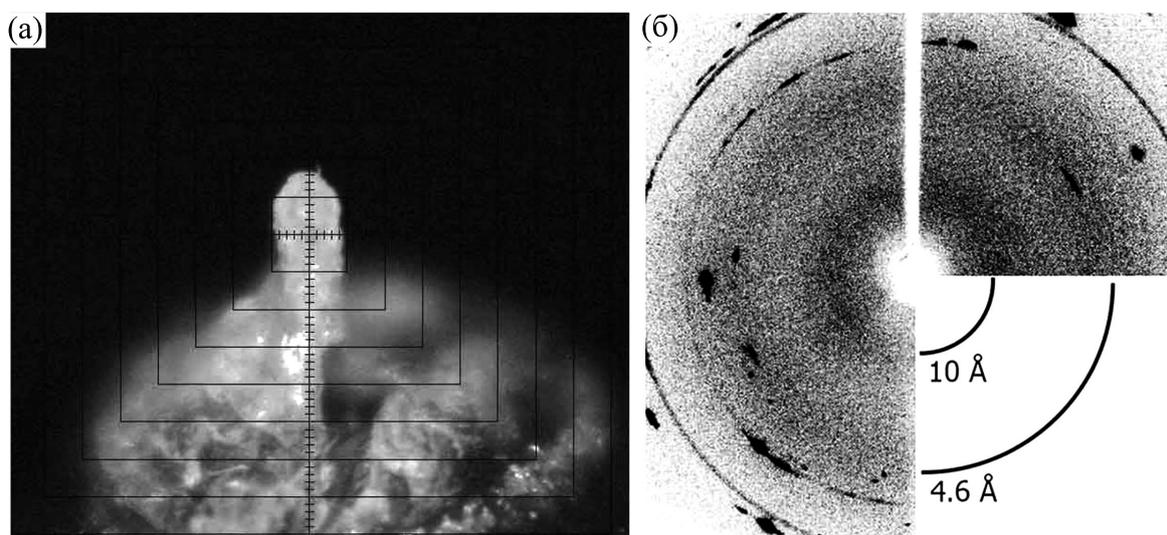
**Рис. 2.** Электронная микроскопия агрегатов Х-белка: (а) – спирально-скрученные ленточные фибриллы Х-белка, полученные в растворе, содержащем 30 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (б) – пучки фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 30 мМ СаСl<sub>2</sub>, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (в) – аморфные агрегаты Х-белка, полученные в растворе, содержащем 30 мМ MgСl<sub>2</sub>, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (г) – пучки фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 10 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (д) – протофибриллы и отдельно лежащие нити фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 50 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0; (е) – пучки фибрилл Х-белка, полученные в растворе, содержащем 500 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0. Время инкубации всех образцов – 24 ч при 4°С. Негативное окрашивание 2%-м водным раствором уранилацетата, Шкала 500 нм.

творях, содержащих 30 мМ СаСl<sub>2</sub>, 10 мМ КСl и 500 мМ КСl (рис. 2б,г,е); протофибриллы и отдельно лежащие нити фибрилл, полученные в растворе, содержащем 50 мМ КСl (рис. 2д), а также аморфные агрегаты в растворе, содержащем 30 мМ MgСl<sub>2</sub> (рис. 2в). На рис. 2 также представлены высокоупорядоченные спирально-скрученные ленточные фибриллы, полученные в растворе, содержащем 30 мМ КСl (рис. 2а), впервые визуализированные ранее [20]. Полиморфизм агрегатов Х-белка, его способность агрегировать в диапазоне значений ионной силы от 0.03 до 0.50, а также в присутствии различных ионов (Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) свидетельствуют о высокой склонности данного белка к агрегации.

Проведенные ранее исследования также показали, что со спирально-скрученными ленточными фибриллами Х-белка, сформированными в растворе, содержащем 30 мМ КСl, связывались красители Конго красный и тиофлавин Т [21], которые применяются для выявления амилоидной структуры белковых агрегатов. На основании обнаруженного связывания было сделано заключение, что вышеуказанные агрегаты Х-белка явля-

ются амилоидными. Однако сейчас известно, что для точного определения принадлежности каких-либо фибрилл к амилоидным необходимо доказать наличие их четвертичной кросс-β-структуры. Для этих целей используют метод рентгеновской дифракции. С помощью данного метода четвертичная кросс-β-структура выявляется наличием двух рефлексов – 10.0 и 4.7 Å [22–25]. Предполагается, что рефлекс 4.6–4.8 Å возникает из-за периодичности связанных водородными связями β-цепей, ориентированных перпендикулярно оси волокна, а дифракция в области – 10–11 Å отображает расстояние между β-листами [26, 27].

В нашем исследовании для изучения внутренней структуры спирально-скрученных ленточных фибрилл Х-белка методом рентгеновской дифракции образцы были подготовлены по методике, описанной в работе [9]. При рентгенодифракционном исследовании агрегатов Х-белка были выявлены круговые диффузные рентгеновские рефлексы 10.0 и 4.6 Å (рис. 3б). Полученные рефлексы имеют высокую степень размытости и, по всей вероятности, свидетельствует только о β-структуре, имеющейся в иммуноглобулин- и



**Рис. 3.** Дифракция рентгеновских лучей в препаратах частично выровненного Х-белка: (а) — препарат образца фибрилл Х-белка, локализованный на поверхности парафиновой головки; (б) — полученные рефлексы для фибрилл Х-белка. Были обнаружены два диффузных рефлекса (4.6 и 10.0 Å). Из-за экстремально высокого размытия рефлексов можно сделать вывод об отсутствии четвертичной кросс-β-структуры, свойственной амилоидным белкам.

фибронектин III-подобных доменах Х-белка, а не о четвертичной кросс-β-структуре его фибрилл. Таким образом, мы утверждаем, что спирально-скрученные ленточные фибриллы Х-белка не имеют четвертичной кросс-β-структуры и, следовательно, не являются амилоидными.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований показывают, что Х-белок формирует *in vitro* разные по морфологии агрегаты. Наиболее структурированные спирально-скрученные ленточные фибриллы Х-белка не имеют упорядоченной кросс β-структуры и, следовательно, не являются амилоидными.

Таким образом, несмотря на высокую склонность Х-белка к агрегации *in vitro*, его агрегаты не являются амилоидными. Причина, которая лежит в основе неамилоидной агрегации Х-белка в отличие от амилоидной агрегации, например, «родственного» миозин-связывающего белка С, по всей вероятности, заключается в структурных особенностях доменов Х-белка, которые в процессе эволюции утратили способность формировать в клетках токсичные нерастворимые амилоидные агрегаты. Среди таких структурных особенностей может быть низкая идентичность в аминокислотной последовательности [9], наличие чередующихся структурированных и неструктурированных областей в молекуле белка [9], а также наличие S-S-связей, обеспечивающих общую стабильность молекул, не позволяющих произвести полный разворот молекулы в процес-

се агрегации для дальнейшего сворачивания в амилоидную структуру.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-00805 (задача, касающаяся выделения миозин-связывающих белков С, подтверждение чистоты выделенных препаратов методом электрофореза).

### 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. F. Chiti and C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 27 (2017).
2. P. J. Crouch, D. J. Tew, T. Du, et al., *J. Neurochem.*, **108**, 1198 (2009).
3. А. А. Нижников, К. С. Антоненц и С. Г. Инге-Вечтомов, *Биохимия*, **80** (9), 1356 (2015).
4. D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, et al., *PLoS Biol.* **4** (1), e6 (2006).

5. M. Stefani and C. M. Dobson, *J. Mol. Med. (Berlin)*, **81**, 678 (2003).
6. C. M. Dobson, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **5**, 3 (2004).
7. S. M. Dorta-Estremera, J. Li, and W. Cao, *J. Vis. Exp.*, **82**, 50869 (2013).
8. L. Goldschmidt, P. K. Teng, R. Riek, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (8), 3487 (2010).
9. L. G. Bobyleva, S. A. Shumeyko, E. I. Yakupova, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 731 (2021).
10. J. W. McNamara and S. Sadayappan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **660**, 121 (2018).
11. A. Vydyanath, Ch. A. Gurnett, S. Marston, et al., *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **33**, 61 (2012).
12. M. A. Ackermann and A. Kontrogianni-Konstantopoulos, *Front. Physiol.*, **4**, 391 (2013).
13. M. A. Ackermann and A. Kontrogianni-Konstantopoulos, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 652065 (2010).
14. G. Offer, C. Moos, and R. Starr, *J. Mol. Biol.*, **74**, 653 (1973).
15. R. Starr and G. Offer, *Methods Enzymol.*, **85** (Part B), 130 (1982).
16. J. D. Fritz, D. R. Swartz, and M. L. Greaser, *Anal. Biochem.*, **180**, 205 (1989).
17. H. Laemmli, *Nature*, **227** (5259), 680 (1970).
18. K. Yamamoto and K. Moos, *J. Biol. Chem.*, **258** (13), 8395 (1983).
19. R. Starr and G. Offer, *J. Mol. Biol.*, **170**, 675 (1983).
20. P. Bennett, R. Starr, A. Elliott, et al., *J. Mol. Biol.*, **184**, 297 (1985).
21. Л. Г. Марсагишвили, Дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2007).
22. D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, et al., *PLoS Biol.*, **4**, e6 (2006).
23. H. Ramshini, C. Parrini, A. Relini, et al., *PLoS One*, **6**, e16075 (2011).
24. E. D. Eanes and G. G. Glenner, *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 673 (1968).
25. J. C. Stroud, C. Liu, P. K. Teng, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7717 (2012).
26. D. Eisenberg and M. Jucker, *Cell*, **148** (6), 1188 (2012).
27. H. Wille, W. Bian, M. McDonald, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (40), 16990 (2009).

### ***In vitro* Study of Aggregation Properties of Muscle X-Protein**

**L.G. Bobyleva\*, A.G. Gabdulkhakov\*\*, N.N. Salmov\*, I.M. Vikhlyantsev\*, and A.G. Bobylev\***

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

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

A feature of skeletal muscle X-protein aggregation is the formation of helical fibrils from twisted ribbons, which were previously observed by electron microscopy. To get a deeper understanding of polymorphism of X-protein aggregates, electron microscopy was used to study X-protein aggregation under various conditions. It was found that X-protein formed various types of aggregates: amorphous, protofibrils, bundles of linear fibrils, helical fibrils formed from twisted ribbons, presumably of amyloid nature. In order to confirm this assumption, structural studies of X-protein helical fibrils assembled from twisted ribbons were carried out using information from X-ray diffraction. The analysis revealed the presence of strongly blurred reflections at 4.6 and 10 Å. The results obtained indicate that the fibrils of X-protein do not possess a quaternary cross- $\beta$ -structure that is characteristic for amyloid fibrils of known proteins and peptides, such as, for example, insulin, amyloid  $\beta$ -peptide and titin. These results contradict the previously obtained data on amyloid-like X-protein aggregation, the findings suggested that fibrils of X protein can bind "amyloid" dyes Congo red and thioflavin T. The ability of X-protein to form non-amyloid aggregates *in vitro* may be due to a defense mechanism developed through evolution that prevents the formation of toxic insoluble amyloid aggregates in cells.

*Keywords: multidomain muscle proteins, myosin-binding protein C, X-protein, aggregation, amyloids*

УДК 577.3

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТВОРОВ ВЕЩЕСТВ В МАЛЫХ И СВЕРХМАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

© 2022 г. В.И. Лобышев\*,#

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

#E-mail: lobyshev@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.04.2022 г.

После доработки 22.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Представлен обзор проблемы малых и сверхмалых концентраций различных биологически активных веществ и ее краткая история. Характерной особенностью действия малых и сверхмалых концентраций является немонотонный, в общем случае полимодальный, отклик живых организмов и модельных биологических систем на монотонно уменьшающуюся концентрацию воздействующих веществ. Совокупность экспериментальных данных заставляет внимательно рассмотреть физико-химические свойства воды, разбавленных водных растворов и технологию их приготовления.

*Ключевые слова:* разбавленные водные растворы, микрогетерогенность, самоорганизация, мезочастицы, механохимия, активные формы кислорода, азота.

DOI: 10.31857/S0006302922040044, EDN: ISTYXS

Одной из тем лаборатории физической биохимии Института биологической физики АН СССР (в настоящее время – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН), организованной и длительное время руководимой С.Э. Шнолем, была проблема слабых воздействий на биологические системы. Эта тема включает в себя влияние малых и сверхмалых концентраций различных биологически активных веществ, а также влияние малых доз ионизирующего и неионизирующего излучения на биологические объекты. Проблема воздействия малых концентраций была обнаружена еще в XIX веке. Ее характерный признак состоит в немонотонном ответе живого организма на монотонно уменьшающуюся концентрацию воздействующего агента. Этот феномен был объяснен стимулирующим действием вызывающих стресс веществ, но еще недостаточных для проявления вредных последствий, и назван гормезисом [1]. Со второй половины 1970-х годов появляется нарастающий поток работ, в которых исследуется широкий диапазон концентраций действующих биологически активных веществ на различные функции существенно более простых модельных систем [2–9], где представление о гормезисе теряет смысл. Типичным примером являются результаты эксперимента с двухоптимальным ответом степени ингибирования протеинкиназы С на концентрацию антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола [10]. Ха-

рактерный признак этой зависимости состоит в наличии максимума при малых (их называют также сверхмалыми) концентрациях действующего вещества в области  $10^{-14}$  М и «мертвой зоны», лежащей обычно в области  $10^{-7}$ – $10^{-11}$  М. При повышении концентрации до  $10^{-4}$  М появляется обычно наблюдаемый максимум активности. Аналогичная зависимость была опубликована для реакции дегрануляции базофилов крови человека на последовательный ряд образцов разбавлений антисыворотки [11].

Еще одна возможная особенность высокоразбавленных растворов состоит в том, что их значительное действие может проявляться на фоне большей эндогенной концентрации того же вещества в изучаемой модели. Например, опиоиды модулируют иммунную активность различных клеток в концентрациях  $10^{-18}$ – $10^{-14}$  М, хотя те же опиоидные пептиды присутствуют в клетках в значительно большей естественной концентрации  $10^{-10}$ – $10^{-12}$  М [12, 13]. Аналогичные эффекты были также обнаружены при сочетанном действии фармакологических средств и гомеопатических препаратов в высоком разбавлении [14, 15].

Стимулирующее воздействие малых доз при поражающем действии больших доз было обнаружено для ионизирующего излучения и по аналогии было названо радиационным гормезисом

[16, 17]. При исследовании действия слабых неионизирующих электромагнитных полей на живые организмы и модельные системы также были обнаружены немонотонные эффекты, зависящие от интенсивности и частоты электромагнитных полей естественного происхождения [18–20]. Качественное сходство эффектов, наблюдаемых при воздействии электромагнитных полей низкой интенсивности и сильно разбавленных растворов в виде полимодальной зависимости измеряемых параметров от дозы воздействия или концентрации действующего реагента заставляют задуматься об общей причине наблюдаемых эффектов. Общим компонентом всех этих экспериментов является вода. Предположение об определяющей роли воды подкрепляется также результатами экспериментов по действию электромагнитных полей низкой интенсивности, где предварительно экспонированная в поле вода проявляет физико-химические отличия от исходной воды и вызывает биологические эффекты [21].

### ВОДА – СЛОЖНАЯ НЕРАВНОВЕСНАЯ СИСТЕМА

Молекула воды является самой маленькой трехатомной молекулой. Электронная структура атома кислорода в молекуле воды характеризуется  $sp^3$  гибридизацией, что предопределяет тетраэдрическую симметрию электронных оболочек и уникальную возможность образования четырех водородных связей с соседними молекулами воды и/или молекулами биополимеров. В отличие от ближайших изоэлектронных аналогов  $H_2S$  и  $H_2Te$ , будучи дважды донорами и дважды акцепторами протона в водородных связях, молекулы воды способны к образованию развитой пространственной сети водородных связей, что резко отличает воду от других жидкостей. Кроме того, вода даже в лабораторных условиях является физически и химически неоднородной.

В жидкой воде содержатся:

- ионы  $H^+$  и  $OH^-$  в концентрации  $10^{-7}$  М вследствие диссоциации молекулы воды;

- кроме молекул  $H_2^{16}O$ , другие основные стабильные изотопные формы:  $H_2^{17}O$ ,  $H_2^{18}O$  и  $DH^{16}O$  с количеством тяжелых изотопов:  $^{18}O$  – 0.20% (~ 0.1 М),  $^{17}O$  – 0.04% (~ 0.02 М),  $D = ^2H$  – 0.015% (~ 15 мМ);

- орто( $\uparrow HON\uparrow$ )- и пара( $\uparrow HON\downarrow$ )-молекулы (естественное статистическое распределение форм в газовой фазе 3:1);

- растворенные газы окружающего воздуха, нанопузырьки;

- растворенные органические и неорганические примеси из воздуха и материала сосуда;

- активные формы кислорода и азота и, как следствие, переменный окислительно-восстановительный потенциал.

Рассмотрим указанные факторы более подробно. Вода является слабым электролитом и проявляет как кислотные, так и основные свойства. Диссоциация нейтральной молекулы воды на ионы  $H^+$  и  $OH^-$  – процесс динамический, равновесная константа диссоциации воды без примесей мала и составляет  $1.82 \cdot 10^{-16}$  моль/л, а константы скоростей диссоциации и рекомбинации равны  $2.5 \cdot 10^{-5} c^{-1}$  и  $(1.4 \pm 0.2) \cdot 10^{11}$  л/(моль·с) соответственно. Энтальпия гидратации протона составляет ~276 ккал/моль и превышает более чем на 100 ккал/моль энтальпию гидратации любого другого одновалентного катиона. Это свидетельствует о том, что протоны сильно взаимодействуют с молекулами воды и образуют ионы гидроксония  $H_3O^+$  или более сложные комплексы. Среднее время ассоциации протона с данной молекулой воды оценено М. Эйгеном в  $10^{-12}$  с, а средний интервал между ассоциациями данной молекулы воды с протоном  $5 \cdot 10^{-4}$  с [22].

В состав молекул природной воды входят два стабильных изотопа водорода ( $^1H$ ,  $^2H = D$ ) и три стабильных изотопа кислорода ( $^{16}O$ ,  $^{17}O$  и  $^{18}O$ ). Они могут образовать 9 изотопных разновидностей молекул воды. Четыре из них вместе с концентрациями указаны выше, а пять других форм ( $HD^{18}O$ ,  $HD^{17}O$ ,  $D_2^{16}O$ ,  $D_2^{18}O$  и  $D_2^{17}O$ ) представлены в обычной воде в убывающем количестве от  $6 \cdot 10^{-5}$  до  $10^{-9}$  объемных процентов [23]. Хотя основная часть воды представлена молекулами  $H_2^{16}O$ , количество основных изотопных форм молекул воды, выраженное в молях, как указано выше, характеризуется достаточно большими величинами, сравнимыми с количеством основных ионов Na, K, Ca, Mg в живой клетке. Наряду с понятными биологическими изотопными эффектами обогащенной тяжелой воды, наблюдаются неожиданно большие эффекты при небольшой вариации изотопного состава относительно его природного состава, не нашедшие до сих пор адекватного объяснения [24–27]. Кроме указанных стабильных изотопов существуют радиоактивные изотопы кислорода  $^{14}O$ ,  $^{15}O$ ,  $^{19}O$ , но их время жизни менее двух минут, а также изотоп водорода – тритий  $^3H = T$ , период полураспада которого составляет 12.32 года. Тритий образуется в атмосфере в результате взаимодействия вторичных ядерных частиц космического излучения, в основном нейтронов и протонов, с ядрами азота и кислорода. Вскоре после образования тритий окисляется и образует молекулы воды в форме НТО. Равновесное количество трития, генериру-

емого космическими лучами, составляет 3–10 кг, содержится он в основном в воде и лишь 7% присутствует в атмосфере. Ввиду малости концентрации трития в природной воде его принято выражать в «тритиевых единицах» (ТЕ). Такая единица соответствует содержанию одного атома трития на  $10^{18}$  атомов протия и эквивалентна 7.2 распада в минуту на 1 кг воды или 0.12 Бк/кг. Тритий является мягким  $\beta$ -излучателем с максимальной энергией электронов 18.6 кэВ и средним значением 5.7 кэВ, а конечным продуктом распада трития является стабильный изотоп гелия  $^3\text{He}$ . Концентрация трития значительно выросла вследствие испытаний ядерного оружия и достигла десятков тысяч ТЕ в 1974 г. Содержание трития снижается во времени, сильно варьирует от местности и наличия его техногенных источников. До проведения ядерных испытаний количество трития в пресноводных источниках не превышало 1 Бк/л. Сейчас среднее количество трития в пресных водах европейской части РФ составляет около 4 Бк/л [28].

Впервые спиновые модификации молекулы водорода орто- $\text{H}_2$  со спином  $J = 1$  и пара- $\text{H}_2$  со спином  $J = 0$  были независимо предсказаны В. Гейзенбергом и Ф. Хундом в 1927 г., в том же году эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение. Водород при низкой температуре удалось фракционировать, поскольку орто- и пара-молекулы водорода обладают большим различием во вращательных уровнях энергии. Оно составляет 170.6 К, что значительно больше, чем температура кипения жидкого водорода (20.4 К). Метод разделения спиновых изомеров состоял в охлаждении газа до 20.4 К в присутствии катализатора, ускоряющего спиновую конверсию (например,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ). После достижения равновесия практически все молекулы переходили на нижний вращательный уровень  $J = 0$ , т.е. переходили в параизомеры. После нагревания газа получали газ в пара-состоянии, сохраняющийся из-за очень медленной конверсии. Для чистого водорода характерное время составляет один год при комнатной температуре и нормальном давлении. Подробнее об этом можно прочитать в работе [29]. Значительно позднее с использованием новых современных технологий были фракционированы спиновые изомеры других многоатомных молекул, таких как  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{F}$  и др., обладающих значительно меньшим различием в энергиях вращательных степеней свободы и более высокой температурой кипения [30]. Уже не приходится удивляться тому, что молекулы с идентичными ядрами в симметричных молекулах, такие как  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2$  и др., существуют в природе в форме спиновых изомеров, для которых правила отбора предписывают определенные вращательные квантовые числа для разных спиновых изомеров.

Создана база данных HITRAN, содержащая разнообразные спектроскопические характеристики высокого разрешения паров воды, ее изотопологов и около 300 молекул газов и дополнительных молекул, встречающихся в атмосфере [31].

Как и молекула водорода, молекула воды может быть в двух спин-изомерных формах – орто-изомера, в котором ядерные спины протонов параллельны ( $J = 1$ ) и параизомера, в котором спины антипараллельны ( $J = 0$ ). При нормальной температуре орто-изомерам соответствуют три проекции спина (1, 0, -1), а параизомерам – только одна со спином, равным 0. Поэтому в условиях термодинамического равновесия соотношение орто:пара должно быть равным 3:1; только при низких температурах (ниже 50 К) оно стремится к нулю при  $T \rightarrow 0$  К. Разделение спиновых изомеров воды впервые удалось реализовать в процессе конденсации паров воды на углекислом газе [32]. Позднее разделение спиновых изомеров воды было достигнуто методом хроматографии при медленной прокачке смеси водяного пара с азотом в качестве газа-носителя сквозь адсорбционную колонку, заполненную пористым углем. Выходящий из колонки газ направляли в кювету, сопряженную с субмиллиметровым ЛОВ-спектрометром. В кювете рабочую смесь зондировали на частотах 30–40  $\text{см}^{-1}$  пучком перестраиваемого по частоте монохроматического излучения. [33, 34]. Максимумы на спектрах поглощения для орто- и пара-модификаций соответствовали 30.603 и 37.137  $\text{см}^{-1}$ . Разделение спиновых модификаций воды было получено также при использовании перестраиваемых лазерных диодов [35]. В перечисленных работах измерения проводили в газовой фазе при пониженном давлении паров около 3 торр. В работе других авторов [36] разделения спиновых изомеров достигнуть не удалось, но давление паров воды было на два порядка больше. Основным результатом стало заключение о том, что константы связывания спиновых изомеров с адсорбентом различаются, орто-изомеры связываются слабее, чем пара-изомеры, и первой волной выходят из хроматографической колонки. Таким образом, статистическое соотношение изомеров 3:1 нарушается и в данном эксперименте увеличивается до 11:1.

Обогащенные порции водяного пара вымораживали с помощью азотной ловушки и хранили в холодильнике в замороженном состоянии. Через некоторое время образцы размораживали и вновь подвергали спектральному анализу. В результате время жизни спиновых изомеров было оценено в десятки минут для жидкой воды и месяцы для льда. Поскольку переходы между орто- и пара-изомерами молекулы запрещены, водяной пар является смесью независимых долгоживущих орто- и пара-фракций. Возможность наблюдения

запрещенных колебательно-вращательных переходов между орто- и пара-изомерами воды была детально теоретически исследована в работе [37]. Вместе с тем механизм спиновой конверсии остается не ясен. Было обнаружено также, что помимо угля в качестве спин-модификаторов воды могут выступать многие другие вещества с развитой поверхностью (например, цеолиты и силикагель). Это дает основание предположить наличие возможных нарушений соотношения орто:пара в других естественных процессах [33]. Высказанное предположение было подтверждено наблюдением предпочтительной адсорбции пара-изомеров воды лиофилизированными препаратами ДНК, лизоцима и коллагена, а также цеолитом и солями CaO и CuSO<sub>4</sub>. Оказалось, что разница в скоростях связывания спин-изомеров воды слабо зависит от свойств сорбента при их принципиальном различии в механизмах связывания с водой [38]. Кроме того, было обнаружено, что селективность связывания орто- и пара-модификаций воды уменьшается с увеличением влажности сорбента.

Приведенные результаты получены в парах воды при низком давлении, когда молекулы можно считать свободными. В жидкости из-за уширения полос очень слабой интенсивности не удается различить спиновые модификации стандартными спектроскопическими методами, однако сомневаться в наличии орто- и пара-состояний воды также не приходится. Различить орто- и пара-состояния молекул воды в жидком состоянии удалось с использованием метода нелинейной когерентной лазерной спектроскопии четырехфотонного рассеяния [39]. В этом методе используются встречные пучки лазерного излучения с частотами  $\omega_1$  и  $\omega_2$ , лежащими в области видимого света, а разность этих излучений перестройкой  $\omega_2$  сканируется в микроволновом диапазоне. Источником излучения  $\omega_1$  является лазер с плотностью мощности около 60 МВт·см<sup>-2</sup> с круговой поляризацией, вторым источником – лазер с перестраиваемой частотой с плотностью мощности около 10 МВт·см<sup>-2</sup> и линейно поляризованном излучением. Измеряемым параметром служит состояние поляризации излучения на частоте смещения  $\omega = \omega_1 - (\omega_1 - \omega_2)$ . Эта методика позволила изучить диапазон от 1 до 100 см<sup>-1</sup>. Не вдаваясь в подробное описание этого сложного нелинейного метода, отметим, что полученные спектры являются результатом усреднения после 10–30 вспышек мощного лазерного излучения при частоте повторения импульсов генерации лазеров, равной 1 Гц, и длительности импульсов около 10 пс. В жидкой воде были зарегистрированы спектры либраций молекул, совпадающие по частоте с вращательным спектром H<sub>2</sub>O в газовой фазе. Наиболее интенсивными оказались линии

79.8 см<sup>-1</sup> для пара-изомера и 88.1 см<sup>-1</sup> для орто-изомера. Эксперименты, проведенные в растворах биополимеров (ДНК,  $\alpha$ -химотрипсин), показали, что в присутствии биополимеров существенно возрастает резонансный вклад вращательного спектра воды [39, 40]. Авторы констатируют, что механизм этого явления не ясен, и предполагают, что биополимеры нарушают сетку водородных связей в воде так, что увеличивается количество свободных молекул. Этот вывод, однако, не согласуется с известными экспериментальными и теоретическими результатами. Учитывая высокую интенсивность лазерного излучения, гетерогенность образцов и быстрое время перестройки электронной структуры H<sub>2</sub>O, меньшее, чем время зондирующего импульса (10 пс), трудно сказать, какую систему мы реально изучаем. На этот вопрос еще следует получить обоснованный ответ. Вместе с тем учет наличия орто- и пара-состояний протона в симметричных молекулах заслуживает внимания, и эта тема продолжает развиваться [41, 42].

В воде, находящейся в равновесии с окружающим воздухом, всегда находятся растворенные газы, среди которых доминируют азот, кислород и углекислый газ. Коэффициенты растворимости азота, кислорода и углекислого газа известны и составляют при нормальных условиях 0.016, 0.032 и 0.879 л газа/л воды соответственно. Средняя относительная концентрация этих газов в воздухе равна 0.781, 0.209 и 0.0004 соответственно. При этом их содержание в воде составит 0.589 мМ, 0.289 мМ и 1.57·10<sup>-5</sup> М. Взаимодействие углекислого газа с водой приводит к появлению угольной кислоты, которая, в свою очередь, диссоциирует. Таким образом в воде в области нейтральных значений pH присутствуют анионы HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> в концентрации около 10<sup>-5</sup> М, что подтверждается экспериментально с высокой точностью [43]. По этой причине дистиллированная вода в открытом сосуде без дополнительных примесей имеет значение pH 5.5, меньшее, чем ожидаемое значение (pH 7.0). Наличие растворенных газов влечет за собой образование стабильных газовых пузырьков, называемых бабстонами, размер которых увеличивается от 9.6 нм до 57.8 нм при увеличении концентрации NaCl в растворе от 10<sup>-6</sup> до 10<sup>-2</sup> М. При этом могут образовываться бабстонные кластеры микронных размеров [44, 45].

Вода активно растворяет все примеси неорганического и органического происхождения, находящиеся в воздухе и в материале сосуда, в котором находится вода. Уместно напомнить также, что в воздухе для больничных палат нормируемое ГОСТ 2007 (идентичным международному стандарту ISO) количество только лишь колониеобра-

зующих частиц составляет  $500 \text{ шт/м}^3$ ; максимальное число «пылевых» частиц с размером, равным и более  $0.5 \text{ мкм}$ , в операционных помещениях не должно превышать  $3520000$  штук в  $\text{м}^3$ , а их количество в палатах даже не нормируется. Показательным примером могут служить результаты исследования «аномальной» сверхплотной конденсированной воды в кварцевых капиллярах, полученной впервые Н.Н. Федякиным и активно исследуемой в то время Б.В. Дерягиным. После провокационной публикации Э. Липпинкотта о том, что эта вода, возможно, является полимерной структурой [46], за два года в разных лабораториях мира было опубликовано несколько сотен работ. Оказалось, что кроме растворенного кремния в конденсированной внутри кварцевых капилляров воде обнаруживаются и другие вещества, имеющиеся в лаборатории. Наш давний опыт показал, что в стеклянном бидистилляторе электропроводность бидистиллята оказывается выше, чем дистиллята, за счет растворения ионов Na из стекла, что было экспериментально подтверждено спектральным анализом. При этом содержание Ca и Mg в бидистилляте действительно уменьшалось. Хочется напомнить также, что такое вещество как AgCl, считающееся нерастворимым, дает насыщенный водный раствор с концентрацией  $1.34 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ . В настоящее время в основной массе работ можно увидеть фразу: «использовалась вода класса 1 с удельным сопротивлением  $18.2 \text{ МОм}\cdot\text{см}$ ». Реально столь низкая электропроводность сохраняется очень недолго и через 10 мин в открытом стеклянном сосуде увеличивается примерно в 10 раз.

Все приведенные выше факты убедительно свидетельствуют о том, что реальная вода гетерогенна по своему составу. Концентрации всех вышеперечисленных компонент зависят от множества внешних условий, включающих предисторию воды, температуру и давление. Самая чистая коммерческая вода для хроматографии производства компании Fisher Scientific (США) гарантирует отсутствие лишь избранных ионов (Al, Cd, Cr, Cu, K) на уровне  $10 \text{ ppb}$ , т.е. на уровне  $10^{-8} \text{ М}$ . Таким образом, условно чистая вода даже в лабораторных условиях является многокомпонентным раствором, практически всегда неравновесна и нарушает многие устойчивые представления об идеальной жидкости и растворе. Чистую воду, состоящую только из молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , можно наблюдать лишь на листе бумаги или на экране монитора компьютера.

## ВОДА ВЕСЬМА ЧУВСТВИТЕЛЬНА К ВНЕШНИМ ФИЗИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Уже более 50 лет известно, что ультразвуковая кавитация в воде приводит к появлению гидроксил-радикала  $\text{OH}^\bullet$ , ионов нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) и, в меньшей степени, нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ). С разработкой технологии одиночного пульсирующего пузырька удалось на один цикл схлопывания пузырька количественно измерить выход  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{NO}_x$ , а также фотонов, чей спектр не был характерен и простирался от  $800$  до  $200 \text{ нм}$  с увеличением интенсивности в коротковолновой части спектра [47]. Спектр такого вида в рамках модели черного тела говорит о температуре внутри пузырька, достигающей  $20000 \text{ К}$ , что, в свою очередь, говорит о возможности ионизации внутреннего содержимого пузырька и последующих ион-электронных рекомбинационных процессов. Появление активных форм кислорода и азота в наномолярных и микромолярных концентрациях неизбежно влечет за собой каскад сопряженных цепных электрон-радикальных реакций и изменений окислительно-восстановительного потенциала среды, весьма важного для функционирования живых систем. К появлению активных форм кислорода в воде приводят также такие низкоинтенсивные механические воздействия, как ультразвуковое докавитационной интенсивности, продавливание воды через капилляры и мембраны [48–50]. Очень интересен результат, полученный при вибрации сосуда с водой. Такая процедура приводит к появлению не только активных форм кислорода, но и регистрируемого объема выделяющихся газов кислорода и водорода, причем частоты вибраций около  $1 \text{ Гц}$  оказываются наиболее эффективными [51, 52]. Не так давно вышла работа, повторяющая появление перекиси водорода при выдавливании микрокапель воды из капилляра [53]. Авторы этой работы не цитируют наших отечественных авторов и отмечают, что, хотя вода и является привычной жидкостью, она обладает многими непонятными свойствами. Адекватного понимания механизмов образования активных форм кислорода и, тем более, азота в воде на сегодняшний день не существует. Наиболее вероятным в качестве инициаторов активных форм кислорода, по аналогии с кавитацией, можно рассматривать спонтанно образующиеся нанопузырьки, названные бабстонами [44]. Недавно выполненная работа [54] подтверждает это предположение. В ней показано, что в сосудах с водой, подвергавшихся колебаниям амплитудой в  $5 \text{ мм}$  и частотой  $30 \text{ Гц}$  появляются стабильные пузырьки со средним размером  $600 \text{ нм}$ . При этом наблюдается «синяя» люминесценция, характерная для сонолюминесценции. Ко-

личество перекиси водорода и гидроксил радикала растет со временем механического воздействия и с ростом частоты колебаний от 30 до 60 Гц, напротив, количество растворенного кислорода уменьшается со временем механической обработки.

Наряду с этим было обнаружено, что даже выдерживание воды при температуре 40°C в течение часа сопровождается появлением активных форм кислорода и молекулы перекиси водорода  $H_2O_2$  [55], а при выдерживании при температуре 70°C — даже окислов азота [56]. Аналогичные удивительные эффекты наблюдаются и при освещении воды видимым светом, а также квазимонохроматическим светом небольшой интенсивности в полосах поглощения молекулярного кислорода в видимом и инфракрасном диапазоне спектра [57]. Образование активных форм кислорода под влиянием внешних слабых воздействий приводит к появлению длительных химических преобразований, в том числе циклического характера [58]. Полной ясности в механизмах описанных наблюдений пока еще нет. Известно около 40 реакций, в которых участвуют реагенты и продукты кислородно-водородных молекул [59]. Среди них есть как очень быстрые, так и очень медленные реакции, что приводит к длительной эволюции системы [60, 61]. В воде, насыщенной атмосферным углекислым газом, анионы гидрокарбонатов могут выступить донорами электронов и воздействовать на протекание сопряженных цепных электрон-радикальных реакций [62]. Инициатором этих процессов могут служить также природные источники ионизирующего излучения, среди которых следует назвать тритий и радиоактивный изотоп калия  $^{40}K$ , распад которых сопровождается бета-излучением, приводящим к появлению гидратированных электронов. Так, в морской воде было зарегистрировано 80 мкМ гидратированных электронов за счет бета-излучения [63]. Сходство процессов радиолиза, фотолиза и термолиза удивительно, поскольку энергии квантов в процессе термолиза и фотолиза видимым излучением воды недостаточно для разрыва ковалентной связи в молекуле воды и образования радикалов  $H\cdot$  и  $OH\cdot$ . Для объяснения этих фактов была предложена концепция воды как открытой неравновесной активной среды, которая накапливает энергию под воздействием теплового электромагнитного излучения и может освобождаться в результате слабых резонансных воздействий в областях поглощения кислородом квантов света с переходом  $O_2$  в синглетное состояние. Последующий коллапс нанопузырьков (бабстонов) в результате происходящего в них локального электромагнитного возбуждения и образование различных продуктов в ходе сопряженных цепных электрон-радикальных реакций приводит к раз-

рыву химических связей в молекулах воды. При этом образующиеся продукты аналогичны тем, которые возникают при воздействии ионизирующих излучений с энергиями, значительно превышающими энергию химической связи в молекуле воды [64, 65]. Эта гипотеза ожидает более детального экспериментального подтверждения и теоретического обоснования.

Очень часто при анализе сложных эффектов говорят об изменении структуры воды. Это в принципе неправильное высказывание. По определению структура есть совокупность устойчивых связей объекта. Поэтому жидкая вода, обладающая трансляционной подвижностью, структуры не имеет. Можно говорить лишь о ближнем порядке. Тем не менее, это словосочетание стало устойчивым, а количество библиографических ссылок в Интернете о «структуре воды» значительно превышает таковое о структуре ДНК или белка. Как уже говорилось выше, вода единственная из своих изоэлектронных гомологов  $H_2S$  и  $H_2Se$  обладает возможностью образования четырех водородных связей в тетраэдрической конфигурации, что предопределяет полиморфизм возможных структур. Вода в твердом состоянии обладает уникальным количеством полиморфных кристаллических структур, так, совсем недавно была установлена новая структура льда XVIII [66]. Построение некристаллографических, параметрических структур связанной, в частности, с биополимерами воды значительно расширяет эти возможности [67, 68]. Молекулярный дизайн параметрических структур из тетраэдрических элементов дает возможность построения практически неограниченного множества структурных элементов из молекул воды, включая хиральные, фрактальные и запрещенные в кристаллографии, но распространенные в биологическом мире [69, 70].

Для описания состояния жидкой воды используют модели двух типов (двух состояний) — модель, впервые четко сформулированную В. Рентгеном [71], и модель непрерывной сетки водородных связей, предложенную Дж. Берналом и Р. Фаулером [72]; каждая из этих моделей обрела множество модификаций. В качестве современного примера можно привести эволюцию взглядов одной научной группы, проводившей исследование жидкой воды с использованием синхротронного источника излучения. На начальной стадии исследований говорилось, как и в классической модели двух состояний, о наличии льдообразной и свободной воды, о кольцеобразных и линейных связанных структурах. В последнем самобзоре эти авторы пришли к тому, что жидкая вода является локально неоднородной жидкостью [73]. В ней сосуществуют области тетраэдрически упорядоченной воды низкой плотности

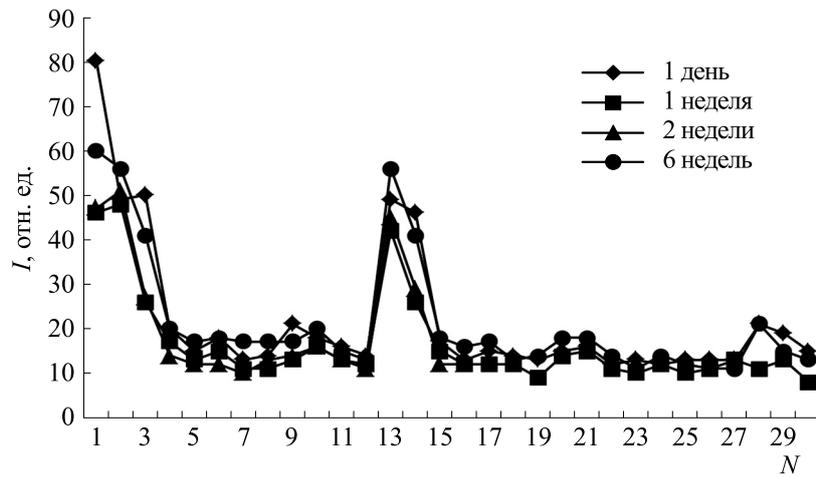
(LDL) и менее упорядоченной воды высокой плотности (HDL) без ясных фазовых границ, между которыми существуют флуктуационные переходы. Авторы обзора отмечают, что ближайшей задачей является определение степени неоднородности в воде и резкости границ раздела между флуктуирующими областями (“a burning question is to determine the degree of heterogeneity in water and the sharpness of the boundaries between fluctuating regions”). При этом авторы перестали пользоваться понятиями льдообразных кластеров, употреблявшихся ими в более ранних работах. Точка зрения о динамическом локально неоднородном состоянии воды поддерживается также компьютерными расчетами [74]. В этой работе обнаружено, что в жидкой воде имеются области пространства, в которых молекулы в среднем перемещаются в одном направлении. Эти области имеют размер более десяти нанометров и хорошо проявляются, если за системой наблюдать в течение времени порядка 100 пс, что можно рассматривать как своеобразную наноразмерную динамическую неоднородность жидкостей. Дальнейшее развитие эксперимента пошло по пути исследования переохлажденной воды с целью обнаружения предполагаемого фазового разделения двух состояний воды высокой и низкой плотности [75].

Как уже говорилось ранее, проблема малых концентраций берет начало из биологических исследований, где был зарегистрирован в модельных системах немонотонный ответ на последовательно уменьшающиеся концентрации добавляемых биологически активных препаратов. Но что же происходит с физическими характеристиками воды при растворении и разбавлении водных растворов? Вода — полярная жидкость с высокой диэлектрической проницаемостью, что делает ее хорошим растворителем для полярных и ионных веществ. Эти вещества в не очень высоких концентрациях дают идеальные водные растворы, в которых растворенные вещества не взаимодействуют друг с другом, а растворы являются однородными. Основная концепция физико-химических свойств разбавленных идеальных растворов состоит в монотонном переходе к свойствам растворителя при высоких разбавлениях. На практике растворы с концентрацией  $10^{-4}$  М и ниже называются бесконечно разбавленными растворами. Амфифильные вещества при определенных концентрациях в воде, называемых критической концентрацией мицеллообразования, самоорганизуются в коллоидные структуры — различные типы мицелл. Эти точки критических концентраций мицеллообразования обычно регистрируются как перегибы на графиках зависимости различных физических характеристик (вязкость, проводимость, скорость звука, рассеяние света и т.д.) от концентрации амфифильных веществ.

Значения критических концентраций мицеллообразования находятся в диапазоне  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  М. Мезомасштабные неоднородности могут существовать также в микроэмульсиях без поверхностно-активных веществ в тройных системах, состоящих из относительно короткого амфифильного компонента (гидротропа) и двух плохо смешивающихся жидкостей. Уникальная структура мезочастиц в микроэмульсиях без поверхностно-активных веществ открывает различные возможности. Например, такие микроэмульсии являются мощными солюбилизующими средами, обеспечивают аномалии ферментативной активности и химической реакционной способности при использовании в качестве реакционной среды [76, 77]. Структурные неоднородности в таких бинарных системах, как «вода–спирты» или другие полярные неэлектролиты, известны давно [78]. Они характеризуются двумя максимумами интенсивности рассеянного света, вызванными появлением неоднородностей в растворе. Основной из них является широким по шкале концентраций добавляемого компонента при мольной доле спирта  $X = 0.2$ – $0.5$ , а другой, более интенсивный и узкий, — при  $X = 0.01$ – $0.05$ . Основной максимум вызван флуктуациями концентрации, но природа резкого максимума при более низкой концентрации все еще не совсем ясна [79]. Все вышеописанные неоднородности, зарегистрированные различными физическими методами, проявляются при концентрации более  $10^{-5}$  М.

Установлено, что равновесие в водно-спиртовых растворах устанавливается в течение длительного времени, вплоть до нескольких суток после смешивания жидкостей [79]. Длительность эволюции этих систем очень похожа на полученные нами в экспериментах с другими водными растворами при значительно меньшей концентрации примесей в воде. Наши исследования флуоресценции воды и разбавленных растворов пептидов показали наличие флуоресценции у дистиллированной воды, не связанное с возможным наличием примесей гуминовых кислот, резкое возгорание интенсивности люминесценции при уменьшении концентрации люминофора глицилтриптофана до  $10^{-7}$  М и появление пика люминесценции у нелюминесцирующего дипептида глициласпарагина в этом же диапазоне концентраций, а также длительное время эволюции спектров излучения. Спектры возбуждения и соответствующие спектры излучения изученных растворов различны, что характерно для кристаллофосфоров. В рамках этого представления область возбуждения была оценена в 100 нм [80–82].

Очень малые концентрации сложно получить однократным растворением или разбавлением. Поэтому их практически получают последовательными итерациями разбавления в определен-



**Рис. 1.** Зависимость интенсивности флуоресценции от числа десятичных разбавлений раствора хлористого натрия. Образец 13-го десятичного разбавления соответствует концентрации соли  $2 \cdot 10^{-12}$  М. Длина волны возбуждения 300 нм, излучения – 385 нм. Среднеквадратичная погрешность измерения соответствует размеру точки.

ное количество раз. На каждой стадии разбавления раствор подвергают интенсивному встряхиванию, называемому потенцированием. Такая технология является традиционной в изготовлении гомеопатических препаратов. С использованием этой технологии нами были выполнены эксперименты по изучению флуоресценции широкого ряда последовательно разбавленных растворов NaCl, подвергавшихся интенсивному механическому воздействию (потенцированию) после каждого десятикратного разбавления [84]. Результаты представлены на рис. 1.

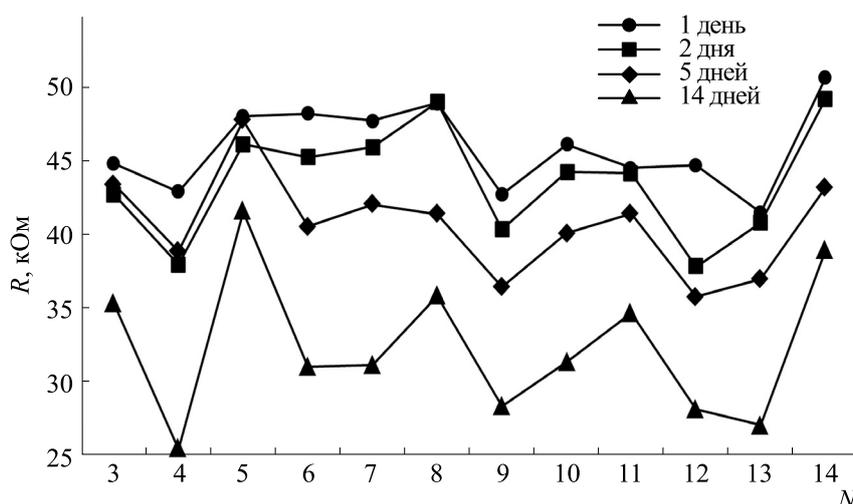
Было установлено наличие сохранявшегося в течение длительного времени резкого увеличения интенсивности флуоресценции в области числа итераций  $N = 13$ . Аналогичный паттерн был получен нами позднее в другой лаборатории. Впервые нами также была установлена высокая отрицательная корреляция (коэффициент линейной корреляции  $\rho = -0.93$ ) между интенсивностью флуоресценции раствора хлористого натрия и спонтанной активностью пресноводных одно-

клеточных организмов, т.е. между физическими характеристиками и биологической активностью растворов (табл. 1) [84]. Позднее методом NTA (nanoparticle tracking analysis) мы определили в этой области концентраций наличие наночастиц размером 96–115 нм в количестве  $(3 \pm 2) \cdot 10^8$  частиц/мл.

Еще более сложный немонотонный паттерн был получен при измерении высокочастотной электропроводности потенцированных растворов диклофенака (рис. 2). В этой работе использовали процедуру последовательных сотенных разбавлений с потенцированием, включая мнимые концентрации, когда само понятие концентрации теряет смысл при  $N > 11$ . Эволюцию получаемого паттерна наблюдали в течение двух недель после приготовления растворов [86]. При точности измерений не хуже 0.5% наблюдаются значительные вариации электропроводности от числа итераций «разбавление–потенцирование». С увеличением времени хранения растворов среднее значение электропроводности

**Таблица 1.** Корреляция между спонтанной подвижностью одноклеточных *Spirostoma ambiguum* в потенцированных растворах хлористого натрия и интенсивностью флуоресценции этих растворов

Разбавление, N	2	9	11	12	13	14	15	16	17
Подвижность инфузорий, усл. ед.	$0.0 \pm 0.0$	$7.7 \pm 2.6$	$11.8 \pm 1.4$	$11.7 \pm 0.6$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$9.1 \pm 1.8$	$6.7 \pm 2.6$	$8.7 \pm 1.8$
Интенсивность флуоресценции, усл. ед.	56	17	15	13	56	41	18	16	17



**Рис. 2.** Эволюция паттернов сопротивления (кОм) для серии сотенных разбавлений с потенцированием раствора диклофенака. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: ● – 1 день, ■ – 2 дня, ◆ – 5 дней, ▲ – 14 дней.

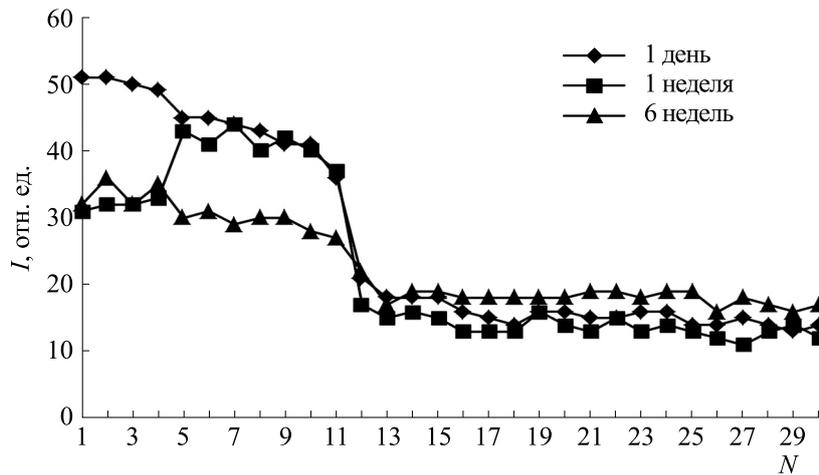
монотонно возрастает и растет контрастность паттерна, т.е. различие между минимальными и максимальными значениями. Парные коэффициенты корреляции между результатами этих последовательных экспериментов, проведенных в разные дни после приготовления образцов равны, соответственно:  $R[1-2] = 0.87$ ,  $R[1-5] = 0.65$ ,  $R[1-14] = 0.72$ ,  $R[2-5] = 0.70$ ,  $R[2-14] = 0.80$ ,  $R[5-14] = 0.87$ . Критическое значение коэффициента корреляции для 12 степеней свободы при 1%-м уровне значимости  $R_{0.01}(12) = 0.66$ . Превышение этого критического значения означает достоверное сходство эволюционирующих паттернов. Такое сходство однозначно говорит о том, что причина немонотонного изменения электропроводности разбавленных растворов заключается в методе их приготовления.

Стоит также отметить, что диэлектрическая проницаемость с точностью 0.2% на частотах 100 кГц – 3 МГц остается постоянной, что говорит об отсутствии в растворах мезочастиц с большим дипольным моментом. Столь большие изменения электропроводности непонятны и связаны, по-видимому, с химическими процессами, происходящими в потенцированных растворах.

Представленные выше эксперименты ясно показывают, что процедура потенцирования изменяет коллективные свойства водного раствора, и эти свойства запоминаются системой в течение длительного времени, далекого от микроскопического масштаба времени молекулярных реорганизаций, обычно принимаемого в рассмотрение при обсуждении физических свойств жидкостей. Поэтому вопрос о памяти воды можно свести к определению памяти. Ясно только, что к структуре воды память не имеет никакого отношения.

Немонотонное изменение различных физических характеристик и появление наночастиц обнаруживали разными методами в сильно разбавленных растворах, в том числе в потенцированных растворах, в которых расчетная концентрация меньше  $10^{-20}$  М [86–90].

Значительная роль в изучении физико-химических характеристик разбавленных растворов принадлежит группе, руководимой академиком А.И. Коноваловым (1934–2021), которая исследовала более 60 химических веществ разными методами и установила, что подавляющее большинство из них образует наночастицы при больших степенях разбавлений, определяемых методом динамического светорассеяния. При этом установлено, что для их самоорганизации, как правило, необходимо наличие естественного электромагнитного фона. При выдерживании растворов в условиях гипомангнитного поля, создаваемого пермаллоевым экраном, наночастицы в регистрируемом количестве не образуются [91–93]. Этот вывод подтверждается экспериментом с получением наночастиц при выдерживании образцов в поле с частотой 7.85 Гц и амплитудой 48 А/м, создаваемом в катушке соленоида, размещенного в пермаллоевом экране [94]. В работах этой группы на ряде микроорганизмов и действующих веществ подтверждается также корреляция между появлением наночастиц и возрастанием биологической активности в растворе. Повышенная биологическая активность фармакологических препаратов в коллоидной форме известна также из других работ. Так, например, было показано, что феназепам обладает фармакологической активностью в сверхмалых дозах только в дисперсном состоянии в виде наночастиц диа-



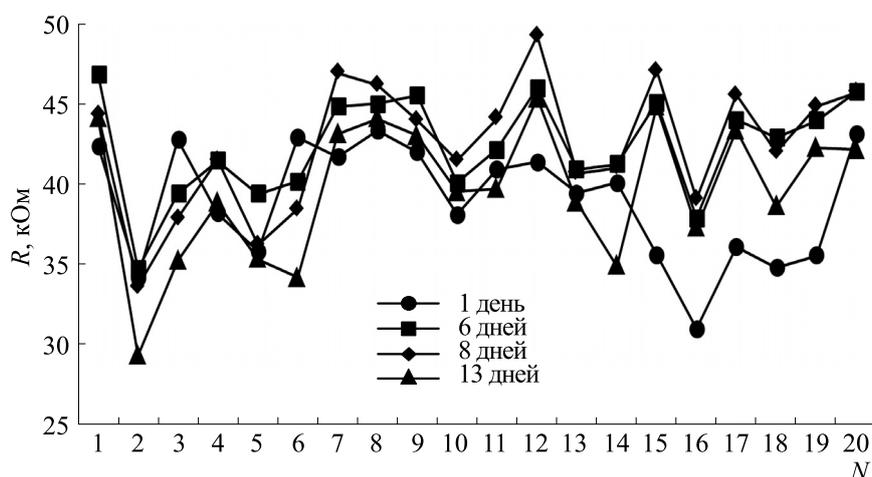
**Рис. 3.** Зависимость интенсивности флюоресценции от числа итераций  $N$  десятичных разбавлений дистиллированной воды с потенцированием. Длина волны возбуждения 300 нм, излучения — 385 нм.

метром не более 100–300 нм, а образование наночастиц навязывается добавлением поверхностно активных реагентов в процессе приготовления препарата [95]. Дополнительную информацию на тему изменения ферментативной активности в зависимости от формы препарата можно найти в работе [96]. Подробное обсуждение этого феномена выходит за рамки данной работы. Существование наночастиц в потенцированных водных растворах высокого разбавления подтверждено многими авторами и уже не вызывает сомнений, однако их строение и состав до сих пор неизвестны. В области высоких концентраций растворенных веществ процессы потенцирования становятся незначимыми. Можно считать, что многократный процесс механического потенцирования с последующим разбавлением является не только, а при больших числах итерации и не столько разбавлением, сколько механохимической модификацией веществ, содержащихся в растворе. Это косвенно подтверждается реализацией химических реакций в порошковых системах с механической обработкой, не идущих в обычных условиях, разложением воды на обычной магнитной мешалке в присутствии некоторых солей [97], а также прямым наблюдением осадков в высушенных каплях более 200 фармацевтических препаратов в сверхмалых и мнимых концентрациях методами просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей туннельной микроскопии [98].

Выше были рассмотрены свойства последовательно разбавленных и потенцированных растворов различных веществ. Но поскольку вода сама является сложным многокомпонентным раствором и чувствительна к внешним воздействиям, возникает вопрос, как будут меняться свойства условно чистой воды при аналогичной итераци-

онной процедуре разбавления-потенцирования. На рис. 3 представлены результаты измерений интенсивности флюоресценции образцов потенцированной дистиллированной воды с последующим десятичным разбавлением исходной водой и повторением этой процедуры  $N$  раз [84]. Как видно, уже первое потенцирование приводит к возрастанию интенсивности флюоресценции. Последующие итерации сопровождаются уменьшением интенсивности и ее резким спадом в области  $N = 12$  до фоновых значений. Со временем хранения интенсивность в образцах  $N1 - N11$  заметно уменьшается, но все же сохраняется в течение шести недель.

Аналогичный эксперимент был проведен с водой MQ 1-го класса с измерением электрических характеристик образцов [99]. Результаты приведены на рис. 4. В данном случае после потенцирования образца выполняется сотенное разбавление исходной водой. Измерения проводили на частоте 100 кГц, погрешность измерений составляла менее 0.5%. Как и в случае разбавления диклофенака (рис. 2) наблюдается сложная немонотонная зависимость. В данном случае наблюдали эволюцию образцов в 20 итерациях, но аналогичные немонотонные зависимости получали и для 30 итераций, откуда можно сделать вывод, что их вообще может быть любое число. Как и в случае диклофенака, диэлектрическая проницаемость остается постоянной, что говорит об отсутствии структур с большим дипольным моментом. Паттерны серий образцов, приготовленных в разные дни, отличаются, но параллельно приготовленные две серии обладают одинаковыми паттернами с коэффициентом корреляции более 0.9. Такие результаты не вызывают удивления, если воду рассматривать как самоорганизующуюся активную среду, чувствительную к слабым возмущени-



**Рис. 4.** Эволюция паттернов сопротивления на частоте 100 кГц для серии сотенных разбавлений с потенцированием воды. Погрешность измерения не превышает размера точки. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: ● – 1 день, ■ – 6 дней, ◆ – 8 дней, ▲ – 13 дней.

ям. В обоих случаях среднее значение электропроводности со временем увеличивается (сопротивление уменьшается), как и в случае с диклофенаком, но дисперсия результатов практически сохраняется и имеет тенденцию к уменьшению, а в растворах диклофенака на протяжении двух недель она возрастает со временем. Отсюда нетрудно заключить, что в растворах диклофенака происходят более сложные химические процессы.

Что же говорит теория о возможности образования мезоструктур нанометрового диапазона в жидкой воде? Существуют, основанные на представлениях квантовой электродинамики, теоретические предпосылки образования в растворах частиц, называемых когерентные домены, размер которых лежит в области сотни нанометров [100–103]. По признанию G. Vitiello эта теория имеет общий характер и не обладает предсказательной силой для конкретных случаев.

В заключение хочется подчеркнуть, что реальная вода даже в лабораторных условиях является неравновесным сложным многокомпонентным раствором. Можно считать твердо установленным, что многократное последовательное разбавление растворов, сопровождающееся интенсивным встряхиванием, приводит к образованию химически активных соединений, самоорганизации в растворе, проявляющейся в появлении мезочастиц и немономонном изменении физико-химических свойств разбавленных растворов. Неясен механизм этого феномена, молекулярный состав мезочастиц размером в сотни нанометров, возможная роль нанопузырьков в составе этих мезочастиц, а также роль слабых электромагнитных полей в их образовании. Решение этих фундаментальных физико-химических про-

блем будет способствовать решению общей проблемы биологической активности растворов малых и сверхмалых концентраций.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. М. Southam, J. Ehrlich. *Phytopathol.*, **33**, 517 (1943).
2. Ю. А. Перчихин, Г. Н. Шангин-Березовский и И. А. Раппопорт, в сб. *Химический мутагенез и создание сортов интенсивного типа* (Наука, М., 1977), с. 263.
3. Г. Н. Шангин-Березовский, Ю. А. Перчихин и А. А. Колбасин, в сб. *Эффективность химических мутагенов в селекции* (Ин-т хим. физики АН СССР, М., 1980).
4. Г. Н. Шангин-Березовский, В. Я. Адамов, О. С. Рыхлецкая и С.А. Молоскин, в сб. *Улучшение культурных растений и мутагенез* (Ин-т хим. физики АН СССР, М., 1982).
5. В. П. Ямскова, Е. А. Модянова, М. М. Резникова и А. Г. Маленков, *Молекуляр. биология*, **11** (5), 1147 (1977).
6. В. П. Ямскова, Е. А. Модянова, В. И. Левенталь и др., *Биофизика*, **22**, 168 (1977).

7. Е. Б. Бурлакова, Т. Н. Греченко, Е. Н. Соколов и С. Ф. Терехова, *Биофизика*, **31**, 921 (1986).
8. Е. Б. Бурлакова, *Росс. хим. журн.*, **XLIII** (5), 3 (1999).
9. Е. М. Молочкина, И. Б. Озерова и Е. Б. Бурлакова, *Росс. хим. журн.*, **XLIII** (5), 63 (1999).
10. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева, Е. И. Пынзарь и Е. Б. Бурлакова, *Росс. хим. журн.*, **XLIII** (5), 55 (1999).
11. E. Davenas, et al., *Nature*, **338**, 816 (1988).
12. S. L. Brown and D.E. Van Erps, *J. Immunol.*, **134**, 3384 (1985).
13. S. V. Zaitsev, et al., *FEBS Lett.*, **291**, 84 (1991).
14. О. И. Эпштейн, *Сверхмалые дозы (история одного исследования)* (Изд. РАМН, М., 2008).
15. О. И. Эпштейн, *Успехи физиол. наук*, **44**, 54 (2013).
16. А. М. Кузин, *Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы* (Атомиздат, М., 1977).
17. Л. Х. Эйдус, *Мембранный механизм биологического действия малых доз* (ИТЭФ РАН, М., 2001).
18. А. Л. Чижевский, *Земное эхо солнечных бурь*, Изд. 2-е («Мысль», М., 1976).
19. Н. А. Темурьянц, Б. М. Владимирский и О. Г. Тишкин, *Сверхнизкочастотные электромагнитные сигналы в биологическом мире* (Наук. думка, Киев, 1992).
20. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Физматлит, М., 2011).
21. V. I. Lobyshev, *Electromagn. Biol. Med.*, **24**, 449 (2005).
22. Д. Эйзенберг и В. Кауцман, *Структура и свойства воды* (Гидрометеоиздат, Л., 1975).
23. В. И. Лобышев и Л. П. Калининченко, *Изотопные эффекты D<sub>2</sub>O в биологических системах* (Наука, М., 1978).
24. В. И. Лобышев, В. А. Твердислов Л. В. Яковенко и Ю. Фогель, *Биофизика*, **23**, 390 (1978).
25. В. И. Лобышев, *Биофизика*, **28**, 666 (1983).
26. В. И. Лобышев, *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **3**, 511 (2018).
27. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, and S. Dzhimak, *Nutrients*, **11**, 1903 (2019).
28. В. И. Ферронский и В. А. Поляков, *Изотопия гидросферы земли* (Научный мир, М., 2009).
29. А. Фаркас, *Ортоводород, пароводород и тяжелый водород* (ОНТИ, М., 1936).
30. P. L. Charovsky and L. J. F. Hermans, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **50**, 315 (1999).
31. I. E. Gordon, *J. Quant. Spectroscopy and Radiative Transfer*, **203**, 3 (2017).
32. В. К. Конюхов, В. И. Тихонов и Т. Л. Тихонова, *Письма в ЖТФ*, **12**, вып. 23, 1438 (1986).
33. А. А. Вигасин и др., *Докл. РАН*, **387**, 613 (2002).
34. V. I. Tikhonov and A. A. Volkov, *Science*, **296**, 2363 (2002).
35. Е. В. Степанов, В. А. Тихонов и В. А. Миляев, *Квант. электроника*, **35**, 205 (2005).
36. С. Л. Вебер, Е. Г. Багрянская, П. Л. Чаповский, *Журн. эксперим. и теорет. физики*, **129**, 80 (2006).
37. A. Miani and J. Tennyson, *J. Chem. Phys.*, **120**, 2732 (2004).
38. S. A. Potekhin and R. S. Khusainova, *Biophys. Chem.*, **118**, 84 (2005).
39. А. Ф. Бункин, А. А. Нурматов и С. М. Першин, *Успехи физ. наук*, **176**, 883 (2006).
40. А. Ф. Бункин и др., *Квант. электроника*, **37**, 941 (2007).
41. S. M. Pershin, *Phys. Wave Phenomena*, **17**, 241 (2009).
42. A. F. Bunkin and S. M. Pershin, *Phys. Wave Phenomena*, **18**, 237 (2010).
43. X. Yan, et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, **9**, 96 (2018).
44. Н. Ф. Бункин и Ф. В. Бункин, *Успехи физ. наук*, **186**, 933 (2016).
45. Н. Ф. Бункин и др., *Журн. эксперим. и теорет. физики*, **135**, 917 (2009).
46. E. R. Lippincott, et al., *Science*, **164**, 1482 (1969).
47. Y. T. Didenko and R. S. Suslick, *Lett. to Nature*, **418**, 394 (2002).
48. Г. А. Домрачев, Ю. Л. Родыгин и Д. А. Селивановский, *Докл. РАН*, 329, **186** (1993).
49. Г. А. Домрачев, Ю. Л. Родыгин, Д. А. Селивановский и П. А. Стунжас, в кн. *Химия морей и океанов* (Наука, М., 1995), сс. 169–177.
50. Ю. С. Веселов, *Химия и технология воды*, **13**, 741 (1991).
51. A. D. Styrkas and N. G. Nikishina, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **54**, 961 (2009).
52. A. D. Styrkas, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **56**, 1029 (2011).
53. J. K. Lee, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **116**, 19294 (2019).
54. S. V. Gudkov, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8033 (2020).
55. A. V. Chernikov and V. I. Bruskov, *Biophysics*, **47**, 773 (2002).
56. A. V. Chernikov and V. I. Bruskov, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **400**, 40 (2005).
57. S. V. Gudkov, et al., *J. Phys. Chem. B*, **115**, 7693 (2011).
58. S. V. Gudkov, et al., *Biophysics*, **57**, 1 (2012).
59. A. N. Ignatiev, A. N. Pryakhin, and V. V. Lunin, *Russ. Chem. Bull.*, **57**, 1172 (2008).
60. V. N. Binhi and R. M. Sarimov, *Biophysics*, **59**, 515 (2014).
61. L. V. Belovolova, M. V. Glushkov, and E. A. Vinogradov, *Biophysics*, **59**, 524 (2014).
62. В. Л. Воейков и др., *Журн. физ. химии*, **86**, 1518 (2012).
63. A. J. Swallow, *Nature*, **222**, 369 (1969).

64. V. I. Bruskov, et al., *Phys. Wave Phenomena*, **28**, 103 (2020).
65. V. I. Bruskov, et al., *Phys. Wave Phenomena*, **29**, 94 (2021).
66. M. Millot, et al., *Nature*, **569**, 251 (2019).
67. Н. А. Бульенков, *Кристаллография*, **33**, 424 (1988).
68. Н. А. Бульенков, *Биофизика*, **36**, 181 (1991).
69. В. И. Лобышев, А. Б. Соловей и Н. А. Бульенков, *Биофизика*, **48**, 1011 (2003).L
70. V. I. Lobyshev, A. B. Solovey, and N. A. Bulienkov, *J. Mol. Liquids*, **106**, 277 (2003).
71. W. C. Röntgen, *Ann. Phys. Chem. N.F.*, **XLV**, 91 (1891).
72. J. D. Bernal and R. H. Fowler, *J. Chem. Phys.*, **1**, 515 (1933).
73. A. Nilsson and L. G. M. Petterson, *Nature Commun.*, **6**, 8998 (2015).
74. А. Г. Маленков, *Радиоэлектроника. Наносистемы. Информ. технологии*, **12**, 29 (2020).
75. P. Gallo, et al., *Chem. Rev.*, **116**, 7463 (2016).
76. M. Hahn, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **21**, 8054 (2019)
77. S. Krickl, et al., *J. Coll. Int. Sci.* **516**, 466 (2018).
78. М. Ф. Вукс, *Рассеяние света в газах, жидкостях и растворах* (Изд. ЛГУ, Л., 1977).
79. L. A. Bulavin, et al., *Russ. Chem. Bull.*, **65**, 851 (2016).
80. В. И. Лобышев, Б. Д. Рыжиков, З. Э. Шихлинская и Т. Н. Мазурова, *Биофизика*, **39**, 565 (1994).
81. V. I. Lobyshev, R. E. Shikhlin'skaya, and B. D. Ryzhikov, *J. Mol. Liquids*, **82**, 73 (1999).
82. V. I. Lobyshev, In *Optical Diagnostics of Biological Fluids IV*, Ed. by A. V. Priezzhev and Toshimitsu Asakura (Proc. SPIE, **3599**, 1999), p. 52.
83. V. I. Lobyshev and M. S. Tomkevich, In *Optical Diagnostics and Sensing of Biological Fluids and Glucose and Cholesterol Monitoring*, Ed. by A. V. Priezzhev and G. L. Cote (Proc. SPIE, **4263**, 2001), p. 59.
84. В. И. Лобышев, М. С. Томкевич и И. Ю. Петрушанко, *Биофизика*, **50**, 464 (2005).
85. V. I. Lobyshev. *Phys. Wave Phenomena*, **27**, 119 (2019).
86. L. Rey, *Physica A*, **323**, 67 (2003).
87. V. Elia and M. Niccoli, *J. Therm. Analysis and Calorimetry*, **75**, 815 (2004).
88. V. Elia, et al., *Homeopathy*, **103**, 44 (2014).
89. S. M. Pershin, et al., *Dokl. Phys.*, **60**, 114 (2015).
90. S. M. Pershin, et al., *Phys. Wave Phenomena*, **24**, 41 (2016).
91. I. S. Ryzhkina, et al., *Dokl. Phys. Chem.*, **428**, 196 (2009).
92. A. I. Konovalov, et al., *Biophysics*, **59**, 341 (2014).
93. I. S. Ryzhkina, et al., *Dokl. Phys. Chem.*, **462**, 110 (2015).
94. A. I. Konovalov, et al., *Electromagn. Biol. Med.*, **34**, 141 (2015).
95. С. В. Стовбун и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **153**, 441 (2012).
96. Zh. Wu, B. Zhang, and B. Yan, *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 4198 (2009).
97. S. Ikeda, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **1**, 4485 (1999).
98. E. S. Rajendran, *Nanodynamics* (Mohna Publ., Kerala, India, 2015).
99. V. I. Lobyshev, *Phys. Wave Phenomena*, **29**, 98 (2021).
100. G. Preparata, *QED Coherence in Matter* (World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1995).
101. R. Arani, et al., *Int. J. Mod. Phys. B.*, **9**, 1813 (1995).
102. E. Del-Guidice and G. Vitiello, *Phys. Rev. A.*, **74**, 022105 (2006).
103. G. Vitiello, *Systems*, **2**, 203 (2014).

## Biological Activity of Solutions of Substances in Low and Ultra Low Concentrations

V.I. Lobyshev\*

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

This paper provides a review of the problem of low and ultra-low concentrations of various biologically active substances and focuses on its brief history. A characteristic feature of the effects of low and ultra-small concentrations is the non-monotonic, in general polymodal, response of living organisms and model biological systems to the monotonically decreasing concentration of the active substances. Data collected from the experiment show that the physicochemical properties of water, diluted aqueous solutions and solution preparation technique should be the object of careful study.

*Keywords:* diluted aqueous solutions, microheterogeneity, self-organization, mesoparticles, mechanochemistry, reactive oxygen and nitrogen species

УДК 544.43

## НАТРИЙ- $\mu$ 2-ДИТИОСУЛЬФАТО-ТЕТРАНИТРОЗИЛДИФЕРРАТА ТЕТРАГИДРАТ ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАБОТЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2022 г. И.В. Жигачева\*.,# , Н.И. Крикунова\*, И.П. Генерозова\*\*.,## , П.А. Буцанец\*\*, Н.Ю. Герасимов\*, О.В. Неврова\*, С.В. Васильев\*\*, А.Н. Голощапов\*

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

#E-mail: zhigacheva@mail.ru

\*\*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, 127276, Россия

##E-mail: igenozova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

Исследуя антистрессовые свойства донора оксида азота железо-тиосульфатного комплекса натрий- $\mu$ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрата  $\text{Na}_2([\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ , изучали влияние различных его концентраций на функциональное состояние изолированных митохондрий проростков гороха. Инкубация митохондрий с  $10^{-4}$  М препарата приводила к резкому уменьшению вязкости свободного липидного бислоя, обусловленному увеличением содержания ненасыщенных жирных кислот в липидной фракции мембран митохондрий. При этом препарат разобщал процессы окисления и фосфорилирования. Обработка митохондрий  $10^{-8}$  М железо-тиосульфатного комплекса сопровождалась повышенным содержанием ненасыщенных  $\text{C}_{20}$  жирных кислот, которое возрастало на 25–45%, что, вероятно, обуславливало 15%-е снижение вязкости свободного липидного бислоя. В то же время вязкость в области аннулярных липидов мембран возрастала на 20%, что могло свидетельствовать об изменении активности ферментов дыхательной цепи митохондрий. Действительно, препарат влиял на скорости окисления НАД-зависимых субстратов и сукцината и повышал эффективность окислительного фосфорилирования. Эта концентрация препарата была выбрана для исследования способности железо-тиосульфатного комплекса повышать устойчивость проростков гороха к дефициту воды. Железо-тиосульфатный комплекс предотвращал изменения жирнокислотного состава мембран митохондрий в условиях дефицита воды и обусловленные стрессом изменения биоэнергетических характеристик митохондрий. Полученные данные могут свидетельствовать, что протекторные свойства препарата реализуются на мембранном уровне за счет сохранения/увеличения пула ненасыщенных жирных кислот, способствующих поддержанию текучести мембран.

*Ключевые слова:* митохондрии, оксид азота, вязкость, свободный липидный бислой, аннулярные липиды, жирные кислоты.

DOI: 10.31857/S0006302922040056, EDN: ISYKJS

Митохондрии занимают ключевые позиции в энергетических, окислительно-восстановительных и обменных процессах в клетке. Тем не менее, в условиях стресса эти органеллы являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) [1], которые в зависимости от силы стрессового воздействия могут служить индукторами процессов адаптации, либо вызывать

нарушение метаболизма клетки [2]. При этом митохондрии являются источником и мишенью этих интермедиатов.

Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами (ЖК), такими как арахидоновая, линолевая и линоленовая, входящими в состав липидов мембран митохондрий, возможно, имеет следствием активацию перекисного окисления липидов. При этом, вероятно, происходит нарушение осмотического баланса между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. В результате происходит набухание митохондрий. Следствием «перекисного» на-

*Сокращения:* АФК – активные формы кислорода, ЖК – жирные кислоты, ТНКЖ-тио – железо-тиосульфатный комплекс ( $\mu$ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат), БСА – бычий сывороточный альбумин, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот.

бухания митохондрий (или образования больших пор во внешней мембране), вероятно, является высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активация митохондриального пути апоптоза. Можно предположить, что препараты, снижающие генерацию АФК митохондриями, будут повышать устойчивость организма к действию стрессовых факторов. На эту роль в первую очередь претендуют антиоксиданты, ингибирующие свободнорадикальное окисление. Однако снизить генерацию активных форм кислорода митохондриями можно за счет других механизмов. Так, снижение генерации АФК митохондриями на 80% возможно за счет «мягкого разобщения», т.е. увеличения протонной проводимости, не нарушающей синтез АТФ, но приводящий к снижению редокс-потенциала внутренней мембраны митохондрий на 13–15% [3]. Сокращение генерации АФК может быть достигнуто также за счет повышения концентрации эндогенных жирных кислот, либо за счет работы разобщающих белков митохондрий (например, белки холодового и теплового шока) [4]. Кроме того, вклад в защиту клетки от окислительного стресса вносит также митохондриальный АТФ-зависимый калиевый ( $\text{mitoK}_{\text{АТФ}}$ ) канал. Функционирование  $\text{P}_{\text{mitoK}_{\text{АТФ}}}$  тесно связано с  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -обменом. Это позволяет осуществлять «калиевый цикл», который обеспечивает возвращение  $\text{H}^+$  в матрикс митохондрий, т.е. снижение мембранного потенциала [5]. Уменьшение генерации АФК митохондриями также может быть достигнуто в результате активации альтернативных путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий, прежде всего при активации альтернативной оксидазы [6].

Таким образом существуют самые разнообразные механизмы защиты клетки и организма от окислительного стресса. Эту функцию могут выполнять биологически активные вещества, влияющие на функциональное состояние митохондрий. Показано, что ряд таких веществ накапливался в органах и тканях растений при стрессовых воздействиях. К ним, например, относится оксид азота [7]. Более того, показано, что обработка растений экзогенными донорами NO повышает их устойчивость к действию стрессовых факторов, в том числе и к дефициту воды [8, 9]. Способность оксида азота осуществлять протекторное действие в условиях абиотического стресса может быть обусловлена его способностью связывать свободные ионы железа в составе нитрозильных комплексов, что, возможно, приводит к ингиби-

рованию реакций свободнорадикального окисления, катализируемых редокс-активными ионами железа [10]. Следовательно, NO может действовать как антиоксидант, хотя возможен и синергизм в действии NO и  $\text{H}_2\text{O}_2$  [11]. Оксид азота также может запускать экспрессию антиоксидантных генов или активировать антиоксидантные ферменты, например, путем посттрансляционных модификаций [12]. Он стимулирует рост придаточных корней и регулирует синтез абсцизовой кислоты [7]. Однако, в ряде случаев быстрое накопление NO в ответ на стрессовые воздействия вызывает ингибирование антиоксидантных ферментов и последующее повышение уровня перекиси водорода [12]. Кроме того, реакция между генерируемыми митохондриями  $\text{O}_2^{\cdot}$  и NO влечет за собой образование пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), окисляющего липидный компонент мембран, ДНК и тиоловые группы белков. Это приводит к нарушению ферментативной активности [13]. Адаптогенное или стрессовое действие NO, вероятно, определяется его концентрацией, возрастом растения, и видом стресса (дефицит воды, солевой, температурный стресс или действие тяжелых металлов и т.д.).

Отметим, что для молекулы NO кластеры железо-серных белков [Fe-S] являются наиболее предпочтительными мишенями в клетке. При этом митохондрии растений могут быть как источниками, так и мишенью для оксида азота [14]. Почти все комплексы электрон-транспортной цепи митохондрий являются мишенью для NO или участвуют в его метаболизме. Показано, что комплекс IV является основным сайтом генерации NO и способствует поддержанию уровня АТФ в условиях дефицита кислорода. В условиях нормоксии восстановление нитрита до NO в клетках растений нарушается при действии ингибиторов альтернативной оксидазы или ингибиторов комплексов III и IV электрон-транспортной цепи митохондрий, что указывает на участие в синтезе NO альтернативной оксидазы, а также III и IV комплексов дыхательной цепи митохондрий [15, 16].

Поскольку реализация антистрессовых программ требует больших энергетических затрат [17], а митохондрии играют одну из ключевых ролей в ответе организма на действие стрессовых факторов, в том числе и на дефицит воды, особый интерес представляет изучение влияния доноров оксида азота на биоэнергетические характеристики митохондрий, определяющие устойчивость растений к водному дефициту. В своей работе в качестве донора оксида азота мы использовали

натрий  $\mu$ 2-дитиосульфат-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат (кристаллический ТНКЖ-тио, или железо-тиосульфатный комплекс). Преимущество этого донора NO перед другими донорами оксида азота связано с тем, что при растворении в воде он выделяет монооксид азота при физиологических значениях pH без какой-либо (термической, окислительно-восстановительной или фото) активации, а при его разложении не образуются токсические вещества, что обеспечивает экологическую безопасность [18]. Ранее мы показали [19], что обработка семян гороха ТНКЖ-тио повышала устойчивость проростков гороха к дефициту воды. Интересно было исследовать механизмы защитного действия этого препарата и прежде всего изучить связь функционального состояния митохондрий с протекторным эффектом препарата. В связи с этим целью нашей работы было изучение влияния различных концентраций ТНКЖ-тио на биоэнергетические характеристики митохондрий этиолированных проростков гороха в опытах *in vitro*, а также исследовать влияние обработки семян гороха раствором препарата в той концентрации, которая оказалась наиболее эффективной в опытах с выделенными митохондриями, на функциональное состояние этих оргanelл.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.), сорт Немчиновский 100.

**Натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат.** Кристаллический водорастворимый донор оксида азота натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат ( $[\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ ) был синтезирован в Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка, Московская обл.). Генерация NO и образование мононитрозильного интермедиата и частицы  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]$  из ТНКЖ-тио начинается только через 40 мин после растворения комплекса [20].

**Проращивание семян гороха.** Семена гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Немчиновский 100 промывали мыльной водой и 0.01%  $\text{KMnO}_4$ . Затем контрольные семена замачивали в воде, опытные семена – в  $10^{-8}$  М ТНКЖ-тио в течение 1 ч. Затем семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение трех суток. После этого половину проростков контрольной группы (дефицит воды) и проростков, обработанных ТНКЖ-тио (дефицит воды +

+ ТНКЖ-тио), переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через сутки проростки переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих трех суток. Вторая половина проростков контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение семи суток. На седьмые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков гороха.

**Выделение митохондрий из семисуточных эпикотилей проростков гороха.** Выделение митохондрий проводили методом дифференциального центрифугирования [21]. Эпикотили гороха длиной 3–6 см (25 г) гомогенизировали со 100 мл среды выделения, содержащей: 0.4 М сахарозы, 5 мМ EDTA, 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.0), 10 мМ KCl, 2 мМ дитиозэритрита и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), свободного от жирных кислот. Гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 5 мин. Второе центрифугирование – в течение 3 мин при 3000 g. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2–3 мл среды, содержащей 0.4 М сахарозы, 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4), 0.1% БСА, и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

**Скорости дыхания митохондрий** этиолированных проростков гороха регистрировали с помощью электрода Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий содержала 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES–Tris (pH 7.2), 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 0.1% БСА (26°C). Скорость дыхания выражали в нг-атом  $\text{O}_2$ /(мг белка в минуту).

**Метилвые эфиры жирных кислот.** Метилвые эфиры жирных кислот (МЭЖК) были получены путем кислотного метанолиза липидов мембран митохондрий [22, 23]. МЭЖК экстрагировали гексаном, полученные растворы анализировали.

**Определение количественного состава метилвых эфиров жирных кислот.** Определение состава МЭЖК проводили на хроматографе Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м  $\times$  0.32 мм, слой 0.25 мкм; J&W Scientific, США). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора – 270°C; скорость газа-носителя гелия составляла 2.0 мл/мин, деление потока на входе в колонку – 1:40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [24]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали как площади пика соответствующей кислоты к

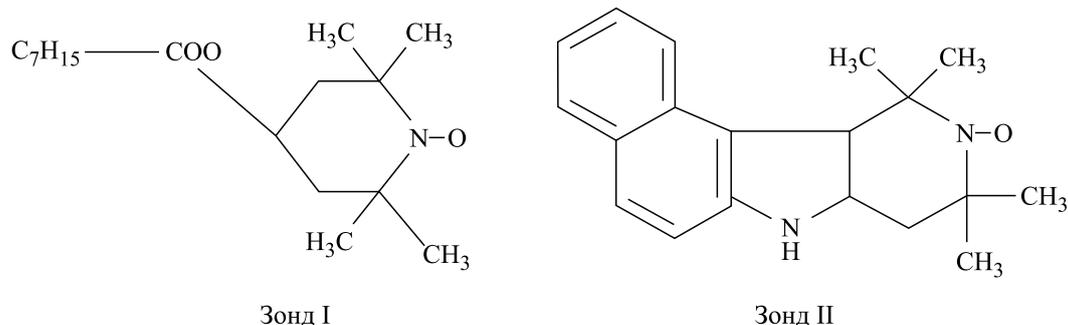


Рис. 1. Структурные формулы зондов.

сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

**Идентификация метиловых эфиров жирных кислот.** Идентификацию МЭЖК в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных газохроматографическому анализу, на приборе HewlettPackard-6890 (США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40–400 Да.

**Структурные характеристики мембран митохондрий** исследовали методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилпиперидин-1-оксил (рис. 1, зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин-3-оксил (рис. 1, зонд II), которые различаются по своей локализации в белково-липидных мембранах.

Согласно работе [25] зонд I преимущественно локализуется в свободном липидном бислое мембран на расстоянии 2–4 Å от поверхности, а зонд II локализуется в зоне липидов, связанных с белковыми доменами (аннулярными липидами).

Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности ( $\tau_c$ ), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле  $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta n^+ \cdot ((I^+ / I^-)^{0.5} - 1)$ , приведенной в работе [26]. Регистрацию спектров ЭПР проводили при температуре 297 К (24°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC (Bruker, Германия).

**Статистическую обработку экспериментальных данных** проводили определением средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами оценивали со значимостью  $P \leq 0.05$ . Обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

**Реактивы.** В работе использовали реактивы следующих фирм: сахароза, Трис, ЭДТА, карбонилцианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразон, малат, глутамат, сукцинат – Sigma-Aldrich, США; БСА, свободный от жирных кислот – Sigma, США; НЕРЕС – MP Biomedicals, Германия; карбонат калия, метанол, хлороформ – Merck, Германия; гексан – Panreac, Испания; ацетилхлорид – Acros, Бельгия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

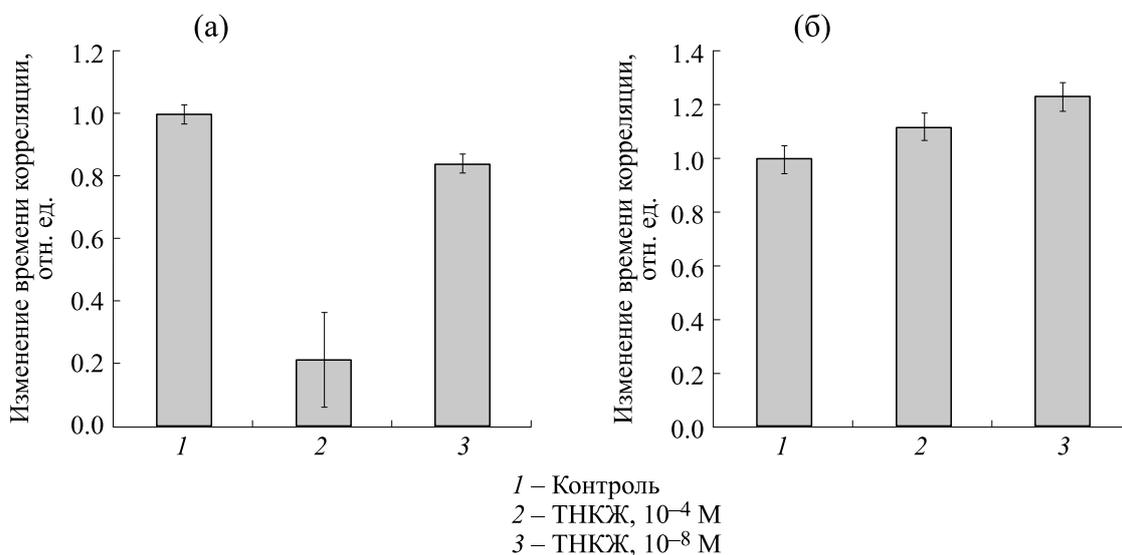
Для изучения протекторных свойств ТНКЖ-тио исследовали влияние инкубации изолированных митохондрий этиолированных проростков гороха с различными концентрациями препарата на жирнокислотный состав общей липидной фракции мембран этих органелл. Обработка митохондрий  $10^{-4}$  М препарата в течение часа приводила к некоторому увеличению содержания ненасыщенных жирных кислот в мембранах митохондрий. При этом повышалось содержание ЖК, входящих в состав кардиолипина – линолевой и линоленовой на 4 и 40% соответственно, а содержание 20:2ω6 возрастало на 63%. Содержание арахидоновой, эйкозотриеновой и 13- и 11-эйкозеновых кислот резко сокращалось (табл. 1), что отражалось на физико-химических свойствах липидной фракции мембран. Наблюдалось резкое уменьшение микровязкости свободного липидного бислоя, измеренной с помощью зонда I, до значений, при которых мембраны находятся в жидком, но не жидкокристаллическом состоянии (рис. 2а). Значительное разжижение мембран ха-

**Таблица 1.** Влияние различных концентраций ТНКЖ-тио на жирнокислотный состав общей липидной фракции мембран митохондрий проростков гороха (отн.%)

ЖК	Контроль	ТНКЖ-тио, $10^{-4}$ М	ТНКЖ-тио, $10^{-6}$ М
14:0	$0.67 \pm 0,30$	$0.96 \pm 0,20$	$0.91 \pm 0,22$
16:1 $\omega$ 7	$0.90 \pm 0,12$	$1.31 \pm 0,09$	$1.13 \pm 0,11$
16:0	$16,16 \pm 0,5$	$22,00 \pm 1,00$	$15.82 \pm 0,80$
17:0	$2.14 \pm 0,07$	$3.00 \pm 0,10$	$1.37 \pm 0,08$
18:2 $\omega$ 6	$50.00 \pm 0.21$	$52.00 \pm 0.38$	$43.2 \pm 0.51$
18:3 $\omega$ 3	$5.06 \pm 0.02$	$7.07 \pm 0.02$	$4.52 \pm 0.02$
18:1 $\omega$ 9	$2.25 \pm 0.11$	$2.25 \pm 0.09$	$2.47 \pm 0.08$
18:1 $\omega$ 7	$0.60 \pm 0.02$	$0.6 \pm 0.01$	$1.2 \pm 0.01$
18:0	$3.00 \pm 0.21$	$4.5 \pm 0.18$	$7.4 \pm 0.25$
20:3 $\omega$ 6	$2.76 \pm 0.11$	$0.42 \pm 0.14$	$4.00 \pm 0.18$
20:2 $\omega$ 6	$4.90 \pm 0.23$	$8.00 \pm 0.34$	$4.26 \pm 0.21$
20:1 $\omega$ 9	$6.72 \pm 0.61$	$0.59 \pm 0.32$	$8.40 \pm 0.43$
20:1 $\omega$ 7	$3.84 \pm 0.18$	$0.10 \pm 0.01$	$2.82 \pm 0.12$
20:0	$1.00 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.01$	$2.50 \pm 0.03$

рактрно, например, при развитии патологии у животных [27]. Резкое уменьшение микровязкости липидного бислоя, вероятно, могло привести к нарушению структуры мембран, что в свою очередь могло повлечь за собой дисфункцию митохондрий. В то же время микровязкость приоб-

ковых областей мембран митохондрий возрастала на 10% относительно контроля (рис. 2б). В этом случае, вероятно, структура мембран изменялась так, чтобы сохранить функционирование мембранных белков за счет деструкции липидной фазы.

**Рис. 2.** Относительное изменение времени корреляции вращательной диффузии липидного (а) и белкового (б) зондов при обработке проростков ТНКЖ-тио. Контрольные значения  $\tau_c$ : для липидного зонда –  $0.7 \cdot 10^{-10}$  с, для белкового зонда –  $1.25 \cdot 10^{-10}$  с.

**Таблица 2.** Влияние различных концентраций ТНКЖ-тио на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха

Группа	$V_2$	Концентрация ТНКЖ-тио, М	ТНКЖ-тио	АДФ	$V_4$	ДК	ДНФ
Контроль	$31.4 \pm 2.4$	—	—	$74.30 \pm 5.8$	$31.4 \pm 1.5$	$3.00 \pm 0.02$	$95.4 \pm 4.7$
Контроль	$28.7 \pm 2.0$	$10^{-4}$	$53.5 \pm 4.0$	$27.1 \pm 3.2$	$19.4 \pm 1.7$	$1.40 \pm 0.01$	$47.7 \pm 3.0$
Контроль	$21.2 \pm 2.1$	$10^{-5}$	$27.7 \pm 1.8$	$34.8 \pm 3.0$	$19.6 \pm 1.4$	$1.77 \pm 0.02$	$30.3 \pm 2.4$
Контроль	$24.7 \pm 2.2$	$10^{-6}$	$28.7 \pm 1.4$	$23.0 \pm 1.5$	$9.2 \pm 1.0$	$2.5 \pm 0.03$	$20.1 \pm 2.4$
Контроль	$21.7 \pm 2.8$	$10^{-8}$	$20.0 \pm 2.2$	$54.4 \pm 3.7$	$12.6 \pm 2.0$	$4.3 \pm 0.03$	$57.5 \pm 4.9$

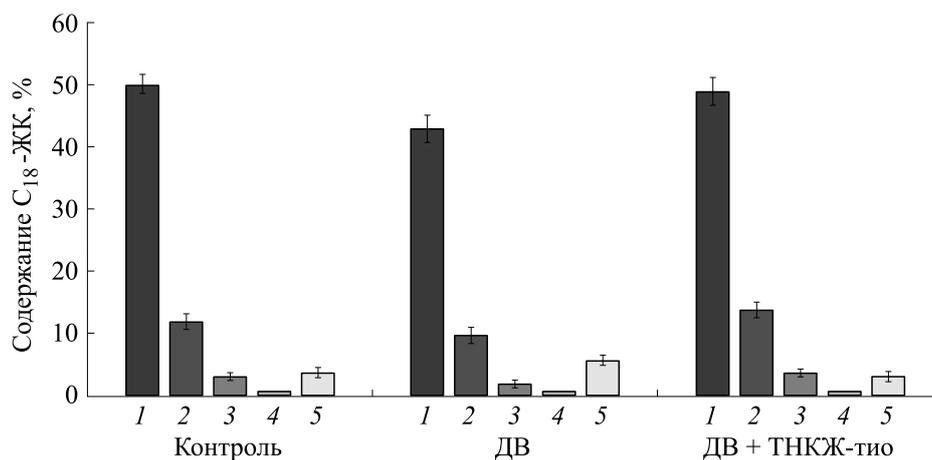
Примечание. Среда инкубации: 0.4 М сахарозы, 20 мМ НЕРЕС-Tris-буфер (pH 7.2), 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% БСА, 10 мМ малата, 10 мМ глутамата. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ,  $10^{-6}$  М карбонилцианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразона. Скорости окисления (представлены в нг атом  $\text{O}_2$ /мг белка·мин):  $V_2$  — скорость окисления субстратов,  $V_4$  — скорость окисления в состоянии покоя (скорость окисления субстрата при исчерпании АДФ). Число повторов — 6.

Изменение физико-химических свойств липидного компонента мембран отразилось на активности ферментов дыхательной цепи митохондрий. Исследовали в основном влияние препарата на скорости окисления НАД-зависимых субстратов. Такой выбор был обусловлен тем, что внешние воздействия более сильно влияют на активность комплекса I дыхательной цепи, чем на комплекс II [28–30]. Действительно, введение  $10^{-4}$  М ТНКЖ-тио в среду инкубации митохондрий, содержащей НАД-зависимые субстраты окисления, приводило к разобщению окисления и фосфорилирования. При этом величина дыхательного контроля по Чансу снижалась с  $3.00 \pm 0.02$  до  $1.40 \pm 0.01$ , а соотношение АДФ/О уменьшалось с  $2.20 \pm 0.02$  до  $1.15 \pm 0.01$  (табл. 2).

Иная картина наблюдалась при использовании препарата в концентрации  $10^{-6}$  М. В данном случае происходило снижение содержания ненасыщенных  $\text{C}_{18}$ -жирных кислот — линолевой и линоленовой, входящих в состав кардиолипина. Их содержание в липидах мембран митохондрий сократилось на 15.6 и 11.0% соответственно. При этом содержание ненасыщенных  $\text{C}_{20}$ -ЖК даже несколько возрастало. Так, содержание эйкозатриеновой кислоты возрастало на 45%, а эйкозеновой кислоты — на 25% (табл. 1). Изменения в жирнокислотном составе липидов мембран митохондрий отразились и на биоэнергетических характеристиках. В концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  М ТНКЖ-тио проявлял небольшой разобщающий эффект, выражающийся в 16%-м и 30%-м увеличении скоростей окисления субстратов ( $V_2$ ) (табл. 2). При этом в концентрации  $10^{-6}$  М препарат значительно снижал скорости окисления

НАД-зависимых субстратов как в фосфорилирующем состоянии, так и в присутствии разобщителя (табл. 2). Вероятно, это обусловлено снижением содержания в липидном компоненте мембран линолевой и линоленовой кислот, входящих в состав кардиолипина, обеспечивающего эффективную работу дыхательной цепи митохондрий [30]. Однако эффективность окислительного фосфорилирования менялась незначительно: дыхательный контроль по Чансу уменьшался с  $3.00 \pm 0.02$  до  $2.50 \pm 0.03$ . Отметим, что введение в среду инкубации митохондрий  $10^{-8}$  М препарата приводило к повышению эффективности окислительного фосфорилирования при окислении НАД-зависимых субстратов. Это увеличение было обусловлено некоторым снижением скоростей транспорта электронов в состоянии покоя (после исчерпания АДФ). ТНКЖ-тио также увеличивал скорости окисления сукцината в присутствии АДФ, в результате чего в полтора раза возрастала величина дыхательного контроля по Чансу, а АДФ/О увеличивалось с  $1.40 \pm 0.02$  до  $1.71 \pm 0.04$ .

Данные изменения биоэнергетических характеристик митохондрий, вероятно, были обусловлены изменениями физико-химических свойств липидного компонента мембран. Инкубация митохондрий с  $10^{-8}$  М препарата вызывала 15% снижение микровязкости, измеренной зондом I (свободный липидный бислой) по сравнению с контролем (рис. 2а). В то же время микровязкость, измеренная зондом II (зона липидов, связанная с белковыми доменами), возрастала на 20% (рис. 2б). Специфические изменения микровязкости, наблюдаемые в области аннулярных липидов мембран, по-видимому свидетельствуют об изменении белок-липидного взаимодействия,



**Рис 3.** Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на относительное содержание С18 жирных кислот в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось абсцисс: 1 – 18:2 ω6, 2 – 18:3 ω3, 3 – 18:1 ω9, 4 – 18:1 ω7, 5 – 18:0; ось ординат – относительное содержание (в %) С18 жирных кислот в мембранах митохондрий проростков гороха.

**Таблица 3.** Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха

Группа	$V_2$	$V_3$	$V_4$	$V_3/V_4$	ДНФ
Контр	25.22 ± 2.21	80.53 ± 3.10	35.32 ± 1.71	2.28 ± 0.01	72.85 ± 1.95
Дефицит воды	37.35 ± 1.15	49.00 ± 2.40	27.50 ± 1.23	1.78 ± 0.01	44.00 ± 1.12
Дефицит воды + 10 <sup>-8</sup> М ТНКЖ-тио	41.66 ± 2.00	76.68 ± 2.91	28.01 ± 1.54	2.74 ± 0.02	68.65 ± 2.01

Примечание. Среда инкубации: 0.4 М сахарозы, 20 мМ НЕРЕС-Tris буфер (рН 7.2), 5 мМ КН<sub>2</sub>Р<sub>0</sub><sub>4</sub>, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1% БСА, 10 мМ малата, 10 мМ глутамата. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10<sup>-6</sup> М карбонилцианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразона. Скорости окисления (представлены в нг атом О<sub>2</sub>/мг белка·мин):  $V_2$  – скорость окисления субстратов,  $V_3$  – скорость окисления субстратов в присутствии АДФ;  $V_4$  – скорость окисления в состоянии покоя (скорость окисления субстрата при истощении АДФ). Число повторов – 8.

что, вероятно, сказалось на активности ферментов, ассоциированных с мембранами, а, следовательно, на активности дыхательных ферментов митохондрий. Отметим, что разнонаправленные изменения микровязкости разных фаз мембран характерны при нормальном функционировании органелл клеток [27].

Учитывая влияние данной концентрации препарата на структурные характеристики мембран митохондрий и биоэнергетику этих органелл, 10<sup>-8</sup> М ТНКЖ-тио мы использовали для изучения его антистрессовых свойств на модели дефицита воды. Дефицит воды приводил к снижению содержания основных ЖК, входящих в состав кардиолипина: линолевой кислоты на 14,5% и линоленовой кислоты – на 19% (рис. 3). При этом наблюдалось повы-

шение содержания насыщенных ЖК (С<sub>14:0</sub>, С<sub>17:0</sub>, С<sub>18:0</sub>, С<sub>20:0</sub>). В результате отношение  $\Sigma$ С ненасыщенных ЖК /  $\Sigma$ С насыщенных ЖК снизилось с 2.79 ± 0.02 до 2.15 ± 0.01, что, вероятно, увеличивало ригидность мембран митохондрий. Изменения в жирнокислотном составе мембран этих органелл сопровождалось снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов на 39%, а также 12%-м снижением эффективности окислительного фосфорилирования (табл. 3). Обработка семян гороха 10<sup>-8</sup> М препарата предотвращала изменения состава ЖК мембран митохондрий в условиях стресса и обусловленные этим изменения биоэнергетических характеристик митохондрий. При этом эффективность окислительного фосфорилирования возрастала на 20%.

## ВЫВОДЫ

Исходя из полученных данных можно прийти к заключению, что ТНКЖ-тио влиял на структурные характеристики мембран митохондрий проростков гороха. Это влияние имело дозозависимость: в концентрации  $10^{-4}$  М препарат вызывал нарушение структурных характеристик мембран, что влекло за собой дисфункцию митохондрий. Существенное влияние на биоэнергетические характеристики митохондрий оказывал ТНКЖ-тио в концентрации  $10^{-8}$  М. В этой концентрации препарат увеличивал эффективность окислительного фосфорилирования за счет некоторого снижения скоростей транспорта электронов в состоянии покоя (после истощения АДФ).

Использование препарата в качестве адаптогена к стрессовым воздействиям, в частности к дефициту воды, показало, что  $10^{-8}$  М ТНКЖ-тио обеспечивал эффективное функционирование дыхательной цепи митохондрий за счет сохранения/увеличения пула основных ЖК, входящих в состав кардиолипина – линолевой и линоленовой кислот, а также ненасыщенных ЖК, способствующих поддержанию текучести мембран. Таким образом антистрессовые свойства препарата в основном обусловлены его антиоксидантной активностью.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают огромную благодарность сотруднику Института проблем химической физики РАН д.х.н. Н.А. Саниной за предоставление для исследований натрий- $\mu$ 2-дитиосульфато-тетранитозилдиферрата тетрагидрата.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской Академии наук (номер темы 44.4-1201253310).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Plotnikov, A. Chupyrkina, A. Vasileva, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, S58 (2008).
2. А. Е. Шиков, Т. В. Чиркова и В. В. Емельянов, *Экологич. генетика*, **19** (4), 343 (2021). DOI: 10.17816/ecogen75975
3. А. А. Starkov, *Biosci. Rep.*, **17** (3), 273 (1997). DOI: 10.1023/a:1027380527769
4. P. Ch. Ikwegbue, P. Masamba, B. E. Oyinloye, and A. P. Kappo. *Pharmaceuticals (Basel)*, **11** (1), 2 (2018). DOI: 10.3390/ph11010002
5. D. Pastore, D. Trono, M. N. Laus, et al., *J. Exp. Bot.*, **58** (2), 195 (2007). DOI: 10.1093/jxb/erl273
6. J. Jayawardhane1, D. W. Cochrane, P. Vyas, et al., *Front. Plant Sci.* (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.00566
7. R. B. SNabi., R. Tayade, A. Hussain, et al., *Environ. Exp. Bot.*, **161**, 120 (2019). DOI: 10.1016/J.ENVEXP-BOT.2019.02.003
8. P. Santisree, P. Bhatnagar-Mathur, and K. K. Sharma, *Funct. Plant Biol.*, **45** (2), 267 (2017). DOI: 10.1071/FP16324
9. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. M. Alam, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 9643 (2013). Doi: 10.3390/ijms14059643
10. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Москва-Ижевск, 2015).
11. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. M. Alam., and M. Fujita, *Austral. J. Crop Sci.*, **6** (8), 1314 (2012)
12. F. Groß, J. Durner, and F. Gaupels, *Front. Plant Sci.*, **4**, 419 (2013). DOI: 10.3389/fpls.2013.00419
13. F. Van Breusegem, E. Vranová, J. F. Dat, and D. Inze, *Plant Sci.*, **161**, 405 (2001). DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00452-6
14. K. J. Gupta, A. Kumari, I. Florez-Saras, et al., *J. Exp. Bot.*, **69** (14), 3413 (2018). DOI: 10.1093/jxb/ery119
15. K. J. Gupta and W. M. Kaiser, *Plant Cell Physiol.*, **51**, 576 (2010). DOI: 10.1093/pcp/pcq022
16. M. Stoimenova, A. U. Igamberdiev, K. J. Gupta, and R. D. Hill, *Planta*, **226**, 465 (2007). DOI: 10.1007/s00425-007-0496-0/
17. Ф. М. Шакирова, *Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция* («Гилем», Уфа, 2001).
18. A. F. Vanin, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (19), 10356 (2021). DOI: 10.3390/ijms221910356
19. I. Zhigacheva, V. Binyukov, E. Mil, et al., *Curr. Chem. Biol.*, **14**, 203 (2020) DOI: 10.2174/2212796814999200907162619
20. Н. А. Санина и С. М. Алдошин, *Изв. РАН. Сер. хим.*, **7**, 1199 (2011)
21. В. Н. Попов, Э. К. Рууге и А. А. Старков, *Биохимия*, **68** (7), 910 (2003).
22. J. P. Carreau and J. P. Dubacq, *J. Chromatogr. A*, **151**, 384 (1979). DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9
23. Y. Wang, H. Sunwoo, G. Cherian, and J. S. Sim, *Poult Sci.*, **79** (8), 1168 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168 PMID: 10947186.
24. R. V. Golovina and T. E. Kuzmenko, *Chromatography (Basel)*, **10**, 545 (1977). DOI: 10.1007/BF02262915
25. В. И. Бинюков, С. Ф. Борунова, М. Г. Гольдфельд и др., *Биохимия*, **36** (6), 1149 (1972)
26. А. М. Вассерман, А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский и И. Б. Нейман, *Высокомолекуляр. соединения*, **10A**, 1930 (1968).

27. А. Н. Голощачов, Е. Б. Бурлакова, Биофизика, **25** (1), 97 (1980).
28. L. Adzibbli, E. P. Sokolov, S. Ponsuksili, and I. M. Sokolova, J. Exp. Biol. **225** (1), 243304 (2022). DOI: 10.1242/jeb.243304
29. A. Navarro and A. Boveris, Am. J. Physiol. Cell Physiol., **292** (2), 670 (2007). DOI: 10.1152/ajpcell.00213.2006
30. G. Paradies, G. Petrosillo, M. Pistolese, et al., Circ. Res., **94** (1), 53 (2004). DOI: 10.1161/01.RES.0000109416.56608.64

## Sodium $\mu$ 2-Dithiosulfate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate Increases the Efficiency of the Respiratory Chain Activity in Mitochondria of Pea Seedlings

I.V. Zhigacheva\*, N.I. Krikunova\*, I.P. Generozova\*\*, P.A. Butsanets\*\*, N.Yu. Gerasimov\*, O.V. Nevrova\*, S.V. Vasiliev\*\*, and A.N. Goloshchapov\*

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

\*\*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276 Russia

The present study was designed to investigate the antistress properties of the nitric oxide donor of the ferric-thiosulfate complex of sodium  $\mu$ 2-dithiosulfate-tetranitrosyl diferrate tetrahydrate  $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (TNIC-thio), where the effects of different concentrations of the donor on the functional state of mitochondria isolated from pea seedlings were studied. Incubation of mitochondria with  $10^{-4}$  M of the drug led to a sharp decrease in microviscosity of a freestanding lipid bilayer. This is attributable to a rise in the content of unsaturated fatty acids in the lipid fraction of mitochondrial membranes. At the same time, the drug uncoupled the processes of oxidation and phosphorylation. Treatment of mitochondria with  $10^{-8}$  M TNIC-thio brought about an increase (by 25–45%) in the content of unsaturated  $\text{C}_{20}$  fatty acids, that could cause a 15% drop in microviscosity of the freestanding lipid bilayer. However, microviscosity in the annular lipid region of the membranes increased by 20%, thus, indicating that the activity of mitochondrial respiratory chain enzymes altered. Indeed, the drug affected the oxidation rates of NAD-dependent substrates and succinate and increased the efficiency of oxidative phosphorylation. This concentration of the drug was chosen to study the ability of TNIC-thio to improve the resistance of pea seedlings during water deficit. TNIC-thio prevented changes in the fatty acids composition of mitochondrial membranes in the conditions of water deficit and stress-induced changes in the bioenergetic characteristics of mitochondria. The findings of the study suggest that the protective properties of the drug are developed at the membrane level due to the preservation/increase of the pool of unsaturated fatty acids contributing to the maintenance of membrane fluidity.

*Keywords: mitochondria, nitric oxide, microviscosity, freestanding lipid bilayer, annular lipids, fatty acids*

## ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ЙЕРБА МАТЕ (*Ilex paraguariensis*) НА ПРОЦЕСС ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН

© 2022 г. Ю.О. Теселкин<sup>\*,#</sup>, И.В. Бабенкова<sup>\*</sup>, А.А. Кочетова<sup>\*</sup>, А.Н. Осипов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997, Россия

<sup>#</sup>E-mail: [teselkin-box@mail.ru](mailto:teselkin-box@mail.ru)

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.

После доработки 19.05.2022 г.

Принята к публикации 26.05.2022 г.

Исследовано влияние водного извлечения из йерба мате (*Ilex paraguariensis*) на процесс пероксидного окисления фосфолипидов липосомальных мембран, индуцированный ионами  $Fe^{2+}$ . За процессом липидной пероксидации липосом наблюдали, регистрируя кинетику хемилюминесценции, активирующей кумарином С-525. С повышением концентрации водного извлечения из мате в суспензии липосом происходило дозозависимое увеличение времени достижения максимума «медленной» вспышки хемилюминесценции и понижение ее интенсивности. Это свидетельствует соответственно об уменьшении скорости окисления ионов  $Fe^{2+}$  и снижении скорости образования липидных радикалов. Аналогичный результат был получен при добавлении к липосомам классических радикальных ингибиторов – бутилгидрокситолуола и тролокса. Однако в отличие от радикальных ингибиторов при дальнейшем увеличении концентрации водного извлечения в суспензии липосом (более 2.5 мкг сухого растительного сырья/мл) имело место постепенное уменьшение времени достижения максимума «медленной» вспышки хемилюминесценции, что характерно для действия железохелатирующих веществ (ЭДТА и дефероксамина) и обусловлено сокращением времени окисления ионов  $Fe^{2+}$  до критической концентрации. Можно предположить, что биологически активные вещества, входящие в состав водного извлечения из мате, проявляют как радикалперехватывающую, так и железосвязывающую активность. Было изучено влияние на  $Fe^{2+}$ -индуцированное свечение липосом некоторых соединений полифенольной природы из состава водных экстрактов мате – кверцетина, рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот. Установлено, что в липосомальной модельной системе кверцетин действовал как радикальный ингибитор. Смешанный тип действия – радикалперехватывающий и железохелатирующий – наблюдали у рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот. Таким образом, торможение  $Fe^{2+}$ -индуцированного пероксидного окисления липидов биологических мембран может быть одним из механизмов антиоксидантных эффектов йерба мате, наблюдаемых *in vivo*.

**Ключевые слова:** йерба мате, *Ilex paraguariensis*, липосомы, пероксидное окисление липидов, ионы железа, полифенольные соединения, антиоксиданты, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302922040068, EDN: ITAUBA

Водные извлечения из йерба мате (*Ilex paraguariensis*) обладают антиоксидантными свойствами, которые обусловлены содержанием в них биологически активных веществ (БАВ) полифенольной природы, в частности, кверцетина, рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот, а также их производных [1, 2]. Во многих исследованиях, в том числе и в наших работах, установлена антирадикальная активность водных извлечений

из мате (водных экстрактов мате) по отношению к ряду известных свободных радикалов [3–6].

Важный механизм антиоксидантного действия водных извлечений из мате заключается в торможении реакций свободнорадикального пероксидного окисления липидов (ПОЛ) [4, 7]. Большой интерес представляет изучение влияния мате на процесс ПОЛ, индуцированный ионами металлов переменной валентности, например ионами железа. Известно, что ионы  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  участвуют в продукции активных форм кислорода –  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  и  $OH^{\bullet}$  и других [8, 9]. В физиологических условиях активные формы кислорода

**Сокращения:** БАВ – биологически активные вещества, ПОЛ – пероксидное окисление липидов, ВНТ – бутилгидрокситолуол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол).

выполняют сигнальную функцию в клетках, оказывая регулирующее воздействие на работу различных систем организма человека [8, 10, 11]. Нарушение гомеостаза железа в организме приводит к увеличению уровня каталитически активных ионов  $Fe^{2+}$  и, как следствие, к усилению продукции радикальных интермедиатов кислорода и активации оксидативного стресса, играющего важную роль в патогенезе ряда заболеваний [8, 12]. В этой связи изучение способности водных извлечений из мате ингибировать процесс липидной пероксидации, индуцированный ионами  $Fe^{2+}$ , может иметь большое значение для понимания возможных механизмов антиоксидантных эффектов мате *in vivo*.

Одним из методов, позволяющих исследовать как антирадикальные, так и  $Fe^{2+}$ -хелатирующие свойства БАВ, является метод хемилюминесценции, сопровождающей процесс  $Fe^{2+}$ -индуцированного ПОЛ модельных мембран (липосом). Установлено, что вещества, перехватывающие липидные радикалы (радикальные ингибиторы), увеличивают время достижения максимальной интенсивности свечения липосом и понижают интенсивность этого свечения, в то время как вещества, хелатирующие ионы  $Fe^{2+}$ , при концентрации этих ионов выше критической величины вызывают уменьшение первого показателя и в меньшей степени влияют на второй [13, 14].

Цель исследования – изучить механизм ингибирующего действия водного извлечения из мате на процесс липидной пероксидации липосомальных мембран с использованием метода  $Fe^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применяли кверцетин, кофеиновую кислоту, хлорогеновую кислоту, динатриевую соль ЭДТА, тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), дефероксамин, бутилгидрокситолуол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол, ВНТ), 2,3,5,6-ИН,4Н-тетрагидро-9-(2'-бензоксазол-лил)-хинолизин-(9,9а,1-gh)кумарин (С-525), диметилсульфоксид, неорганические соли (все – производства Sigma-Aldrich, США), рутин (Acros Organics, США), яичные фосфолипиды (60% L- $\alpha$ -фосфатидилхолина, Fluka, Швейцария).

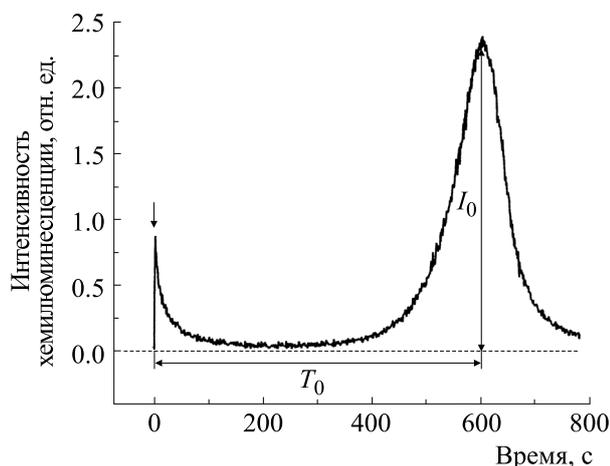
В качестве объекта исследования использовали мате торговой марки Amanda категории Desplada (La Cachuega S.A., Аргентина). Водное извлечение из мате получали, как было описано ранее [5]. К навеске сухого растительного сырья добавляли бидистиллированную воду (из расчета 1 мл на 1 мг сырья), образец перемешивали и инкубировали в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Затем образец выдерживали при комнатной

температуре в течение 10 мин, охлаждали в холодной воде, восстанавливали общий объем бидистиллированной водой и фильтровали через бумажный фильтр. Приготовленное водное извлечение из мате хранили при 4°C в течение эксперимента (5–6 ч).

Однослойные липосомы из яичных фосфолипидов готовили по методу, описанному в работе [15]. Для этого в 13.5 мл 50 мМ трис-НСl-буфера, содержащего 100 мМ КCl, рН 7.4, быстро впрыскивали 0.5 мл раствора яичных фосфолипидов в этаноле (56 мг/мл) при интенсивном перемешивании. Полученную суспензию липосом инкубировали при слабом равномерном перемешивании в течение 40 мин при комнатной температуре и хранили при 4°C в течение эксперимента. Значения оптической плотности (мутности) суспензии липосом при 600 нм находились в интервале 0.04–0.06.

Процесс ПОЛ липосом инициировали ионами  $Fe^{2+}$ . За протеканием процесса пероксидации фосфолипидов липосом наблюдали, регистрируя кинетику хемилюминесценции. Измерение хемилюминесценции липосом проводили на хемилюминометре Lum-5773 (ООО «ДиСофт», Россия) с программным обеспечением PowerGraph 3.3 Professional ([www.powergraph.ru](http://www.powergraph.ru)). Реакционная среда имела следующий состав: липосомы (0.4 мг фосфолипидов на 1 мл), 1.25 мкМ С-525 в качестве активатора хемилюминесценции [14] в 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 100 мМ КCl, рН 7.4. Концентрация этанола составляла не более 0.7% по объему. Исследуемые пробы предварительно инкубировали в измерительной ячейке хемилюминометра при постоянном перемешивании в темноте в течение 5 мин для достижения температуры 37°C. Затем индуцировали хемилюминесценцию липосом добавлением сульфата железа в конечной концентрации 15 мкМ. Раствор сульфата железа готовили перед проведением исследования с использованием 0.01 н НCl и хранили при 4°C в течение эксперимента.

При изучении влияния водных извлечений из мате, биологически активных веществ мате, радикальных ингибиторов (ВНТ, тролокс) и хелатирующих веществ (ЭДТА, дефероксамин) на  $Fe^{2+}$ -индуцированную хемилюминесценцию липосом их добавляли в реакционную среду после внесения суспензии модельных мембран. При последовательном внесении в пробы необходимых добавок (суспензии липосом, водных извлечений из мате, БАВ, радикальных ингибиторов, хелаторов, С-525, сульфата железа) осуществляли перемешивание с использованием вортекса Reax top (Heidolph, Германия). Кинетику  $Fe^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом измеряли без перемешивания.



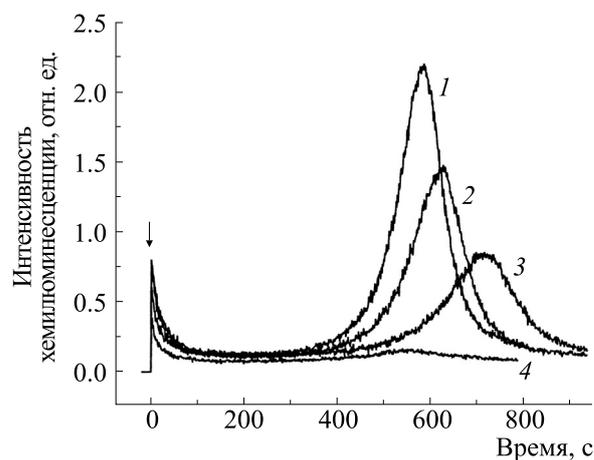
**Рис. 1.** Кинетика  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом:  $I_0$  — максимальная интенсивность «медленной» вспышки хемилюминесценции;  $T_0$  — время достижения максимальной интенсивности «медленной» вспышки хемилюминесценции. Стрелкой отмечен момент введения сульфата железа.

Исходные растворы ВНТ, кверцетина, кофеиновой и хлорогеновой кислот готовили в этаноле в концентрации 10 мМ. Рабочие растворы кофеиновой и хлорогеновой кислот (1 мМ) получали разведением исходных растворов 50 мМ трис-НСI-буфером, содержащим 100 мМ КСI, рН 7.4. При постановке контролей на этанол кинетика хемилюминесценции липосом не изменялась. Растворы тролокса (1 мМ) и рутина (0.1 мМ) готовили с использованием буферного раствора.

Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики и представлены в форме средней величины и стандартной ошибки средней ( $M \pm m$ ), рассчитанных по данным трех и более отдельных экспериментов. Оценку достоверности различий между сравниваемыми показателями проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании способность водного извлечения из мате ингибировать процесс  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного ПОЛ липосом изучали, регистрируя хемилюминесценцию, активированную кумариновым красителем С-525 [14, 16]. Типичная кинетика  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного свечения липосом имела четко выраженные стадии — «быструю» вспышку, «медленную» вспышку и латентный период — время между окончанием «быстрой» вспышки и началом развития «медленного» свечения (рис. 1). «Быстрая» вспышка обусловлена разрушением липидных гидропе-



**Рис. 2.** Влияние водного извлечения из мате на кинетику  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом: 1 — контрольная кинетика; 2, 3, 4 — в присутствии 1.25, 2.5 и 12.5 мкг сухого растительного сырья/мл соответственно. Стрелкой отмечен момент введения сульфата железа.

роксидов, исходно содержащихся в липосомах, при их взаимодействии с ионами  $\text{Fe}^{2+}$ , а «медленная» вспышка — развитием реакций цепного свободнорадикального окисления липосомальных фосфолипидов. Латентный период — это время, в течение которого свечение угнетается [16]. На практике вместо латентного периода часто определяют время достижения максимальной интенсивности «медленного» свечения, которое отсчитывают от момента введения в суспензию липосом ионов  $\text{Fe}^{2+}$  [13]. Для анализа антиоксидантных свойств водного извлечения из мате и БАВ нами были использованы относительные показатели —  $T/T_0$  и  $I/I_0$ , где  $T_0$  и  $T$  — время достижения максимальной интенсивности хемилюминесценции без и в присутствии исследуемого объекта,  $I_0$  и  $I$  — максимальная интенсивность «медленной» вспышки хемилюминесценции без и в присутствии исследуемого объекта.

Добавление водного извлечения из мате к суспензии липосом оказывало существенное влияние на кинетику  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции (рис. 2). В частности, изменялись оба исследуемых показателя свечения липосом (рис. 3). С повышением концентрации водного извлечения из мате в липосомальной суспензии до 2.5 мкг сухого растительного сырья/мл наблюдалось увеличение  $T/T_0$ . При дальнейшем повышении концентрации водного извлечения этот показатель постепенно уменьшался до значений ниже исходных (при концентрации 15 мкг сухого растительного сырья/мл). Показатель  $I/I_0$  снижался дозозависимым образом.

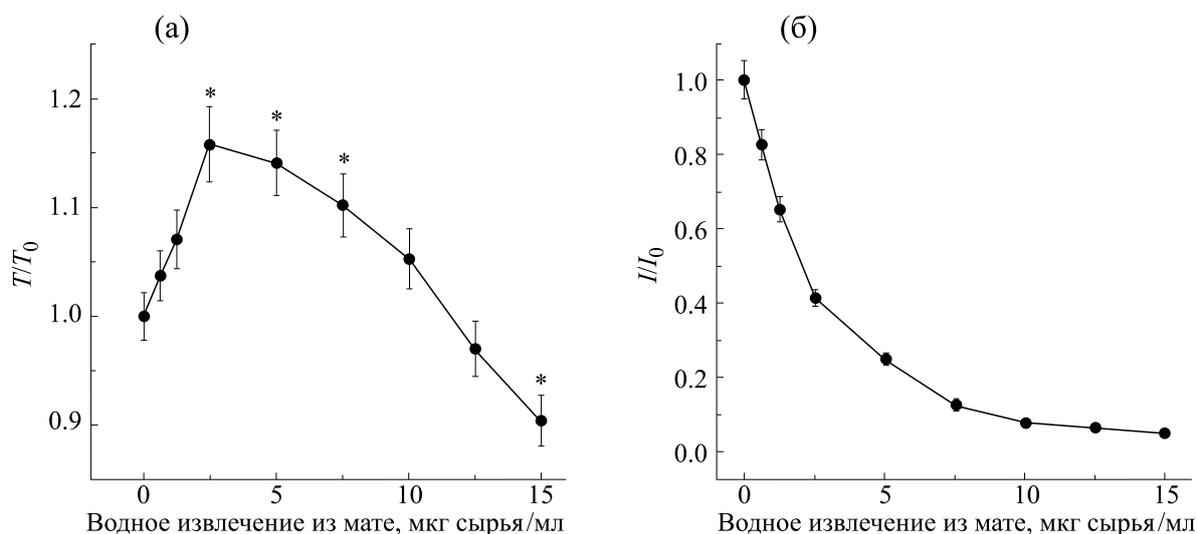


Рис. 3. Влияние водного извлечения из мате на показатели  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом: (а) –  $T/T_0$ , (б) –  $I/I_0$ ; \* –  $p < 0.05$  по отношению к исходному значению показателя.

Полученный результат показывает, что влияние водного извлечения из мате на  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированное свечение липосом имеет свои особенности и отличается от описанного ранее некоторыми авторами влияния радикальных ингибиторов и хелаторов ионов  $\text{Fe}^{2+}$  [13, 14]. По-видимому, эти особенности можно объяснить тем, что БАВ, входящие в состав водного извлечения из мате, обладают как радикалперехватывающей, так и железосвязывающей активностью. Относительно малые количества водного извлечения оказывают действие, аналогичное радикальным ингибиторам – увеличивают  $T/T_0$  и уменьшают  $I/I_0$ . При больших концентрациях наряду с антирадикальными свойствами начинают проявляться и железохелатирующие свойства – значение  $T/T_0$  уменьшается.

Нами изучено влияние кверцетина, рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот – полифенольных соединений, выявленных в водных экстрактах мате [4, 6, 17, 18], – на кинетику  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом в сравнении с классическими радикальными ингибиторами (ВНТ, тролоксом) и хелатором ионов  $\text{Fe}^{2+}$  (ЭДТА). Обнаружено, что кинетические кривые в присутствии кверцетина и рутина были аналогичны кривым (по изменению  $T$ ), полученным для ВНТ и тролокса, тогда как кинетики хемилюминесценции в присутствии кофеиновой и хлорогеновой кислот в большей мере соответствовали ЭДТА (рис. 4).

Для выяснения механизма антиоксидантного действия кверцетина, рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот было исследовано изменение

показателей  $T/T_0$  и  $I/I_0$  в зависимости от концентрации этих полифенольных соединений. Установлено, что кверцетин вызывал дозозависимое

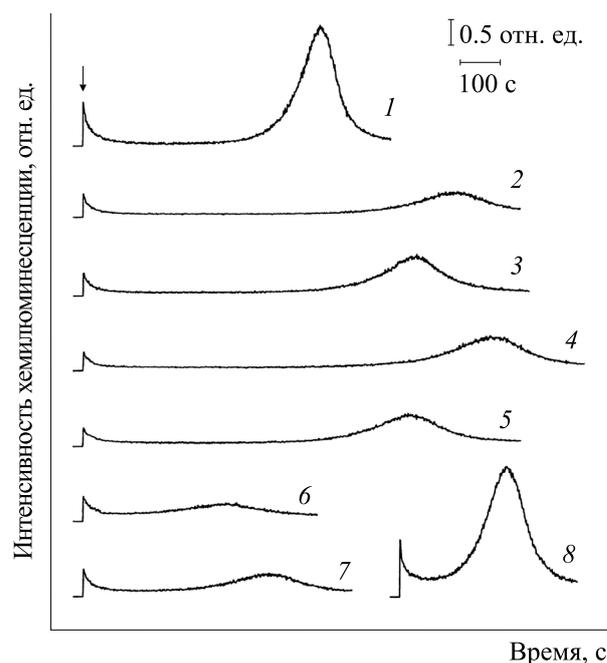


Рис. 4. Влияние биологически активных веществ мате, радикальных ингибиторов и ЭДТА на  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированную хемилюминесценцию липосом: 1 – контроль; 2 – 0.2 мкМ ВНТ; 3 – 0.5 мкМ тролокса; 4 – 0.5 мкМ кверцетина; 5 – 3 мкМ рутина; 6 – 4 мкМ кофеиновой кислоты; 7 – 4 мкМ хлорогеновой кислоты; 8 – 5 мкМ ЭДТА. Стрелкой отмечен момент введения сульфата железа.

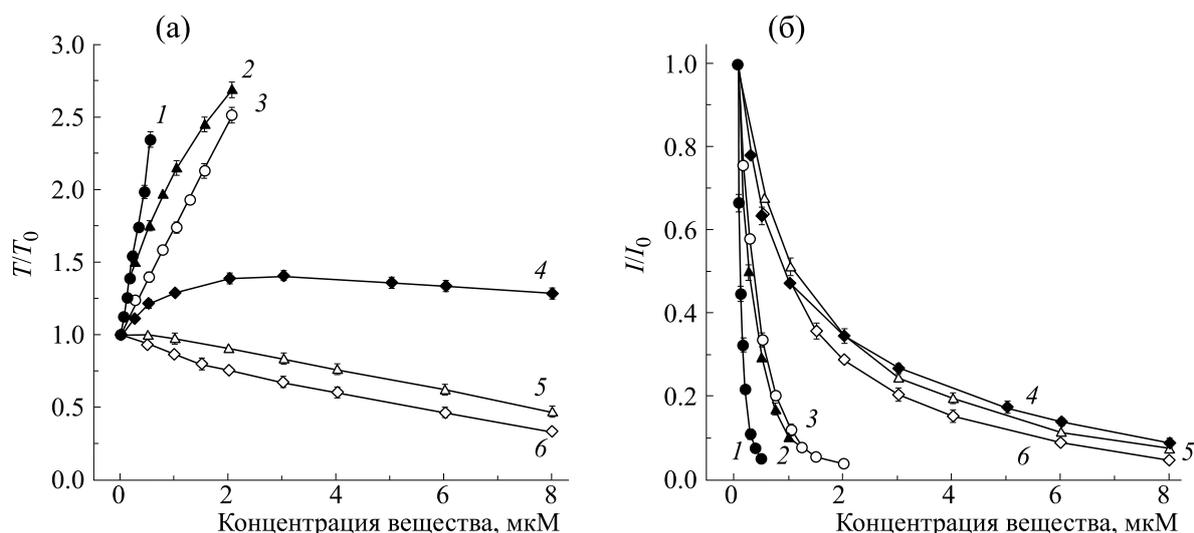


Рис. 5. Влияние биологически активных веществ мате и радикальных ингибиторов на показатели  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом: (а) –  $T/T_0$ , (б) –  $I/I_0$ . 1 – ВНТ; 2 – кверцетин; 3 – тролокс; 4 – рутин; 5 – хлорогеновая кислота; 6 – кофеиновая кислота.

увеличение  $T/T_0$ , тогда как кофеиновая и хлорогеновая кислоты – уменьшение (рис. 5а). В случае рутина повышение его концентрации до 2 мкМ сопровождалось увеличением  $T/T_0$  до некоторого определенного уровня, который практически не изменялся при дальнейшем повышении концентрации (до 8 мкМ). Увеличение концентрации изучаемых веществ в суспензии липосом сопровождалось понижением  $I/I_0$  (рис. 5б). При этом значения концентраций, при которых имело место снижение  $I/I_0$  на 50% ( $IC_{50}$ ), возрастали в следующем ряду: ВНТ < кверцетин, тролокс < кофеиновая, хлорогеновая кислота < рутин.

Необходимо отметить, что регистрируемое уменьшение  $I/I_0$  при увеличении в данной модельной системе концентрации водного извлечения из мате, а также биологически активных веществ мате нельзя объяснить поглощением ими квантов света, испускаемых С-525, который использовался в качестве физического активатора хемилюминесценции липосом. В пользу данного утверждения свидетельствует тот факт, что значения оптической плотности растворов водного извлечения из мате и исследуемых БАВ при их действующих концентрациях в области длин волн, соответствующих испусканию флуоресценции указанного красителя в липосомах (450–580 нм), были меньше 0.01.

Влияние ЭДТА на  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированную хемилюминесценцию липосом (рис. 6) обусловлено его железохелатирующими свойствами (одна молекула может связать один ион  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Fe}^{3+}$ ). С повышением концентрации ЭДТА в суспензии липосом наблюдалось дозозависимое уменьше-

ние  $T/T_0$ . При концентрациях ЭДТА более 17 мкМ значения  $T/T_0$  были равны нулю, поскольку свечение липосом не развивалось (все двухвалентное железо связано хелатором). Что касается изменения  $I/I_0$ , то при добавлении ЭДТА данная зависимость имела более сложный характер. В интервале концентраций 5–13 мкМ интенсивность хемилюминесценции липосом увеличивалась, превышая исходный уровень. Дальнейшее повышение концентрации ЭДТА приводило к уменьшению интенсивности хемилюминесценции липосом ниже исходного уровня (15 мкМ) и затем к полному ингибированию свечения (более 17 мкМ). Близкие зависимости для  $T/T_0$  и  $I/I_0$  также были получены для другого хелатирующего агента – дефероксамина. Известно, что дефероксамин обладает высоким сродством к ионам  $\text{Fe}^{3+}$ , которые связывает в эквимольных концентрациях [19, 20]. Что касается ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , то при взаимодействии с дефероксмином эти ионы окисляются до трехвалентного состояния с образованием комплекса хелатор- $\text{Fe}^{3+}$  [21]. Таким образом, добавление к суспензии липосом дефероксамина, как и добавление ЭДТА, будет приводить к уменьшению концентрации активных ионов  $\text{Fe}^{2+}$ .

Наблюдаемые изменения показателей  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом ( $T/T_0$  и  $I/I_0$ ) при добавлении к ним водного извлечения из мате или биологически активных веществ мате можно объяснить, если учесть, что в данной модельной системе ионы  $\text{Fe}^{2+}$  выполняют две противоположные функции. С одной сто-

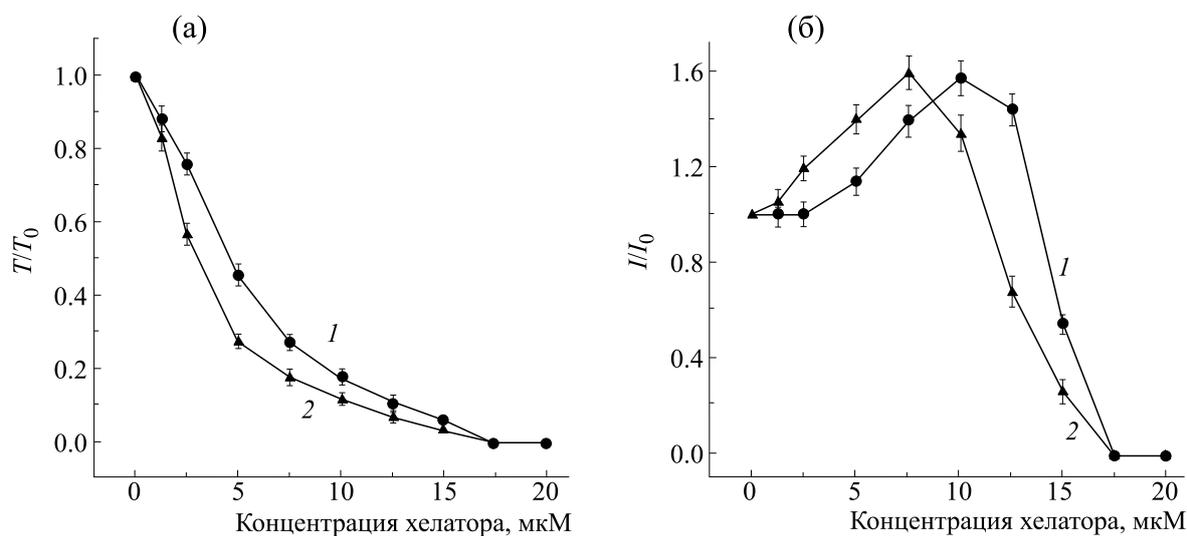
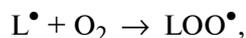
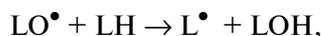
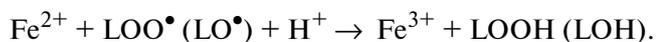


Рис. 6. Влияние хелатирующих агентов на показатели  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции липосом: (а) –  $T/T_0$ , (б) –  $I/I_0$ . 1 – ЭДТА; 2 – дефероксамин.

роны, они выступают в качестве инициатора процесса свободнорадикального ПОЛ, катализируя распад предсуществующих липидных гидропероксидов ( $\text{LOOH}$ ), а также липидных гидропероксидов, образующихся при окислении ненасыщенных жирнокислотных остатков фосфолипидов липосом (ЛН):

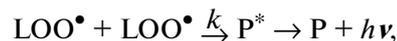


где  $\text{L}^\bullet$ ,  $\text{LO}^\bullet$ ,  $\text{LOO}^\bullet$  – соответственно алкильные, алкоксильные и пероксильные радикалы липидов. С другой стороны, ионы  $\text{Fe}^{2+}$  ингибируют процесс липидной пероксидации, участвуя в реакциях обрыва цепи [22]:



Для возникновения «медленной» вспышки хемилюминесценции липосом концентрация ионов  $\text{Fe}^{2+}$  должна уменьшиться до некоторой критической величины. Окисление ионов  $\text{Fe}^{2+}$  до критической концентрации происходит во время латентного периода. Как только концентрация ионов  $\text{Fe}^{2+}$  достигнет критической, последние начинают выступать главным образом в качестве инициатора процесса ПОЛ, что приводит к развитию «медленной» вспышки хемилюминесценции [13, 22]. Кванты хемилюминесценции обра-

зуются в реакции диспропорционирования двух  $\text{LOO}^\bullet$ :

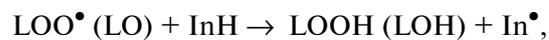


где  $k$  – константа скорости реакции диспропорционирования  $\text{LOO}^\bullet$ ,  $\text{P}^*$  и  $\text{P}$  – образующиеся молекулярные продукты в возбужденном и основном состояниях соответственно. Интенсивность хемилюминесценции связана с концентрацией  $\text{LOO}^\bullet$  следующим образом:

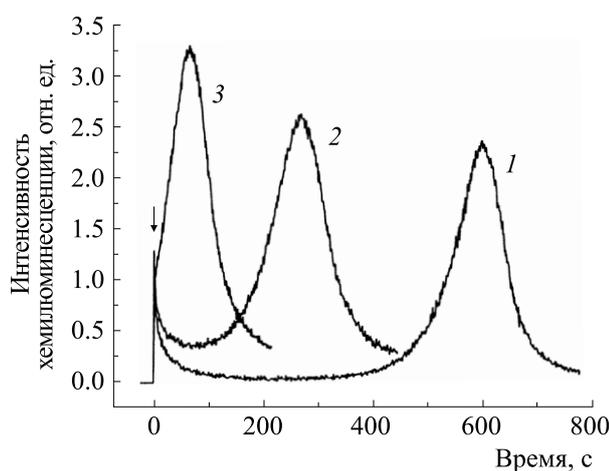
$$I = K \phi k [\text{LOO}^\bullet]^2,$$

где  $K$  – константа пропорциональности,  $\phi$  – квантовый выход хемилюминесценции [14, 16, 23].

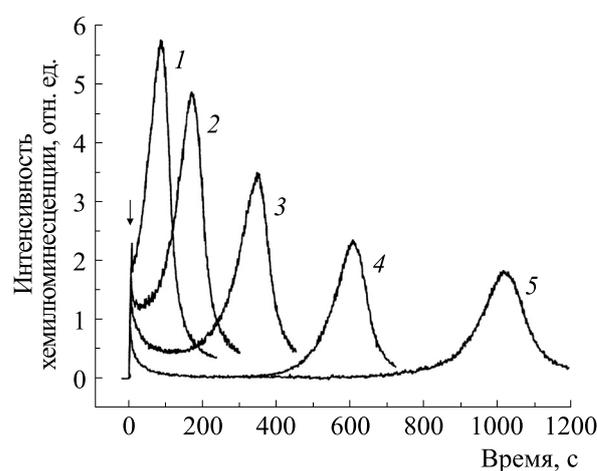
При введении в суспензию липосом классических радикальных ингибиторов, таких как ВНТ и тролокс, количество генерируемых липидных радикалов уменьшается:



где  $\text{InH}$  – радикальный ингибитор,  $\text{In}^\bullet$  – малоактивный радикал ингибитора. В результате скорость окисления ионов  $\text{Fe}^{2+}$  до критической концентрации замедляется. Это приводит к увеличению  $T/T_0$ . Что касается  $I/I_0$ , то этот показатель, наоборот, понижается. Добавление хелаторов (ЭДТА, дефероксамина), удаляющих из среды часть активных ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , сокращает время окисления оставшихся свободных ионов  $\text{Fe}^{2+}$  до критической концентрации, что вызывает уменьшение  $T/T_0$ . Результаты, представленные на



**Рис. 7.** Влияние ЭДТА на  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированную хемилюминесценцию липосом: 1 – в отсутствие ЭДТА (контроль); 2 – 5 мкМ ЭДТА; 3 – 12.5 мкМ ЭДТА. Стрелкой отмечен момент введения сульфата железа.



**Рис. 8.** Влияние концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$  на кинетику хемилюминесценции липосом: 1, 2, 3, 4, 5 – 7.5, 10, 12.5, 15 и 25 мкМ  $\text{Fe}^{2+}$  соответственно. Стрелкой отмечен момент введения сульфата железа.

рис. 5, позволяют сделать вывод, что в пределах исследованного диапазона концентраций кверцетин действует как радикальный ингибитор. Другие БАВ либо увеличивали  $T/T_0$  до некоторой постоянной величины (рутин), либо уменьшали этот показатель (кофеиновая и хлорогеновая кислоты). Полученные зависимости указывают на то, что связывание ионов  $\text{Fe}^{2+}$  является одним из возможных механизмов антиоксидантного действия данных веществ. С другой стороны, подобно радикальным ингибиторам, эти вещества дозозависимым образом понижали  $I/I_0$ . Таким образом, в случае рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот можно говорить о наложении двух антиоксидантных эффектов.

В отличие от рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот, в присутствии ЭДТА и дефероксамина в определенных диапазонах концентраций значения  $I/I_0$ , наоборот, повышались (рис. 6). По-видимому, это обусловлено тем, что концентрация свободных ионов  $\text{Fe}^{2+}$  в суспензии липосом приближалась к критической величине. Так, при концентрации ЭДТА, равной 12.5 мкМ, наблюдалось слияние «быстрой» и «медленной» вспышек хемилюминесценции (латентный период отсутствует) и увеличение интенсивности свечения по сравнению с контролем (рис. 7).

Следует отметить, что при изменении начальной концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$  в суспензии липосом можно наблюдать кинетики хемилюминесценции, схожие с кинетиками, регистрируемыми при добавлении хелаторов (рис. 8). Например, при концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , равной 7.5 мкМ, «быстрая» и «медленная» вспышки сливаются в

одну вспышку, тогда как при концентрациях 10 и 12.5 мкМ происходит их разделение. При этом время достижения максимальной интенсивности свечения меньше по сравнению с контролем (15 мкМ), а сама интенсивность свечения выше. Для сравнения: при концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , равной 25 мкМ, интенсивность «медленного» свечения уменьшалась на 25%, тогда как время достижения максимума хемилюминесценции увеличивалось (необходимо больше времени для окисления ионов  $\text{Fe}^{2+}$  до критической концентрации). Что касается непосредственно значения критической концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , то оно было определено с использованием подхода, предложенного в работе [13], и составило 9 мкМ (данные не представлены).

Влияние водных извлечений из мате на процесс ПОЛ в различных биологических объектах исследовано рядом авторов. Обнаружено, что последние ингибируют процесс перекисидации линолевой кислоты [4], ферментативное и неферментативное ПОЛ микросом печени крысы, ПОЛ мембран эритроцитов крысы, индуцированное пероксидом водорода [7]. Наши результаты свидетельствуют о том, что водное извлечение из мате ингибирует процесс  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного ПОЛ фосфолипидных липосом. Анализ изменений показателей хемилюминесценции липосом ( $I/I_0$  и  $T/T_0$ ) позволяет предположить, что наблюдаемый эффект обусловлен способностью некоторых биологически активных веществ мате (например кверцетина, рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот) перехватывать липидные радикалы и связывать ионы  $\text{Fe}^{2+}$ . Антиоксидантное действие этих БАВ на процесс ПОЛ, иници-

рованный *in vitro* ионами  $Fe^{2+}$ , было изучено в ряде работ. В частности, установлено торможение  $Fe^{2+}$ -индуцированного ПОЛ гомогенатов мозга крысы кверцетином и рутином [24], а микросом печени быка – хлорогеновой кислотой [25]. Показано ингибирование кофеиновой кислотой липидной перекисидации гомогенатов печени крысы в присутствии ионов  $Fe^{2+}$  и пероксида водорода (реактив Фентона) [26]. Авторы этих работ продемонстрировали наличие у кверцетина, рутина и кофеиновой кислоты не только антирадикальных свойств, но и способности связывать ионы  $Fe^{2+}$ , тогда как у хлорогеновой кислоты была выявлена способность образовывать комплексы с ионами  $Fe^{3+}$ .

Можно предположить, что при добавлении водного извлечения из мате к суспензии липосом входящие в их состав БАВ перераспределяются между водной и липидной фазой. БАВ, находящиеся в растворе, связывают ионы  $Fe^{2+}$ , вызывая эффекты, сходные с хелаторами. В то же время БАВ, встроившиеся в липосомальные мембраны, перехватывают липидные радикалы, действуя как цепь-обрывающие антиоксиданты. Из работы [13] следует, что главную роль в иницировании ПОЛ липосом играют ионы  $Fe^{2+}$ , которые связываются с поверхностью липидного бислоя. Нельзя исключить, что полифенольные соединения мате, встроившиеся в липидную фазу, способны оказывать влияние на каталитическую активность этих ионов. Вклад железосвязывающей активности в общий механизм антиоксидантного действия рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот в липосомальной модельной системе, по-видимому, больше, чем у кверцетина. Однако по сравнению с перечисленными веществами последний обладает наименьшим значением  $IC_{50}$ , что позволяет говорить о его более высокой антирадикальной активности.

Способность водных экстрактов мате оказывать антиоксидантное действие на процесс ПОЛ подтверждена в экспериментах на животных, например интактных мышцах [27], а также на моделях гиперхолестеринемии [28], иммобилизационного стресса [29], острого инфаркта миокарда [30]. В исследованиях с участием здоровых добровольцев установлено уменьшение содержания продуктов липидной перекисидации в плазме/сыворотке крови и повышение некоторых показателей антиоксидантной системы после продолжительного употребления водных извлечений из мате [31] или капсул, содержащих сухой экстракт мате, полученный на основе водного извлечения [32]. К настоящему времени на основании результатов многочисленных исследований сложилось мнение, что водные экстракты мате могут использоваться для профилактики и лечения за-

болеваний, сопровождающихся развитием оксидативного стресса [1].

Таким образом, нами показано ингибирующее действие водного извлечения из мате на процесс  $Fe^{2+}$ -индуцированной липидной перекисидации липосомальных мембран, которое определяется радикалперехватывающими и железохелатирующими свойствами входящих в его состав полифенольных соединений. Поскольку ионы  $Fe^{2+}$  рассматриваются в качестве одного из инициаторов оксидативного стресса *in vivo*, можно предположить, что защита экстрактами мате биологических мембран от свободнорадикального повреждения осуществляется с участием тех же механизмов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Gawron-Gzella, J. Chanaj-Kaczmarek, and J. Cielecka-Piontek, *Nutrients*, **13** (11), 3706 (2021).
2. A. T. Valduga, I. L. Gonçalves, E. Magri, and J. R. Delalibera Finzer, *Food Res. Int.*, **120**, 478 (2019).
3. S. Dudonné, X. Vitrac, P. Coutière, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **57** (5), 1768 (2009).
4. C. Anesini, S. Turner, L. Cogoi, and R. Filip, *LWT – Food Science and Technology*, **45**, 299 (2012).
5. Yu. O. Teselkin, I. V. Babenkova, L. A. Pavlova, et al., *Biophysics*, **66** (1), 125 (2021).
6. E. Rzaşa-Duran, A. Kryczyk-Poprawa, D. Drabicki, et al., *Antioxidants (Basel)*, **11** (2), 371 (2022).
7. G. R. Schinella, G. Troiani, V. Dávila, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269** (2), 357 (2000).
8. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39** (1), 44 (2007).
9. K. Jomova and M. Valko, *Toxicology*, **283** (2–3), 65 (2011).
10. H. Sies and D. P. Jones, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21** (7), 363 (2020).
11. Y. A. Hajam, R. Rani, and S. Y. Ganie, *Cells*, **11** (3), 552 (2022).
12. E. Gammella, S. Recalcati, and G. Cairo, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**, 8629024 (2016).

13. E. Driomina, V. Sharov, and Yu. A. Vladimirov, *Free Radic. Biol. Med.*, **15** (3), 239 (1993).
14. Y. A. Vladimirov, E. V. Proskurnina, and D. Yu. Izmailov, *Biophysics*, **56** (6), 1055 (2011).
15. S. Batzri and D. E. Korn, *Biochim. Biophys. Acta*, **298** (4), 1015 (1973).
16. Yu. A. Vladimirov and E. V. Proskurnina, *Biochemistry (Moscow)*, **74** (13), 1545 (2009).
17. K. A. Berté, M. R. Beux, P. K. Spada, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **59** (10), 523 (2011).
18. M. Bojić, V. Simon Haas, D. Sarić, and Z. Maleš, *J. Anal. Methods Chem.*, **2013**, 658596 (2013).
19. G. Jones, S. K. Goswami, H. Kang, et al., *Nanomedicine (Lond.)*, **15** (13), 1341 (2020).
20. D. Bellotti and M. Remelli, *Molecules*, **26** (11), 3255 (2021).
21. D. Yu. Yegorov, A. V. Kozlov, O. A. Azizova, and Yu. A. Vladimirov, *Free Radic. Biol. Med.*, **15** (6), 565 (1993).
22. Z. Cheng and Y. Li, *Chem. Rev.*, **107** (3), 748 (2007).
23. L. A. Romodin, *Acta Naturae*, **13** (3), 90 (2021).
24. A. O. Ademosun, G. Oboh, F. Bello, and P. O. Ayeni, *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, **21** (4), NP 11 (2016).
25. Y. Kono, S. Kashine, T. Yoneyama, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (1), 22 (1998).
26. T. C. Genaro-Mattos, Â. Q. Maurício, D. Rettori, et al., *PloS One*, **10** (6), 1 (2015).
27. F. Martins, A. J. Suzan, S. M. Cerutti, et al., *Br. J. Nutr.*, **101** (4), 527 (2009).
28. L. Bravo, R. Mateos, B. Sarriá, et al., *Fitoterapia*, **92**, 219 (2014).
29. A. C. Colpo, M. E. de Lima, M. Maya-López, et al., *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, **42** (11), 1172 (2017).
30. L. F. González Arbeláez, J. C. Fantinelli, A. Ciocci Pardo, et al., *Food Funct.*, **7** (2), 816 (2016).
31. R. L. Matsumoto, D. H. Bastos, S. Mendonça, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **57** (5), 1775 (2009).
32. A. M. Becker, H. P. Cunha, A. C. Lindenberg, et al., *Plant Foods Hum. Nutr.*, **74** (4), 495 (2019).

## **Inhibitory Effect of Aqueous Extract from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on the Process of Lipid Peroxidation of Liposomal Membranes**

**Yu.O. Teselkin\*, I.V. Babenkova\*, A.A. Kochetova\*, and A.N. Osipov\***

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

The effect of aqueous extract from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on the Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in phospholipid liposomal membranes was investigated. The process of lipid peroxidation in liposomes was explored based on the kinetic curves of chemiluminescent reactions in the presence of coumarin C-525. With increasing concentration of aqueous extract from yerba mate in the liposome suspension, a rise in the time period within which the “slow flash” of chemiluminescence reached its maximum value and a decrease of its intensity were observed. This indicates a decrease in the oxidation rate of Fe<sup>2+</sup> and a decrease in the rate forming lipid radicals, respectively. Similar results were obtained after addition of classical radical inhibitors butylhydroxytoluene and trolox to liposomes. However, unlike radical inhibitors, a further increase in the concentration of aqueous extract from mate in the liposomal suspension (more than 2.5 µg of dry plant raw material/ml) was accompanied by a gradual decrease in the time period within which the “slow flash” of chemiluminescence reached its maximum value, which was typical of the action of iron chelating agents (EDTA and deferoxamine) and caused by a decreased time of Fe<sup>2+</sup> oxidation to the critical concentration. It can be supposed that biologically active substances in the composition of aqueous extract from mate exhibit both their radical scavenging activity and iron binding ability. The effects of some polyphenolic compounds from the composition of aqueous extracts from mate (quercetin, rutin, chlorogenic acid and caffeic acid) on the Fe<sup>2+</sup>-induced liposome chemiluminescence were studied. It has been established that quercetin in a liposome-based model system acted as radical inhibitor. Our study showed that rutin, caffeic acid and chlorogenic acid exhibit a mixed type of action, they can act as radical scavengers and iron binding agents. Thus, inhibition of Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in biological membranes can be one of the mechanisms for antioxidant effects of yerba mate observed *in vivo*.

*Keywords: yerba mate, Ilex paraguariensis, liposomes, lipid peroxidation, iron ions, polyphenolic compounds, antioxidants, chemiluminescence*

## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АКУСТИЧЕСКОГО ПОЛЯ ДЛЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ КЛЕТКИ РЫБ В КРИОЗАЩИТНОМ РАСТВОРЕ ПРИ ЭКВИЛИБРАЦИИ

© 2022 г. Е.Н. Пономарева\*, \*\*, #, А.Н. Соловьев\*, \*\*\*, А.А. Матросов\*, В.А. Чебаненко\*\*,  
Д.А. Нижник\*, А.А. Егорова\*, \*\*\*, А.А. Красильникова\*, \*\*

\*Донской государственной технической университет, пл. Гагарина, 1, Ростов-на-Дону, 344010, Россия

#E-mail: kafavb@mail.ru

\*\*Южный научный центр РАН, просп. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006, Россия

\*\*\*Южный федеральный университет, ул. Мильчакова, 8а, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.

После доработки 21.04.2022 г.

Принята к публикации 26.05.2022 г.

Работа посвящена математическому моделированию акустических полей при применении пьезоактуаторов в технологии низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток осетровых рыб с интеллектуальным управлением процесса замораживания. Предложено воздействовать акустическим полем на репродуктивные клетки рыб на этапе эквilibрации после помещения их в криозащитную среду. Построена математическая модель пьезоактуатора, создающего акустическое поле, и с помощью конечно-элементного анализа выполнены численные эксперименты. В результате определены частоты резонанса и антирезонанса, коэффициент электромеханической связи, проанализированы распределения скоростей в объеме, занимаемом суспензией, найдены оптимальные характеристики пьезоактуатора, создающего акустическое поле.

*Ключевые слова:* пьезоактуатор, акустическое поле, криопротектор, эквilibрация, сперма рыб, метод конечных элементов.

DOI: 10.31857/S000630292204007X, EDN: ITDBRY

В настоящее время по данным Организации Объединенных Наций одним из глобальных вызовов человечеству является нехватка продовольствия [1, 2]. Около 30% населения Земли (более 2.3 миллиарда человек) лишены доступа к достаточному питанию, из них 0.8 миллиарда голодают [3]. Вкладом в эту борьбу является интенсивное развитие аквакультуры, в том числе разработка новых технологий низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток рыб и их внедрение в процессы искусственного воспроизводства рыбы с целью повышения продуктивности рыбоводческих хозяйств. Другой важной задачей современности является сохранение генетического разнообразия ценных видов рыб. Для решения этой задачи необходимо создавать криобанки, способные обеспечить сохранность криоконсервированных образцов половых клеток без потери их продуктивных качеств в течение нескольких десятилетий.

Основная проблема криоконсервации заключается в необходимости предохранения клеток от

повреждения при их замораживании. Для этого используют криопротекторы, призванные защитить клетку в процессе охлаждения и формирования кристаллов льда. Чтобы криопротектор быстрее проникал внутрь клетки, на этапе эквilibрации желательно увеличить проницаемость клеточных мембран. Такого эффекта можно достичь воздействием на клетку акустического поля определенной мощности и частоты [4]. Так, выживаемость сперматозоидов осетровых рыб после применения акустического воздействия в процессе эквilibрации увеличивается на 20% по сравнению со спермой, замороженной по традиционной методике [5]. Сперма такого качества в дальнейшем может быть использована для длительного хранения и последующего искусственного осеменения икры осетровых рыб.

Обзор мировой литературы, посвященной проблемам криоконсервации спермы, показал, что основными темами исследований являются разработка протоколов консервации, составов криопротекторов, коэффициентов разбавления, времени эквilibрации и др.

При этом в основном рассматриваются конкретные породы рыб или морских животных. Так

*Сокращения:* КЭМС – коэффициент электромеханической связи, АЧХ – амплитудно-частотная характеристика.

в работе [6] рассматривается текущее положение и будущие перспективы стандартизации применения криоконсервации спермы устриц. В работе [7] исследуются вопросы воздействия криопротекторов при криоконсервации на сперму каменной камбалы *Kareius bicoloratus*, в том числе рассматривается влияние коэффициента разбавления, времени эквilibрации и др.

В работе [8] описаны положительные результаты экспериментов по витрификации сперматозоидов двух видов рыб: пресноводного евразийского окуня *Perca fluviatilis* и морского европейского угря *Anguilla anguilla*. Приводится разработка протоколов витрификации, обсуждаются температурный режим, состав витрифицирующих растворов, коэффициенты разбавления и смежные вопросы. В работе [9] представлена разработка методов криоконсервации спермы у пехерей *Odontesthes bonariensis*. Обсуждаются вопросы состава и концентрации криозащитных сред. Впервые продемонстрирована возможность криоконсервации спермы пехерей с использованием простых протоколов.

В работе [10] описывается разработка открытого аппаратного 3D-печатного конвейерного устройства для непрерывной криоконсервации нестандартных образцов. В статье [11] описываются изменения параметров спермы самок рыбок мандаринок с измененным полом *Siniperca chuatsi* в процессе криоконсервации. Работа [12] посвящена обзору состояния криоконсервации аквариумных рыб. Проведено сравнение предложенных протоколов криоконсервации спермы аквариумных рыб. Подчеркивается важность искусственного оплодотворения для оценки жизнеспособности размороженной спермы.

Целью исследования [13] стала оценка различных протоколов криоконсервации спермы хиростомы *Chirostoma estor*. Сделан вывод о том, что при криозаморозке данного объекта могут использоваться коммерческие разбавители спермы МПП™ и Androstar Plus™ совместно с метилгликолем. В исследовании [14] авторы представили протокол криоконсервации спермы *Oryzias* в соломинках объемом 0.25 мл.

В работе [15] рассматривается использование для криоконсервации спермы карпа (*Cyprinus carpio*) разбавителя, содержащего 10% соевого лецитина и лишённого животных белков. Показано, что такой разбавитель обладает защитными свойствами, близкими по уровню к свойствам разбавителя на основе яичного желтка. Работы [16, 17] посвящены совершенствованию протокола криоконсервации спермы осетровых рыб, в том числе белуги (*Huso huso*), внесённой в Красную книгу.

Суммируя вышеописанные работы, можно сделать вывод, что клетки чаще всего заморажи-

вают с применением программируемых криозамораживателей до температуры жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) с применением солевых разбавителей; в качестве криопротекторов чаще всего используют метанол и диметилсульфоксид.

Одним из перспективных направлений криобиологических исследований является использование в технологии низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток новых физических методов, математического и компьютерного моделирования, что обеспечивает комплексный междисциплинарный подход к решению проблемы увеличения эффективности консервации. Следует подчеркнуть, что работы, посвященные воздействию полей различной физической природы на сперму осетровых рыб в процессе эквilibрации [4, 5], в частности акустических полей, практически отсутствуют.

Применение нового методологического подхода к методам длительного сохранения при низких температурах репродуктивного материала гидробионтов с применением акусто-механического воздействия, открывает большие возможности для создания новых эффективных биотехнологий.

Нами впервые предложено применение в технологии криоконсервации репродуктивных клеток рыб акусто-механического воздействия на замораживаемый материал, что, как мы предполагаем, позволит увеличить сохранность клеток во время двойного температурного шока. Основанием для применения акустических актуаторов в процессах криоконсервации клеток являются данные об увеличении проницаемости биологических мембран при воздействии ультразвука на клетки в суспензиях и биологические ткани [18, 19]. Применение ультразвука в криобиологии и криоконсервации подробно рассмотрено в работе [20]. В химиотерапии и биотехнологии используется эффект увеличения пассивной проницаемости мембран клеток в фазе разрежения под действием ультразвука [21].

Целью настоящей работы стало построение математической и компьютерной модели и лабораторной установки процесса акустического воздействия на смесь криозащитного раствора и спермы рыб, установления адекватности модели и проведения модельного эксперимента с фиксацией акустических полей в жидкости (в качестве жидкости в модельном эксперименте была выбрана вода, т.к. использование половых клеток связано с сезонными процессами), а также выбор оптимальных параметров конструкции, в смысле преобразования электрической энергии в механическую в окрестности первой изгибной моды плоского дна емкости, представляющей собой полупассивный биморф. Предполагается, что оптимальные амплитуда и частота воздействия мо-

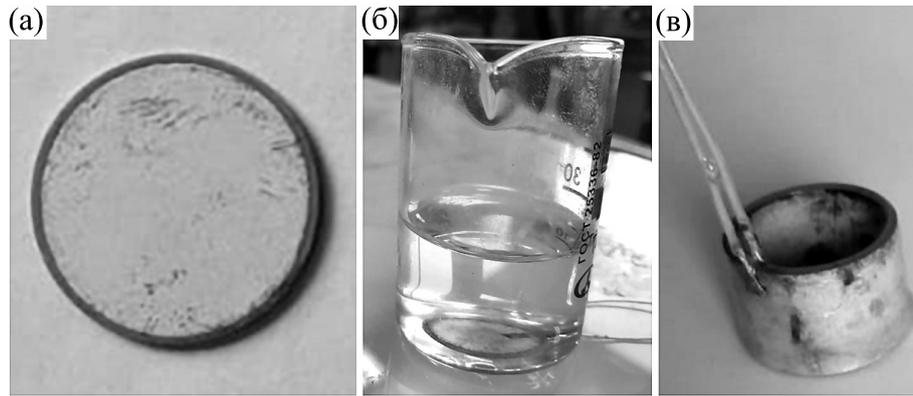


Рис. 1. Пьезоэлемент (а), собранная конструкция (б) и сенсор (в).

гут быть определены построением математической модели процесса.

### МЕТОДЫ

В работе выполнена целая серия численных экспериментов. При проведении расчетов использованы следующие материальные константы материалов: стакан – стекло (модуль Юнга 70 ГПа, коэффициент Пуассона 0.33, плотность 2700 кг/м<sup>3</sup>); пьезоэлемент – пьезокерамика PZT-4 (плотность 7500 кг/м<sup>3</sup>,  $c_{11}^E = 139$  ГПа,  $c_{12}^E = 77,8$  ГПа,  $c_{13}^E = 77,4$  ГПа,  $c_{33}^E = 115$  ГПа,  $c_{44}^E = 25,6$  ГПа,  $e_{31} = -5,2$  Кл/м<sup>2</sup>,  $e_{33} = 15,1$  Кл/м<sup>2</sup>,  $e_{15} = 12,7$  Кл/м<sup>2</sup>,  $\epsilon_{11}/\epsilon_0 = 730$ ,  $\epsilon_{33}/\epsilon_0 = 635$ ,  $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12}$  Ф/м) [22–24].

Акустической средой является криозащитный раствор, имеющий достаточно сложный состав. В него, исходя из расчета на 1 литр, входят следующие вещества [16, 17]: NaCl – 6.5 г/л; KCl – 0.25 г/л; CaCl<sub>2</sub> – 0.25 г/л; NaHCO<sub>3</sub> – 2 г/л; HCl в количестве, чтобы показатель кислотности (водородный показатель) pH равнялся 8.0; сахароза – 1,7 г; маннит – 1 г; яичный желток – 10%; диметилсульфоксид – 10%.

Для проверки предложенной модели, был проведен модельный натурный эксперимент, в котором возбуждение колебаний осуществляли пьезоэлементом с радиусом 0.01 м (рис. 1а), сосуд с приклеенным пьезоэлементом показан на рис. 1б. Для регистрации акустических волн в жидкости, в качестве которой в модельном эксперименте была выбрана вода, использовали пьезокерамический сенсор, представляющий собой полый цилиндр с радиальной поляризацией и электродированными цилиндрическими поверхностями (рис. 1в). Для изоляции сенсора от воды он был покрыт слоем эпоксидной смолы. Этот сенсор служил только для цели регистрации аку-

стических полей внутри стакана, в будущих экспериментах с раствором криоагента и половыми клетками его использование не предполагается в силу вышеописанных соображений стерильности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пьезоактуаторы – это специальные сверхпрецизионные короткоходные линейные электроприводы. Они преобразуют электрическую энергию в небольшое, но крайне точно контролируемое линейное перемещение с высоким развиваемым усилием. В основе принципа их действия лежит обратный пьезоэлектрический эффект, то есть механическая деформация кристалла (пьезокерамики) при воздействии на него электрического поля. При этом осуществляется возвратно-поступательное движение или другие его виды. Поскольку пьезокерамика является довольно хрупким материалом, плохо выдерживающим высокие нагрузки растяжения и сдвига, пьезоактуаторы изготавливают в корпусе для защиты от воздействия внешних сил, а также проникновения влаги и инородных частиц.

Математическая модель воздействия на репродуктивные клетки рыб при криоконсервации акустического поля, генерируемого пьезоактуатором, строится в рамках механики сплошной среды. Для этого используются уравнения механики деформируемого твердого тела (в частности, линейной теории упругости и электроупругости) и уравнения движения жидких и газообразных сред (в акустическом приближении) [25, 26]. Такая модель представляет собой начально-краевую задачу и в общем случае ее решение может быть построено только численно с использованием соответствующих программных комплексов конечно-элементного анализа.

Выпишем уравнения движения для упругой среды (в рамках линейной теории упругости), определяющие соотношения (закон Гука) и соот-

ношения Коши (для малых деформаций) соответственно [27]:

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \underline{\underline{\sigma}} + \underline{\underline{F}} &= \rho \underline{\underline{\dot{u}}}, \\ \underline{\underline{\sigma}} &= \underline{\underline{c}} \odot \underline{\underline{\varepsilon}}, \\ \underline{\underline{\varepsilon}} &= \frac{1}{2}(\nabla \underline{\underline{u}} + (\nabla \underline{\underline{u}})^T), \end{aligned} \quad (1)$$

где  $\underline{\underline{\sigma}}$  – тензор напряжений;  $\underline{\underline{\varepsilon}}$  – тензор деформаций;  $\underline{\underline{u}}$  – вектор перемещений;  $\underline{\underline{F}}$  – вектор плотности объемных сил;  $\underline{\underline{c}}$  – тензор (четвертого ранга) упругих модулей;  $\nabla$  – набла-оператор;  $\odot$  – операция полного скалярного умножения; верхним индексом «T» обозначена операция транспонирования.

Для пьезоэлектрической среды к уравнениям движения и соотношениям Коши в рамках линейной теории электроупругости добавляются уравнения электростатики и определяющие соотношения (уравнения состояния для предварительно поляризованной среды с независимыми переменными – компонентами тензора деформации и компонентами вектора напряженности электрического поля) соответственно [28]:

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \underline{\underline{\sigma}} + \underline{\underline{F}} &= \rho \underline{\underline{\dot{u}}}, \\ \nabla \cdot \underline{\underline{D}} &= 0, \\ \underline{\underline{\sigma}} &= \underline{\underline{c}} \odot \underline{\underline{\varepsilon}} - \underline{\underline{e}}^T \cdot \underline{\underline{E}}, \\ \underline{\underline{D}} &= \underline{\underline{e}} \odot \underline{\underline{\varepsilon}} + \underline{\underline{\varepsilon}}^S \cdot \underline{\underline{E}}, \\ \underline{\underline{\varepsilon}} &= \frac{1}{2}(\nabla \underline{\underline{u}} + \nabla \underline{\underline{u}}^T), \\ \underline{\underline{E}} &= -\nabla \varphi, \end{aligned} \quad (2)$$

где  $\underline{\underline{D}}$  – вектор электрической индукции,  $\underline{\underline{E}}$  – вектор напряженности электрического поля,  $\varphi$  – электрический потенциал,  $\underline{\underline{e}}$  – тензор (третьего ранга) пьезомодулей,  $\underline{\underline{\varepsilon}}^S$  – тензор (второго ранга) диэлектрических проницаемостей, измеренных при постоянной (нулевой) деформации.

Для акустической среды уравнения движения, уравнение неразрывности, определяющие соотношения и условие потенциальности поля скоростей соответственно [29]:

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \underline{\underline{\sigma}} &= \rho \underline{\underline{\dot{v}}}, \\ \nabla \cdot \underline{\underline{v}} + \frac{1}{\rho c^2} \dot{p} &= 0, \\ \underline{\underline{\sigma}} &= -\rho \underline{\underline{E}} + b \nabla \underline{\underline{v}}, \\ \underline{\underline{v}} &= \nabla \psi, \end{aligned} \quad (3)$$

где  $\rho$  – плотность акустической среды,  $c$  – скорость звука в акустической среде,  $p$  – звуковое

давление,  $\underline{\underline{v}}$  – вектор скорости,  $b$  – диссипативный коэффициент акустической среды,  $\psi$  – потенциал скоростей,  $\underline{\underline{E}}$  – единичный тензор.

Для корректной постановки задачи к системам уравнений (1)–(3) необходимо добавить граничные и начальные условия.

При определении механических граничных условий граница тела представляется в виде объединения непересекающихся областей  $S = S_u \cup S_\sigma \cup S_{u\sigma}$ , на которых задаются следующие условия ( $\underline{\underline{n}}$  – единичный вектор внешней нормали к поверхности):

– условие задания перемещений на границе тела:

$$\underline{\underline{u}}|_{S_u} = \underline{\underline{u}}^0 \quad (4)$$

и, в случае условия закрепления границы тела:

$$\underline{\underline{u}}|_{S_u} = 0;$$

– условие приложения внешней нагрузки интенсивности  $\underline{\underline{p}}^0$  к границе тела:

$$\underline{\underline{t}} = \underline{\underline{\sigma}} \cdot \underline{\underline{n}}|_{S_\sigma} = \underline{\underline{p}}^0 \quad (5)$$

– условие гладкого контакта рассматриваемого тела с абсолютно твердым телом – равенство нулю нормальных перемещений и касательных напряжений:

$$\begin{aligned} u_n &= \underline{\underline{u}} \cdot \underline{\underline{n}}|_{S_{u\sigma}} = 0, \\ \sigma_\tau &= \underline{\underline{\sigma}} \cdot \underline{\underline{n}} \cdot \underline{\underline{\tau}}|_{S_{u\sigma}} = 0. \end{aligned} \quad (6)$$

Последнее условие ставится также на оси симметрии при решении осесимметричной задачи.

Электрические краевые условия задаются на совокупности областей  $S = \bigcup_{m=1}^M S_{E_m} \cup S_D$ , на которых задаются следующие условия:

– условие на металлизированных поверхностях (электродах), когда задается известный электрический потенциал:

$$\varphi|_{S_{E_m}} = \varphi_m^0 = const; \quad (7)$$

– условие на неэлектропроводящих участках границы:

$$D_n|_{S_D} = \underline{\underline{D}} \cdot \underline{\underline{n}}|_{S_D} = 0. \quad (8)$$

(последнее условие также ставится на оси симметрии при решении осесимметричной задачи);

– условие для определения неизвестного электрического потенциала, которое формулируется дополнительно к условию (7) на электроде, включенному в электрическую цепь:

$$\int_{E_m} \dot{D}_n dS = I_m. \quad (9)$$

В частности, если электрод свободен, то заряд или ток в электрической цепи равны нулю ( $I_m = 0$ ).

Для формулировки граничных условий для акустической среды предположим, что акустическая среда заполняет объем  $\Omega_w$  с границей  $S_w = \partial\Omega_w$ . Разобьем  $S_w$  на четыре части:  $S_w = S_{wf} \cup S_{wc} \cup S_{wi} \cup S_{ws}$ . Будем считать, что граничная поверхность  $S_{wf}$  свободна,  $S_{wc}$  – жесткая стенка,  $S_{wi}$  – участок с заданным импедансным условием, а  $S_{ws}$  – часть границы, контактирующей с деформируемым твердым телом (упругим или пьезоэлектрическим). В этом случае соответственно имеем следующие граничные условия:

$$\begin{aligned} \underline{v} &= 0, \quad \mathbf{x} \in S_{wc}, \\ n_{wk} \sigma_{wkm} &= 0, \quad \mathbf{x} \in S_{wf}, \\ n_{wk} \sigma_{wkm} &= -Z v_m, \quad \mathbf{x} \in S_{wi}, \\ n_{wk} \sigma_{wkm} &= n_{wk} \sigma_{skm}, \quad \underline{v} = \dot{\underline{u}}, \quad \mathbf{x} \in S_{ws}, \end{aligned}$$

где  $n_{wk}$  – компоненты вектора внешней по отношению к объему  $\Omega_w$  единичной нормали к  $S_w$ ;  $Z$  – импеданс границы  $S_{wi}$ ;  $\sigma_{skm}$  – компоненты тензора напряжений  $\underline{\sigma}$  деформируемого тела.

Рассмотрим задачу определения оптимальных эффективных характеристик пьезоактуатора при его акустическом воздействии на репродуктивные клетки рыб на этапе эквilibрации.

Пьезоактуатор [30, 31] представляет собой круглую пластину диаметром 0.02 м. Пластина приклеена с внешней стороны по центру ко дну стандартного стеклянного лабораторного низкого градуированного стакана В-1-50ХС. Стакан имеет следующие размеры: объем 50 мл, диаметр  $38 \pm 1.0$  мм, высота  $70 \pm 2$  мм (ГОСТ 25336-82) [32, 33].

Суспензия спермы и криозащитной среды заполняет стакан примерно на одну треть его высоты и имеет температуру около 4°C. Эксперимент проводится при комнатной температуре.

Рабочим элементом пьезоактуатора является пьезоэлемент из пьезокерамики PZT-4 толщиной 0.003 м, предварительно поляризованной по толщине. Лицевые поверхности пьезоактуатора электродированы способом вжигания серебра и к ним подведены электрические провода. Толщиной нанесенных электродов пренебрегаем ввиду их малости. Внешняя поверхность электродов покрыта эпоксидной смолой толщиной 0.001 м, выполняющей роль защитного слоя.

По электрическим проводам на электроды подается переменная разность потенциалов по гармоническому закону с амплитудой  $V_0$ .

Дно стакана и пьезоэлемент образуют полупассивный биморф, поэтому приложении переменной разности потенциалов на электроды пьезоэлемента приводит к поперечным колебаниям дна емкости. Это вызывает установившиеся коле-

бания пьезоактуатора и соответственно стакана. Создаваемое акустическое поле в суспензии в свою очередь приводит к акустическому воздействию на репродуктивные клетки рыб. При этом рабочей частотой является первая частота изгибных колебаний дна емкости.

Задача решается в осесимметричной постановке.

Для решения сформулированной задачи акустоэластостатики (1)–(3) с граничными условиями (4)–(6) будем использовать метод конечных элементов в классической формулировке Лагранжа.

В работе был использован программный комплекс свободного программного обеспечения (free software) конечно-элементного анализа ACELAN [34, 35].

В связи с необходимостью моделировать связанные механические и электрические поля были использованы треугольные квадратичные конечные элементы. На рис. 2 представлены половина осевого сечения стакана с суспензией и пьезоэлементом и фрагмент сгенерированной конечно-элементной сетки, которая состоит из 2269 элементов, содержащих 1259 узлов. При проведении численных экспериментов конечно-элементную сетку сгущали до тех пор, пока результаты расчетов становились независимы от ее формы. Это позволило рассчитывать поле смещений и собственные резонансные частоты с точностью до четвертого знака.

Репродуктивные клетки соединяются с криозащитной средой. Размеры этих клеток достаточно малы по сравнению с длиной акустических волн. Поэтому полученная смесь криопротектора с репродуктивными клетками представляется однородной суспензией. Определение акустических параметров этой суспензии (плотности  $\rho$ , скорости звука  $c$ , диссипативного коэффициента  $b$ ) является дальнейшей самостоятельной экспериментальной задачей. В силу этого далее в работе в рамках поставленной задачи об определении оптимальных эффективных характеристик пьезоактуатора суспензия моделируется в первом приближении водой (плотность 1000 кг/м<sup>3</sup>, скорость звука 1500 м/с).

Первым шагом численного анализа является исследование эффективности возбуждения колебаний в зависимости от радиуса пьезоэлемента. Для этого для различных значений радиусов пьезоэлемента  $R$  проведен модальный анализ конструкции без суспензии. При этом найдены численные значения собственных частот резонанса  $f_r$  и антирезонанса  $f_a$ . Кроме того, вычислена величина коэффициента электромеханической связи (КЭМС), определенного через частоты резонанса

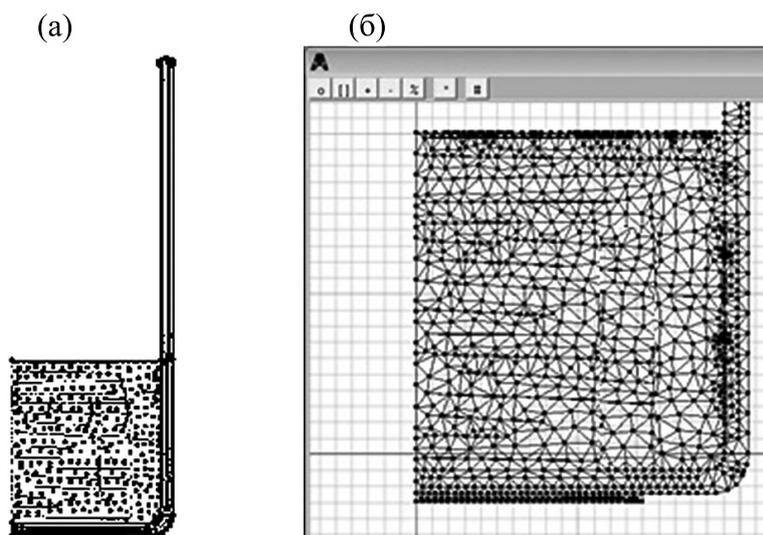


Рис. 2. Конечно-элементная сетка: (а) – половина осевого сечения стакана с суспензией и пьезоэлементом; (б) – фрагмент конечно-элементной сетки.

и антирезонанса [36, 37]:

$$k_{33}^2 = \frac{f_a^2 - f_r^2}{f_a^2}.$$

Зависимость частот резонанса и антирезонанса, а также КЭМС от радиуса пьезоэлемента представлена в табл. 1.

Зависимость собственных частот резонанса, антирезонанса от радиуса пьезоэлемента и КЭМС представлены также графически на рис. 3а и 3б соответственно.

Анализ результатов, представленных в табл. 1 и на рис. 3, показывает, что существует радиус пьезоэлемента  $R = 0.014$  м, при котором КЭМС принимает максимальное значение на первой изгибной моде. Таким образом, использование данного размера пьезоэлемента позволит наиболее

эффективно возбуждать акустические волны в суспензии.

Дальнейшее решение неоднородной задачи о возбуждении акустических волн в суспензии с помощью приложения гармонической разности потенциалов к электродам пьезоэлемента проведено именно для этого размера.

На рис. 4 представлены первая форма колебания (первая изгибная мода дна сосуда) и распределение смещений. Из этих рисунков следует, что на этой частоте интенсивно колеблется дно сосуда. В то же время цилиндрическая стенка сосуда находится в относительном покое.

При наличии жидкости (высота 0.021 м), которая моделирует раствор криоконсерванта и биологического материала (суспензии) и учета модельной диссипации по Релею собственная резо-

Таблица 1. Зависимость частот резонанса и антирезонанса, а также величины коэффициента электромеханической связи от радиуса пьезоэлемента

Радиус пьезоэлемента (м)	Частота резонанса (кГц)	Частота антирезонанса (кГц)	КЭМС
0.006	8.402	8.504	0.154
0.008	8.405	8.597	0.211
0.010	8.463	8.757	0.257
0.012	8.523	8.901	0.288
0.013	8.549	8.951	0.296
0.014	8.576	8.985	0.298
0.015	8.588	8.985	0.294
0.016	8.614	8.981	0.283
0.018	8.757	9.025	0.242

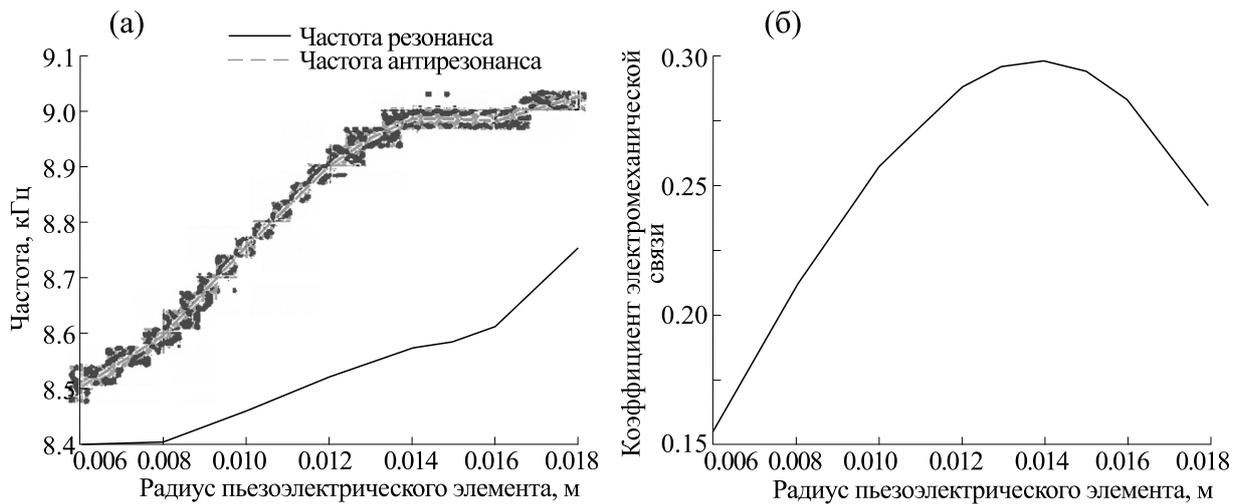


Рис. 3. Зависимости частот резонанса и антирезонанса (а) и коэффициента электромеханической связи (б) от радиуса пьезоэлемента.

нансная частота уменьшается и равна 6.075 КГц. Очевидно, что эта величина существенно зависит от объема жидкости. Так, на рис. 5 представлена амплитудно-частотная характеристика (АЧХ) осевого смещения центральной внутренней точки, расположенной на дне сосуда, в окрестности резонансной частоты первой изгибной моды.

На рис. 6 и 7 представлены соответственно АЧХ действительной и мнимой частей потенциала скоростей в той же точке, расположенной на

дне сосуда, в окрестности резонансной частоты первой изгибной моды.

На рис. 8 представлены распределения с изолиниями действительной и мнимой частей потенциала скоростей соответственно в области жидкости вблизи резонансной частоты первой изгибной моды.

На рис. 9 представлены соответственно распределение осевой и радиальной составляющей скорости вблизи резонансной частоты первой изгибной моды.

Наличие на последнем рисунке областей разной интенсивности свидетельствует о наличии положительной и отрицательной составляющей вертикальной и горизонтальной скорости. Это явление должно вызвать перемешивание суспензии внутри объема стакана.

На рис. 10а представлен сосуд с жидкостью и сенсором внутри, а на рис. 10б — осциллограммы электрического напряжения на актуаторе и на сенсоре. Таким образом, акустическое поле возбуждается в объеме жидкости, о чем свидетельствует принятый сигнал на сенсоре.

Частота резонанса первой изгибной моды, рассчитанная на основе описанной выше конечно-элементной модели, составила 5.755 кГц. В эксперименте резонанс наблюдался на частоте 5.960 кГц, разница с теоретической частотой составила 3.4%. Следовательно, построенная теоретическая модель является адекватной и может быть использована при оценке акустического воздействия на биологический материал в растворе криоконсерванта.

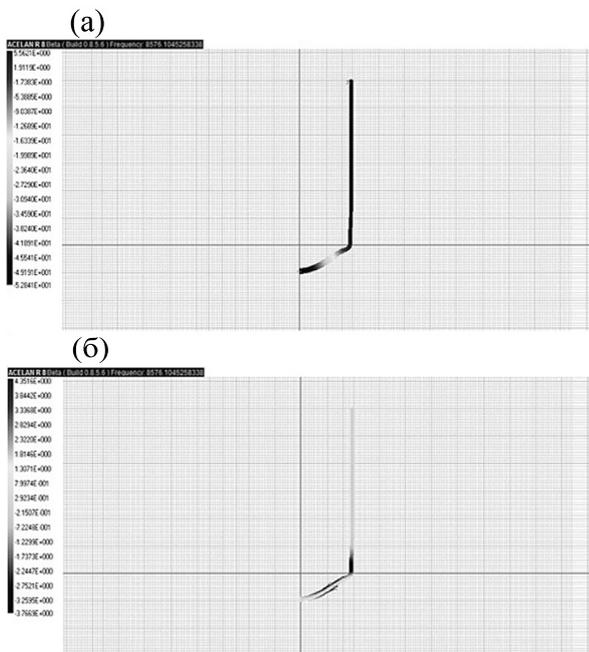


Рис. 4. Распределение смещений на первой моде: (а) — осевое смещение, (б) — радиальное смещение.

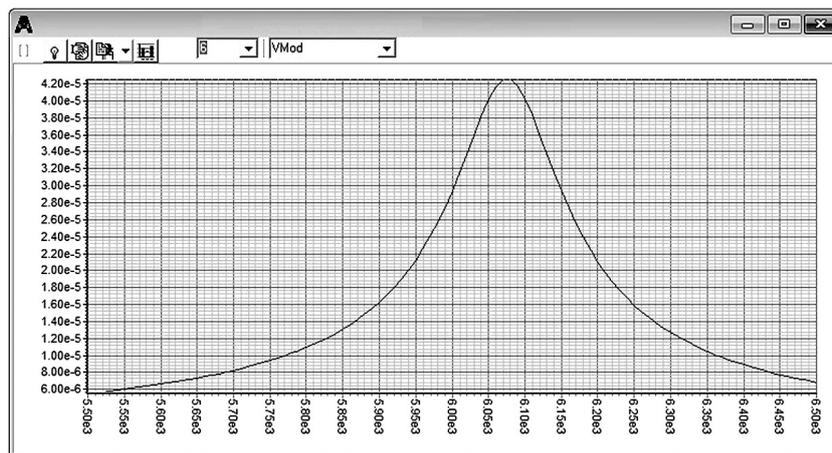


Рис. 5. АЧХ осевого смещения центральной внутренней точки.

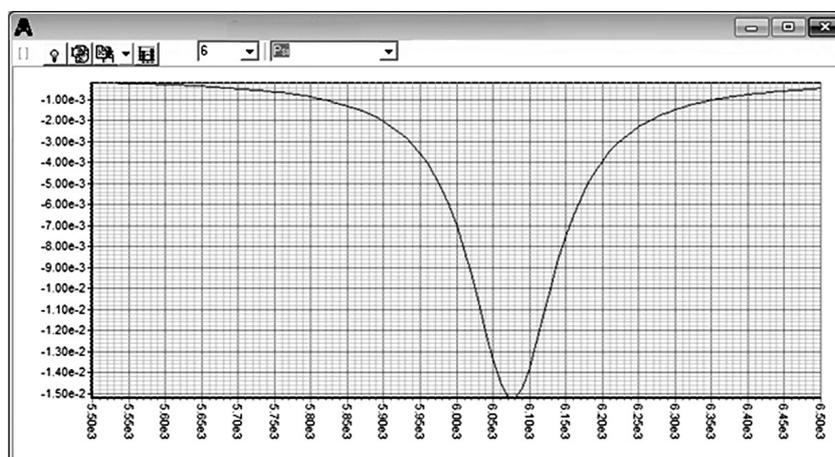


Рис. 6. АЧХ действительной части потенциала скоростей центральной внутренней точки.

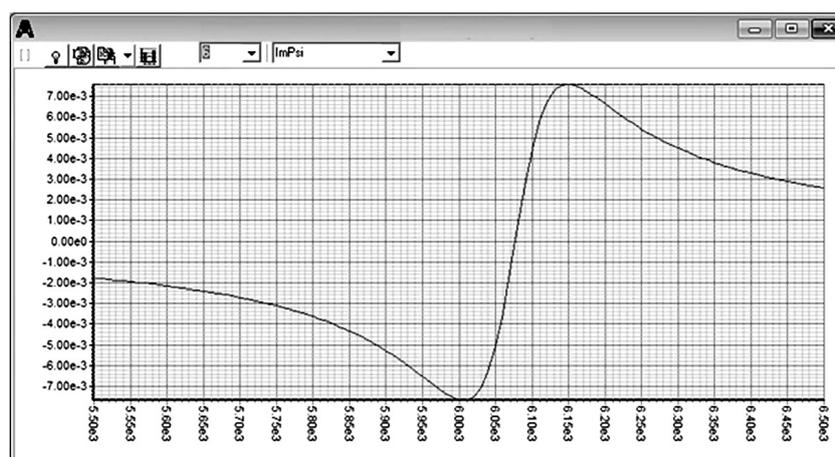


Рис. 7. АЧХ мнимой части потенциала скоростей центральной внутренней точки.

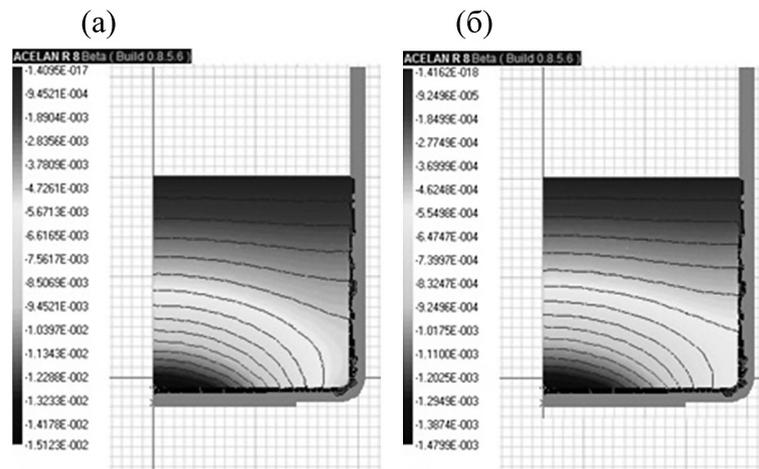


Рис. 8. Распределение потенциала скоростей в жидкости: (а) — действительная часть; (б) — мнимая часть.

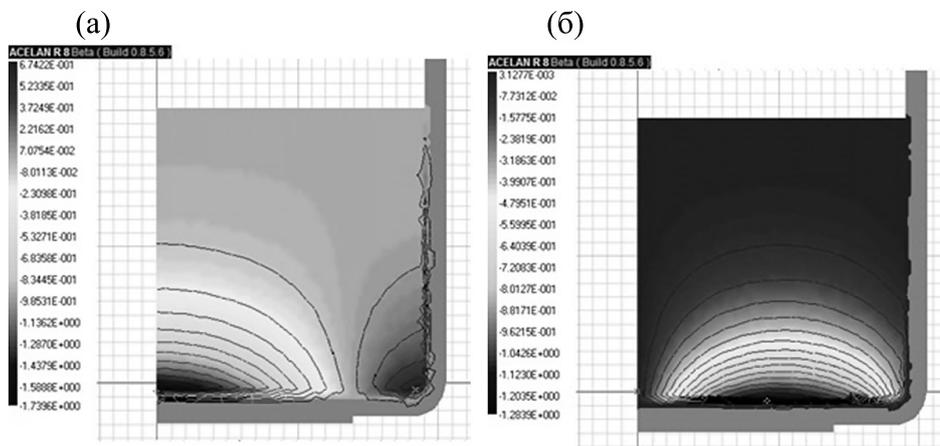


Рис. 9. Распределение скорости вблизи резонансной частоты первой изгибной моды: (а) — осевая составляющая; (б) — радиальная составляющая.

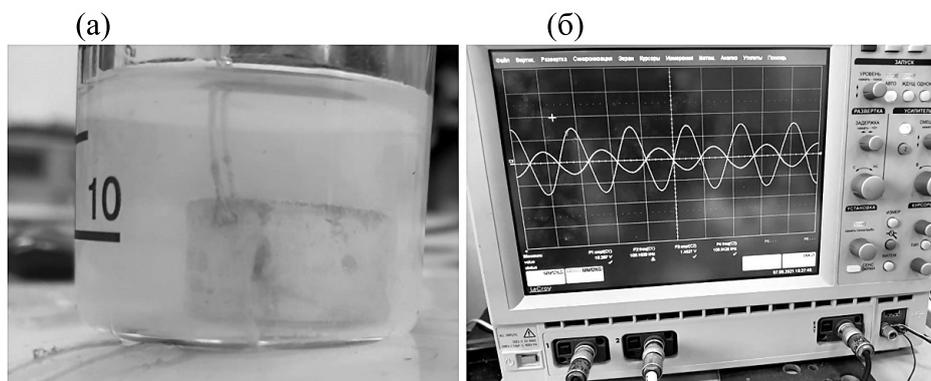
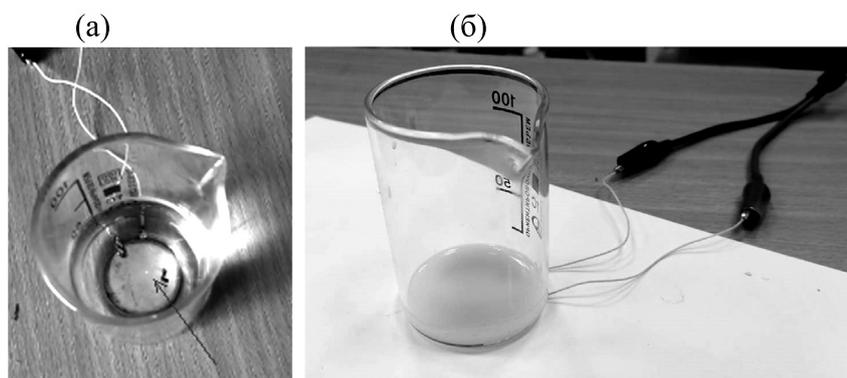


Рис. 10. Сенсор в жидкости (а), осциллограмма электрических потенциалов (б).



**Рис. 11.** Конструкция с пьезоэлементом. Стрелка указывает на светлый кружок – пузырек кавитации (а), криоагент с половыми клетками в лабораторном стакане с пьезоэлементом (б).

Следует отметить, что при увеличении напряжения на пьезоэлементе на резонансной частоте 5.8 кГц, в центре жидкости наблюдался пузырек кавитации (рис. 11а), влияние которого на процесс эквilibрации является предметом отдельного исследования. В эксперименте с раствором криосреды с половыми клетками (рис. 11б), жидкость занимает весьма незначительный объем стакана, поэтому процессы ее перемешивания по глубине не важны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе выполнено математическое и экспериментальное моделирование применения пьезоактуаторов в акустическом воздействии на криозащитную среду с репродуктивными клетками рыб, которая моделируется акустической средой, на этапе эквilibрации. Построена математическая модель пьезоактуатора, создающего акустическое поле в рамках краевой задачи для составного упругого, электроупругого и акустического тела. Эта задача решается методом конечных элементов. В численных экспериментах на основе определенных частот резонанса и антирезонанса найдены оптимальные геометрические параметры пьезоактуатора, проанализировано распределение скоростей в акустической среде.

Проведен натурный эксперимент, в котором пьезоэлектрический сенсор регистрировал акустическое поле в жидкости, возбуждаемое пьезоактуатором. Этот эксперимент показал адекватность построенной теоретической модели и численных расчетов, разница в определении резонансной частоты составила 3.4%.

Анализ численных результатов, представленных на рис. 4–9, показывает, что в объеме жидкости эффективно возбуждается акустическое поле на первой изгибной моде. Однако это поле не является однородным, о чем свидетельствует распределение скоростей внутри жидкости. Поэтому

в процессе акустического воздействия имеет смысл использовать перемешивание раствора. В то же время наличие участков с интенсивной положительной и отрицательной составляющей вертикальной скорости, возможно, автоматически приведет к процессу перемешивания.

Таким образом, в технологии низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток рыб на этапе эквilibрации представляется целесообразным использование пьезоактуаторов на первой изгибной моде.

В дальнейшем в отдельном исследовании планируется экспериментально исследовать особенности проникновения элементов криоагента через клеточную мембрану.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-16-00118.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/hunger/>
2. <https://www.wfp.org/>
3. *Global Report on Food Crises* (Food Security Information Network, WFP, 2021). <https://docs.wfp.org/api/documents/WFP-0000127343/download/>
4. Е. Н. Пономарёва, М. М. Богатырёва и А. М. Тихомиров, Докл. РАН, **431** (2), 264 (2010).
5. Е. Н. Пономарёва, А. М. Тихомиров, М. М. Богатырёва и др., Патент 2009115035/12 (2009).
6. M. Mahbul Hassan, J. G. Qin, and X. Li, *Aquaculture*, **438**, 24 (2015).
7. Y. Ho Leea, J. Yeol Parka, I. Young Leeb, et al., *Aquaculture*, **531**, 735969 (2021).
8. E. Kása, G. Bernáth, T. Kollár, et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **245**, 102 (2017).
9. G. Lichtenstein, M. Elisio, and L. A. Miranda, *Aquaculture*, **306**, 357 (2010).
10. Y. Liu, M. Eskridge, A. Guitreau, et al., *Aquacult. Engineer.*, **95**, 102202 (2021).
11. Sh. Liu, G. Wang, Z. Chen, et al., *Theriogenology*, **133**, 22 (2019).
12. H. Yang and T. R. Tiersch, *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, **149**, 224 (2009).
13. N. C. Motta, G. J. Machado, I. S. Ferreira, et al., *Cryobiology*, **103**, 81 (2021).
14. H. Yang, M. Norris, R. Winn, and T. R. Tiersch, *Cryobiology* **61** (2), 211 (2010).
15. C. Yildiz, Y. Bozkurt, and I. Yavas, *Cryobiology*, **67** (1), 91 (2013).
16. V. P. Osipova, M. N. Kolyada, N. T. Berberova, et al., *Cryobiology* **69** (3), 467 (2014).
17. М. М. Богатырёва, *Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб* (Астрахань, 2010).
18. A. R. Williams, *Ultrasound: biological effects and potential hazards* (Acad. Press, 1983).
19. *Применение ультразвука в медицине. Физические основы*, Под ред. К. Хилла (Мир, М., 1989).
20. В. Б. Акопян и Ю. А. Ершов, *Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами* (МГТУ им. Н.Э. Баумана, М., 2005).
21. А. И. Журавлев, *Биофизическая и радиационная экология* («Белые альвы», М., 2012).
22. T. Ogawa, *Piezoelectric Materials* (Springer, 2016).
23. <https://www.americanpiezo.com/>
24. *Handbook of Advanced Dielectric, Piezoelectric and Ferroelectric Materials*, Ed. by Z.-G. Ye (Woodhead Publ., 2008).
25. T. M. Atanackovic and A. Guran, *Theory of Elasticity for Scientists and Engineers* (Birkhäuser, Basel, 2000).
26. R. B. Hetnarski and J. Ignaczak, *The Mathematical Theory of Elasticity* (CRC Press, 2013).
27. A. I. Lurie. *Theory of Elasticity (Foundations of Engineering Mechanics)* (Springer, 2005).
28. J. Yang, *An Introduction to the Theory of Piezoelectricity* (Springer, 2018).
29. R. N. Miles, *Physical Approach to Engineering Acoustics* (Springer Int. Publ., 2020).
30. S. N. Shevtsov, A. N. Soloviev, I. A. Parinov, et al., *Piezoelectric Actuators and Generators for Energy Harvesting* (Springer, 2018).
31. S.-B. Choi and Y.-M. Han, *Piezoelectric Actuators: Control Applications of Smart Materials* (CRC Press, 2010).
32. <https://www.chemical.ru/>
33. <https://minimed.ru/>
34. A. Belokon, V. Eremeyev, A. Nasedkin, et al., *J. Appl. Math. Mechanics*, **64** (3), 367 (2000).
35. A. Belokon, A. Nasedkin, and A. Solovyev, *J. Appl. Math. Mechanics*, **66** (3), 481 (2002).
36. D. J Griffiths, *Introduction to Electrodynamics* (Pearson/Addison-Wesley, 1999).
37. K. Ch. Kao, *Dielectric Phenomena in Solids* (Acad. Press, 2004).

## Mathematical Simulation of Acoustic Effect on Cryoprotector with Fish Sperm at Equilibration

**E.N. Ponomareva\*., \*\*, A.N. Soloviev\*., \*\*\*, A.A. Matrosov\*, V.A. Chebanenko\*\*., D.A. Nizhnik\*, A.A. Egorova\*., \*\*\*, and A.A. Krasilnikova\*., \*\***

\*Don State Technical University, pl. Gagarina 1, Rostov-na-Donu, 344010 Russia

\*\*Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova, 41, Rostov-na-Donu, 344006 Russia

\*\*\*Southern Federal University, ul. Milchakova 8a, Rostov-na-Donu, 344090 Russia

The work is devoted to mathematical modeling of application of piezoactuators in technology of low-temperature preservation of reproductive cells of sturgeon fish with intelligent control of freezing process. Precisely, after placing fish reproductive cells in the cryoprotective medium at the equilibration stage, they are exposed to an acoustic field. The work builds a mathematical model of a piezoactuator that creates an acoustic field. Numerical experiments were performed using finite element analysis. As a result, resonance and antiresonance frequencies, electromechanical coupling coefficient were determined, velocity distributions in the volume occupied by the suspension were analyzed, optimal characteristics of the piezoactuator creating the acoustic field were found. A full-scale experiment was also conducted.

*Keywords: piezoactuator, acoustic impact, cryoprotector, balancing, fish sperm, finite element method*

УДК 577/591.3

## ЯЙЦЕКЛЕТКИ СЕРЫХ МОРСКИХ ЕЖЕЙ *Strongylocentrotus intermedius* КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ И ИСТОЧНИК ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

© 2022 г. Л.И. Крамарова\*, #, Р.Х. Зиганшин\*\*, В.К. Утешев\*\*\*,  
Т.В. Крамарова\*, Э.Н. Гахова\*\*\*.##

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
ул. Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: luda\_kramarova@rambler.ru

\*\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

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

##E-mail: gakhova@gmail.com

Поступила в редакцию 06.02.2022 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принята к публикации 19.04.2022 г.

Интенсивный поиск факторов, способных индуцировать и/или регулировать процесс перехода к состоянию временной, пониженной жизнедеятельности различных организмов, ведется в течение многих десятилетий. В работе изучены гипометаболические свойства фракций уксуснокислого экстракта с молекулярной массой  $\leq 1$  кДа,  $1-10$  кДа и  $\geq 10$  кДа, полученных из яйцеклеток серых морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* и мозга зимоспящих сусликов *Spermophilus undulates*. Найдено, что вещества, содержащиеся во фракции с молекулярной массой  $1-10$  кДа, выделенной из неоплодотворенных яйцеклеток морских ежей, в дозе 0.05 (весовых эквивалентах ткани)/мл морской воды замедляли развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей на 5–6 стадий через 40 ч после оплодотворения по сравнению с контролем. Аналогичная фракция с молекулярной массой  $1-10$  кДа, выделенная из мозга сусликов в состоянии спячки, обладала более мощным гипометаболическим эффектом и в дозе 0.05 (весовых эквивалентах ткани)/мл морской воды через 40 ч после оплодотворения яйцеклеток морских ежей замедляла их развитие на 15–16 стадий по сравнению с контролем. Эта же фракция из мозга летне-активных животных или из оплодотворенных яйцеклеток морских ежей не влияла на развитие оплодотворенных яйцеклеток. Мы полагаем, что клетки организмов в состоянии пониженной жизнедеятельности способны синтезировать гипометаболические вещества, которые могут участвовать в индукции и/или регуляции состояния гипобиоза даже у эволюционно далеких видов животных.

*Ключевые слова:* яйцеклетки морских ежей, гипометаболические факторы, гипобиоз, мозг зимоспящих сусликов.

DOI: 10.31857/S0006302922040081, EDN: ITDGZI

Поиск эндогенных веществ, способных регулировать процессы инициации и вхождения в состояние временной пониженной жизнедеятельности (гипобиоз/гипометаболизм/оцепенение) у различных животных и человека, является одним из приоритетных направлений в области современной медицины и биологии.

*Сокращения:* взт — весовой эквивалент ткани; МСС (1-10) — фракция экстракта с молекулярной массой  $1-10$  кДа, полученная из мозга сусликов в состоянии спячки; НЯМЕ (1-10) — фракция с молекулярной массой  $1-10$  кДа, выделенная из неоплодотворенных яйцеклеток морских ежей.

Внимание ученых многих стран привлекли зимоспящие животные (суслики, сурки, сони, бурндуки, хомяки и др.), которые во время переживания неблагоприятных условий окружающей среды (низкие температуры, отсутствие воды и пищи), способны к избирательному и активно контролируемому подавлению многих физиологических функций организма: угнетению общего метаболизма, снижению частоты сердечных сокращений и температуры тела, изменению активности нейронов [1–5]. В тканях зимоспящих животных во время гибернации резко снижена пролиферативная активность клеток [6–8].

На протяжении последних десятилетий были предприняты попытки выделения и идентификации факторов из различных тканей гетеротермных животных, которые могли бы у гомойотермных и гетеротермных животных индуцировать состояние гипобиоза или вызывать отдельные его проявления. Основанием для многих подобных работ явилась гипотеза Г. Свона [9, 10], предположившего, что явление оцепенения в природе — сложившаяся в процессе эволюции универсальная стратегия регуляции метаболизма для выживания организмов и, следовательно, не должно быть видовой специфичности факторов, вызывающих это состояние. Накопившиеся данные о значительной роли регуляторных пептидов в индукции и поддержании состояния зимнего оцепенения, а также сезонная динамика их содержания в тканях, явились причиной выделения пептидных фракций из тканей животных, находящихся в состоянии гипобиоза [11–16].

Ранее мы сообщали о выделении низкомолекулярной пептидной фракции уксуснокислого экстракта (молекулярная масса 1–10 кДа) кишечника и мозга зимоспящих сусликов различных видов и ее гипометаболическом-гипотермическом действии при введении гомойотермным животным [17, 15]. Факторы, входящие в состав данной фракции, инициировали снижение уровней различных физиологических процессов у организмов, эволюционно значительно удаленных друг от друга. К примеру, вещества, содержащиеся во фракции кишечника зимоспящих сусликов, влияли на клеточный цикл плазмодия истинного миксомицета (*Physarum polycephalum*) и подавляли его двигательную активность [18]. Исследование влияния подобных факторов на работу изолированного сердца лягушки (*Rana temporaria*) выявило их дозозависимое ингибирующее действие вплоть до полной остановки сердца [19].

Было продемонстрировано, что подобные биологически активные факторы синтезируются у рыб в состоянии оцепенения и у генотипически адаптированной якутской лошади [9, 15]. В связи с этим мы провели работу по получению аналогичных факторов из яйцеклеток морских ежей, которые, по нашему предположению, в период перед оплодотворением находятся в состоянии пониженной жизнедеятельности и, возможно, синтезируют гипометаболические факторы.

Основным лимитирующим фактором поиска гипометаболических-гипотермических факторов является необходимость расходования большого количества выделяемых веществ на промежуточных стадиях очистки в тестах на лабораторных животных. Одним из путей преодоления этого

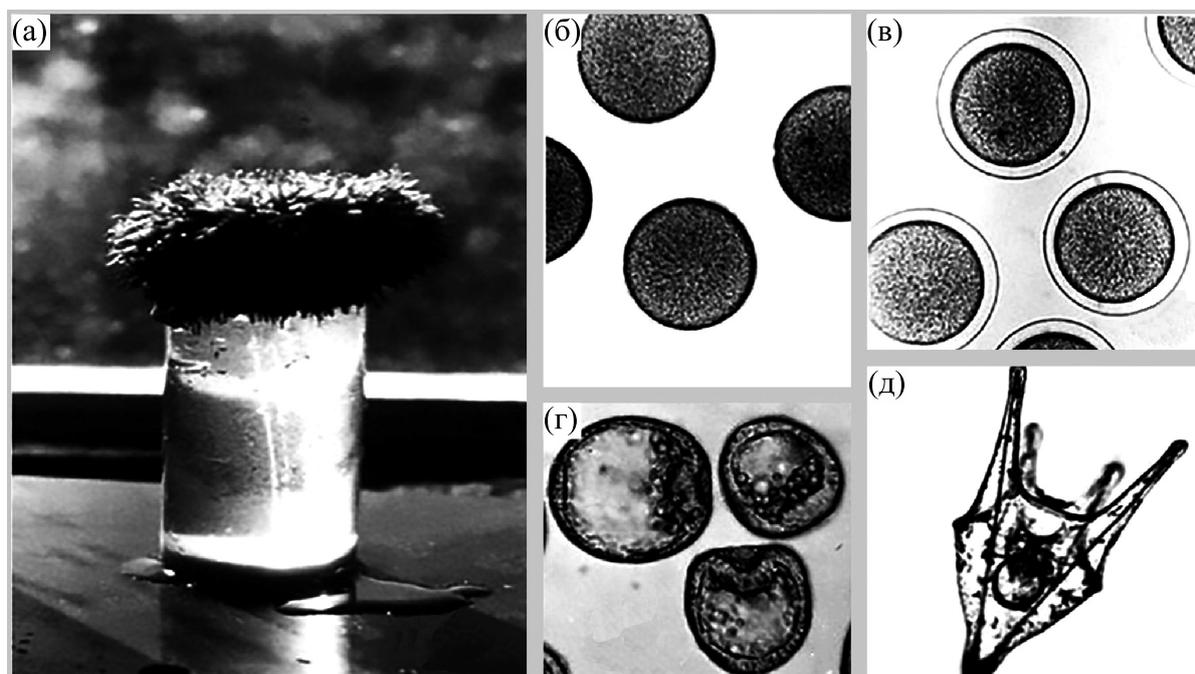
ограничения может быть использование различных клеточных процессов для оценки влияния выделяемых факторов. Оплодотворенные яйцеклетки морских ежей — необычайно удобный тест-объект благодаря хорошей проницаемости мембраны, высокой биологической чувствительности, простоте инкубации зародышей в естественной для них среде и легкости прижизненных наблюдений, поскольку нормальный эмбриогенез зародышей детально описан. Большим преимуществом является тот факт, что с момента оплодотворения начинается формирование и развитие яйцеклетки как организма [20, 21].

В данной работе мы выделили пептидные фракции с молекулярным весом  $\leq 1$  кДа, 1–10 кДа и  $\geq 10$  кДа, из оплодотворенных и неоплодотворенных яйцеклеток серых морских ежей и из мозга зимоспящих сусликов, находящихся в состоянии спячки и летне-активном состоянии. Далее было проведено сравнение действия выделенных фракций на развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Источник ткани.** Серые морские ежи (*Strongylocentrotus intermedius*) были отловлены в сезон их размножения в заливе Петра Великого (Японское море) на биологической станции «Витязь» ДВНЦ РАН (рис. 1). Неоплодотворенные яйцеклетки и сперму получали путем электрического раздражения животного (постоянный ток, 10 В) и многократной смены морской воды для получения только зрелых яйцеклеток (~95%) (рис. 1б). Полученные яйцеклетки оплодотворяли добавлением нескольких капель разбавленной спермы (рис. 1в). В пределах одного эксперимента использовали один образец спермы с наиболее подвижными сперматозоидами в конечной концентрации ~1:60000. Собранные оплодотворенные яйцеклетки, которые прошли несколько начальных стадий развития, и неоплодотворенные яйцеклетки немедленно замораживали в жидком азоте.

Суслики (*Spermophilus undulatus*) были отловлены в Якутии в августе месяце, перевезены в Институт биофизики клетки РАН (Пушино, Московская область) и помещены в индивидуальные клетки при температуре окружающей среды 15–20°C. Пищу, воду и гнездовой материал животные получали в достаточном количестве. В ноябре месяце все животные были перенесены в темную комнату с температурой 2–4°C. Целый мозг от активных животных забирали в июле, от спящих животных — в январе-феврале (на третий-пя-



**Рис. 1.** Морские ежи (*S. intermedius*): (а) — получение яйцеклеток морских ежей; (б) — (д) — стадии развития яйцеклеток: (б) — неоплодотворенные яйцеклетки морских ежей, (в) — оплодотворенные яйцеклетки, (г) — стадия бластулы, (д) — стадия плутеус I.

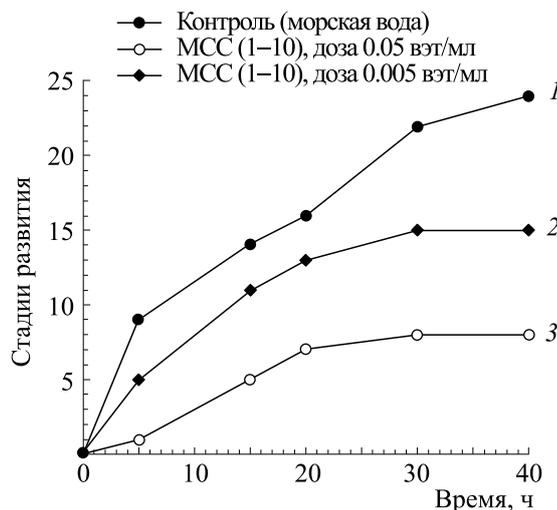
тый день баута спячки). Животных забивали декапитацией, мозг быстро извлекали и замораживали в жидком азоте. Весь процесс от декапитации до замораживания занимал от 60 до 90 с.

#### **Выделение биологически активных фракций.**

Выделение экстрактов и фракций с молекулярной массой  $\leq 1$  кДа, 1–10 кДа и  $\geq 10$  кДа проводили по методике, описанной ранее и модифицированной нами [15, 22]. Для удаления липидного материала замороженные яйцеклетки или мозг переносили в ацетон при температуре  $-10^\circ\text{C}$ . Отношение веса сырого материала к объему ацетона составляло 1 : 10. Биоматериал в ацетоне гомогенизировали при 14000 об/мин в течение одной минуты в гомогенизаторе типа «Polytron». Гомогенат центрифугировали 15 мин при 3000 g и температуре  $4^\circ\text{C}$ . Супернатант отбрасывали, к осадку добавляли свежую порцию ацетона, гомогенизировали и центрифугировали при тех же условиях. Для более полной экстракции липидного материала обработку ацетоном проводили трижды. Осадок после центрифугирования лиофильно высушивали и хранили при температуре жидкого азота ( $-196^\circ\text{C}$ ). К ацетоновому порошку добавляли 1 M уксусную кислоту (из расчета 30 мл раствора на 1 г ацетонового порошка), смесь гомогенизировали и затем кипятили на водяной бане 30 мин

при  $95^\circ\text{C}$ . Далее смесь охлаждали и центрифугировали 1 ч при 40000 g. Затем супернатант фракционировали ультрафильтрацией на фильтре РМ-10 (Amicon, США), который задерживает вещества с молекулярной массой  $\geq 10$  кДа. Фильтрат фракционировали на фильтре UM-2 (Amicon, США), который задерживает вещества с молекулярной массой  $\geq 1$  кДа. Такое последовательное фракционирование уксуснокислого экстракта позволяет получить три фракции, содержащие вещества с различными молекулярными массами: 1)  $\geq 10$  кДа, 2) 1–10 кДа, 3)  $\leq 1$  кДа. Используемый метод экстракции биологически активных факторов обеспечивает хороший выход пептидных фракций, относительно свободных от жиров и белков.

**Тестирование фракций.** Все испытуемые фракции были растворены в фильтрованной морской воде, тщательно размешаны и отцентрифугированы (5 мин, 3000 g при  $4^\circ\text{C}$ ). Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость в соответствующих дозах добавляли в инкубационную среду (морская вода) с дозированным количеством яйцеклеток ( $\sim 100$  яйцеклеток на 1 мл инкубационной среды) немедленно после оплодотворения. Количество добавляемых фракций выражали в весовых эквивалентах ткани (вЭТ) на мл морской воды. Один весовой эквивалент ткани равен количеству



**Рис. 2.** Развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей под действием фракции МСС (1-10), в дозах 0.05 вэт/мл морской воды (кривая 3) и 0.005 вэт/мл морской воды (кривая 2). В качестве контроля были взяты оплодотворенные яйцеклетки, развивающиеся в морской воде (кривая 1). На графике представлено развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей, полученных в одном эксперименте ( $n = 7$ ).

биологически активного материала, выделяемого из одного мозга взрослого животного (сырой вес 5 г) или из равного этому весу яйцеклеток морских ежей. Длительность эксперимента составляла ~40 ч при 18–20°C. Оценку действия фракций проводили непрерывно до 10-й стадии развития яйцеклеток в контроле (стадия бластулы по классификации Бузникова [20]), а затем через каждые 15, 20, 30 и 40 ч. В качестве контроля использовали оплодотворенные яйцеклетки морского ежа, развивающиеся в морской воде. Наблюдения проводили с помощью оптического микроскопа Биолам (ЛОМО, Санкт-Петербург).

Необходимо отметить, что после получения половых продуктов морские ежи возвращались в естественную среду обитания. Для тестирования каждой из фракций были взяты семь самок для получения неоплодотворенных яйцеклеток и семь самцов для получения спермы; каждый эксперимент был проведен в трех повторах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

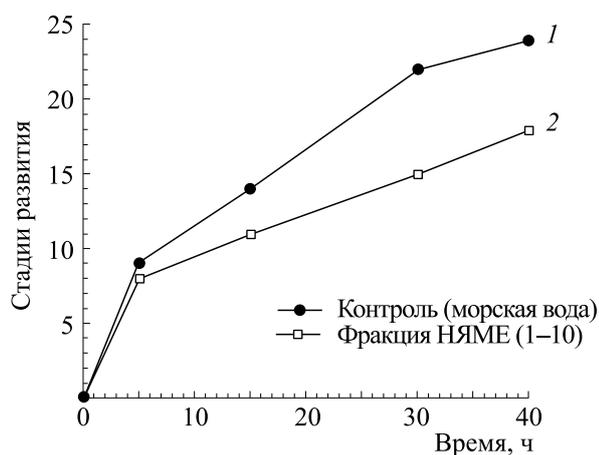
**Гипометаболические факторы из мозга сусликов.** Были выделены три фракции с различной молекулярной массой  $\leq 1$  кДа, 1–10 кДа и  $\geq 10$  кДа) из уксуснокислых экстрактов мозга сусликов, находившихся в состоянии спячки и летне-активном состоянии, и изучено их влияние на развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей.

Было показано, что только фракция 1–10 кДа, полученная из мозга сусликов в состоянии спяч-

ки (МСС (1-10)), обладала способностью замедлять развитие зародышей морских ежей (рис. 2). Из рис. 2 видно, что фракция МСС (1-10) в дозе 0.05 вэт/мл морской воды вызывала сильное замедление в развитии оплодотворенных яйцеклеток, которые через 20 ч находились на стадии восьми бластомеров, а через 40 часов — на стадии ранней бластулы. Через 40 ч отставание в развитии зародышей морских ежей составляло 16 стадий относительно контроля. Необходимо отметить, что фракция 1–10 кДа из мозга активных животных в дозе 0.05 вэт/мл морской воды не вызывала замедления развития оплодотворенных яйцеклеток. Данная доза была взята нами на основании предварительных экспериментов на белых мышах, где был продемонстрирован мощный гипометаболический-гипотермический эффект при внутрибрюшинном введении МСС (1-10) в дозе 0.05 вэт/г веса животного.

Фракция МСС (1-10) в дозе 0.005 вэт/мл морской воды (рис. 2, кривая 2) обладала гораздо меньшим ингибирующим эффектом и через 20 ч яйцеклетки находились на стадии поздней бластулы; через 40 ч — на стадии ранней гастролы.

**Гипометаболические факторы из яйцеклеток морских ежей.** Мы сравнили эффект низкомолекулярных фракций с различной молекулярной массой (1–10 кДа,  $\geq 10$  кДа и  $\leq 1$  кДа), выделенных из уксуснокислого экстракта оплодотворенных и неоплодотворенных яйцеклеток серых морских ежей, на развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей этого же вида (рис. 3).



**Рис. 3.** Развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей в отсутствие (контроль, кривая 1) и в присутствии фракции НЯМЕ (1-10) в дозе 0.05 вэт/мл морской воды (кривая 2). В качестве контроля использовали оплодотворенные яйцеклетки, развивающиеся в морской воде. На графике представлено развитие оплодотворенных яйцеклеток в одном из семи экспериментов.

Показано, что способностью замедлять развитие оплодотворенных яйцеклеток морских ежей обладала только фракция с молекулярной массой 1–10 кДа, выделенная из неоплодотворенных яйцеклеток (НЯМЕ (1-10)) в дозе 0.05 вэт/мл морской воды (рис. 3). Через 30 ч яйцеклетки находились на стадии ранней гастролы, а через 40 ч — отставание в развитии зародышей морских ежей составляло пять-шесть стадий относительно контроля (морская вода). Данная фракция (НЯМЕ (1-10)) в дозе 0.005 мг/мл морской воды не оказывала достоверного снижения развития яйцеклеток. Фракции  $\geq 10$  кДа и  $\leq 1$  кДа, полученные из неоплодотворенных яйцеклеток морских ежей, не обладали замедляющим эффектом. Следует отметить, что фракция с молекулярной массой 1–10 кДа (вэт/мл морской воды), выделенная из оплодотворенных яйцеклеток морских ежей, которые прошли несколько начальных стадий, не замедляла их развитие.

Для исключения возможного токсического эффекта фракций МСС (1-10) и НЯМЕ (1-10) была проверена обратимость их действия в дозе 0.05 вэт/мл морской воды путем многократной смены инкубационной среды. Отмывание от фракций МСС (1-10) и НЯМЕ (1-10) начиналось через 5–6 ч после оплодотворения и добавления фракции. После многократной смены морской воды происходило нормальное дробление яйцеклеток и развитие их до стадии плутеуса, но с отставанием по времени на одну-две стадии от контроля при отмывании от фракции МСС (1-10) и

практически без отставания от контроля при отмывании от фракции НЯМЕ (1-10).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что низкомолекулярная фракция (1–10 кДа), выделенная из двух источников — мозга сусликов, находящихся в состоянии зимней спячки, и неоплодотворенных яйцеклеток морских ежей, способна замедлять развитие зародышей морских ежей. При сравнении кривых развития оплодотворенных яйцеклеток, представленных на рис. 2 и 3, видно, что факторы мозга гибернирующего суслика обладают более мощным гипометаболическим эффектом и соответственно более выраженной способностью замедлять дробление и прохождение последующих стадий развития зародышей по сравнению с факторами, выделенными из неоплодотворенных яйцеклеток морских ежей. Выделяемые факторы нетоксичны, поскольку после удаления данной фракции из инкубационной среды происходило нормальное дробление яйцеклеток с некоторым отставанием от контроля.

Наши ранние эксперименты по влиянию уксуснокислого экстракта мозга гибернирующих сусликов на метаболизм и температуру белых мышей показали, что вещества, входящие в состав экстракта, вызывали понижение температуры у животных в среднем на 10–12°C при температуре окружающей среды 23°C [23]. Грубые экстракты и компоненты фракции с молекулярной массой 1–10 кДа из мозга и тонкого кишечника сусликов в состоянии спячки оказывали заметное угнетение потребления кислорода этими животными, снижали частоту и амплитуду сокращений сердца лягушки, и влияли на формы покоя первичного сна этого животного [19, 24]. Это согласуется с результатами, полученными в данной работе, и еще раз подтверждает гипотезу о невидоспецифичности гипометаболических факторов.

Было обнаружено, что в тканях сусликов во время гипобиоза резко снижена пролиферативная активность клеток [8]. Исследования с использованием метода проточной флуориметрии показали, что на протяжении зимних месяцев клетки различных органов сусликов (*Citellus suslicus*), а именно роговицы глаза, надпочечников, щитовидной железы и лимфатических узлов, находятся в фазе  $G_1$ , либо в фазе покоя  $G_0$  клеточного цикла [8]. Мы предположили, что ради сохранения энергии яйцеклетки морских ежей до оплодотворения находятся в состоянии гипобиоза и, следовательно, могут содержать гипометаболические вещества.

Исходя из собственных и литературных данных о значительном снижении пролиферации клеток в состоянии гипобриоза животных и замедлении движения клеток по фазам клеточного цикла под действием низкомолекулярных фракций из мозга зимоспящих животных, нам представлялось целесообразным использовать в качестве клеточной тест-системы оплодотворенные яйцеклетки морских ежей. Исследования показали, что применение данного теста в процессе фракционирования и выделения гипометаболических факторов не только удобно для оценки их биологической активности, но и открывает большие перспективы для исследования механизмов действия испытуемых веществ, включая онтогенетические и филогенетические аспекты.

Механизмы действия биологически активных компонентов, синтезирующихся в мозге гибернирующих животных и в неоплодотворенных яйцеклетках морских ежей, на процессы развития морских ежей остаются неисследованными. Мы предполагаем, что они могут быть связаны как с ингибированием специфических механизмов синтеза макромолекул, таких как ДНК, РНК и белков, так и с подавлением процессов клеточного энергообеспечения.

Факт однонаправленности эффектов низкомолекулярных факторов у филогенетически отдаленных организмов, находящихся в состоянии сниженной жизнедеятельности, позволяет предположить существование в природе универсального эволюционно закрепленного фактора(ов) гипобриоза.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Экспериментального генетического криобанка Института биофизики клетки РАН (Пушино, Московская область).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках государственных научно-исследовательских заданий № 075-01027-22-00 и ФИЦ № 075-01512-22-00.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Kayser, *The Physiology of Natural Hibernation* (Pergamon Press, N.-Y., 1961).
2. C. Lyman, J. Willis, A. Malan, and L. Wang, *Hibernation and torpor in mammals and birds* (Academic Press, N. Y., 1982).
3. Н. И. Калабухов, *Спячка млекопитающих* (Наука, М., 1985).
4. L. C. H. Wang, in *Advances in comparative and environmental physiology* (Springer-Verlag, Berlin, 1988), pp. 1–45.
5. Л. И. Крамарова, Р. Х. Зиганшин, и Э. Н. Гахова, *Биоорг. химия*, **35**, 597 (2009).
6. S. Adelstein, C. Lyman, R. O. Brein, and S. Ito, in *Mammalian hibernation III* (Oliver and Lloyd, Edinburgh, 1967), pp. 398–408.
7. В. М. Юнкер, Г. В. Алексеева, А. Ф. Никифоров и А. П. Селезнева, *Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций* (Наука, Новосибирск, 1971).
8. S. G. Kolaeva, L. I. Kramarova, E. N. Iliasova, and F. E. Iliasov, *Intern. Rev. Cytol.*, **66**, 147 (1980).
9. H. Swan, D. Jenkins, and K. Knox, *Nature*, **217**, 671 (1968).
10. H. Swan and C. Schatte, *Science*, **195**, 84 (1977).
11. T. L. Stanton, A. L. Beckman, and A. N. Winikur, *Reg. Pept.* **3**, 135 (1982).
12. L. I. Kramarova, S. G. Kolaeva, V. V. Rozanetz, and R. C. Yuchananov, *Comp. Bioch. Physiol.*, **74**, 31 (1983).
13. L. I. Kramarova, Y. Cui, T. F. Lee, and L. C. H. Wang, *Life Sci.*, **48**, 175 (1991).
14. L. C. H. Wang, in *Life in the Cold* (Westview Press, Boulder, USA, 1993), pp. 297–303.
15. Р. Х. Зиганшин, В. И. Свиричев, Б. В. Васильковский и др., *Биоорг. химия*, **20**, 899 (1994).
16. Л. И. Крамарова, Р. Х. Зиганшин и Э. Н. Гахова, *Биоорг. химия*, **35**, 597 (2009).
17. L. I. Kramarova, S. G. Kolaeva, S. G. Bronnikov, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **71** (3), 293 (1993).
18. М. А. Белявский, Н. Б. Матвеева и С. Е. Бейлина, в кн. *Механизмы зимней спячки* (ИЦБИ, Пушино, 1987), сс. 133–137.
19. Г. С. Сухова, Д. А. Игнатьев, А. К. Ахременко и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **26**, 623 (1990).
20. Г. А. Бузников и В. К. Подмарев, в кн. *Объекты биологии развития* (Наука, М., 1975), сс. 188–216.

21. N. Kobayashi, in *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment* (State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Belgium, 1984), pp. 341–405.
22. D. Amorese, H. Swan, and J. Bamburg, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **79**, 6375 (1982).
23. Г. Р. Иваницкий, С. Г. Колаева, Ю. Ф. Пастухов и др., *ДАН СССР*, **267** (4), 978 (1982).
24. И. Г. Карманова, С. Г. Колаева, Л. И. Крамарова и др., *Криобиология и криомедицина*, **15**, 36 (1984).

## Eggs of Gray Sea Urchins *Strongylocentrotus intermedius* as a Test-Object and a Source of Hypometabolic Factors

LI. Kramarova\*, R.Ch. Ziganshin\*\*, V.K. Uteshev\*\*\*, T.V. Kramarova\*, and E.N. Gakhova\*\*\*

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

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

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

Over very long time periods, an intensive search has been performed to find factors that can induce and/or regulate the transition to a temporary state of decreased physiological activity in different animals. This paper represents a study that is focused on hypometabolism of the fractions of the acetic acid extract with molecular mass of  $\leq 1$  kDa, 1–10 kDa and  $\geq 10$  kDa, obtained from eggs of gray sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*, and from brain tissue of ground squirrels *Spermophilus undulatus* that hibernate during winter. It was found that components of the low-molecular weight fraction (1–10 kDa) isolated from the unfertilized eggs of sea urchins at a dose of 0.05 wet/ml of sea water are able to delay the development of fertilized sea urchins by 5–6 stages 40 hours after fertilization as compared to control. The similar low (1–10 kDa) molecular weight fraction isolated from brain tissue of ground squirrels during torpor demonstrated more pronounced hypometabolic effect and at a dose of 0.05 wet/ml of sea water 40 hours after egg fertilization in the sea urchins this fraction delayed the development of fertilized sea urchins by 15–16 stages as compared to control. A similar fraction, isolated from the brain of summer-active animals or from fertilized eggs of sea urchins, had no effect on the development of fertilized eggs. It is suggested that cells and organisms that are in a state of decreased physiological activity are able to synthesize substances that can participate in the induction and/or regulation of a state of cell hypobiosis even in evolutionary distant animal species.

*Keywords: eggs of sea urchins, hypometabolic factors, hypobiosis, brains of ground squirrels that hibernate through the winter*

УДК 577.3

## ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЕБРА

© 2022 г. Д.Б. Корман\*, Л.А. Островская\*.,# , Н.В. Блюхтерова\*,  
В.А. Рыкова\*, М.М. Фомина\*

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

#E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 28.04.2022 г.

После доработки 28.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

В обзоре обобщены экспериментальные данные, связанные с изучением цитотоксической активности серебросодержащих соединений в отношении клеточных культур опухолей человека. Рассматриваются возможные механизмы наблюдающихся эффектов.

*Ключевые слова:* серебросодержащие соединения, цитотоксичность, клеточные культуры опухолей человека.

DOI: 10.31857/S0006302922040093, EDN: ITMGRO

Соединения, содержащие ионы благородных металлов — золота и серебра, как показали исследования последних десятилетий, обладают значительной биологической, в том числе цитотоксической, генотоксической, гемостатической и противоопухолевой активностью, что указывает на перспективность их изучения в качестве потенциальных противоопухолевых, антимикробных и гемостатических средств [1–6].

Хорошо известно, что предметы из серебра использовали для предохранения воды, пищевых продуктов и вина от порчи еще в античной Греции и древнем Риме.

В течение сотен лет серебро и его соединения использовали в медицине качестве антисептических средств при лечении ран, язв, ожогов.

До введения в медицинскую практику антибиотиков серебросодержащие соединения были самыми мощными антимикробными агентами.

Наиболее известные препараты серебра — азотнокислое серебро (нитрат серебра, или ляпис), сульфодиазин серебра (Dermaxine) и сульфатиазол серебра (Argosulfan). Широко применяются также препараты коллоидального серебра (колларгол и протаргол). Лечебные свойства всех этих средств определяются специфической биологической активностью ионов серебра Ag(I), которые образуются в результате распада этих соединений [7].

Следует заметить, что серебро в следовых количествах обнаружено в 29 различных тканях че-

ловека, однако физиологическая роль серебра в организме остается невыясненной [8].

Одним из главных фармакологических свойств препаратов серебра является их антимикробная активность, благодаря чему они используются в основном как антисептики, прежде всего в медицине для предупреждения инфицирования, в частности, в качестве покрытия при изготовлении искусственных клапанов сердца и катетеров, а также в фармацевтической, пищевой, косметологической и текстильной промышленности [7, 8].

Важной фармакологической особенностью препаратов на основе серебра является также их гемостатическое кровоостанавливающее действие [6, 9].

В последние годы установлено, что препараты серебра наряду с антимикробной и гемостатической активностью обладают также цитотоксическим и генотоксическим действием на нормальные и опухолевые клетки человека и животных.

Показано, что цитотоксический и генотоксический эффект препаратов серебра обусловлен воздействием ионов серебра на различные интрацеллюлярные органеллы и молекулярные структуры.

Мишенями для действия ионов серебра могут служить тиолсодержащие белки и молекулы в цитоплазме, плазматическая, митохондриальная, лизосомные мембраны, а также ДНК. Ионы серебра вызывают перекисидацию липидов мембран, приводящую к повышению их проницаемости. Повреждение плазматической мембраны вызывает выход из клетки содержимого цитозоля

Сокращение: АФК — активные формы кислорода.

и некротическую гибель клетки. Повреждение мембраны лизосом приводит к выделению катепсина и индукции аутофагии. Повреждение митохондрий сопровождается нарушением транспорта электронов, ингибированием синтеза АТФ, увеличением продукции активных форм кислорода (АФК), генерацией оксидативного стресса. Ионы серебра способны индуцировать также различные повреждения ДНК. Все эти процессы ведут к апоптотической гибели клетки.

Обнаружение цитотоксических свойств препаратов серебра стимулировало их исследование в качестве потенциальных противоопухолевых агентов [11, 12].

В представленном обзоре рассматриваются цитотоксические эффекты различных соединений, содержащих серебро, в отношении культур опухолевых и нормальных клеток человека и животных.

Серебро, будучи переходным металлом, способно образовывать комплексные соединения. Синтез и исследование подобных веществ в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов интенсивно развиваются в течение последних двух десятилетий. Показано, что активность таких соединений во многом зависит от природы лиганда, входящего в структуру этих веществ. При этом особое значение придается использованию лигандов, обладающих собственной биологической активностью. Предполагается, что сочетание в одном соединении двух биологически активных компонентов – ионов серебра и лиганда – способно обеспечить достижение эффекта синергизма при действии препарата [12].

**Полиакрилат серебра (аргакрил).** Примером такого рода соединения может служить серебрясодержащий препарат на основе биологически активного полимера – полиакриловой кислоты, имеющий условное название аргакрил.

Полиакрилат серебра (аргакрил), представляет собой неполную металлическую соль полиакриловой кислоты, содержащую одновалентный ион серебра.

Показано, что аргакрил обладает значительной противоопухолевой активностью, вызывая *in vivo* торможение развития солидных опухолей мышей: карциномы легких Льюис – на 90%, аденокарциномы молочной железы Са-755 – на 70%, аденокарциномы Акатол – на 55%, а также увеличение средней продолжительности жизни мышей на 46% по сравнению с контролем (карцинома легких Льюис). Этот эффект достигается при применении препарата в диапазоне доз 2–6 мг/кг в сутки, внутрибрюшинно, в течение 5–9 суток, начиная со следующих суток после перевивки опухоли ( $LD_{50}$  составляет 30 мг/кг) [2, 4, 5].

Установлен значительный цитотоксический эффект аргакрила в отношении клеточных куль-

тур опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого А-549, рак толстой кишки НСТ116, меланома Mel Me). Показатель цитотоксического эффекта  $IC_{50}$  варьирует в пределах от 25 до 180 мкг/мл, изменяясь в зависимости от типа опухолевых клеток. Наибольшую чувствительность к действию препарата проявляют клетки рака молочной железы MCF-7. Отмечено цитотоксическое действие аргакрила и на нормальные фибробласты кожи человека линии hFb-hTERT6 ( $IC_{50} = 25$  мкг/мл) [2, 3].

**Нитрат серебра (азотнокислое серебро).** Результаты многочисленных исследований, проведенных с нитратом серебра ( $AgNO_3$ ), свидетельствуют о способности ионов серебра оказывать цитотоксическое действие на опухолевые и нормальные клетки. При этом отмечается дозо- и время-зависимый характер гибели клеток под влиянием препарата.

Так, нитрат серебра при применении в концентрациях 1000 и 20 мкМ вызывает гибель 90 и 80% клеток рака легкого человека линии А549 соответственно, а при применении в концентрации менее 10 мкМ утрачивает цитотоксическое действие [13–16]. Аналогичную зависимость отметили при культивировании с нитратом серебра фибробластов эмбриона крыс линии H-ras 5RP7 [12].

Цитотоксический эффект нитрата серебра связывают в первую очередь с образованием иона серебра ( $Ag^+$ ), генерирующего АФК и индуцирующего оксидативный стресс, что ведет к повреждениям, вызывающим клеточную гибель [10]. После 72-часовой инкубации клеток рака легкого человека А549 с нитратом серебра в концентрации, при которой гибнет 50% клеток (индекс цитотоксичности  $IC_{50}$ ), зарегистрированы гиперпродукция АФК, деполяризация потенциала митохондриальной мембраны, повреждения ДНК и признаки раннего и позднего апоптоза опухолевых клеток. Установлена достоверная корреляция между степенью повреждения митохондрий и интрацеллюлярным уровнем АФК [13, 15].

Считается, что нитрат серебра мало токсичен для нормальных клеток. Однако при инкубации с препаратом фибробластов эмбриона крыс (линия H-ras5RP7) и мышей (линия NIH/3T3) в течение 24 ч зарегистрирована дозозависимая апоптотическая гибель клеток с  $IC_{50}$ , равным 6.75 и 12.3 мкМ соответственно. После 24-часового культивирования с нитратом серебра клеток H-ras5RP7 число апоптотических клеток увеличилось с 3.4% в контроле до 48.3% [14].

Следует отметить, что карбонат серебра ( $Ag_2CO_3$ ), в отличие от нитрата серебра, оказывает незначительное цитотоксическое действие на герминогенные клетки мышей линии С18-4. При культивировании этих клеток с карбонатом се-

ребра, примененным в диапазоне концентраций до 100 мкг/мл, гибели клеток не наблюдалось;  $IC_{50}$  препарата составил 408 мкг/мл [17].

Обнаружение цитотоксичности нитрата серебра в отношении опухолевых клеток послужило основанием для синтеза и изучения на наличие цитотоксической активности в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток разнообразных серебросодержащих комплексных соединений.

Важно отметить, что цитотоксический эффект многих серебросодержащих комплексов в отношении опухолевых клеток сопоставим или даже превосходит активность комплексного соединения платины (цис-диамин-дихлорплатина, или «цисплатина»), являющегося стандартным высокоэффективным противоопухолевым препаратом, а также некоторых других противоопухолевых препаратов (5-фторурацил, тамоксифен) [18].

Для ряда Ag(I)-содержащих комплексов показано отсутствие перекрестной резистентности с цисплатиной. Например, на клетках рака легкого A549, резистентных к препаратам платины, зарегистрирована высокая цитотоксичность Ag(I) комплексов, содержащих в качестве лигандов N-гетероциклические карбены [19].

Изучено несколько десятков комплексных соединений, в которых ионы серебра были координированы с лигандами, представляющими химические соединения разных классов (карбоновые кислоты, аминокислоты, доноры азота, фосфора или сульфогрупп, гетероциклические карбены и др.). Цитотоксический эффект этих соединений связывают с интрацеллюлярным выделением из них ионов серебра, в то время как лиганды рассматриваются в качестве структур, обеспечивающих доставку серебра в клетки [20].

Предполагается, что эффект комплексных соединений серебра зависит от таких важных характеристик препарата как стабильность и соотношение его гидрофильно-липофильных свойств, которые в значительной степени обусловлены природой имеющегося в структуре вещества лиганда.

Показано, что цитотоксическое действие этих комплексов зависит как от природы лиганда, соединенного с ионом серебра, так и от типа клеток, причем, как правило, цитотоксичность в отношении всех опухолевых клеток существенно превосходит действие препаратов на разнообразные нормальные клетки.

Следует отметить, что зарегистрирована селективность цитотоксического действия серебросодержащих комплексных соединений в отношении определенных опухолевых клеток в зависимости от типа лиганда, координированного с ионами серебра.

Например, показано, что комплексы, имеющие в качестве лиганда доноры атомов фосфора, демонстрируют высокую цитотоксичность на клетках карциномы и саркомы и существенно меньшую активность на клетках аденокарциномы. В то же время комплексы с лигандами на основе карбоксильной кислоты наиболее активны в отношении клеток аденокарциномы [20].

**Серебросодержащие фосфины.** Показано, что ряд фосфинов серебра вызывают апоптотическую гибель клеток рака молочной железы человека линии MCF-7 [21].

Двухъядерный фторсодержащий комплекс  $Ag^+$  с трифенилфосфином оказывал выраженное цитотоксическое действие на клетки рака колоноRECTАЛЬНОГО рака человека линии HCT116 ( $IC_{50}$  составлял 4.9 мкМ) и трижды-негативного рака молочной железы линии MBA-MB-331 ( $IC_{50}$  равнялся 4.2 мкМ). Показано, что этот комплекс способен электростатически связываться с ДНК путем взаимодействия ионов серебра с фосфатной группой ДНК, выделенной из тимуса теленка [22].

Комплекс серебра с тиоцианат-4-метоксифенилфосфином индуцировал апоптотическую гибель клеток плоскоклеточного рака пищевода линии SNO, ассоциированную с повреждением митохондрий. Культивирование клеток с этим комплексом приводило к деполяризации митохондриальной мембраны, снижению уровня АТФ, усилению продукции АФК, выходу в цитозоль цитохрома *c* и распаду каспазы-9 [23].

При культивировании клеток SNO с фосфиновым комплексом серебра с цианидом зарегистрирована более высокая цитотоксичность комплекса по сравнению с цисплатиной —  $IC_{50}$  составлял 4.02 и 47.39 мкМ соответственно [18].

При исследовании цитотоксичности комплексов  $Ag^+$  с пиридолфосфинами на панели культивируемых клеток рака яичников человека установлена связь между цитотоксическим эффектом этих комплексов и их гидрофильностью. В зависимости от величины коэффициента растворения в системе октанол/вода  $IC_{50}$  изученных соединений колебался в пределах от 0.18 до 1500 мкМ [24].

**Карбен-содержащие соединения серебра.** Синтезировано и протестировано на наличие противоопухолевой активности большое число разнообразных комплексов серебра с N-гетероциклическими карбенами [25, 26].

Показана цитотоксичность трех Ag(I)-N-гетероциклических карбеновых комплексов на основе 4,5-дихлор-1H-имидазола в отношении клеточных культур рака яичников OVCAR-3 и рака молочной железы MB157. Показатель  $IC_{50}$  для ис-

следовавшихся культур через 72 ч инкубирования клеток с препаратами составил 20–35 и 8–20 мкМ соответственно, изменяясь в указанном диапазоне концентраций в зависимости от структуры соединения. Следует отметить, что в отношении указанных клеток приведенные показатели цитотоксичности протестированных комплексов сопоставимы с индексами цитотоксичности цисплатины и нитрата серебра, для которых  $IC_{50}$  изменялся в пределах 12–25 и 25–35 мкМ соответственно. Отмечено также, что в условиях более короткой инкубации (36 ч) при применении комплексов в концентрации 50 мкМ их цитотоксичность превосходила действие цисплатины и нитрата серебра [8].

Зависимость цитотоксического эффекта этих комплексов от типа опухоли подтверждается практически полным отсутствием их цитотоксичности для клеток рака шейки матки линии HeLa, в то время как и цисплатина, и нитрат серебра, в отличие от изученных комплексов, оказались для этих клеток высокотоксичными ( $IC_{50}$  составил 25 мкМ для обоих агентов).

В эксперименте *in vivo* с ксенографтами рака яичников OVCAR-3, в котором комплексы вводили мышам подкожно в области опухоли три раза в течение 10 суток в суммарной дозе 1000 мг/кг, при оценке эффекта по результатам гистологического исследования обнаружена значительная гибель клеток в опухоли при отсутствии видимых повреждений в нормальных тканях [8].

Цитотоксичность комплексов Ag(I) с N-гетероциклическими карбенами обнаружена также в отношении клеток рака молочной железы линий MCF-7 и MDA-MB-231, клеток колоректального рака линии HCT116 и клеток рака предстательной железы линии DU-145 [25,27]. Отмечена высокая чувствительность к подобным соединениям клеток рака молочной железы линии MDA-MB-231 ( $IC_{50}$  составлял 1 мкМ) [27].

Комплексы Ag(I) с N-гетероциклическими карбенами оказались менее цитотоксичными для нормальных мышинных жировых клеток линии L-929 по сравнению с опухолевыми клетками (MCF-7, MDA-MB-231, DU-145) [27].

Сообщалось о синтезе и изучении флуоресцирующего серебросодержащего карбенового комплекса ( $[Ag(EIA)_2]Cl$ ), содержащего 2-антраценил-флуоресцентный зонд. На клетках нейробластомы человека линии SM-SYSY показана цитотоксичность этого соединения, которая определялась уровнем его интернализации в клетку. Механизм цитотоксического действия комплекса связывают с ковалентным связыванием одного или двух карбеновых лигандов с C-терминальным декапептидом антиоксидантного фермента тиоредоксин редуктазы (hTrxR9488-

499) с сопутствующим выделением катиона серебра, что ведет к ингибированию активности фермента [28].

Выраженная цитотоксичность аналогичного комплекса обнаружена в отношении клеток колоректального рака линии SW480, рака легкого линии A549, гепатоцеллюлярного рака линии HepG2. При этом также показано, что антипролиферативное действие комплекса может быть связано с подавлением активности тиоредоксин редуктазы. Кроме того, в этих экспериментах обнаружено связывание комплекса с ДНК [29].

Следует заметить, что тиоредоксинредуктаза является мишенью для реализации цитотоксического действия и комплексных соединений одно- и трехвалентного золота. Однако в этом случае эффект обусловлен связыванием ионов золота с селеном, входящим в каталитический центр фермента. В результате также ингибируется активность фермента, что ведет к развитию оксидативного стресса и гибели клетки [1].

Цитотоксичность серебросодержащих комплексов может реализовываться также в результате индукции некроза клеток. На клетках РЛ А549 показано, что при культивировании клеток с пиразол/пиридин-Ag(I)-комплексами с N-гетероциклическими карбенами в качестве лигандов происходит каспазо-независимая некротическая гибель клеток, ассоциированная с усилением внутриклеточной продукции АФК и снижением потенциала митохондриальной мембраны [19].

Еще одной мишенью для противоопухолевого действия серебросодержащих комплексов может быть убиквитин-протеосомная система. Показано, что комплекс серебра с дисульфирамом (антабус) ингибирует деубиквитиназы протеосомы 19S (USP14 и UCHL5) и не влияет на активность пептидаз протеосомы 20S. При инкубации клеток рака легкого линий А549 и H1299 с этим комплексом регистрировалась выраженная апоптотическая гибель клеток с  $IC_{50}$ , составляющим 0.49 и 0.60 мкМ соответственно. Для клеток нормально легочного эпителия (линия 16HBE) цитотоксичность комплекса была существенно меньше –  $IC_{50}$  равнялся 2.59 мкМ. На ксенографтах линий А549 и H1299 показано, что комплекс обладает противоопухолевой активностью – внутрибрюшинное введение мышам комплекса в дозе 2.5 мг/кг/сутки в течение двух недель приводило к достоверному торможению роста опухолей в течение этого времени [16].

**Кумарин-содержащее соединение серебра.** Комплекс одновалентного серебра с 4-окси-3-нитрокумарин-бис(фенантролин)ом  $[Ag(hnc)(phen)_2]$  проявляет дозо- и время-зависимое антипролиферативное действие в отношении культур клеток рака почки линии А-498 и гепатоцеллюлярного рака линии HepG2, тогда как этот эффект не

наблюдается в отношении опухолевых клеток почек линии НК-2 и печени линии Chang. В отношении клеток HerG2 комплекс оказался в четыре раза активнее цисплатины. Показано, что комплекс не интеркалирует ДНК, но снижает ее синтез. Гибель клеток при действии комплекса происходит путем апоптоза [20].

**Гидразон-содержащие соединения серебра.** Цитотоксические свойства исследованы у ряда комплексных соединений серебра с бензоилпиридин-производными гидразонов, в которых к иону серебра присоединены в качестве лигандов гидразон и нитрат.

Культивирование клеток меланомы мышей линии В16F10 с этими комплексами привело к дозозависимой гибели клеток с  $IC_{50}$ , равным 2.0–2.4 мкМ, тогда как при применении цисплатины  $IC_{50}$  составлял 10.0 мкМ. Цитотоксичность этих комплексов в отношении неопухолевых меланцитов (линия MelanA) оказалась в четыре-десять раз меньше, чем в отношении опухолевых клеток.

Обнаружено, что эти комплексы интеркалируют ДНК тимуса теленка за счет взаимодействия лигандов с ДНК, тогда как ковалентное связывание  $Ag^+$  с ДНК не зарегистрировано.

Показано также, что изученные комплексы связываются альбуминами сыворотки крови человека [31].

**Комплексное соединение серебра с тиосульфатом натрия.** Исследована цитотоксичность серебросодержащего комплекса с тиосульфатом натрия ( $Na_3[Ag(S_2O_3)_2]^{3-}$ ).

Известно, что тиосульфат натрия обладает антиоксидантной активностью и используется в качестве антидота при отравлении цианидами и для предупреждения некоторых побочных явлений при лечении рядом противоопухолевых препаратов.

При культивировании с этим соединением клеток рака молочной железы MCF-7 и клеток миелоидного лейкоза K562 зарегистрирована дозозависимая цитотоксичность, более выраженная у клеток MCF-7 (гибель клеток наблюдалась в диапазоне концентраций 12–120 мкМ при  $IC_{50}$ , равном 21.3 мкМ) по сравнению с клетками K562 (достоверная гибель клеток отмечена только при концентрации препарата, равной 120 мкМ).

Культивирование опухолевых клеток с этим комплексом сопровождалось возрастанием интрацеллюлярного уровня АФК, снижением уровня глутатиона, блоком клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub>/S, снижением экспрессии маркера клеточной пролиферации PCNA.

В то же время комплекс не проявлял цитотоксичности при всех изученных концентрациях в

отношении клеток нормального эпителия молочной железы человека (линия НМЕС) и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека (линия НМСС) [32].

**Комплексные соединения серебра на основе известных лекарственных препаратов.** При исследовании противоопухолевых и цитотоксических свойств серебросодержащих соединений большое внимание уделяется синтезу и изучению комплексных соединений серебра, имеющих в своей структуре в качестве лигандов вещества, которые уже используются в медицинской практике как лекарственные препараты.

**Комплексные соединения серебра и метронидазола.** Проводится синтез и изучение цитотоксичности комплексных соединений серебра, содержащих в своей структуре в качестве лигандов производные имидазола, в частности метронидазол, который применяется при лечении бактериальных и протозойных инфекций, а также производные пиридина, имеющие широкое медицинское применение [12].

При сравнительном исследовании цитотоксичности нитрата серебра, комплекса серебра с метронидазолом и комплекса серебра с 4-гидрокси-симетилпиридином установлено, что все три соединения подавляют рост клеток рака поджелудочной железы линий PANC-1 и 1.2B4. Показано, что индекс  $IC_{50}$  этих соединений для клеток линии PANC-1 составляет 16.2, 14.5 и 13.1 мкМ соответственно, а для клеток линии 1.2B4 – 8.8, 10.0 и 8.8 мкМ соответственно. Для сравнения отметим, что  $IC_{50}$  для цисплатины в этом эксперименте составил 11.8 и 19.7 мкМ. Показано, что метронидазол и 4-гидрокси-симетилпиридин практически не подавляют рост опухолевых клеток.

Отмечается зависимость цитотоксичности этих комплексов от типа опухолевых клеток. Все три вещества проявляют более выраженную цитотоксичность в отношении клеток линии 1.2B4 по сравнению с действием на клетки линии PANC-1. При этом в отношении клеток линии 1.2B4 цитотоксичность изученных соединений значительно превышает цитотоксичность цисплатины. Показано, что инкубация клеток обеих линий с изученными донорами ионов серебра сопровождается дозозависимым повреждением ДНК и индукцией апоптоза [12].

Инкубация клеток гепатоцеллюлярного рака линии HerG2 с этими соединениями в течение 72 ч также сопровождалась значительной дозозависимой гибелью клеток с  $IC_{50}$ , равным 6.4, 7.6 и 6.5 мкМ соответственно.

В то же время для нормальных клеток (фибробласты мышей линии Balb/c3T3) цитотоксичность этих сравниваемых соединений оказалась почти в два раза значительнее, чем для опухоле-

вых клеток —  $IC_{50}$  составлял соответственно 2.2, 3.4 и 2.1 мкМ.

Авторы полагают, что обнаруженное различие в чувствительности опухолевых и нормальных клеток к изучавшимся препаратам серебра обусловлено особенностями этих клеток — фибробласты относятся к неметаболизирующим клеткам, тогда как клетки гепатоцеллюлярного рака — к метаболизирующим [33].

*Комплексные соединения серебра с нестероидными противовоспалительными препаратами.* Установлена высокая цитотоксичность комплексов Ag(I) с известными нестероидными противовоспалительными препаратами — диклофенаком и нифлуминовой кислотой — в отношении трех линий клеток опухолей человека: рака молочной железы MCF-7, гепатоцеллюлярного рака HepG2 и колоректального рака HT-29.

При культивировании этих клеток с обоими комплексами показана дозозависимая клеточная гибель, выраженность которой определялась типом опухоли. Наибольший цитотоксический эффект для комплекса с диклофенаком и препарата с нифлуминовой кислотой зарегистрирован на клетках MCF-7 ( $IC_{50}$  составил 20.6 и 29.2 мкМ соответственно), наименьший эффект — на клетках HT-29 ( $IC_{50}$  равен 53.2 и 71.0 мкМ соответственно).

Следует отметить, что цитотоксичность этих комплексов в отношении опухолевых клеток в данном исследовании была сопоставима с цитотоксичностью карбоплатина (производное цисплатины).

Цитотоксичность обоих комплексов в отношении мышинных фибробластов линии 3T3-L1 была незначительной ( $IC_{50}$  — 151.8 мкМ) и на порядок меньшей, чем у карбоплатина ( $IC_{50}$  — 16.1 мкМ).

Оба комплекса вызывают апоптотическую гибель клеток (линия MCF-7), что связывают с индукцией оксидативного стресса, ассоциированного с генерацией АФК, повреждением мембраны митохондрий и ингибированием активности ряда ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы) при возрастании активности супероксиддисмутазы [34].

Обнаружена цитотоксичность, сопоставимая с действием цисплатины, у гетеролептических комплексов Ag(I) с еще одним нестероидным противовоспалительным препаратом — напроксеном и с терпиридинами в отношении клеток рака молочной железы MCF-7, рака шейки матки HeLa, гепатоцеллюлярного рака HepG2, эпителиомы линии Hep-2. Апоптотическая гибель клеток при культивировании их с этими соединениями была примерно оди-

наковой у разных клеток —  $IC_{50}$  находилась в пределах 7–9 мкМ.

Для нормальных фибробластов кожи человека линии NHDF цитотоксичность препаратов была незначительной ( $IC_{50} > 100$  мкМ).

При исследовании механизмов цитотоксичности этих соединений на клетках гепатоцеллюлярного рака HepG2 установлено, что они способны интеркалировать ДНК, связываться с рецепторами факторов роста EGFR и VEGFR2, вызывать блок клеточного цикла в  $G_0/G_1$  [35].

Однако цитотоксичность гетеролептических комплексов Ag(I) с напроксеном и тиосемикарбазонами в отношении клеток рака молочной железы линий MCF-7, MDA-MB-231 и клеток рака поджелудочной железы линии PANC-1, оказалась намного меньше ( $IC_{50}$  колебался в пределах от 73 до 107 мкМ) и почти в два раза уступала цитотоксичности цисплатины и карбоплатины. Для нормальных эпителиальных клеток молочной железы человека (линия MCF-10a) эти соединения оказались также малотоксичными ( $IC_{50} > 100$  мкМ) [36].

*Комплексные соединения серебра с глицином и никотинамидом.* Серебросодержащие комплексы с глицином и никотинамидом проявляют в три раза более высокую цитотоксичность, чем цисплатина, в отношении клеток лейкемии L-1210. Этот эффект, как полагают, обусловлен связыванием комплексов с ДНК (установлено в экспериментах с ДНК тимуса теленка) и с подавлением активности топоизомераз [37].

При сравнительном исследовании цитотоксичности в отношении клеток меланомы В16 серии из шести серебросодержащих комплексов, различающихся лигандами, обнаружено, что  $IC_{50}$  у этих соединений различался на порядок и колебался в диапазоне от 2.44 до 28.65 мкМ. Следует отметить, что только один из этих шести комплексов, содержащий в качестве лиганда производное пиридина, существенно превосходил по активности нитрат серебра и цисплатину.

Культивирование изученных комплексов с мышинными фибробластами линии 10T1/2 в концентрации, соответствующей  $IC_{50}$  для клеток В16, практически не сопровождалось гибелью фибробластов [38].

## ВЫВОДЫ

Анализ имеющихся данных о цитотоксичности серебросодержащих соединений, различающихся характером присутствующих в их структуре лигандов, указывает на несомненную способность таких веществ вызывать гибель опухолевых клеток в условия *in vitro*.

Для большинства изученных соединений степень цитотоксичности, которую принято харак-

теризовать величиной индекса цитотоксичности  $IC_{50}$ , соответствует общепринятым критериям, с помощью которых фиксируют наличие у препарата цитотоксических свойств [39].

Однако если руководствоваться только этим критерием, исходя из накопленных к настоящему времени данных невозможно выделить структуру, наиболее перспективную для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного средства для лечения злокачественных опухолей.

Очевидно, что для принятия обоснованного решения по этому вопросу нельзя ограничиться только результатами исследований *in vitro*, но следует провести экспериментальное изучение противоопухолевой эффективности серебросодержащих веществ в отношении широкого спектра перевиваемых опухолей животных и ксенографтов опухолей человека *in vivo*.

К сожалению, подобные исследования с серебросодержащими комплексами пока не проводились. Исключение, по-видимому, представляет препарат полиакрилата серебра (аргакрил), для которого была показана, помимо цитотоксичности *in vitro*, способность существенно тормозить рост опухолей животных *in vivo*.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии*, **64** (6), 697 (2018).
- Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
- Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
- L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Ther.*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
- L. A. Ostrovskaya, D. B. Korman, N. V. Bluhterova, et al., *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **4** (4), 816 (2014).
- К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и Л. А. Островская, *Изв. РАН. Сер. хим.*, **66** (12), 2314 (2017).
- L. Xu, Y. Y. Wang, J. Huang, et al., *Theranostics*, **10** (20), 8996 (2020). DOI: 10.7150/Lhno.45413
- D. A. Medvetz, K. M. Hindi, M. J. Panzher, et al., *Metal-Based Drugs*, **2008**, ID384010 (2008). DOI: 10.1155/2008/384010.
- К. А. Абзаева, М. Г. Воронков, Л. В. Жилицкая и др., *Хим.-фармацевт. журн.*, **46** (4), 11 (2012).
- N. Miura and Y. Shinohara, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **390**, (3), 733 (2009). DOI: 10.106/j.bbrc.2009.10.039
- W. Yang, H. Veroniaia, X. Qi, et al., *Adv. Ther. (Weint.)*, **3** (1), 201900102 (2020). DOI: 10.1002/adtp.201900102
- D. Zyro, A. Sliwinska, I. Szymczak, et al., *Cancers (Basel)*, **12** (120), 3848 (2020). DOI: 10.3390/cancers12123848
- R. Foldbjerg, D. A. Dang, and H. Antrup, *Arch. Toxicol.*, **85** (7), 743 (2011). DOI: 10.1007/S00204-010-0545-5
- A. Kaplan, G. A. Ciffci, and H. M. Kultu, *Cytotechnology*, **68** (5), 1727 (2016). DOI: 1007/S106-015-9922-5
- A. Kaplan, G. A. Ciffci, and H. M. Kultu, *Tumor Biol.*, **1** (12), (2017). DOI: 10.1177/1010428317695033
- X. Chen, Q. Yang, J. Chen, et al., *Cell Physiol. Biochem.*, **49**, 780 (2018). DOI: 10.1159/000493041
- L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, et al., *Toxicol. Sci.*, **88** (2), 412 (2005). DOI: 10.1093/toxsci/kfi256
- Z. Human-Engelbrect, R. Meijboom, M. J. Cronje, *Cytothechnology*, **69** (4), 591 (2017). DOI: 10.1007/s10616-017-0070-y
- C. Chen, L. Zhou, B. Xie, et al., *Dalton Trans.*, **49** (8), 2505 (2020). DOI: 10.1039/c9dt04751d
- C. Banti and S. K. Hadjikakou, *Metallomics*, **5**, 569 (2013). DOI: 10.1039/c3mt00046j
- E. Ferreira, A. Munyaneza, B. Omondi, et al., *Biometals*, **28** (4), 765 (2015). DOI: 10.1007/s10534-015-9865-5
- M. Zheng, F. Bigdeli, L. Gao, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **15**, 953 (2020). DOI: 10.2147/IJN.5225038
- Z. Engelbrecht, R. Meijboom, and M. Cronje, *Biomed.*, **31** (2), 189, (2018). DOI: 10.1007/s1053-017-0051-9
- S. Bemers-Price, R. J. Bowen, and P. Galettis, *Coordination Chem. Rev.*, **185–186**, 823, (1999). DOI: 10.1016/s0010-854(99)00039-9
- M. Asif, M. A. Igbal, M. A. Hussein, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **108**, 177 (2016). DOI: 10/1016/j.ejmach.2015.11.034
- S. Kankala, N. Thota, F. Bjokling, et al., *Drug Devel. Res.* **80** (2), 188 (2018). DOI: 10.1002/ddr.21478
- S. Sin-Bolukbasi, N. Sahin, N. N. Tahir, et al., *Organ. Chim. Acta*, **486**, 711 (2019). DOI: 10.1016/j.ica.2018.11.044
- C. Fabbrini, D. Girri, A. Pratesi, et al., *Chem. Medchem.*, **14** (1), 182 (2019). DOI: 10/1002/cm dc.2018000672

29. F. Guarra, N. Busto, A. Guerri, et al., *J. Inorg. Biochem.*, **205**, 110998 (2020). DOI: 10.11016/j.jinorg-bio.2020.110998
30. B. Thati, A. Noble, B. S. Creaven, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **602**, 303 (2009). DOI: 10/1016/j.ej-phar.2008.11.020
31. A. F. Sanros, I. P. Ferreira, C. B. Pinheiro, et al., *ACS Omega*, **3** (6) 7027 (2018). DOI: 10.1021/acsomega.8800533
32. A. Ota, M. Tajima, K. Mor, et al., *Pharmacol. Rep.*, **73**, 847 (2021). DOI: 10/1007/s43440-021-00260-0
33. L. Radko, S. S. Stypula-Treba, A. Posyniak, et al., *Molecules*, **24**, 1949 (2019). DOI: 10.3390/molecules.24101949
34. A. Altay, S. Caglar, and B. Caglar, *Arch. Physiol. Biochem.*, ser. 13, 1 (2019). DOI: 10.1080/13813455.2019
35. D. Mahendiran, R. S. Kumar, and A. K. Rahiman, *Mater. Sci. Engineer.* **c76**, 601 (2017). DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.085
36. S. Bharathi, D. Mahendiran, R. S. Kumar, et al., *Toxicol. Res.* **9**, 28 (2020). DOI: 10.1093/toxres/tfaa001
37. M. Rendesova, Z. Vargova, J. Kuchar, et al., *J. Inorg. Biochem.*, **168**, 1 (2017). DOI: 10/1016/j.inorg-bio.2016.12.003
38. U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Checinska, et al., *Molecules*, **21** (2), 87 (2016). DOI: 10.3390/molecules.21020087
39. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др., ч. 1 («Гриф и К», М., 2012), с. 642.

## Cytotoxicity of Silver Compounds

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

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

The purpose of this review is to sum up experimental data obtained from the study of cytotoxic activity of silver-containing compounds against human tumor cell lines. The potential mechanisms related to the observed effects are considered.

*Keywords: silver-containing compounds, cytotoxicity, human tumor cell lines*

УДК 577.3

## НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА – ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

© 2022 г. Д.Б. Корман\*, Л.А. Островская\*<sup>\*,#</sup>, Н.В. Блюхтерова\*, В.А. Рыкова\*, М.М. Фомина\*

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

*# E mail: larros@list.ru*

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

В обзоре обобщены экспериментальные данные, связанные с изучением цитотоксической, противоопухолевой активности и механизма действия наночастиц серебра.

*Ключевые слова: наночастицы серебра, цитотоксичность, противоопухолевая активность, клеточные культуры опухолей человека и животных.*

DOI: 10.31857/S000630292204010X, EDN: ITWG BQ

Соединения, содержащие благородные металлы золото и серебро, на протяжении последних десятилетий широко исследуются в качестве веществ, обладающих разносторонней биологической активностью. Показана, в частности, на экспериментальных опухолевых моделях в условиях *in vitro* и *in vivo* способность такого рода соединений вызывать гибель опухолевых клеток, ингибировать развитие опухолей животных и ксенографтов опухолей человека, оказывать радиосенсибилизирующее действие [1–3].

Одним из направлений исследования веществ, содержащих золото и серебро, является изучение возможностей их применения для биомедицинских целей в виде наночастиц. Интенсивность развития этого направления исследований обусловлена уникальными физическими (размер, форма, поверхностный заряд) и химическими (элементный состав покрытия поверхности, растворимость) свойствами наночастиц золота и серебра, которые создают условия для развития в клетках живых организмов оксидативного стресса, ведущего к различным биологическим эффектам [1, 2, 4, 5].

Ранее нами были обобщены данные, характеризующие наночастицы золота в качестве цитотоксических и радиосенсибилизирующих агентов, имеющих определенную перспективу применения в виде потенциальных противоопухолевых средств [1].

*Сокращения: НЧС – наночастицы серебра, АФК – активные формы кислорода.*

Задача представленного обзора состоит в анализе результатов экспериментального изучения цитотоксической активности, противоопухолевых свойств и механизмов действия наночастиц серебра (НЧС).

Отметим, что препараты серебра, вследствие присущей данному металлу антимикробной активности, давно находят практическое применение в различных областях. Наночастицы серебра используются в медицинских целях (антисептические покрытия инструментов, катетеров), в парфюмерной и текстильной промышленности, при изготовлении антисептических спреев, предметов гигиены, при производстве контейнеров для хранения продуктов питания, некоторых предметов электроники [2, 6–9].

### МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Существует целый ряд физических и химических методов получения НЧС, в основе которых лежат реакции химического восстановления нитрата серебра с помощью аскорбиновой кислоты, этанола, гидрата бора, цитрата натрия и ряда других восстанавливающих агентов, а также процессы фотохимического, электрохимического восстановления, испарения, термального синтеза.

В последние годы серьезное развитие получил так называемый биогенный синтез («зеленый синтез») НЧС с использованием экстрактов разнообразных растений, водорослей, грибов, бактерий.

Принято считать, что биогенный синтез обладает рядом преимуществ по сравнению с химическими и физическими методами получения НЧС — не требуется применения токсических химических реагентов, сложного дорогостоящего оборудования, высоких температур и давления. Такие факторы как доступность, безопасность, простота и низкая стоимость биогенного синтеза способствовали его широкому распространению [9–12].

Методы биогенного получения НЧС могут быть разделены на экстрацеллюлярный и интрацеллюлярный синтез.

При экстрацеллюлярном биогенном синтезе в качестве восстанавливающих агентов обычно используются экстракты разных частей растений (листья, стебли, корни, плоды), служащие источником образующихся в них вторичных метаболитов (фенольные соединения, алкалоиды, изопреноиды, различные минорные соединения). В результате их действия ионы серебра восстанавливаются до атомов металлического серебра, которые формируют наночастицы разного размера, как правило, диаметром менее 100 нм. Варьируя условия протекания реакции — концентрацию соли, величину pH и температуру — можно контролировать размеры получаемых НЧС. Вторичные метаболиты, содержащиеся в экстрактах растений, покрывают образующиеся НЧС, имеющие, как правило, сферическую форму, что препятствует их агрегации. Такой процесс «естественного» покрытия наночастиц позволяет избежать этапа их специального покрытия, характерного для химического синтеза.

При интрацеллюлярном синтезе нитрат серебра добавляют к культуре микроорганизмов либо грибов, где происходит его внутриклеточное восстановление с образованием НЧС.

Среди НЧС, синтезированных биогенным путем, ~72% получены при использовании экстрактов растений и около 15% — при применении экстрактов грибов [8, 10, 12–15].

Биологическая активность НЧС, полученных при биогенном синтезе, подтверждена рядом экспериментальных данных.

Так, НЧС, полученные с использованием экстракта одного из видов малины (*Rubus fairholmianus*), покрытые слоем этого экстракта толщиной ~4.7 нм, индуцировали выраженную апоптотическую гибель клеток рака молочной железы человека линии MCF-7 (концентрация НЧС — 10 мкг/мл, время инкубации — 24 ч) [16].

Сферические НЧС со средним диаметром, равным 38.5 нм, полученные путем биогенного синтеза с участием актинобактерий линии B5, вызывали гибель клеток гепатокарциномы человека линии HepG2 ( $IC_{50}$  составил 8.4 мкг/мл) [17].

Показана преимущественная цитотоксическая активность НЧС, полученных биогенным путем, по сравнению с химически синтезированными частицами [18]. В цитируемом исследовании проведено сравнение НЧС, полученных биогенным путем с использованием экстракта листьев чая (НЧС-Ч) и синтезированных химическим способом с применением в качестве восстановителя цитрата натрия (НЧС-Ц).

«Биогенные» НЧС оказывали более значительное цитотоксическое действие как на опухолевые, так и на нормальные клетки по сравнению с химически синтезированными. При применении НЧС-Ч и НЧС-Ц индекс цитотоксичности  $IC_{50}$  для клеток рака легкого линии A549 составил 63.1 и 72.2 ppm, а для нормальных фибробластов мышей линии MRC-5 — 1.3 и 17.6 ppm соответственно. Для обоих типов НЧС характерно снижение цитотоксичности с возрастанием степени их агрегации.

Выявлены определенные различия также и в физико-химических характеристиках, сравниваемых наночастиц. НЧС-Ч и НЧС-Ц имели размеры, равные 8.3 и 10.1 нм, сферическую форму у 96 и 70% частиц, дзета-потенциал, составляющий 27.8 и 36.2 мВ соответственно.

Сравниваемые НЧС различались по характеру и размерам покрытия, а также по склонности к агрегации. «Биогенные» НЧС обладали биологической матрицей из элементов экстракта листьев чая и отличались меньшей склонностью к агрегации по сравнению с химически синтезированными [18].

#### ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Изучению цитотоксичности НЧС для опухолевых клеток способствовало пристальное внимание к оценке токсичности соединений серебра, все более широко используемых в пищевой, медицинской, косметологической и парфюмерной промышленности. Во многих подобных токсикологических исследованиях экспериментальными моделями служили стабильные клеточные культуры опухолей человека различной природы. Очевидно, что полученные в этих исследованиях данные можно рассматривать и для оценки потенциальных противоопухолевых свойств НЧС.

Цитотоксичность НЧС исследована на широком спектре клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы, шейки матки, легкого, предстательной железы, гепатоцеллюлярный, колоректальный, назофарингеальный рак, глиобластома, фибросаркома). Показано, что НЧС вызывают гибель клеток практически всех изученных опухолей с индексом цитотоксичности  $IC_{50}$ , на-

ходящемся в диапазоне, соответствующем принятым критериям цитотоксичности химических соединений [19].

Например, при исследовании цитотоксичности сферических НЧС диаметром 7–20 нм  $IC_{50}$  для клеток фибросаркомы человека (линия HT-1080) составил 10.6 мкг/мл, а для клеток эпидермальной карциномы (A431) – 11.1 мкг/мл. Гибель клеток происходила в результате индукции оксидативного стресса – уровень глутатиона снизился в 1.6 и 3.0 раза, уровень супероксид дисмутазы – в 2.5 и в 2.0 раза, пероксидация липидов усилилась в 2.5 и 2.9 раза соответственно. Концентрация каспазы-3, требуемой для индукции апоптоза, составила 0.78 и 1.5 мкг/мл [20].

В то же время в ряде исследований не удалось зарегистрировать цитотоксический эффект у некоторых изученных НЧС. Так, при 24-часовом культивировании клеток MCF-7 с НЧС диаметром 20 нм в концентрации 0.39–100 мкг/мл не наблюдали гибель клеток, хотя при концентрации НЧС, равной 25 и 50 мкг/мл, регистрировали усиление продукции активных форм кислорода (АФК), но не наблюдали изменений потенциала митохондриальной мембраны. В то же время обнаружены индукция эпителиально-мезенхимального перехода по усилению экспрессии ряда белков, регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход (MTA3,  $\beta$ -катенина), и усиление способности клеток к миграции [21].

Особый интерес представляют НЧС, получаемые биогенным синтезом с использованием экстрактов растений, обладающих собственной цитотоксической активностью. Предполагается, что при таком подходе можно добиться усиления противоопухолевого действия за счет суммации действия ионов серебра и этих растений, в том числе, за счет более значительного накопления в опухолевых клетках экстрактов растений, доставляемых НЧС [22].

Следует отметить, что антипролиферативная активность НЧС, полученных биогенным синтезом, изучена на разных линиях опухолевых клеток; при этом в большинство исследований включались клетки рака молочной железы, для которых НЧС оказались высокотоксичными [14].

Усиление цитотоксического действия экстрактов растений при использовании для их доставки в клетки НЧС показано в экспериментах по сравнительному изучению эффективности чистого экстракта листьев индийской конопли (*Fagopyrum indica*), обладающей значимой противоопухолевой активностью, и НЧС, полученных биогенным путем с применением этого экстракта.

Установлено, что как НЧС (диаметром 10–60 нм с дзета-потенциалом –16.3 мВ), покрытые экстрактом, так и «чистый» экстракт обладают существенной дозо- и время-зависимой цитоток-

сической активностью в отношении клеток MCF-7. Однако НЧС достоверно превосходили по цитотоксичности «чистый» экстракт –  $IC_{50}$  составлял 12.35 и 25.09 мкг/мл соответственно. Оба агента индуцировали в клетках продукцию АФК, усиливали активацию каспаз 3 и 9, вызывали апоптоз, при этом выраженность этих эффектов также была достоверно более значительной при применении НЧС [10].

Высокая дозозависимая цитотоксичность для клеток MCF-7 обнаружена у НЧС, полученных биогенным синтезом с использованием экстракта листьев черного чая, содержащего большие количества полифенолов, в том числе катехинов, обладающих противоопухолевой активностью. Инкубация клеток с этими НЧС приводила к почти 100%-й гибели клеток [23].

НЧС (средний размер 12 нм), полученные с использованием экстракта цветов одного из видов тысячелистника (*Achillea biebersteinii*), обладающего противоопухолевыми свойствами, вызывали дозо- и время-зависимую гибель клеток MCF-7 с индексом цитотоксичности  $IC_{50}$ , равным 20 мкг/мл (время инкубации – 24 ч) [24].

Сообщалось о получении НЧС биогенным синтезом с использованием экстракта зеленой шелухи грецкого ореха, содержащего большое количество полифенолов, в том числе эллаговую кислоту, обладающую противоопухолевой активностью. При инкубации клеток MCF-7 с этими НЧС зарегистрирована дозозависимая гибель клеток с максимальным эффектом (гибель 70% клеток) при концентрации НЧС, равной 60 мкг/мл. При применении в такой концентрации стандартных НЧС погибло 56% клеток, при применении экстракта – 40% клеток. Цитотоксичность «биогенных» НЧС в отношении фибробластов мышей линии L-929 была незначительной (гибель 15% клеток) [22].

Была исследована цитотоксичность НЧС, полученных в реакции нитрата серебра с водным экстрактом листьев крапивы индийской (*Acalypha indica*), в отношении культуры клеток рака молочной железы MDA-MB-231 [25]. Зарегистрирована умеренная дозозависимая гибель клеток с максимумом гибели (40%) после 48-часовой инкубации при максимальной изученной дозе (100 мкг/мл). Такой же эффект зарегистрирован при инкубации этих клеток с такими же дозами нитрата серебра [25].

Более значительная цитотоксичность на клетках MCF-7 зарегистрирована для НЧС, полученных с использованием экстракта листьев центеллы азиатской (*Centella asiatica*). Культивирование клеток MCF-7 в течение 48 ч с этими НЧС в концентрации 100 мкг/мл привело к гибели 93% клеток. Однако при концентрации НЧС, равной 3 мкг/мл, гибель клеток составила всего 18.5%.

Определенное значение для эффективности НЧС имеет и длительность воздействия. При культивировании клеток с этими НЧС в течение 24 ч  $IC_{50}$  составил 8.8 мкг/мл, в течение 48 ч — 5.0 мкг/мл [26].

НЧС, полученные с использованием экстракта корневища растения семейства имбирных (*Kaempferia rotunda*), обладающего противоопухолевой активностью, вызывали дозозависимую гибель стволовых клеток глиобластомы человека — при концентрации НЧС, равной 40 мкг/мл, регистрировалась гибель 100% клеток,  $IC_{50}$  равнялся 6.8 мкг/мл [27].

Сферические НЧС (диаметром 3–36 нм с поверхностным зарядом  $-18.7$  мВ), полученные при смешивании раствора нитрата серебра с автолизатом актинобактерий линии SF<sub>23</sub>M, обладают цитотоксичностью как в отношении клеток рака молочной железы MCF-7, так и нормальных макрофагов линии RAW264.7. Индекс цитотоксичности  $IC_{50}$  составлял соответственно 12.9 и 16.3 мкг/мл [28].

#### ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Существует представление, согласно которому НЧС следует рассматривать лишь как систему направленной доставки ионов серебра в высоких концентрациях к клеткам-мишеням. Предполагается, что, воздействуя на эту систему разными способами (варьируя размеры, природу связанных с ними лигандов, тип покрытия), можно существенно повысить эффективность действия НЧС за счет повышения интрацеллюлярного уровня ионов серебра [6, 9].

Показано, что цитотоксичность НЧС, так же, как и наночастиц других благородных металлов, зависит от их размера, характера поверхности, ее заряда, а также от концентрации и длительности воздействия [1, 9, 29].

**Размер и форма наночастиц.** Предполагается, что чем меньше размер наночастиц, тем выше их цитотоксичность вследствие усиления эндоцитоза. Однако в результате проведенных в этом направлении экспериментальных исследований НЧС получены неоднозначные данные.

При исследовании действия трех видов НЧС размерами 5, 20 и 50 нм, на четырех клеточных моделях разных опухолей человека (A549, SGC-7901, HepG2, MCF-7) установлено, что наиболее выраженные эффекты (гибель клеток, генерация АФК, развитие оксидативного стресса, блок клеточного цикла в S-фазе, индукция апоптоза) регистрировались при применении НЧС диаметром 5 нм. Наиболее значительное интрацеллю-

лярное содержание НЧС также наблюдалось при применении НЧС диаметром 5 нм, с чем и связывают наибольшую цитотоксичность НЧС такого размера [30].

Оценка влияния размера НЧС на их эффективность проведена на примере изучения цитотоксичности НЧС, полученных биогенным синтезом с использованием экстракта черного чая. Показано, что в отношении клеток линии MCF-7 НЧС диаметром 5 нм обладали существенно более высокой цитотоксичностью, чем НЧС диаметром 15 нм [23].

В сравнительном исследовании НЧС диаметром 20 и 110 нм, покрытых цитратом или поливинилпирролидоном, также обнаружена существенно более высокая цитотоксичность НЧС меньшего размера в отношении клеток легочного эпителия [31].

В другом исследовании показано, что самые малые (диаметром 4 нм) из изученных НЧС проявляли наибольшую эффективность (подавление роста клеток, развитие оксидативного стресса) в отношении клеток лейкоза U937 [29].

Однако в работе других авторов, проведенной на клетках HeLa и U397, показано, что размер изученных ими НЧС не влиял на их цитотоксичность [32]. При сравнении апоптотического эффекта НЧС диаметром 5 и 35 нм в отношении клеток остеосаркомы также было показано, что этот эффект не зависит от размера НЧС в случае одинаковой интернализации НЧС разного размера [9].

Необходимо отметить, что имеются данные, указывающие на способность НЧС в зависимости от размера оказывать либо цитотоксический эффект, либо вызывать стимуляцию пролиферации опухолевых клеток. При культивировании клеток гепатоцеллюлярного рака HepG2 с НЧС диаметром 20 нм регистрировалась дозозависимая цитотоксичность с повреждением ДНК и митохондрий, а также с развитием оксидативного стресса. В то же время применение НЧС диаметром 10 и 100 нм индуцировало пролиферацию клеток, активацию митоген-активируемой киназы (МАРК), повышение экспрессии c-Jun и c-Fos [29].

Сферические НЧС проявляют максимальную цитотоксичность по сравнению с НЧС другой формы, благодаря свойственному им оптимальному, наиболее высокому соотношению между площадью поверхности и объемом частицы.

**Характер поверхности наночастиц.** Цитотоксичность НЧС зависит от характера их поверхности. При этом полагают, что характер покрытия влияет на способность НЧС образовывать ионы серебра [31].

Было проведено сравнительное изучение действия химически синтезированных НЧС, покры-

тых цитратом (НЧС-Ц), с частицами, дополнительно модифицированными покрытием лактозой (НЧС-Ц-Л) или олигонуклеотидом (НЧС-Ц-О), на клетки рака легкого линии A549. Наиболее выраженная гибель клеток и гиперэкспрессия белка p53 зарегистрированы при действии исходных НЧС-Ц. В то же время НЧС-Ц-Л проявили более значительную цитотоксичность, чем НЧС-Ц-О. Отмечено, что модифицированные наночастицы (НЧС-Ц-Л и НЧС-Ц-О) вызывают меньшую гибель нормальных фибробластов кожи человека линии HDF, чем исходные наночастицы (НЧС-Ц). Обнаруженные различия связывают с разной степенью проникновения НЧС в клетки, зависящей от химических особенностей поверхности НЧС [33, 34].

Влияние характера покрытия на цитотоксичность НЧС подтверждается данными, полученными при сравнительном изучении активности НЧС диаметром 20 и 110 нм, покрытых цитратом или поливинилпирролидоном. Показана преимущественная цитотоксичность НЧС, покрытых цитратом, в отношении клеток рака легкого, вне зависимости от размера НЧС [31].

**Заряд наночастиц.** Влияние величины заряда на цитотоксичность НЧС было показано в сравнительном исследовании двух видов НЧС диаметром 30 и 50 нм, полученных путем восстановления дубильной кислотой (НЧС-Д) или боргидратом натрия (НЧС-Б), которые различались по величине дзета-потенциала (30.6 и 22.2 мВ соответственно) [35].

Цитотоксичность НЧС оценивали на клетках эпителия кожи человека (A-431), легочного эпителия человека (A-459) и на макрофагах мышей (RAW264.7) по маркерам оксидативного стресса – генерация АФК, гиперэкспрессия p38, TNF- $\alpha$ , HSP-70. Показано, что цитотоксичность НЧС-Д была существенно выше цитотоксичности НЧС-Б.

Цитотоксичность НЧС-Д оказалась дозозависимой в диапазоне всех изученных концентраций, тогда как для НЧС-Б зависимость эффекта от дозы сохранялась в пределах концентраций, не превышающих 50 мкг/мл, при дальнейшем повышении концентрации цитотоксичность этого вида частиц уменьшалась.

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано, что при концентрации, равной 5 мкг/мл, оба типа НЧС не агрегируют, но при концентрации, равной 100 мкг/мл, агрегация наблюдалась только для НЧС-Б, тогда как НЧС-Д, имеющие более высокий дзета-потенциал, при этой концентрации не образовывали агрегатов. С такими особенностями сравниваемых НЧС связывают их разную цитотоксичность, поскольку не агрегировавшие НЧС легче про-

кают в клетку, несмотря на отрицательный заряд поверхностной мембраны клеток [35].

Необходимо отметить, что НЧС при попадании в среду, содержащую белки, в частности, в кровь, подвергаются электростатическому взаимодействию с белками, что может приводить к образованию белковой «короны» (биомолекулярная корона) на поверхности НЧС. Образование такой белковой короны способно оказывать влияние на физические свойства НЧС, их абсорбцию, аккумуляцию, интрацеллюлярный эффект.

Показано, что НЧС с белковыми коронами могут попадать в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, а характер короны является важной предпосылкой для проявления высокой цитотоксичности НЧС [9, 11].

**Тип опухолевых клеток.** Зависимость цитотоксичности НЧС от типа опухолевых клеток показана в ряде исследований.

Так, было установлено, что цитотоксичность НЧС, диаметром 40 нм, примененных в концентрации 10 мкг/мл, снижалась в зависимости от вида опухолевых клеток в следующем ряду: A2780 (рак яичников) > MDA-MB-231 (трижды негативный рак молочной железы) > MCF-7 (эстроген-зависимый рак молочной железы) [29].

В то же время цитотоксичность НЧС, полученных с использованием тропического растения семейства тыквенных (*Cucumis prophetarum*), менялась в другой последовательности – MCF-7 ( $IC_{50}$  = 65.6 мкг/мл) > MDA-MB-231 (81.1 мкг/мл) > HepG2 (94.2 мкг/мл) > A549 (105.8 мкг/мл). Как видно, к действию этих НЧС наиболее чувствительными оказались клетки рака молочной железы линии MCF-7 [36].

Культивирование трех разных линий клеток рака яичников человека со сферическими НЧС диаметром 25 нм, покрытыми поливинилпирролидоном, показало, что клетки двух линий (A2780 и SCOV3) высокочувствительны к цитотоксическому действию НЧС ( $IC_{50}$  составлял 7.2 и 9.4 мкг/мл соответственно), а клетки линии OVCAR3 оказались практически нечувствительными к их действию ( $IC_{50}$  равнялся 320.6 мкг/мл).

Показано, что клетки этих линий различались по базальному уровню АФК – он был высоким в клетках A2780 и SCOV3 и незначительным в клетках OVCAR3. Применение НЧС приводило к возрастанию уровня АФК в чувствительных клетках и не меняло его в нечувствительных клетках.

Следует отметить, что все три линии клеток рака яичников были одинаково чувствительными к цитотоксическому действию цисплатины ( $IC_{50}$  составлял 2.9, 5.3 и 4.6 мкМ соответственно) [37].

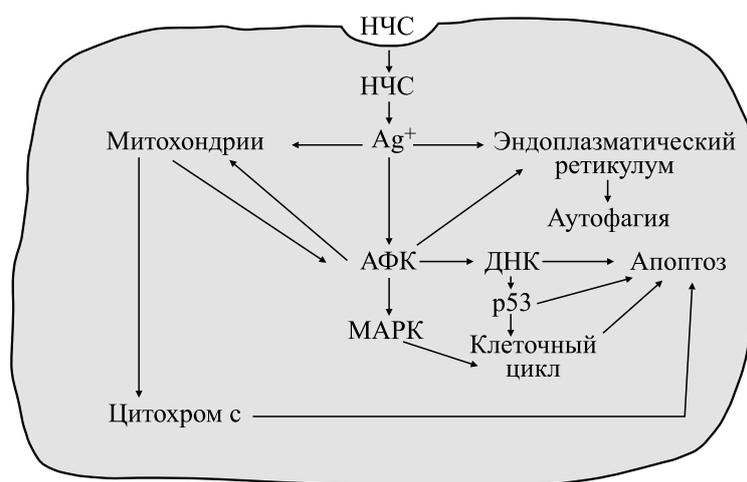


Рис. 1. Мишени и механизмы цитотоксического действия наночастиц серебра.

### МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Цитотоксическое действие НЧС на опухолевые клетки может реализоваться путем апоптоза или некроза, индуцируемых разрушением ультраструктуры клеток в результате усиления продукции АФК, повреждения митохондрий, ДНК, инактивации ферментов и нарушения регуляторных сигнальных путей.

Предполагается, что НЧС способны блокировать инвазию опухолевых клеток и метастазирование путем ингибирования ангиогенеза.

Селективность попадания НЧС в опухолевые клетки может обеспечиваться эффектом «усиления проникновения и задержки», характерным для опухолей и обусловленным особенностями архитектуры ткани опухоли [7, 9, 11].

Реализация цитотоксического действия НЧС включает в себя несколько основных этапов:

- проникновение НЧС в клетку путем диффузии, фагоцитоза, простого эндоцитоза или рецептор-опосредованного эндоцитоза;
- интрацеллюлярная генерация АФК под действием самой НЧС или выделяемого из нее иона серебра, развитие оксидативного стресса;
- подавление разных антиапоптотических белков, экспрессия проапоптотических белков, активация сигнальных путей, регулирующих апоптоз [9, 29].

Результаты многочисленных исследований указывают на большое разнообразие мишеней и механизмов действия НЧС, которые могут участвовать в реализации их цитотоксичности [7, 9, 11, 29, 38].

Среди наиболее часто упоминаемых мишеней и механизмов действия отметим следующие:

- повреждение плазматической и митохондриальной мембран вследствие воздействия на мембранные белки, обусловленного высокой аффинностью серебра к сере, что приводит к увеличению перекисидации и проницаемости мембран, активации сигнальных путей;

- повреждение дыхательной цепи митохондрий, подавление продукции АТФ;

- усиление продукции АФК;

- снижение уровня глутатиона, подавление активности антиоксидантных ферментов;

- развитие оксидативного стресса;

- повреждение ДНК с нарушением экспрессии ключевых генов, регулирующих важные сигнальные пути, в частности *p53*, *p21*, *HIF-1*, *JNK*, *STAT-3*, *VEGF* и др.;

- экспрессия про- и антиапоптотических белков (Bax, BCL-2), что ведет к индукции апоптоза;

- выход из митохондрий в цитозоль цитохрома с, гиперэкспрессия каспаз 3, 8, 9;

- блок клеточного цикла;

- ингибирование теломеразы и дисфункция теломер;

- снижение активности металлопротеиназ MMP-2 и 9;

- повреждение эндоплазматического ретикула, индукция аутофагии.

Схематически мишени и механизмы действия НЧС показаны на рис. 1.

В первую очередь цитотоксичность НЧС связывают с увеличением продукции АФК и развитием оксидативного стресса. О важной роли гиперпродукции АФК в цитотоксическом действии НЧС свидетельствуют выявленные на клетках рака легкого A549 корреляции между уровнем АФК и степенью повреждения ДНК, митохондрий и

ранним апоптозом. Об этом же свидетельствует снижение цитотоксичности НЧС при предварительной обработке этих клеток антиоксидантом N-ацетилцистеином [39].

Следует заметить, что индукция в опухолевых клетках оксидативного стресса рассматривается в настоящее время как одно из новых перспективных направлений в лекарственной терапии рака [40].

Известно, что наночастицы серебра могут индуцировать двойные разрывы ДНК.

Культивирование опухолевых и нормальных клеток с НЧС (диаметром 23 нм), покрытыми поливинилпироллидоном, в дозе 10 и 25 мкг/мл приводило к достоверному увеличению уровня маркера двойных разрывов – гистона  $\gamma$ H2AX, при этом эффект был наибольшим в клетках MDA-MB-231, меньшим – в клетках MCF-7 и еще меньшим – в нормальных клетках молочной железы линии MCF-10A [41].

Увеличение уровня гистона  $\gamma$ H2AX зарегистрировано также после 24-часового культивирования с НЧС клеток рака яичников линий A2780 и SCOV3 (чувствительны к цитотоксическому действию) и не обнаружено в клетках рака яичников линии OVCAR3 (нечувствительны к действию наночастиц) [37].

О способности НЧС повреждать ДНК могут свидетельствовать и обнаруженные при действии НЧС (в концентрации 25 мкг/мл) хромосомные aberrации как в опухолевых (глиобластома человека U251), так и в нормальных (легочные фибробласты человека IMR-90) клетках. При этом частота aberrаций в опухолевых клетках была существенно больше, чем в нормальных (0.32 и 0.18 на клетку соответственно). На этих клетках показано также, что НЧС подавляют клеточную пролиферацию, вызывая блок клеточного цикла в митозе, при этом в нормальных клетках происходит быстрое восстановление пролиферации, тогда как в опухолевых клетках подавление пролиферации регистрировалось в течение длительного времени [42].

Механизмы цитотоксического действия НЧС могут включать также нарушение интрацеллюлярного транзита  $Ca^{2+}$ , снижение экспрессии актинсвязывающего белка и филамина [42].

Важным условием реализации цитотоксического действия НЧС является их способность проникать внутрь клетки. Показано, что НЧС попадают как в нормальные (легочные фибробласты человека IMR-90), так и в опухолевые (глиобластома человека U251) клетки путем клатринопосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза, а выводятся путем время-зависимого экзоцитоза. После попадания в клетку НЧС равномерно распределяются в цитоплазме и в ядре [42].

О роли эндоцитоза в реализации цитотоксического действия НЧС могут свидетельствовать результаты экспериментов, в которых показано, что предварительная обработка клеток рака молочной железы MDA-MB-231 цитохолозином Д (ингибитор большинства форм эндоцитоза) ингибирует цитотоксическое действие на эти клетки НЧС (диаметром 25 нм), покрытых поливинилпироллидоном [41].

Эти результаты были подтверждены в аналогичном эксперименте с клетками рака яичников линии A2780, чувствительными к цитотоксическому действию НЧС. Применение цитохолозина Д в опытах с клетками рака яичников линии OVCAR3, нечувствительными к действию НЧС, не оказало никакого эффекта [37].

Не исключается прямое попадание НЧС в клетку через ионные каналы [29].

Как уже отмечалось, дозозависимая гибель опухолевых клеток под влиянием НЧС может происходить путем как апоптоза, так и некроза.

Показано, в частности, что НЧС диаметром 18 нм, полученные в реакции с гидрохлорид гидроксиламином, вызывали преимущественно некротическую, а не апоптотическую гибель клеток MCF-7 ( $IC_{50}$  составил 40 мкг/мл). При этом доля некротических клеток превосходит долю клеток в апоптозе при воздействии всех испытанных концентраций НЧС. Отмечено, что при возрастании концентрации НЧС количество апоптотических клеток практически не меняется, тогда как число некротических клеток постоянно [34].

#### СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И НИТРАТА СЕРЕБРА

При исследовании механизмов цитотоксического действия НЧС возникает вопрос, чем обусловлен этот эффект – действием ионов серебра Ag(I), которые могут образовываться из НЧС, или особенностями действия НЧС как таковых. Результаты проведенных исследований весьма противоречивы [9, 29].

Ответ на этот вопрос пытаются найти в сравнительных экспериментах при одновременной оценке цитотоксичности НЧС и ионов серебра. При этом полагают, что в случае, если эффекты будут одинаковыми, то можно считать, что действие НЧС обусловлено ионами серебра, образующимися интрацеллюлярно из НЧС.

Считается, что механизмы цитотоксического действия НЧС в отношении опухолевых клеток могут быть близки механизмам действия на микробные клетки.

Исследования на бактериальных клетках показали, что биологическая активность НЧС обу-

словлена, в основном, действием катиона серебра, выделяющегося из НЧС.

Ион серебра связывается с тиоловыми группами ферментов, участвующими в дыхательной цепи бактериальной клетки, в результате чего генерируются АФК, что ведет к развитию оксидативного стресса и повреждению клетки. Показано, что ионы серебра генерируют также пероксиды, которые могут окислять липиды и повреждать клеточные мембраны [6, 34].

Методом катионного обмена установлено, что растворы НЧС содержат лишь незначительное количество свободных ионов серебра. Однако культивирование клеток рака печени человека с НЧС сопровождалось цитотоксичностью, сопоставимой с цитотоксичностью нитрата серебра, являющегося источником  $\text{Ag(I)}$ . По мнению авторов исследования, это свидетельствует о роли интрацеллюлярного образования из НЧС ионов серебра в реализации цитотоксического действия НЧС [43].

Предполагается, что усилению этого эффекта при действии серебра в виде НЧС, по сравнению с применением серебрясодержащих соединений, могут способствовать особенности поверхности НЧС, благодаря которым они способны более интенсивно генерировать АФК или катализировать окисление компонентов клетки [30, 34].

Однако при инкубации (в течение 24 ч) клеток линии HeLa53 с НЧС диаметром 5–10 нм или с нитратом серебра обнаружено, что цитотоксичность НЧС более чем в пять раз меньше цитотоксичности нитрата серебра. Индекс цитотоксичности  $IC_{50}$  составлял соответственно 92 и 17 мкг  $\text{Ag/мл}$ . Максимальное (близко к 100%) число клеток в апоптозе отмечено при концентрации НЧС, равной 120 мкг  $\text{Ag/мл}$ , и при концентрации нитрата серебра, равной 32 мкг  $\text{Ag/мл}$ . Исследование влияния этих агентов на стрессовые гены показало, что как НЧС, так и нитрат серебра индуцируют гиперэкспрессию генов *mt-2A* и *ho-1* и не меняют экспрессию гена *hsp70*, но по степени влияния на экспрессию этих генов НЧС также уступали нитрату серебра [44].

В то же время при сравнении цитотоксичности для клеток HeLa нитрата серебра и сферических НЧС (средний диаметр 13.4 нм, дзета-потенциал – 61.9 мВ), полученных восстановлением нитрата серебра кверцетином, было обнаружено, что НЧС оказывают более выраженный цитотоксический эффект – значительное снижение выживаемости клеток начинается при концентрации НЧС, равной 2 мкг/мл, тогда как нитрат серебра при всех концентрациях незначительно снижал выживаемость клеток [32].

Однако на клетках гистиоцитарной лимфомы человека (линия U397) цитотоксичность этих НЧС и нитрата серебра оказалась очень близкой.

Авторы интерпретируют эти результаты, как указание на зависимость участия ионов серебра в реализации цитотоксичности НЧС от типа опухолевых клеток, который может влиять на способность интрацеллюлярного выделения ионов серебра из НЧС [32].

Следует отметить, что в этих экспериментах клетки U397 оказались более чувствительны, чем клетки HeLa к цитотоксическому действию как НЧС, так и нитрата серебра – значительное снижение выживаемости клеток начиналось с концентрации 0.5 мкг/мл. Одним из объяснений этого факта, по мнению авторов, может быть различие в характере роста культур этих клеток. В отличие от культуры HeLa, которая является адгезионной культурой, культура клеток U397 относится к суспензионным культурам, что обеспечивает более значительный контакт клеток с НЧС и с ионами серебра [32].

Показано, что при кратковременном инкубировании (в течение 4 ч) НЧС и нитрат серебра вызывали практически одинаковую гибель клеток Т-клеточного лейкоза человека Jurkat. Уровень АФК в клетках также был одинаков. Однако при более длительной экспозиции (24 ч) применение НЧС приводило к генерации более высокого уровня АФК, активации сигнальных путей с участием р38-митоген активируемой протеин киназы, ядерных факторов E2 и  $\kappa\text{B-NF}$ , что вело к повреждению ДНК, блоку клеточного цикла и апоптозу [45].

Изучалось влияние количества ионов серебра, содержащихся в НЧС, на выживаемость клеток рака легкого A549 [46]. Показано, что цитотоксичность суспензии НЧС зависит от уровня содержащегося в ней катиона серебра ( $\text{Ag}^+$ ). При фракции  $\text{Ag}^+$ , составляющей 39%, выжило 92% клеток, при фракции 69% выживаемость клеток составила 54%. В то же время при сравнении цитотоксичности суспензии НЧС и ее супернатанта оказалось, что при содержании в них ионов серебра в количестве, равном 5.5% и более, цитотоксичность суспензии и супернатанта была одинаковой. Однако при уровне ионов серебра, равном 2.6% и менее, цитотоксичность суспензии превосходила цитотоксичность супернатанта. Авторы считают, что реализация цитотоксического действия наночастиц, как таковых, по сравнению с ионами серебра может происходить только при низком содержании последних [46].

При сравнении цитотоксичности нативных НЧС, полученных после фильтрации 30-суточного раствора НЧС, и фильтрата (предполагается, что в нем должны быть ионы серебра, выделившиеся в процессе хранения раствора НЧС) гибель клеток рака яичников (A2780) зарегистрирована только при применении нативных наночастиц [37].

В аналогичном эксперименте с клетками рака молочной железы MDA-MB-231 цитотоксичными оказались также только НЧС, но не фильтрат [41]. Возможно, это обусловлено слишком низким содержанием ионов серебра  $Ag^+$  в фильтрате, которое в этих экспериментах количественно не оценивалось.

Не выявлено различий в цитотоксичности НЧС и нитрата серебра на клетках рака молочной железы MCF-7 [25].

Цитотоксичность НЧС и нитрата серебра оказалась одинаковой для клеток рака яичников линии A2780, чувствительных к действию НЧС. Однако клетки рака яичников линии OVCAR3, нечувствительные к цитостатическому НЧС, проявили весьма значительную чувствительность к нитрату серебра [37].

Обнаружено, что НЧС (диаметром 5 нм) и нитрат серебра, примененные в одинаковых концентрациях (1.00–1.75 мкг/мл), обладают равной генотоксичностью и цитотоксичностью, определяемыми с помощью микроядерного теста и измерения уровня оксидативного стресса, в отношении лимфоцитов селезенки человека линии ТК6.

Однако добавление в культуру клеток N-ацетилцистеина (хелатор  $Ag^+$ ) снижало генотоксичность нитрата серебра и не влияло на эффект наночастиц серебра, тогда как добавление перехватчика радикалов (тролокса) уменьшало генотоксичность обоих агентов.

Установлено, что в культуральной среде, содержащей НЧС, ионизируется только 0.5% наночастиц. Показано, что такая концентрация  $Ag(I)$  не оказывает на клетки цитотоксического и генотоксического действия. С помощью ЭПР анализа показано, что гидроксильные радикалы прямо продуцируются только НЧС. Авторы исследования приходят к выводу, что цитотоксическое действие НЧС не связано с образованием ионов серебра [47].

#### ФОТО- И РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Согласно представлениям о физических механизмах биологического действия наночастиц, можно полагать, что НЧС, аналогично наночастицам золота, также могут обладать фото- и радиосенсибилизирующими свойствами. Обнаружение таких свойств у наночастиц благородных металлов позволяет рассчитывать на потенциальную возможность их использования при фотодинамической и лучевой терапии опухолей [48].

Фотосенсибилизирующее действие обнаружено у НЧС, диаметром 98.5 нм, полученных биогенным синтезом с использованием экстрактов

листьев артишока (*Cynara Scolymus*). Показано, что сочетанное применение этих НЧС и облучения красным светом приводит к существенному дозозависимому снижению выживаемости клеток MCF-7 по сравнению с использованием только НЧС. Обнаружено, что в результате такой сочетанной терапии значительно (более чем в четыре раза) увеличивается внутриклеточное содержание АФК, достоверно снижается уровень антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы), резко увеличивается соотношение про- и антиапоптотических белков (Bax/Bcl-2) и значительно возрастает активность каспазы-3 по сравнению с действием только НЧС. Следует заметить, что в этих экспериментах при применении только НЧС регистрировались те же эффекты, но они были менее выраженными, чем при сочетанном воздействии обоих факторов [49].

В ряде экспериментальных исследований был показан радиосенсибилизирующий эффект НЧС.

Культивирование в течение 24 ч клеток рака молочной железы (MDA-MB-231; MCF-7) и нормальных эпителиальных клеток молочной железы (MCF-10A) с НЧС диаметром 25 нм, покрытыми поливинилпирролидоном, в концентрациях 10–25 мкг/мл, с последующим рентгеновским облучением в дозе 4 Гр достоверно увеличивало во всех клетках повреждение ДНК (через 1 ч после облучения) по сравнению с эффектом только облучения (оценено по уровню маркеров двойных разрывов ДНК – гистону  $\gamma$ H2AX).

Наиболее чувствительными к комплексному воздействию НЧС и облучения оказались клетки MDA-MB-231. С помощью клоногенного теста показано, что применение НЧС в дозе 1 мкг/мл в сочетании с облучением (2 Гр) усиливает эффект облучения в два раза, а применение НЧС в более высоких концентрациях (5 и 10 мкг/мл) при облучении приводит к полному ингибированию образования клеточных колоний [41].

На клетках гепатокарциномы HepG2 индекс усиления цитотоксичности при комбинации НЧС с облучением (6 Гр) составил величину, равную 1.98 [51].

Наряду с этим имеются данные, свидетельствующие об отсутствии радиосенсибилизирующих свойств НЧС.

Так на ксенографтах рака молочной железы MDA-MB-231 было показано, что внутритопуховое введение мышам НЧС не приводило к усилению действия облучения (4 Гр, дважды с интервалом в 21 сутки) [41].

Важно отметить, что к НЧС проявляют чувствительность клетки, находящиеся в состоянии гипоксии. Так, показано, что индекс цитотоксичности  $IC_{50}$  НЧС составил для клеток глиомы U251

в условиях гипоксии (1% O<sub>2</sub>) 30.3 мкг/мл, а в условиях нормоксии – 34.7 мкг/мл. Для клеток глиомы С6 этот показатель равнялся 27.5 и 32.5 мкг/мл соответственно [51].

Предполагается, что НЧС могут повышать чувствительность гипоксических опухолевых клеток к лучевой терапии.

При сочетанном воздействии НЧС (диаметром 27 нм, получены электрохимическим методом) и облучения (линейный ускоритель) на клетки глиомы U251 и глиомы С6, культивируемые в условиях гипоксии (1% O<sub>2</sub>), индекс радиосенсибилизации составил 1.78 и 1.84 соответственно. При этом для клеток, культивируемых в условиях нормоксии, индекс радиосенсибилизации имел значения, равные 1.34 и 1.45 соответственно.

Радиосенсибилизирующий эффект НЧС связывают с более значительным их накоплением в гипоксических клетках по сравнению с другими опухолевыми клетками в популяции [51].

### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Определенная противоопухолевая активность некоторых НЧС показана в ряде исследований, выполненных на экспериментальных моделях опухолей животных и ксенографтах опухолей человека в условиях *in vivo*.

В этих экспериментах использовали как переносимые (меланома В-16, рак молочной железы 4Т1, глиома С6, опухоль Эрлиха), так и канцероген-индуцированные (индуцированная диэтилнитрозоамином гепатокарцинома, индуцированная метилхолантеном фибросаркома) опухоли мышей, а также ксенографты опухолей человека (рак молочной железы MDA-MB-231, рак предстательной железы PC-3) [9].

Определенная чувствительность опухолей в условиях *in vivo* к НЧС (диаметром 25 нм, покрытие поливинилпирролидоном) продемонстрирована в экспериментах с ксенографтами рака молочной железы человека MDA-MB-231. Зарегистрирована выживаемость всех подопытных мышей на протяжении 100 суток при внутривенном введении НЧС в дозе 6 мг Ag/кг трижды в неделю в течение 10 недель. Выживаемость контрольных мышей к этому сроку составила 30% [52].

Показано, что НЧС, полученные с использованием экстракта корневища растения из семейства имбирных (обладает противоопухолевой активностью), вызывали при применении в дозе 12 мг/кг/сутки на протяжении пяти суток торможение развития асцитной опухоли Эрлиха на 55% по сравнению с контролем.

В то же время НЧС, полученные с использованием экстракта фруктов тропического фруктового растения *Zizyphus mauritiana* (противоопухолевой активности не имеет), при применении в дозе 12 мг/кг/сутки тормозили рост опухоли Эрлиха всего на 20%, а при применении в дозе 6 мг/кг/сутки оказались полностью неэффективны [53].

Одним из направлений доклинического изучения новых потенциальных противоопухолевых агентов является изучение их цитотоксичности в отношении опухолевых клеток, резистентных к стандартным противоопухолевым препаратам. Предполагается, что применение НЧС может подавлять некоторые механизмы развития множественной лекарственной устойчивости раковых клеток, такие как повышение толерантности к оксидативному стрессу, усиление репарации ДНК, активация Р-гликопротеина Pgp, обеспечивающего выброс препаратов из клетки.

На клетках рака толстой кишки Colo320 с гиперэкспрессией Pgp, резистентных к химиотерапии, показано, что комбинация НЧС с разными противоопухолевыми препаратами (метотрексат, цисплатин, кармустин, блеомицин, винбластин, вепарамил) привела к синергетическому усилению цитотоксичности всех изученных противоопухолевых препаратов. Это дало основание считать, что преодоление множественной лекарственной устойчивости с помощью наночастиц обусловлено подавлением активности Pgp, ведущим к повышению интрацеллюлярной концентрации препаратов [9].

Однако на клетках рака молочной железы, резистентных к тамоксифену (MCF-7/TAMR-1), цитотоксичность сферических НЧС, диаметром 5–30 нм, полученных с использованием экстракта листьев Гарцинии атровидис (*Garcinia atroviridic*), оказалась значительно меньше эффекта тамоксифена ( $IC_{50}$  равнялся 32.0 и 11.5 мкг/мл соответственно). В то же время на клетках рака молочной железы (MCF-7), чувствительных к тамоксифену, эти НЧС оказались более эффективными, чем тамоксифен. Индекс цитотоксичности  $IC_{50}$  в отношении этих клеток составлял для НЧС и тамоксифена 2.0 м и 8.8 мкг/мл соответственно (время инкубации – 72 ч) [12].

Одним из путей применения НЧС в лекарственном лечении опухолей может быть включение их в разные схемы комбинированной терапии. В этом отношении несомненный интерес представляют результаты исследования цитотоксичности совместного применения НЧС и цисплатины, проведенного на трех разных линиях рака яичников человека.

Показано, что для клеток двух линий (A2780 и OVCAR3) эффект комбинации оказался синергетическим по сравнению с применением каждого

препарата в отдельности, а на клетках линии SCOV3 зарегистрирован лишь небольшой аддитивный эффект [37]. Вероятно, эффективность этой комбинации не связана с чувствительностью клеток к действию НЧС — клетки A2789 и SCOV3 чувствительны к НЧС, тогда как клетки OVCR3 — нечувствительны. Следует также отметить, что клетки всех трех линий одинаково чувствительны к цитотоксическому действию цисплатины.

Синергетическое усиление цитотоксичности показано на клетках рака яичников человека линии A2780 при комбинации НЧС с антимикробным препаратом салиномицином, обладающим противоопухолевой активностью [54].

На клетках HeLa зарегистрировано усиление гибели клеток рака шейки матки при сочетании НЧС с камптотецином (ингибитор топоизомеразы) [55], трихостатином (ингибитор гистондеацетилазы) [56]. Эффективность сочетания НЧС с еще одним ингибитором гистондеацетилазы MS-275 показана на клетках рака легкого A549 [57].

Показана определенная способность наночастиц серебра оказывать антиканцерогенное действие.

Пероральное введение крысам НЧС, полученных биогенным синтезом с использованием актинобактерий B5, в дозах 25–50 мг/кг дважды в неделю в течение 21 недели одновременно с канцерогеном диэтилнитрозоамином, привело к достоверному подавлению частоты возникновения гепатокарцином. Число развившихся опухолей при применении НЧС в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг составило  $4.0 \pm 0.4\%$  и  $3.0 \pm 0.4\%$  соответственно, при развитии  $5.0 \pm 1.0$  опухолей в контроле. Зарегистрировано также достоверное снижение средней массы опухоли — с 0.56 г в контроле до  $0.2–0.18$  г при применении НЧС [17].

Клинические испытания противоопухолевых свойств НЧС, по-видимому, пока не проводились.

Было опубликовано одно сообщение о случае успешного применения НЧС у больного 78 лет с метастазами плоскоклеточного рака полости рта в легкие и печень, резистентными к терапии цисплатиной и таксанами. После лечения пероральным приемом раствора НЧС диаметром 3 и 12 нм рентгенологически зарегистрирована полная регрессия метастазов длительностью 18+ месяцев. Показано, что содержание  $Ag^+$  в крови через 1 ч после приема 60 мл раствора НЧС возросло с 32 до 46 нг/г; в моче ионы  $Ag^+$  не были обнаружены [58].

### ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

В связи с достаточно широким использованием НЧС при изготовлении предметов бытового и медицинского назначения были проведены исследования по безопасности их применения и, в частности, по изучению токсичности НЧС для нормальных клеток и органов.

В ряде исследований показано, что НЧС способны оказывать цитотоксическое действие на некоторые нормальные клетки.

Так, установлено, что НЧС диаметром 15, 30 и 55 нм вызывали дозозависимое снижение выживаемости альвеолярных макрофагов при инкубации в течение 24 ч. При этом зарегистрировано десятикратное увеличение внутриклеточного уровня АФК после применения НЧС диаметром 15 нм в концентрации 50 мкМ [4].

На нормальных клетках печени крыс (BRL 3A) показано, что НЧС диаметром 15 и 100 нм, примененные в концентрациях 5–50 мкг/мл, при инкубации в течение 24 ч вызывали гибель клеток в результате развития оксидативного стресса (увеличение генерации АФК, снижение уровня глутатиона и потенциала мембран митохондрий) [59].

Применение НЧС в опытах с фибробластами линии  $NIH_3T_3$  индуцировало в этих клетках выход цитохрома *c* в цитозоль и транслокацию проапоптотических белков Bax в митохондрии. Показано также, что индукция в фибробластах апоптоза в результате действия НЧС ассоциирована с активацией JNK-киназы [38].

Цитотоксичность НЧС диаметром 5–10 нм, полученных в импульсно-плазменном реакторе, показана в отношении стволовых герминативных клеток мышей линии C18-4. Инкубация клеток с этими НЧС приводила к выраженной гибели клеток с показателем  $IC_{50}$ , равным 8.75 мкг/мл [60].

В то же время в ряде исследований не зарегистрирована цитотоксичность НЧС для нормальных клеток.

Культивирование мышинных гепатоцитов линии AML<sub>12</sub> в течение 24 ч с НЧС диаметром 15 и 6 нм (в концентрации 5 и 10 мкг/мл) сопровождается лишь незначительной цитотоксичностью для клеток (гибель 10–30% клеток). Не обнаружено появления серебра в митохондриях и не зарегистрированы нарушения дыхательной функции митохондрий [61].

Наночастицы серебра диаметром 25 нм, покрытые поливинилпирролидоном, не оказывали существенного влияния на нормальные эпителиальные клетки молочной железы линии MCF-10A ( $IC_{50} = 83.3$  мкг/мл), будучи высокотоксич-

ными для клеток рака молочной железы линии MDA-MB-231 ( $IC_{50} = 11.9$  мкг/мл) [52].

Местное применение на инфицированную рану крыс НЧС, полученных с помощью биогенного синтеза с применением экстракта стебля и корней растения *Acacia rigidula*, растущего в северо-восточных регионах Мексики, не сопровождалось какими-либо функциональными изменениями со стороны печени и почек [62].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ накопленной информации о цитотоксических свойствах НЧС и механизме их действия позволяет рассматривать эти субстанции в качестве возможной основы для разработки потенциальных лекарственных противоопухолевых средств. Большинство исследователей, работающих в этом направлении, считает, что наиболее перспективными могут быть экспериментальные доклинические исследования противоопухолевой активности НЧС, полученных биогенным путем.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., *Биофизика*, **66** (6), 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
2. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
3. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии*, **64** (6), (697 (2018)
4. C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand, et al. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13608 (2008). DOI: 10.1021/j/p712087m
5. W. Yang, H. Veroniana, X. Qi, et al., *Adv. Ther. (Weint)*, **3** (1), 201900102 (2020). DOI: 10.1002/adtp.201900102
6. J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, and P. H. Hurt, *AcsNano*, **4** (11), 6903 (2010). DOI: 10.1021/nn102272n
7. S. Dasari, C. Yedjon, R. T. Brodell, et al., *Nanotechnol. Rew.*, **9** (1), 1500 (2020). DOI: 10.1515/intrev-2020-0117
8. M. Rai, A. P. Ingle, J. Trzcinska-Wencel, et al., *Nanomaterials*, **11**, 2901 (2021). DOI: 10.3390/nan11112901
9. D. Kovacs, N. Igaz, M. K. Gopisetty, and M. Kiricsi, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 839 (2022). DOI: 10.3390/ijms230020839
10. I. Ullah, A. T. Khalie, M. Ali, et al., *Oxidative Med. and Cell. Longevity*, **2020**, ID1215395 (2020). DOI: 10.1155/2020/1215395
11. L. Xu, Y. Y. Wang, J. Huang, et al., *Theranostics*, **10** (20), 8996 (2020). DOI: 10.7150/Thno.45413
12. N. I. Zulkifli, M. Muhamad, M. N. Zain, et al., *Molecules*, **25**, 4432 (2020). DOI: 10.3390/molecules25184332
13. C. E. Escrcega-Gonzalez, J. A. Garza-Cervantes, A. Vazquez-Rodriguez, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **13**, 2349 (2018). DOI: 10.2147/ijn.s160605
14. H. Barabadi, M. A. Mahjoub, B. Tajani, et al., *J. Cluster Sci.*, **30**, 259 (2019). DOI: 10.1007/s10876-018-014917
15. O. Erdogan, M. Abbak, G. M. Demitbolat, et al., *PLoS One*, **14** (6), e0216496 (2019). DOI: 10.1371/journal.pone.0216496
16. B. P. Georg, N. Kumar, H. Abrahams, and S. S. Ray, *Sci. Rep.*, **8**, 14368 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-32480-5
17. T. Shanmugasundaram, M. Radhakrishnan, V. Gopikrishnan, et al., *Nanoseale*, **9**, 16773 (2017). DOI: 10.1039/c7nr04979
18. P. Belteky, A. Rohavari, N. Igaz, et al., *Int. J. Nanomed.*, **14**, 667 (2019). DOI: 10/2147/IJNN.s185965
19. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, с. 642.
20. S. Arora, J. Jain, J. M. Rajwade, and K. M. Paknikar, *Toxicol. Lett.*, **179** (2), 93 (2008). DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.04.009
21. M. Rakowski, S. Porebski, A. Grzelak, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (9), 9203 (2021). DOI: 10.3390/ijms22179203
22. S. Khorrami, A. Zarrabi, M. Khaleghi, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **13**, 8013 (2018). DOI: 10.2147/IJN.s189295
23. S. Rajawat, R. Kurchania, K. Rajukumar, et al., *Green Process Synth.*, **5**, 173 (2016). DOI: 10.1515/gps-2015-0104
24. J. Baharara, F. Namvar, I. Ramerzani, et al., *Molecules*, **20** (3), 2693 (2015). DOI.org/10.3390/molecules20022693
25. C. Krishnaraj, P. Muthukumar, R. Ramachandran, et al., *Biotechnol. Rep.*, **4**, 42 (2014). DOI: 10/1016/j.btre.2914.08.002
26. S. E. Fard, F. Tafvizr, and M. B. Tozbati, *IET-Nanobiotechnol.*, **12** (7), 994 (2018). DOI: 10.1049/iet-nbt.2018.5069
27. S. R. Kabir, Z. Dai, M. Nurujjaman, et al., *J. Cell Mol. Med.*, **24**, 13223 (2020). DOI: 10.1111/jcmm15934
28. M. Wypij, T. Jedrzemnewski, J. Trzcinska-Wencel, et al., *Front. Microbiol.*, **12**, 632505 (2021). DOI: 10.3389/fmicb.2021.632505
29. M. Acter, M. T. Sikder, M. M. Rahman, et al., *J. Adv. Res.* **9** (1), 1 (2018). DOI: 10.1016/j.jare.2017.10.008
30. W. Liu, Y. Wu, C. Wang, et al., *Nanotoxicology*, **4** (3), 319 (2010). DOI: 10.3109/117435390.2020.483745

31. X. Wang, Z. Ji, C. H. Chang, et al., *Small*, **10** (2), 385 (2014). DOI: 10.1002/small.201301597
32. S. I. Kaba and E. M. Egorova, *Nanotechnol. Sci. Appl.*, **8**, 19 (2015). DOI: 10.2147/NSA.5578134
33. I. Sur, M. Altunbak, H. Kahraman, and M. Culha, *Nanotechnology*, **23** (37), 375 (2012). DOI: 10.1088/0957-4484/23/37/372102
34. H. Ciftci, M. Turk, U. Tamer, et al., *Turkish J. Biol.*, **37**, 573 (2013). DOI: 10.3906/biu-1302-21
35. J. Kaur and K. Tikoo, *Food Chem. Toxicol.*, **51**, 1 (2013). DOI: 10.106/j.fct.2012.08.044
36. Hemlata, P. R. Meena, A. P. Singh, and K. K. Tejavath. *Acs Omega*, **5**, 5520 (2020). DOI: 10.1021/acsomega.0c00155
37. C. D. Fahrenholtz, J. Swanner, M. Ramirez-Prez, and R. N. Singh, *J. Nanomaterials*, **2017**, ID5107485 (2017). DOI: 10.1155/2017/5107485
38. Y. H. Hsin, C. F. Chen, S. Huang, et al., *Toxicol. Lett.*, **179** (3), 130 (2008). DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015
39. R. Foldbjerg, D. A. Dang, and H. Autrup, *Arch. Toxicol.*, **85** (7), 743 (2011). DOI: 10.1007/S00204-010-0545-5.
40. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика*, **64** (3), 552 (2019). DOI: 10.1134/S000302919030165
41. J. Swanner, J. Mims, D. Carell, et al., *Int. J. Nanomed.*, **10**, 3937 (2015). DOI: 10.2147/IJN.S80349
42. P. V. AshaRani, M. P. Hnde, and S. Valiyaveettie, *BMC Cell Biol.*, **10**, 65 (2009).
43. S. Kim, J. E. Choi, J. Choi, et al., *Toxicol. in vitro*, **33** (6), 1076 (2009). DOI: 10.1016/j.tiv.2009.06.001
44. N. Miura and Y. Shinohara, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **390** (3), 733 (2009). DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.10.039
45. H. J. Eom and J. Choi, *Environ. Sci. Technol.*, **44** (21), 8337 (2010). DOI: 10.1021/es1020668
46. S. Beer, R. Fuldbjerg, Y. Hayashi et al. *Toxicol. Lett.* **208** (3) 286 (2012). DOI: 10.1016/j/tox.let.2011.11.002
47. Y. Li, T. Qin, T. Ingle, et al., *Arch. Toxicol.*, **91** (1), 509 (2017). DOI: 10.1007/s00204-016-1730-y
48. D. B. Korman, L. A. Ostrovskaya, N. V. Bluhterova, et al., *Biophysics*, **66** (6), 1046 (2021). DOI: 10.1134/s0006350921060063
49. O. Erdogan, M. Abbak, G. M. Demirbolat, et al., *PLoS One*, **14** (6), eo216496 (2019). DOI: 10.1371/journal.pone.0216496
50. Q. Zheng, H. Yang, J. Wei, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **67** (7), 569 (2013). DOI: 10.1016/j.biopha.2013.04.003
51. Z. Liu, H. Tam, X. Zhang, et al., *Artif. Cells Nanomed. Biothechnol.*, **46** (s3), 922 (2018). DOI: 10/1080/21691401.2018.1518912
52. J. Swanner, C. D. Fahrenholtz, I. Tenvooren, et al., *FASEB BioAdvances*, **1**, 639 (2019). DOI: 10.1096/fba.2019-00021
53. S. R. Kabir, A. K. Asaduzzanan, R. Amin, et al., *Acs Omega*, **5**, 20599 (2020). DOI: 10.1021/acsokmega.0c02878
54. X. F. Zhang and S. Gurunathan, *Int. J. Nanomedicine*, **11**, 3655 (2016). DOI: 10.2147/IJN.S111279
55. Y. Yuan, S. Zhang, J. Hwang, and I. K. Kong, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2018**, 5121328 (2018). DOI: 10.1155/2018/6121328
56. N. Igaz, D. Kovasc, Z. Razga, et al., *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **146**, 670 (2016). DOI: 10.1016/j.colsurf b.2016.07.004
57. S. Guranathan, M. Kang, and J. Kim, *Molecules*, **23** (2), 2046 (2018). DOI: 10.3390/molecules23082046
58. J. Singh, W. Moore, F. Fattah, et al., *Head Neck*, **41** (1), E11 (2019). DOI: 10.1002/hed.25492
59. S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, et al., *Toxicol. in vitro*, **19** (7), 975 (2005). DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.034
60. L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, et al., *Toxicol. Sci.*, **88** (2), 412 (2005). DOI: 10.1093/toxicci/kfi256
61. L. Wang, D. F. Mello, R. M. Zucker, et al., *Environ. Sci. Technol.*, **55** (16), 111 (2021). DOI: 10.1021/asc.ets.1c02295
62. C. E. Escrcega-Gonzeler, J. A. Garza-Cervantes, A. Vazquez-Rodriguez, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **13**, 2349 (2018). DOI: 10.2147/IJN.S160605

## Silver Nanoparticles – Cytotoxic Activity and Mechanism of Action

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

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

The review presents experimental data obtained in the study of the cytotoxic and antitumor activity, and the mechanism of action of silver nanoparticles.

*Keywords: silver nanoparticles, cytotoxicity, antitumor activity, cell cultures of human and animal tumors*

## МОДЕЛИ, ОПИСЫВАЮЩИЕ ГЕНЕРАЦИЮ И ПРОВЕДЕНИЕ НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА

© 2022 г. Х.Л. Эрнандес Касерес<sup>\*,#</sup>, С.С. Джимаков<sup>\*\*,\*\*\*</sup>, Д.А. Семенов<sup>\*\*\*\*,\*\*\*\*\*</sup>, М.И. Дроботенко<sup>\*\*</sup>, Ю.Д. Нечипуренко<sup>\*\*\*\*\*,#</sup>

<sup>\*</sup>Кубинский Центр Нейронаук, ул. 25-я, угол к 198-й, Плайя, Гавана, Куба

<sup>#</sup>E-mail: jose.caceres@cneuro.edu.cu

<sup>\*\*</sup>Кубанский государственный университет, ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040, Россия

<sup>\*\*\*</sup>Федеральный исследовательский центр «Южный научный центр РАН», просп. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006, Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>Институт биофизики СО РАН, Академгородок, 50, Красноярск, 660036, Россия

<sup>\*\*\*\*\*</sup>НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ им. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ул. Партизана Железняка, 1, Красноярск, 660022, Россия

<sup>\*\*\*\*\*</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

<sup>##</sup>E-mail: nech99@mail.ru

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 19.05.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Обсуждаются различные модели и подходы к изучению генерации и распространения нервного импульса. Разные исследователи уделяли внимание механическим, термодинамическим и электрическим аспектам работы нервной клетки. Модель Ходжкина–Хаксли, созданная 70 лет назад, занимает сейчас центральное место в нейробиологии. Она смогла теоретически описать все известные в то время электрические проявления потенциала действия, а также вызвала появление новых экспериментальных и теоретических подходов в биофизике мембран. Альтернативной для этой модели является модель механического солитона, согласно которой нервный импульс представляет собой затухающую механическую волну, связанную с фазовым переходом в липидном бислое. Приводятся основные аргументы сторонников теории солитона, отрицающие ряд положений модели Ходжкина–Хаксли. Большинство этих утверждений могут быть объяснены в рамках модели Ходжкина–Хаксли, если принять во внимание, что изменения в мембранном потенциале приводят не только к изменениям в проницаемости каналов, но и также к изменению ее толщины, к модификации белково-липидных взаимодействий, и к модуляции кооперативных взаимодействий между каналами. Появление механического солитона в ряде случаев возможно, но это не главный механизм нервной возбудимости. Встает задача создания универсальной математической модели, способной описать все биофизические изменения, сопровождающие нервный импульс. Эту задачу можно решить путем адаптации модели Ходжкина–Хаксли. Такой подход к моделированию нервного импульса может привести и к новым экспериментальным идеям, и к новым результатам.

*Ключевые слова:* нервный импульс, модель Ходжкина–Хаксли, модель механического солитона, кооперативные взаимодействия, фазовый переход, анестетики, белково-липидные взаимодействия.

DOI: 10.31857/S0006302922040111, EDN: ITXQOP

Проблема возбудимости и проведения нервного импульса — одна из центральных в биофизике. Попытки ее решить сопровождались разработкой передовых экспериментальных и теоретических подходов и методик. Несмотря на бесспорные успехи в этой области, еще не разработана теория, способная описать с единых позиций все экспериментально наблюдаемые процессы, протекающие при генерации и распространении нервного импульса. В последние 70 лет в этой области доминировала теория Ходжкина–Хак-

ли, благодаря которой удалось описать большинство электрических явлений, сопровождающих потенциал действия. Подход, предложенный Ходжкиным и Хаксли, привел к внедрению таких методов, как измерение «воротных» токов смещения [1], пэтч-кламп [2], исследование функциональной активности нервной ткани [3], развитию оптогенетики [4], а также методов моделирования активности мозга «снизу вверх» [5].

Однако существует ряд фактов и данных, которые не укладываются в теорию Ходжкина–Хак-

ли (например, адиабатическое и обратимое изменение температуры нерва [6, 7], изменение упругости липидного бислоя вместе с обратимым утолщением нерва [8], фазовый переход в липидном бислое [7], а также наличие кооперативных явлений между ионными каналами [9]).

Появление таких данных привело к разным реакциям среди биофизиков – от предложения альтернативных теорий, отождествляющих потенциал действия с механическим солитоном [7], при котором ионные каналы играют лишь второстепенную роль, до необходимости пересматривать молекулярные механизмы ионной проницаемости мембраны [9]. Разработка полноценной (универсальной) модели для нервного импульса будет зависеть от корректного понимания сопровождающих его биофизических процессов [10]. В то же время от успеха в построении такой модели будет зависеть успех многих конкретных задач нейрофармакологии и других нейронаук.

Здесь мы обсуждаем «сильные» и «слабые» стороны различных подходов и намечаем возможные пути к универсальной биофизической модели нервной возбудимости, а также уделяем внимание идеям С.Э. Шноля о механизмах возбудимости с точки зрения биологической эволюции.

## ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Многие ученые прошлого формулировали гипотезы о механизме нервного возбуждения, в России можно указать на работы М.В. Ломоносова, который считал, что распространение нервного импульса представляет собой волнообразную последовательность механических сцепленных циклических процессов: «Сие происходит нечувствительным временем для бесперерывного совмещения частиц по всему нерву от конца до самого мозга...» [11].

Однако лишь с привлечением данных, полученных экспериментально, представления о проведении импульсов начали становиться все более и более конкретными. Так, опыты Л. Гальвани в конце XVIII века указывали на электрическую природу нервного и мышечного возбуждения [12]. Эксперименты Э. Дюбуа-Реймона и Г. Гельмгольца в середине XIX века [13] дали такое обилие результатов, что появилась необходимость разработки моделей, которые могли бы объяснить накопленную совокупность данных с единых позиций. Значение моделей второй половины XIX века заключалось в том, что исследователи стремились с их помощью развить представления о нервном импульсе на основании хорошо известных физических механизмов.

Впервые предположение о роли клеточных мембран в генезисе биоэлектрических явлений вы-

сказал В. Оствальд в 1890 г. Опыты с осадочными мембранами позволили ему сделать вывод: «Быть может, не слишком дерзко высказывать здесь предположение, что не только токи в мышцах и нервах, но и таинственные эффекты электрических рыб будут объясняться свойствами полупроницаемых мембран...» [15]. Идеи В. Оствальда были далее разработаны Ю. Бернштейном, учеником Э. Дюбуа Реймона [16].

В результате острых споров относительно ограничений и достижений различных моделей на рубеже XX века возникла модель, которая являлась первой истинно количественной моделью нервного возбуждения. Бернштейн считал, что мембранный потенциал покоя есть результат термодинамического равновесия ионов калия, находящихся по обе стороны полупроницаемой мембраны. Потенциал действия представлялся ему как результат изменений в проницаемости мембраны при возбуждении. Так, в модели Бернштейна сочетались три ключевых момента:

- 1) идея о мембране как месте, в котором происходят процессы возбуждения;
- 2) термодинамический подход для понимания биоэлектрических явлений;
- 3) представление об изменении проводимости мембраны по отношению к разным ионам как основе всего разнообразия явлений, сопровождающих нервное и мышечное возбуждение.

Параллельно, в начале XX века для объяснения нервной проводимости были предложены модель Вильке, в которой рассматривалось механическое возбуждение желатинового цилиндра, где одновременно развивались и механические и электрические волны [17], а также модель Лилли, прообразом которой служила железная проволока, погруженная в раствор азотной кислоты [18], вдоль которой распространяется волна возбуждения.

Изучавший нервную возбудимость при механических раздражениях Э. Вильке еще в 1913 г. пришел к выводу, что нервный импульс не может быть чисто электрическим явлением [17]. Он предполагал, что это пьезоэлектрическое явление, и продемонстрировал механические изменения в простом эксперименте: прикрепляя тонкое стекловолокно к концу нерва, показал, что оно начало колебаться при раздражении нерва.

С другой стороны, идеи Бернштейна получили дальнейшее развитие в экспериментальных и теоретических разработках кембриджской школы, особенно в работах А. Ходжкина, Э. Хаксли и Б. Каца. Так, в 1952 г. появилась знаменитая система уравнений Ходжкина–Хаксли [19].

В 1956 г. Дж. дель Кастильо и Б. Кац [20] на основе электрофизиологических экспериментов, проведенных методом внутриклеточного отведения мембранного потенциала, предсказали

«квантовое» высвобождение нейромедиаторов при синаптической передаче, что было подтверждено с помощью электронной микроскопии спустя несколько лет [21].

Уравнения Ходжкина–Хаксли опирались на обширный экспериментальный материал, полученный главным образом при помощи новейшего в то время метода фиксации напряжения (voltage clamp). Авторы старались построить эмпирическую модель, которая могла бы соответствовать экспериментальным данным – и в то же время количественно описать генерирование потенциала действия, а также его распространение вдоль аксона.

Хотя А. Ходжкин и Э. Хаксли не претендовали на создание концептуальной модели, они приложили усилия к тому, чтобы математические выражения в их модели характеризовались физической правдоподобностью (например, процессы активации ионной проводимости описывались в виде химических уравнений первого порядка и т.п.). Математические выражения должны были количественно описать обширную совокупность экспериментальных данных, а также предсказывать поведение системы при изменении различных параметров.

Авторы не исходили из конкретной физической модели, но настаивали на том, чтобы их экспериментальные результаты и соответствующая система уравнений были совместимы с некоторыми основополагающими идеями. Следуя системе уравнений Ходжкина–Хаксли, можно представить физическую модель, постулирующую существование неких активирующих и инактивирующих частиц, реальность которых была подтверждена 20 лет спустя благодаря экспериментальному обнаружению «воротных токов» [22].

Помимо описания практически всех электрофизиологических явлений, известных в то время для аксона кальмара, посредством несложной адаптации модель была распространена и на другие системы с возбуждением. Подход Ходжкина–Хаксли был применен для описания синаптической передачи, а также к исследованию воротных токов смещения.

#### АЛЬТЕРНАТИВЫ ПОДХОДУ ХОДЖКИНА–ХАКСЛИ

Несмотря на успех уравнений Ходжкина–Хаксли и присуждение авторам в 1963 г. Нобелевской премии по физиологии и медицине, в 1950–1970 гг. были авторы, которые оспаривали модель Ходжкина–Хаксли. Среди них выделялись два выдающихся биофизика – Д.Н. Насонов (1895–1957) и И. Тасаки (1910–2009).

Насонов ввел понятие парабиоза – состояния, при котором протоплазма клетки сильно меняет физические свойства в результате обратимой адсорбции ионов калия присутствующими в ней белками [23]. Идеи Насонова были развиты в работах его ученика А.С. Трошина [24], а также американского биофизика Г. Линга [25].

По сути «школа Насонова» отрицала роль клеточной мембраны в процессах возбуждения (считалось, что главную роль в этом фазовом переходе при возбуждении играют белки протоплазмы) [26]. Однако наличие возможности регистрировать полноценные потенциалы действия и ионные токи в перфузированных гигантских аксонах и сомах изолированных нервных клеток (где протоплазма полностью заменяется раствором ионов без белков) противоречит основным постулатам «школы Насонова» [27].

И. Тасаки считается одним из самых известных ученых в области нейрофизиологии. Его имя связано с открытием роли миелина в проведении нервного импульса. Он широко применял метод фиксации напряжения в своих исследованиях и его экспериментальные результаты не оспаривали даже те, кто не разделял его идеи.

Согласно Тасаки, нервный импульс появляется как результат фазового перехода в мембране, который распространяется вдоль аксона [28]. Он полагал, что возбудимая мембрана представляет собой макромолекулярный комплекс белков и липидов. Каждая субъединица этого комплекса способна к ионному обмену и может пребывать в одном из двух стабильных конформационных состояний – состоянии покоя и состоянии действия.

#### ТЕОРИЯ МЕХАНИЧЕСКОГО СОЛИТОНА

В последние годы идеи И. Тасаки нашли дальнейшую разработку в так называемой теории механического солитона. Согласно этой теории распространение потенциала действия сопровождается стабильным солитоном механической деформации клеточной мембраны, который движется с постоянной скоростью и неубывающей амплитудой [29].

При этом предполагается, что эта механическая волна, сопровождающая потенциал действия, связана с основными механизмами возбудимости. В частности, было высказано предположение, что открытие ионных каналов, участвующих в генерации электрических явлений нервного возбуждения, требует механических изменений в двойном липидном слое. В пользу этого предположения приводился аргумент, что во время активации ионных каналов происходит деформация мембраны и обратимое нагревание аксона. Модель механического солитона была

предложена для описания нервного импульса как неклассический солитон («компактон») [30].

Чтобы обосновать теоретически наблюдаемую зависимость скорости импульса от радиуса аксона, М. Рвачев предложил модель, которая рассматривает нервный импульс как импульс давления, распространяющегося по аксоплазме [31]. Как мы обсуждали выше, опыты с перфузированными аксонами исключают необходимость аксоплазмы для проведения нервного импульса.

Ниже излагаются главные аргументы сторонников теории механического солитона, которые указывают на ряд недостатков модели Ходжкина–Хаксли (см. работу [32]):

1. Модель Ходжкина–Хаксли описывает только зависящие от напряжения аспекты нервного импульса. Иными словами, представления Ходжкина–Хаксли в одностороннем порядке ограничиваются электрическими явлениями при возбуждении.

2. Существенной характеристикой подхода Ходжкина–Хаксли является то, что он основан на диссипативных процессах и поэтому по своей природе необратим.

3. До сих пор невозможно определить, как проводимость белков канала зависит от напряжения и времени, а также вместо чего эта зависимость параметризуется. На основании этого сторонники теории механического солитона утверждают, что модель Ходжкина–Хаксли не представляет собой теорию в строгом физическом смысле. Она не предсказывает поведение системы, а скорее апостериорно описывает результаты измерений.

4. Модель Ходжкина–Хаксли не учитывает изменения других физических величин, например, теплоты или работы по утолщению и удлинению нервного волокна. Тщательные измерения показывают, однако, что другие термодинамические величины также изменяются вместе с изменениями мембранного потенциала во время возбуждения.

5. Потенциал действия может генерироваться и в среде, где отсутствует натрий.

6. Генерация обратимого тепла представляет собой особую проблему для модели Ходжкина–Хаксли. А. Хилл давно сделал первые значимые измерения теплопродукции нервов [6]. Он показал, что тепло выделяется во время начальной фазы нервного импульса, и в значительной степени реабсорбируется во второй фазе импульса, так, что общая теплопродукция равна нулю в пределах точности измерения. Другими словами, нервный импульс можно рассматривать как адиабатический и обратимый процесс, что противоречит модели Ходжкина–Хаксли, диссипативной по своей природе.

7. В бислоистой мембране без белковых компонентов тоже образуются дискретные ионные каналы. Регистрируемые токи напоминают те, которые обычно приписывают белковым ионным каналам. В частности, эти дискретные токи наблюдаются при фазовых переходах. При распространении импульса следует ожидать, что липидная мембрана должна стать проницаемой для ионов. По-видимому, любой агент, который подавляет формирование импульсов в солитонной модели, также будет подавлять эти дискретные токи, поскольку эти два явления неизбежно термодинамически связаны.

8. Важным требованием для получения локализованных импульсов является наличие фазового перехода типа плавления в биомембране, о чем не говорится в модели Ходжкина–Хаксли. Этот переход отвечает не только за обратимый нагрев, но и за локализацию импульса.

9. Известно множество различных веществ, вызывающих анестезию, в том числе закись азота, галотан, хлороформ и многие спирты, а также благородный газ ксенон. Все эти анестетики следуют известному правилу Мейера–Овертона [33], согласно которому их активность прямо пропорциональна их растворимости в липидных мембранах. Это относится к большому диапазону значений растворимости, от закиси азота до длинноцепочечных спиртов. При критической дозе анестетика  $ED_{50}$ , когда 50% пациентов теряют сознание, всегда обнаруживается одна и та же концентрация активных веществ в мембранах, несмотря на различия в их химической природе. Эту корреляцию трудно объяснить в рамках модели Ходжкина–Хаксли.

10. Взаимное проникновение идущих навстречу потенциалов действия. Особенностью механических солитонов является то, что два сталкивающихся импульса проходят друг через друга без диссипации [29], а не аннигилируют, как ожидается в импульсах типа Ходжкина–Хаксли из-за присутствия рефрактерного периода. Проникновение встречных нервных импульсов было недавно экспериментально показано на нервах дождевого червя [34].

**Критика идей сторонников механического солитона.** Ниже излагаем нашу точку зрения относительно некоторых положений сторонников модели механического солитона.

– Модель Ходжкина–Хаксли описывает только зависящие от напряжения аспекты нервного импульса. К середине XX века технически возможно было тщательно измерять только токи и напряжения, во времени и пространстве. Весьма интересно то, что сегодня можно предположить, что и другие параметры, такие как толщина мембраны, температура и фаза агрегации мембраны, также могут значительно изменяться в результате

изменении напряжения. В этом смысле, хотя модель Ходжкина–Хаксли не рассматривала все процессы, сопровождающие нервный импульс, представление о других процессах как зависящих от напряжения кажется правомерным.

– Модель Ходжкина–Хаксли основана на диссипативных процессах и поэтому по своей природе необратима. В этом нет ничего удивительного, так как сама жизнь — далекий от равновесия процесс. Ходжкин в свое время подсчитал, что аксон может генерировать до миллиона потенциалов действия без необходимости уравновесить градиенты [35]. О том, что в мозге происходят диссипативные процессы, свидетельствует тот факт, что по крайней мере 50% энергетических затрат мозга приходится на работу натриевого насоса. Иными словами, проведение нервного импульса может быть диссипативным благодаря тому, что ионные градиенты восстанавливаются различными системами активного транспорта, которые обеспечиваются за счет непрерывного синтеза АТФ и других источников энергии в организме.

– Многие неизвестно о том, как проводимость белков канала зависит от напряжения и времени. Но то немногое, что известно, было достигнуто в основном благодаря электрофизиологическим методам (ток смещения, пэтч-кламп), а также методам генетического картирования и молекулярной биологии. Большинство из этих методов были инспирированы идеями и вопросами, вытекающими из модели Ходжкина–Хаксли [36].

– Модель Ходжкина–Хаксли не является теорией в прямом смысле, как мы писали выше. Сами авторы модели были весьма самокритичны. Так, Э. Хаксли говорил: «Ходжкин и я считаем, что эти уравнения следует рассматривать как первое приближение, которое во многих отношениях требует дальнейшего уточнения и развития при поиске действительного механизма изменения ионной проницаемости на молекулярном уровне...» [37].

В.Н. Дешеревский, ученик С.Э. Шноля, в этой связи писал: «... моделирование процессов в биологии существенно отличается от построения теории физического явления. В физике существует небольшое число элементарных моделей, таких как материальная точка, твердое тело, статистический ансамбль, электромагнитное поле, квантовая система и т. д. Их поведение регламентировано законами природы, которые сформулированы раз и навсегда и «обжалованию не подлежат».

В моделировании биологических процессов пока что дело обстоит иначе. Использовать впрямую элементарные модели теоретической физики в этой области — занятие почти безнадежное. Поэтому возникает необходимость создания набора собственно «биологических элементарных

моделей». В качестве примера одной из таких моделей можно привести уравнения Ходжкина–Хаксли, описывающие возникновение и распространение нервного импульса. Если бы удалось подобным образом смоделировать основные процессы жизнедеятельности, то можно было бы реально говорить о «динамической модели клетки» (термин А.М. Жаботинского), ткани и даже целого организма...» [38].

А. Ходжкин и Э. Хаксли писали в своей оригинальной статье, что они не собирались разрабатывать биофизическую модель. В то же время они указывали на то, что, «в настоящее время толщина и состав возбудимой мембраны неизвестны. Наши эксперименты поэтому мало что могут дать в плане надежной информации о природе молекулярных процессов, приводящих к изменениям проницаемости. Цель этого раздела — показать, что некоторые типы теорий исключаются нашими экспериментами, а другие согласуются с ними...» [19].

Мы, вслед за Э. Канделем [39], считаем, что более важным достоинством модели, чем описание явления, может быть ее способность ставить новые вопросы и планировать новые эксперименты: в этом плане модель Ходжкина–Хаксли ставила и еще ставит новые вопросы уже на протяжении семидесяти лет.

– Модель Ходжкина–Хаксли не рассматривает изменение ряда величин, таких, как теплота или длина нерва. Эти параметры также изменяются одновременно с изменениями мембранного напряжения. Не исключено, однако, что эти величины меняются в результате как раз изменений мембранного потенциала. Учитывая толщину мембраны (около 5 нм), удельную емкость (приблизительно 1 мкФ на квадратный сантиметр) и изменение мембранного потенциала на 0.1 В, можно ожидать, что в мембране будет создаваться гигантское электрическое поле (порядка  $10^9$  В/м), и это может вызывать в ней большие изменения. Конечно, исходя из элементарных соображений (модуль Юнга и т. д.), следует ожидать, что такое давление способно вызывать механические изменения размера липидного бислоя. Так, оценочные расчеты указывают на то, что при изменении мембранного потенциала на 0.07 В (соответствующего деполяризации аксона), на бислое оказывается давление, близкое к  $1.8 \cdot 10^4$  Па (в 15 раз больше давления металлического пресса). При типичных значениях модуля Юнга для реальных биологических мембран (10–100 кПа), следует ожидать относительные изменения в толщине мембраны от 10 до 50%. Это сопоставимо с экспериментально полученными наблюдениями [40]. С другой стороны, еще в 1974 г. было теоретически показано, что деполяризация мембраны может вызывать адиабатическое нагревание, спо-

собное объяснить экспериментально наблюдаемые фазовые переходы и адиабатические процессы [41]. Другими словами, экспериментально измеренные изменения мембранного потенциала во время нервного импульса достаточны для описания наблюдаемых изменений в геометрии мембраны. Под такими давлениями различные материалы могут претерпевать и фазовые переходы (например, углеродные нанотрубки [42]).

– Появление потенциала действия в среде без натрия было детально изучено и позволило охарактеризовать ионную селективность натриевого канала (над этим тоже работал П.Г. Костюк), но эти результаты еще не свидетельствуют о том, что модель Ходжкина–Хаксли не верна [43].

– Возможность регистрировать ионные токи, проходящие через одиночные каналы, является одним из следствий подхода Ходжкина–Хаксли. Дискуссия между И. Тасаки и сторонниками модели Ходжкина–Хаксли привела к поиску экспериментальных доказательств существования дискретных каналов в мембране. Одним из самых ранних доказательств был анализ влияния ионизирующего излучения на способность аксона генерировать потенциалы действия. Результаты показали, что эффект можно смоделировать при помощи теории мишени. Теоретически полученные размеры мишени сопоставимы с типичными размерами мембранных белков. Так, Дж. Фокс и Р. Стампфли показали [44], что ультрафиолетовое излучение (длина волны 280 нм) вызывает необратимую блокаду натриевых каналов, а подавление тока натрия  $I_{Na}$  находится в экспоненциальной зависимости от дозы облучения. С точки зрения теории мишеней однократное экспоненциальное отношение в кривой «доза–эффект» означает, что эффект облучения связан с однократным событием, ограниченным одной дискретной целевой областью. Объем этой целевой области оценивается в  $200 \text{ \AA}^3$ . Эти размеры, теоретически рассчитанные более полувека назад, сопоставимы с тем, что сегодня известно о размерах сенсорных субъединиц натриевого канала. В связи с образованием проводящих пор в бислоиных мембранах об этом явлении известно очень давно. Оно обычно объясняется модификацией структур липидного бислоя (образуются участки с небислоиной упаковкой молекул). При этом на границе бислоя и монослоя образуются эти «каналы». Даже полагается, что эти поры и составляют физическую основу тока утечки в модели Ходжкина–Хаксли. Нам кажется маловероятным, что эти поры могут служить физической основой для всего разнообразия тонко регулируемых электрофизиологических явлений, имеющих место при генерации и проведении нервного импульса.

– Сторонники теории механического солитона говорят о прохождении насквозь встречающихся потенциалов действия как аргументе против модели Ходжкина–Хаксли и в поддержку их разработок [34]. Однако эти результаты, полученные на нервах дождевого червя, не подтверждаются многочисленными экспериментами других исследователей [45].

– На протяжении эволюции у нейронов развивалась сложнейшая система аксонального транспорта, гарантирующая доставку ионных каналов, а также ионных насосов вдоль всего аксона. При этом оправданным представляется сомнение в том, что биологическая функция аксона состоит в проведении механических солитонов, в которых потенциал-зависимые ионные каналы практически не играют никакой важной роли.

Резюмируя, мы полагаем, что наблюдение механических и тепловых изменений, сопровождающих потенциал действия, скорее всего есть результат электрических явлений, описанных в модели Ходжкина–Хаксли, а не первопричина нервного и мышечного возбуждения.

Это отнюдь не означает, что механическими изменениями и фазовыми переходами, имеющими место в бислое, следует пренебречь: по нашему мнению, их надо рассматривать с позиций более общих, чем точка зрения теории механического солитона. Не исключается, что ввиду нелинейной природы процессов, сопровождающих нервный импульс, во время распространяющегося возбуждения может появиться и механический солитон.

Возможность возникновения солитонов в биологических структурах обсуждается давно [46–48], в частности А.С. Давыдов теоретически показал, что механические солитоны могут распространяться вдоль  $\alpha$ -спирали белка со скоростью, близкой к 30 м/с [49] (заметим, что в области соприкосновения с липидным бислоем ионные каналы принимают конформацию  $\alpha$ -спирали). Изменение толщины мембраны вблизи ионных каналов в результате быстрой деполяризации мембраны может влиять на состояние  $\alpha$ -спиралей канала и соответственно на проведение солитона вдоль  $\alpha$ -спирали канала. Это и может составлять один из основных механизмов белково-липидных взаимодействий при проведении нервного импульса.

С другой стороны, И. Чосич (автор модели резонансного взаимодействия между белками – «распознавания») придает большое значение распространению солитонов при резонансном распознавании [50].

Мы полагаем, что действие анестетиков и противосудорожных веществ на липидный бислой свидетельствует о роли белково-липидных взаимодействий в проведении нервного импульса.

Сейчас мало известно о том, как вещества, встроенные в липидный бислой могут оказать влияние, в одном случае блокируя проведение потенциала действия [51, 52] и в другом — вызывая возникновение пароксизмальной деполяризации [53]. Мы думаем, что возможных гипотез может быть несколько, включая и теорию механического солитона.

Различные модификаторы бислоя (например, спирты и ацетон) способны изменять сродство Na,K-АТФазы к натрию и калию [54]. Не исключается, что подобные эффекты можно ожидать и в ион-селективных каналах.

### КООПЕРАТИВНЫЕ ЯВЛЕНИЯ ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

Функциональные ионные каналы включают согласованную работу нескольких субъединиц. Липиды должны играть ключевую роль во взаимодействии между различными субъединицами, более того, предполагается, что во время развертывания потенциала действия имеет место кооперативное согласование между каналами. Эти кооперативные взаимодействия могут возникать по сценарию положительной обратной связи. Изменение мембранного потенциала вызывает механические и фазовые изменения в бислое, которые могут с одной стороны содействовать координации субъединиц канала, а с другой — кооперативному взаимодействию между разными каналами. Конкретные детали этих механизмов пока неизвестны.

Модель Ходжкина–Хаксли полагает, что как активирующие, так и инактивирующие частицы действуют независимо друг от друга. Более того, в этой модели каналы тоже функционируют независимо во время проведения нервного импульса. Соответственно, кооперативные взаимодействия между активируемыми субъединицами в каналах не рассматриваются в модели Ходжкина–Хаксли.

В принципе, кооперативные явления могут проявляться на различных уровнях:

- 1) при связывании ионов в канале [55];
- 2) в виде кооперативных взаимодействий между активирующимися субъединицами [56–59];
- 3) в виде кооперативных взаимодействий между каналами [9].

Было обнаружено, что потенциалы действия, регистрируемые с корковых нейронов млекопитающих, показывают крутую начальную восходящую фазу [60]. Модель Ходжкина–Хаксли не может описать этот крутой подъем [61]. С целью объяснения этого несогласования и была выдвинута идея о кооперативных взаимодействиях между каналами. Согласно этой гипотезе, открывание одного канала увеличивает вероятность от-

крывания соседних каналов. Эта модификация модели лучше описывает экспериментальные наблюдения и подразумевает увеличение кодирующей способности корковых нейронов. Другими словами, кооперативные взаимодействия между индивидуальными натриевыми каналами может оказаться приобретением в результате эволюции нейронов млекопитающих, что обеспечивает быструю обработку внезапных изменений в окружающей среде [9].

### МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

В рамках подхода Ходжкина–Хаксли поведение электрических параметров описывается в виде:

$$C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{\text{ion}} = I_{\text{ext}}, \quad (1)$$

где  $I_{\text{ext}}$  соответствует внешнему току;  $C_m$  — емкость, соответствующая липидному слою клеточной мембраны;  $V_m$  — мембранный потенциал;  $I_{\text{ion}}$  — суммарный ионный ток.

Суммарный ионный ток  $I_{\text{ion}}$  состоит из вкладов от всех типов каналов:

$$I_{\text{ion}} = \sum_k I_k = \sum_k G_k (V_m - E_k), \quad (2)$$

где  $G_k$  — индивидуальная проводимость канала  $k$ ;  $I_k$  — величина электрического тока, генерируемого отдельным видом ионов;  $E_k$  — равновесный потенциал ионного канала  $k$ .

В модели Ходжкина–Хаксли приводятся выражения, связывающие динамическую зависимость индивидуальных проводимостей  $G_k$  от мембранного потенциала. Полная система уравнений Ходжкина–Хаксли приводится в оригинальной работе авторов [19].

Система уравнений, соответствующая модели механического солитона, исходит из волнового уравнения Эйлера для латеральной плотности мембраны:

$$\frac{\partial^2}{\partial \tau^2} \Delta \rho^A = \frac{\partial}{\partial z} \left( c^2 \frac{\partial}{\partial z} \Delta \rho^A \right), \quad (3)$$

где  $\Delta \rho^A$  есть изменение латеральной плотности мембраны —  $\Delta \rho^A = \rho^A - \rho_0^A$ ;  $\rho^A$  соответствует латеральной плотности мембраны,  $c$  — скорость звука;  $\rho_0^A$  — равновесная латеральная плотность мембраны в жидкой фазе.

Авторы теории солитона полагают, что вблизи точки фазового перехода скорость звука непосто-

янна и можно ее переписать, разлагая в ряд Тейлора; соответственно имеем:

$$c^2 = c_0^2 + p\Delta\rho^4 + q(\Delta\rho^4)^2 + \dots$$

На основании экспериментального наблюдения частотной зависимости скорости звука в

$$\frac{\partial^2}{\partial \tau^2} \Delta\rho^4 = \frac{\partial}{\partial z} \left[ (c_0^2 + p\Delta\rho^4 + q(\Delta\rho^4)^2 + \dots) \frac{\partial}{\partial z} \Delta\rho^4 \right] - h \frac{\partial^4}{\partial z^4} \Delta\rho^4, \quad (4)$$

где  $c_0$  – скорость малоамплитудного звука;  $h$  – дисперсионная константа.

Как видно из соотношения (4), базовое уравнение солитонной модели учитывает изменения латеральной плотности мембран и нелинейные отношения, которые устанавливаются между скоростью звука и плотностью в связи с присутствием фазовых переходов мембраны в результате ее механических искажений.

На сегодняшний день нет сомнения в том, что во время потенциала действия имеют место как электрические, так и механические процессы. Тепловые изменения могут приводить к фазовым переходам. Является ли фазовый переход в мембранном бислое обязательным условием для проведения нервного возбуждения, пока не ясно. Согласно теории механического солитона, оно обязательно. Тот факт, что некоторые хладнокровные животные способны генерировать нервные сигналы в диапазоне температур от 0 до 40°C, представляется странным в свете этой теории.

По теории механического солитона электрические и тепловые явления могут появиться в результате механической деформации мембраны. Мы считаем, что как механические, так и тепловые изменения происходят в результате, в первую очередь, изменений мембранного потенциала. Эти тепловые и механические изменения, в свою очередь, могут оказать влияние и на проводимость, на емкость мембраны и, в конце концов, на мембранный потенциал.

От того, какова из этих гипотез верна, зависит и дальнейшая разработка универсальных математических моделей нервного импульса.

Некоторые авторы стараются найти общий сценарий, позволяющий объединить оба подхода. Так авторы работы [10] пытались ввести сопряженную модель, описывая как электрические, так и механические явления, сопровождающие потенциал действия. Они пишут: «потенциал действия должен быть связан с механической деформацией биомембраны и изменениями давления в аксоплазме» [10].

Многочисленные эксперименты показывают, что нервный импульс может протекать в перфузированном аксоне, где аксоплазма полностью

двухмерных искусственных мембранах авторы работы [29] добавили член  $-h \frac{\partial^4}{\partial z^4} \Delta\rho^4$  ( $h > 0$ ), описывающий дисперсионные процессы, что приводит к следующему нелинейному уравнению:

замещена водным раствором электролитов [62]. В таком случае важной роли продольных импульсов давления в аксоплазме при проведении нервного импульса не следует ожидать.

Мы полагаем, что следует, исходя из уравнений Ходжкина–Хаксли, учесть в математической модели электрические и механические изменения: не только ионные проводимости, но и толщину мембраны, теплопродукцию и т. п., зависящие от напряжения. В свою очередь, эти изменения оказывают влияние на другие физические величины и влияют на проводимость мембраны для различных ионов прямо или опосредованно.

Здесь уместно упомянуть и об обратном воздействии конформационных изменений белков (например, при открытии и закрытии каналов) на свойства мембраны, уточняя этим, что как белки могут влиять на липиды, так и липиды могут влиять на белки при генерации и проведении нервного импульса.

Для наглядности на рис. 1 показаны те изменения, которые имеют место при начальной, восходящей фазе потенциала действия, согласно классической модели Ходжкина–Хаксли.

Как видно из рис. 1, в этой модели деполяризация мембраны вызывает увеличение натриевой проводимости, что, в свою очередь, вызывает деполяризацию мембраны. Ходжкин и Хаксли ис-

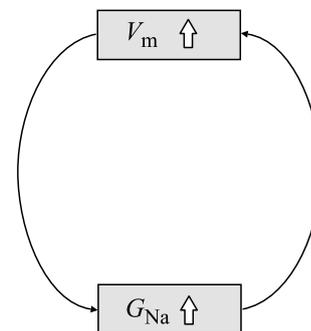
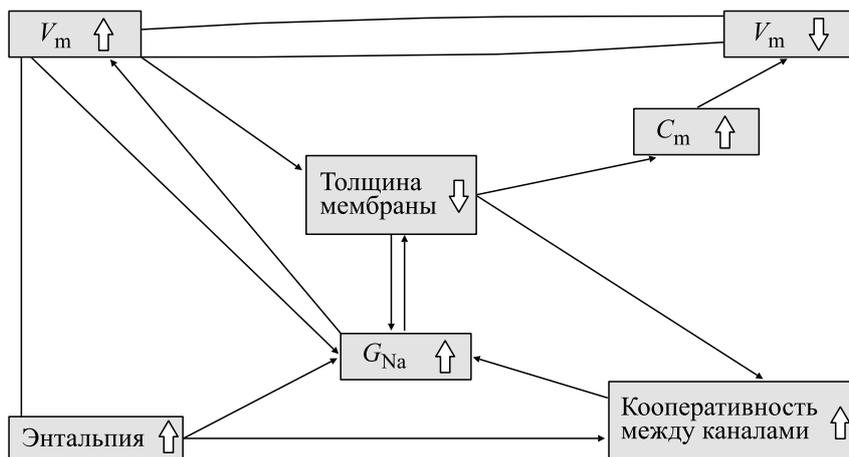


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая взаимосвязь между напряжением и проводимостью в мембране:  $G_{Na}$  – проводимость ионов натрия,  $V_m$  – мембранный потенциал.



**Рис. 2.** Система связей между параметрами, характеризующими нервный импульс:  $C_m$  — электроемкость, соответствующая липидному слою клеточной мембраны;  $V_m$  — мембранный потенциал;  $G_{Na}$  — проводимость ионов натрия.

ходили из этой гипотезы и, развивая идею дальше, пришли к своей системе уравнений.

Для сравнения на рис. 2 показаны те изменения, которые могут появиться в мембране в результате ее деполяризации, и соответствующая система связей между ними.

Мы считаем, что многие из этих связей можно описать в модели. Хорошим началом могло быть моделирование эффекта изменения емкости мембраны при потенциале действия.

Учитывая приведенные выше расчеты, а также экспериментальные данные из литературы, можно преобразовать уравнение (1) следующим образом:

$$C_m \frac{dV_m}{dt} = \frac{(I_{\text{ext}} - I_{\text{ion}})}{1 + \alpha(V_m - V_0)^2}. \quad (5)$$

Знаменатель в правой части уравнения (5) соответствует эмпирически полученной зависимости мембранной емкости от мембранного потенциала. Недавно автор работы [63] предложил учесть изменение емкости мембраны во время нервного импульса, подходя к проблеме с позиций модели механического солитона.

Уравнения Ходжкина–Хаксли способны давать большое разнообразие решений, многие из которых соответствуют таким неожиданным экспериментальным результатам, как хаотический ряд потенциалов действия, или необычно протяженные потенциалы действия. Мы ожидаем, что эти дополнения к модели приведут и к открытию новых, ранее не наблюдаемых явлений в реальных аксонах.

## МНОЖЕСТВЕННОСТЬ МЕХАНИЗМОВ ПРОВЕДЕНИЯ НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА — ВОЗМОЖНЫЙ АТАВИЗМ В ЭВОЛЮЦИИ

Как мы писали выше, экспериментальные данные о проведении нервного импульса в ряде случаев показывают существенное отклонение от предсказаний модели Ходжкина–Хаксли. Возможно, причина несоответствия заключается в эволюционном характере возникновения самого явления проведения нервного импульса. Можно предположить, что ионные каналы появились не сразу и первичная возбудимость прототипа нервной клетки была возможна задолго до появления нейромедиаторов и синапсов.

С.Э. Шноль обратил внимание на то, что теплокровность должна быть связана с оптимальными условиями для проведения нервного импульса [64]. Чем примечателен диапазон 35–40°C, выбранный теплокровными? Одна из версий — что именно в этом диапазоне достигается наименьшая удельная теплоемкость воды. Точнее, теплоемкость достигает минимума при 34.5°C [65]. Вблизи этого минимума изменениями теплоемкости в некотором диапазоне можно пренебречь. Это удобно не только для моделирования, но и для решения задач управления. В первом приближении, теплокровность может поддерживаться в этом диапазоне температур потому, что тут легче поддерживать постоянную температуру. Другими словами, в этом диапазоне поддержание постоянной температуры тела потребует наименьших изменений в затратах энергии.

Экспериментально показано, что мозг млекопитающих крайне чувствителен к охлаждению, при охлаждении до 26°C он почти не проводит нервные импульсы [66]. Но нервный импульс как явление эволюционно старше теплокровности. Нервные импульсы успешно проводят не только

рептилии, черви, насекомые, но и полярные рыбы при температуре тела ниже нуля градусов Цельсия. Почему же теплокровные проводят нервный импульс эффективнее?

Возможно, потому что изначально появление нервного импульса связано с явлениями, локально меняющими «температуру» вблизи мембраны, точнее, меняющими подвижность молекул и ионов.

Для того, чтобы понять изначальною важность этой подвижности, можно обратиться к книге С. Габуды «Связанная вода. Факты и гипотезы» [67]. Автор, начав рассуждения с феномена наркоза растворенными (в том числе инертными) газами, подводит к тому, что для биогенных аминов характерен фазовый переход расслоения с верхней критической точкой. То есть, если раствор амина нагреть, он превратится в эмульсию, что уже несколько противоречит интуиции. Поведение систем вблизи критической точки характерно тем, что в этих условиях возможна остановка диффузии, спонтанное разрастание радиуса корреляции молекулярной системы. Это может порождать удивительные возможности для управления передачей нервных сигналов в синапсах. Но еще больше возможностей это дает для объяснения процесса появления первых нейромедиаторов в первых синапсах. Вопрос, что было первым — нейромедиатор или рецептор к нему — разрешается сам собой, если нейромедиатор может работать без рецептора. Фазовый переход мог быть первичным регулятором, а рецепторы возникли позже и позволили обходиться значительно меньшими концентрациями медиаторов. С рецепторами сам характер регуляции стал стабильнее, можно сказать, что они приручили фазовый переход, но он все равно лежит в физико-химической основе процесса.

Вероятно, такое же рассуждение по аналогии возможно и относительно проведения нервного импульса. Уравнения Ходжкина—Хаксли написаны для ионных каналов, то есть для белков, данных нам в их, выражаясь словами С.Э. Шноля, «эволюционном совершенстве». Могут ли у ионных каналов существовать предшественники? Известно, что некоторые жирные кислоты могут, встраиваясь в мембрану митохондрий, создавать поры, проницаемые для ряда ионов [68]. Этот процесс протекает на основе фазового перехода в липидной мембране. С другой стороны, те же самые жирные кислоты способны индуцировать поток протонов через мембрану митохондрий в бурой жировой ткани уже при помощи специфического встроенного белка термогенина [67]. Процесс разобщения в митохондриях является элементом процесса несократительного термогенеза: утечка протонов позволяет нам согреться [68, 69]. Поток ионов при проведении нервного

импульса тоже должен сопровождаться выделением тепла. Известно, что на уровне целого мозга проблема отведения тепла является важной. Более того, есть оригинальная гипотеза о том, что гипертрофия мозга китообразных связана с необходимостью согреть нервную систему [70]. Локальный нагрев потенциально мог бы спровоцировать фазовый переход расслоения раствора аминов, таким образом, мог бы сопрягаться прототип процесса проведения нервного импульса и прототип процесса синаптической передачи.

Формирование пор в липидном бислое потенциально может быть распространяющейся волной. Формирование таких пор может модулироваться волной, бегущей непосредственно в липидной мембране клеток, как рассмотрено в работе В.Е. Захватаева и Р.Г. Хлебопроса [71].

Этот физический механизм мог бы существовать как предшественник механизма распространения нервного импульса. Впоследствии эволюция могла «оседлать» эту волну, создав потенциал-зависимые ионные каналы. Новая система могла усилить и сделать процесс надежнее. Каналы в таком случае похожи на ретранслирующие вышки в сетях связи или подкачивающие станции нефтепроводов, которые не позволяют ослабнуть потоку. Возможно, архаичный процесс принципиально не смог бы распространить нервный импульс по длинным аксонам. Современный способ передачи нервного импульса мог существенно изменить не только расстояние, на которое может устойчиво распространяться нервный импульс, но и сам механизм распространения. Возможно также, что модель Ходжкина—Хаксли не учитывает вклад эволюционно предыдущего механизма.

Так как этот механизм может появляться как потенциальный эволюционный предшественник, который базируется на фазовом переходе в липидной мембране, то он должен быть чувствителен к температуре и составу мембраны. Постоянство температуры может оказаться необходимо, чтобы минимизировать вклад архаичного механизма в современный процесс нервной проводимости. А интервал температур выбран таким, что свойства растворителя почти не меняются с изменением температуры. Остающаяся зависимость фазового перехода от состава мембраны лежит в основе явления наркоза некоторыми жирорастворимыми анестетиками, что указывает на значимость хоть и устаревшего, но не полностью отмененного механизма. Вероятно, при соответствующем подборе условий эксперимента *in vitro* можно сделать эволюционно более древний механизм доминирующим.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система уравнений Ходжкина–Хаксли была предложена 70 лет назад, когда очень мало было известно о структуре клеточной мембраны и только электрические аспекты нервного импульса подавались надежному измерению. Модель Ходжкина–Хаксли стимулировала разработку новых экспериментальных и теоретических подходов в биофизике мембран. В свете новых результатов, было предложено несколько модификаций оригинальной модели. В то же время группа авторов разработала модель механического солитона, согласно которой нервный импульс и есть неубывающая механическая волна, ассоциированная с фазовым переходом в липидном бислое. Мы считаем, что многие из аргументов сторонников теории механического солитона могут найти рациональное объяснение и в рамках подхода Ходжкина–Хаксли. Не отрицая возможности возникновения солитонов при проведении нервного импульса, мы считаем, что электрические проявления нервного импульса остаются главными.

Возможно, что унифицированную модель для генерации и распространения нервного импульса, учитывающую все доселе известные экспериментальные данные, удастся получить путем дальнейшего развития модели Ходжкина–Хаксли. При этом следует учитывать:

- 1) зависимость емкости мембраны от мембранного потенциала;
- 2) кооперативные взаимодействия как между активирующими/инактивирующими частицами внутри одного канала, так и между разными каналами;
- 3) влияние сжатия/растяжения мембраны при изменении мембранного потенциала на разные аспекты белково-липидных взаимодействий и на фазовые переходы в бислое.

Такой подход в моделировании может привести и к новым идеям экспериментов и к новым результатам.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность Н.Г. Есиповой и В.А. Твердислову, а также рецензентам работы за ценные замечания.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (тема 121052600299-1) и государственного задания ЮНЦ РАН (№ 122020100351-9)

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. D. Keynes, N. G. Green, and I. C. Forster, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **240**, 411 (1990).
2. E. I. Solntseva, J. V. Bukanova, R. V. Kondratenko, and V. G. Skrebitsky, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **169** (6), 791 (2020).
3. S. Kozin, V. Skrebitsky, R. Kondratenko, et al., *Molecules*, **26** (7), 2036 (2021). DOI: 10.3390/molecules26072036
4. M. Häusser, *Nat. Methods*, **11** (10), 1012 (2014).
5. D. J. Amit and N. Brunel, *Cerebral Cortex*, **7**, 237 (1997).
6. B. C. Abbott, A. V. Hill, and J. V. Howarth, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **148**, 149 (1958).
7. T. Heimburg, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **162**, 26 (2021).
8. V. V. Galassi and N. Wilke, *Membranes*, **11**, 478 (2021).
9. Е. С. Никитин, А. Ю. Малышев, П. М. Балабан и М. А. Волгушев, *Журн. высш. нервн. деятельности им. И.П. Павлова*, **66** (3), 279 (2016).
10. J. Engelbrecht, T. Peets, K. Tamm, et al., *Proc. Estonian Acad. Sci.*, **67** (1), 28, (2018).
11. М. В. Ломоносов, *Полное собрание сочинений, том 3* (Изд-во АН СССР, М.—Л., 1950—1983).
12. M. Piccolino, *Brain Res. Bull.*, **46**, 381 (1998).
13. E. du Bois-Reymond, *Monatsberichte der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* (Berlin, 1877), SS. 597–650.
14. H. Helmoholtz, *Monatsberichte der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* (Berlin, 1877), SS. 713–726.
15. W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.*, **6**, 71 (1890).
16. J. Bernstein, *Elektrobiologie. Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt* (Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1912).
17. E. Wilke and E. Atzler, *Pfüger's Arch.*, 430 (1913).
18. R. S. Lillie, *Science* (Washington), 48 (1918).
19. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, *J. Physiol.*, **117**, 500 (1952).
20. J. Del Castillo and B. Katz, *Progr. Biophys. Biophys. Chem.*, **6**, 121 (1956).
21. E. G. Gray and J. Z. Young, *J. Cell Biol.*, **21**(1), 87 (1964).

22. С. М. Armstrong and F. Bezanilla, *J. Gen. Physiol.*, **63**, 533 (1974).
23. Д. Н. Насонов, *Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение* (Изд-во АН СССР, 1962).
24. А. С. Трошин, *Проблема клеточной проницаемости* (Изд-во АН СССР, М.—Л., 1956).
25. G. N. Ling, *Life at the Cell and Below-Cell Level. The Hidden History of a Fundamental Revolution in Biology* (Pacific Press, New York, 2001).
26. V. V. Matveev, *Cell Biol. Int.*, **26**, 305 (2002).
27. J. L. Hernandez Caceres, R. G. de Peralta Menéndez, M. Castellanos Renté, and A. Garateix Fleites, *Int. J. Bio-Med. Comput.*, **29** (3–4), 227 (1991).
28. I. Tasaki and K. Iwasa, *J. J. Physiol.*, **32**, 69 (1982).
29. T. Heimburg and A. Jackson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102** (28), 9790 (2005).
30. F. Contreras, H. Cervantes, M. Agüero, and M. de Lourdes Najera, *Int. J. Mod. Nonlinear Theory Appl.*, **2** (1), 7 (2013).
31. M. M. Rvachev, *Biophys. Rev. Lett.*, **5** (2), 73 (2010).
32. T. Heimburg, *Physik Journal*, **8**, 33 (2009).
33. C. E. Overton, *Studien über die Narkose* (Verlag Gustav Fischer, Jena, 1901).
34. A. R. Gonzalez-Perez, L. D. Budvytyte, S. Mosgaard, et al., *Phys. Rev. X*, **4**, 031047 (2014).
35. A. L. Hodgkin, *The conduction of the nervous impulse* (Liverpool Univ. Press, Liverpool, UK, 1964).
36. T. Sumikama and S. Oiki, *J. Physiol. Sci.*, **69**, 919 (2019).
37. A. Huxley, *The Quantitative Analysis of Excitation and Conduction in Nerve. Nobel Lecture* (December 11, 1963).
38. В. И. Дещеревский, *Математические модели мышечного сокращения* (Наука, М., 1977).
39. E. Kandel, *Behavioral Biology of Aplysia* (New York, 1979).
40. T. D. Nguyen, N. Deshmukh, J. M. Nagarath, et al., *Nat. Nanotechnol.*, **7**, 587 (2012).
41. M. H. Naston and S. J. Keeler, *J. Biol. Phys.*, **3**, 130 (1975).
42. B. K. Wittmaack, A. N. Volkov, and L. V. Zhigilei, *Carbon*, **143**, 587 (2019).
43. P. G. Kostyuk, S. L. Mironov, and Y. M. Shuba, *J. Membrane Biol.*, **76** (1), 83 (1983).
44. J. M. Fox and R. Stämpfli, *Experientia*, **27**(11), 1289 (1971).
45. R. W. Berg, M. T. Stauning, J. B. Sørensen, and H. Jahnsen, *Phys. Rev. X*, **7** (2), 028001 (2017).
46. S. Yomosa, *J. Phys. Soc. Japan*, **18** (10), 1494 (1963).
47. А. С. Давыдов и А. Еремко, *Теоретич. математич. биофизика*, **43** (3), 367 (1980).
48. Z. Sinkala, *J. Theor. Biol.*, **241**, 919 (2006).
49. J. M. Nyman, D. W. McLaughlin, and A. C. Scott, *On Davydov's Alpha-Helix Solitons, Long-Time Prediction in Dynamics* (John Wiley & Sons, NY, 1983).
50. I. Cosic, J. L. Hernandez Caceres, and D. Cosic, *EPJ Nonlinear Biomed. Phys.*, **3**, 1 (2015).
51. H. J. Galla and J. R. Trudell, *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 336 (1980).
52. H. J. Galla and J. R. Trudell, *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 522 (1980).
53. Ю. Д. Нечипуренко, Р. С. Гарсия Рейес и Х. Л. Эрнандес Касерес, *Биофизика*, **66** (6), 1123 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060077
54. М. Н. Резаева, М. Хеншель, Х. Л. Эрнандес и др., *Биофизика*, **25** (1), 41 (1980).
55. В. А. Твердислов, Л. В. Яковенко и М. Н. Резаева, *Молекуляр. биология*, **13** (2), 377 (1979).
56. B. Chanda, O. K. Asamoah, and F. Bezanilla, *J. Gen. Physiol.*, **123** (3), 217 (2004).
57. R. Blunck, H. McGuire, H. C. Hyde, and F. Bezanilla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20263 (2008).
58. B. J. Wylie, M. P. Bhate, A. E. McDermott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 185 (2014).
59. R. D. Keynes and F. Elinder, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **265**, 263 (1998).
60. Y. Shu, A. Duque, Yu. Yuguo, et al., *J. Neurophysiol.*, **97**, 746 (2007).
61. B. Naundorf, F. Wolf, and M. Volgushev, *Nature*, **440**, 1060 (2006).
62. P. Baker, A. Hodgkin, and H. J. Meves, *J. Physiol. (London)*, **170**, 541 (1964).
63. А. М. Диканде, <http://arxiv.org/abs/2102.10400v1> (2021).
64. С. Э. Шноль, *Физико-химические факторы биологической эволюции* (Наука, М., 1979).
65. *Справочник химика*, под ред. Б. П. Никольского (Химия, Л., 1966), том 1, с. 60.
66. Y. S. Mednikova, N. V. Pasikova and F. V. Kopytova, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **34** (5), 459 (2004).
67. С. П. Габуда, *Связанная вода. Факты и гипотезы* (Наука, Новосибирск, 1982).
68. K. N. Belosludtsev, N. V. Belosludtseva, A. V. Agafonov, et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1848** (10), 2200 (2015).
69. P. Muzzin, *Ann. Endocrinol. (Paris)*, **63** (2, Pt 1), 106 (2002).
70. P. R. Manger, N. Patzke, M. A. Spocter, et al., *Sci. Rep.*, **11**, 5486 (2021).
71. В. Е. Захватаев и Р. Г. Хлебопрос, *Биофизика*, **57** (1), 75 (2012).

## Models Describing Nerve Impulse Generation and Conduction

J.L. Hernandez Caceres\*, S.S. Dzhimak\*\*, \*\*\*, D.A. Semionov\*\*\*\*, \*\*\*\*\*,  
M.I. Drobotenko\*\*, and Yu.D. Nechipurenko\*\*\*\*\*

\*Cuban Center for Neurosciences, 15202, 25th street, Playa, Havana, Cuba

\*\*Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

\*\*\*Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova 41, Rostov on Don, 344006 Russia

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

\*\*\*\*\*Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, ul. Partizana Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

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

Different models and approaches to studying nerve impulse generation and conduction are discussed. Different research studies focused ion mechanical, thermodynamic and electrical properties of nerve cells. It has been 70 years since the Hodgkin–Huxley model was developed, but today it is still the gold standard in neuroscience. The model resulted from electric interpretation of the nerve membrane during the event of the action potential and led to the development of novel experimental and theoretical approaches for membrane research in biophysics. The mechanical soliton model was proposed as an alternative explanation of the nerve pulse. According to the mechanical soliton model, the nerve impulse is a non-decremented mechanical wave, linked to a phase transition in the lipid bilayer. Proponents of the mechanical soliton model gave their arguments against some points of the Hodgkin–Huxley model. Most of their statements may find explanation in the framework of Hodgkin–Huxley model considering that changes in membrane potential may lead not only to changes in ion channel permeability, but also to changes in membrane thickness, to modifications in protein-lipid interactions as well as to modulation of cooperativity between ion channels. The appearance of a mechanical soliton might be possible in some cases, but this is not the main mechanism of nerve excitability. A universal mathematical model is thus necessary for interpretation of all biophysical changes observed during the nerve impulse. The key to achieving this task is to adapt the Hodgkin–Huxley model. This approach to nerve impulse modelling could lead to new experimental designs as well as to new results.

*Keywords: nerve impulse, Hodgkin–Huxley model, mechanical soliton model, cooperative interactions, phase transition, anesthetics, protein-lipid interactions*

## ЭНТРОПИЯ И ИНФОРМАЦИЯ В ОПИСАНИИ БИОСИСТЕМ

© 2022 г. В.В. Аристов<sup>\*,#</sup>, А.В. Карнаухов<sup>\*\*</sup>, В.Ф. Левченко<sup>\*\*\*</sup>, Ю.Д. Нечипуренко<sup>\*\*\*\*,##</sup>

<sup>\*</sup>Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН,  
ул. Вавилова, 44, Москва, 119333, Россия

<sup>#</sup>E-mail: aristovvl@yandex.ru

<sup>\*\*</sup>Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

<sup>\*\*\*</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

<sup>##</sup>E-mail: nech99@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 21.04.2022 г.

Принята к публикации 25.04.2022 г.

Понятие энтропии, давно известное в термодинамике, до сих пор не получило широкого применения в биофизике. В настоящей работе делается попытка в общем виде проанализировать возможности использования понятий энтропии (негэнтропии) и информации в качестве инструментов, которые способны описать существенные стороны биосистем. Подчеркивается важность статистической энтропии для описания локальных неравновесных распределений, которые представляют собой необходимое условие существования живого состояния системы. Применение статистических методов к анализу энтропии в биосистемах связано с именем Л.А. Блюменфельда. Мы рассматриваем развитие этих представлений в связи с неравновесными процессами. Понятие энтропии может сыграть важную роль в построении теорий старения, имея в виду деградацию, как своеобразное проявление второго начала термодинамики для открытых неравновесных систем. Обсуждаются различные стационарные и нестационарные процессы для биосистем, для которых понятия информации и энтропии весьма значимы. Рассматривается, в частности, явление симбиоза в живых системах, которое имеет принципиально важное эволюционное значение. Симбиоз имеет ряд общих черт с явлениями самоорганизации, обсуждается связанная с этим феноменом концепция кооперона.

*Ключевые слова:* энтропия, живые системы, номогенез, телеогония, информация, эволюция, симбиоз, кооперон, кооперативные взаимодействия.

DOI: 10.31857/S0006302922040123, EDN: ITYINP

Проблема применения понятий энтропии (негэнтропии) и информации для описания важных свойств живых организмов обсуждается активно достаточно давно, особенно со времени выхода книги Э. Шрёдингера [1]. Существуют различные мнения о том, настолько оправдано применение представлений, выработанных в области физики и математики для адекватного описания биологических процессов. Со времени появления общих представлений о биосистемах как открытых неравновесных структурах (Э. Бауэр, Л. Фон Бергаланфи, Г. Хакен, И. Пригожин и др.) происходит поиск теоретических инструментов для исследования живых систем. Тезис Шрёдингера о том, что «биосистема питается негэнтропией», нуждается в конкретизации.

Лев Александрович Блюменфельд одним из первых поставил и решил задачу оценки суммар-

ной энтропии для живого организма (см. монографию [2]). Он пришел к парадоксальному результату: информация (в термодинамическом контексте), закодированная в сложной биосистеме, с точки зрения статистической физики мало отличается от той, что содержится в куске материала неживой природы той же массы и состава. Блюменфельд из этого сделал вывод: «тем хуже для статистической физики». Равновесное нагревание небольшого количества воды является примером процесса, который приводил бы к изменению энтропии, соответствующему разнице информации между сложной биосистемой и куском неживой материи.

В кинетической теории неравновесных процессов энтропия трактуется как соответствующий момент функции распределения для любого сколь угодно далекого от равновесия состояния.

Традиционная «макроскопическая» точка зрения все время апеллирует к термодинамическим трактовкам, поэтому приводит к высказываниям о том, что понятие энтропии можно применять только к равновесным состояниям. Но здесь принципиальное отличие, которое для биосистем играет решающую роль. Известны сходные высказывания о том, что температура и другие макровеличины можно понять, только если рассматривать равновесные состояния. Для этого надо неравновесное состояние перевести в равновесное с теми же макровеличинами. Но при этом, как нам представляется, утрачивается именно суть живого, связанного с неравновесностью.

В книге Блюменфельда говорится о неудовлетворенности данной оценкой, и выход видится во введении понятия ценности информации [2]. Заметим, что ценность информации для популяции можно определить, вводя понятие о степени ее полезности [3] (см. ниже). В целом, представление о ценности информации нуждается в конкретизации при изучении систем, имеющих разные уровни сложности. И здесь могут быть востребованы представления о телеономичности и целеполагании в биологии. Термин «телеономия» означает повышение внутреннего порядка биологической системы (предложен в работе К. Питтендриха [4]). Стоит также упомянуть в этой связи монографию К. Уоддингтона [5].

В отечественной науке были разработаны теории целеполагания на эволюционном и организменном уровне и здесь следует отметить целый ряд основополагающих работ, начиная с трудов Л.С. Берга, который развил учение о номогенезе (целесообразном реагировании и эволюции на основе закономерностей), Н.А. Бернштейна и П.К. Анохина [6–8].

В работе [9] обобщается оценка информации, проведенная Блюменфельдом, посредством подсчета соответствующей энтропии: рассматривается организм, состоящий из ряда органов и тканей, где клетки в принципе заменимы (перестановочны без потери функций целого). Основной вывод заключается в том, что нельзя оценку энтропии для простой системы, находящейся в состоянии равновесия, применять к сложной перманентно неравновесной системе. По-видимому, необходимо разработать специальный аппарат для описания живых систем как сложных иерархических динамических систем (о чем ранее писали Г.Р. Иваницкий с соавторами [10]). В этом случае может реализоваться идея Блюменфельда о ценности информации: например, каждый уровень системы может характеризоваться своей информацией со своей «ценой», меру которой следует определить. Для этого следует развить новые подходы к описанию биологических иерархических систем. Однако и без такого аппарата, характеризующего качественные особенности сложности системы, можно использовать статистиче-

скую энтропию, если применять ее для описания изменения неравновесных систем. Заметим, что в области теории коммуникаций существует ряд работ, в которых развиты подходы к определению ценности информации [11, 12].

Информация может реализовываться в разных форматах и иметь разные уровни значимости: так, в человеческом обществе существует массовая информация, значимость и ценность которой резко отличается от индивидуальной информации (которую люди получают от близких или из авторитетных источников — то есть по другим каналам, с другим уровнем значимости и пользы от ее получения, см. работу [13]).

М.В. Волькенштейн в монографии [14] приводит вычисление количества информации, накопленной в человеческой культуре. Рассматривая явно завышенное количество написанных книг за всю историю, он получает  $5 \cdot 10^{14}$  бит, что эквивалентно понижению энтропии на  $5 \cdot 10^{-9}$  Дж/К. Это с точки зрения термодинамики равновесных состояний является, конечно, чрезвычайно малой величиной. Характерно высказывание, которое делается здесь: «Нет, человеческую культуру нельзя измерять в термодинамических единицах» [14].

#### ЭНТРОПИЯ И ИНФОРМАЦИЯ ПРИ ОПИСАНИИ СТАЦИОНАРНЫХ И КВАЗИСТАЦИОНАРНЫХ СОСТОЯНИЙ БИОСИСТЕМ

Понятие «жизни» имеет множество определений, отдельную работу этому посвятил Э. Трифонов [15]. В его статье приводится, в частности, такое определение: «Жизнь — это метаболизующаяся материальная информационная система, обладающая способностью к самовоспроизведению с изменениями (эволюция), которая требует энергии и подходящей среды». Здесь мы намерены обсудить некоторые важные понятия из приведенной формулировки. Следует отметить связанные с проявлением жизни для индивидуума нестационарные процессы развития и деградации (старения) во временной шкале человеческой жизни и квазистационарные состояния одномоментно (или в зрелом возрасте). Можно провести оценку энтропии для стационарных (или квазистационарных) процессов, связанных с метаболизмом.

Самовоспроизведение представляет собой явление, в котором парадоксально сочетаются нестационарность на уровне отдельных организмов и стационарность на популяционном уровне. Можно увидеть подобное сочетание нестационарности и стационарности в биологической эволюции, передаче наследственной информации, записанной в геноме, от индивидуума к индивидууму и между поколениями при размножении.

Здесь есть еще один аспект: возможна передача важной для выживания информации негенетическим путем (обучение), что характерно главным образом для высших животных и особенно человека (культура).

Допустимо говорить об эквивалентности энтропии и информации с известной осторожностью, в рамках той или иной парадигмы. Неравновесная статистическая энтропия при правильном выборе соответствующей функции распределения может служить мерой для информации, содержащейся в сложной многоклеточной (многокомпонентной) биосистеме, для этого надо хотя бы на теоретическом уровне проследить возникновение и развитие биоструктуры.

Статистическая энтропия системы,  $S$ , равна  $S = k \ln W$ , где  $k$  – постоянная Больцмана,  $W$  – термодинамический вес. В работе [9] показано, что локальная (в смысле отнесения к точке физического пространства) энтропия в неравновесной открытой системе может быть существенно меньше, чем энтропия при локальном равновесии.

В некоторых клеточных системах ни одна клетка не может быть заменена другой, т.е. не допустимы перестановки с тем, чтобы не изменилось принципиально свойство системы в целом. Но такое свойство можно отнести лишь к очень организованным органам, например, головному мозгу (каждый нейрон обладает своей памятью, т.е. элементы неэквивалентны). Для других органов перестановки клеток в принципе допустимы. В однородном веществе неживой природы все элементы могут быть переставлены – никакого значения для структуры в целом это не будет иметь. Поэтому ясно, что количество комбинаций, при которых реализуется такое «макросостояние», оказывается максимальным из всех возможных – что и означает максимальную энтропию. Между двумя предельными случаями существуют промежуточные, которые можно рассмотреть.

Для грубой оценки энтропии на уровне организма можно разделить организм на органы, в каждом органе возможен обмен клетками (здесь мы пренебрегаем тем, что орган может состоять из нескольких тканей), а между органами – нет. Число допустимых комбинаций в этом случае будет меньше, чем в случае независимого комплекта ячеек. В общем случае представим, что организм состоит из  $m$  органов, внутри органа клетки можно заменять, а между органами нельзя. Тогда число возможных перестановок внутри отдельного органа определяется простой комбинаторной формулой, а общее число – произведением этих чисел. Вычисление энтропии для этого случая аналогично классическому больцмановскому вычислению статистической энтропии с общим числом частиц  $N$  и числом частиц в состояниях,

равным соответственно  $N_1, \dots, N_m$ . Термодинамический вес  $W = N! / (N_1! \dots N_m!)$ .

Можно рассмотреть два предельных случая (их по сути описывал Блюменфельд). В одном возможны все перестановки, как в образце «неживого» материала. Термодинамический вес тогда равен  $N!$ . В другом случае невозможна ни одна перестановка элементов (как в идеализированной нейронной системе мозга), тогда термодинамический вес равен 1, и энтропия равна 0. Энтропию мы рассматриваем как меру неупорядоченности, или меру недостатка информации о рассматриваемой системе. Поэтому можно оценивать величину информации в битах, а величину энтропии – в Дж/К.

Разницу в информации для этих двух случаев можно оценить, используя формулу Стирлинга:  $\Delta I = \log_2((10^{13})! / ((10^{12})!)^{10})$  бит =  $10^{13} \log_2 10^{13}$  бит –  $10 \cdot 10^{12} \log_2 10^{12}$  бит =  $10^{13} \log_2 10$  бит. После умножения на  $k$  получаем, что это эквивалентно понижению энтропии на  $\Delta S = 4.58 \cdot 10^{-9}$  Дж/К. Понятно, что данная величина меньше энтропии при всевозможных перестановках элементов, равной  $k \cdot 13 \cdot 10^{13} \log_2 10$  бит =  $60 \cdot 10^{-9}$  Дж/К.

Для адекватного представления этой величины надо проследить реальный процесс дифференциации от потенциально любой перестановочности клеток в эмбрионе (некоторая аналогия с бластемой при регенерации) до отдельных органов, что требует передачи информации. При морфогенезе происходит интенсивное возрастание информации при помощи синтеза ДНК и РНК и организации уникальных паттернов молчащих и работающих генов, характерных для каждой ткани.

Энтропия уменьшается за счет оттока из биосистемы энтропии вовне. Следует заметить, что не обязательно представлять энтропию в «термодинамических единицах» Дж/К. Более того, такое представление даже способно вводить в заблуждение: в кинетической теории энтропия  $S$  ( $-H$ -функция) – это один из моментов функции распределения, и постоянная Больцмана  $k$  в отличие от другого момента – температуры – там не фигурирует.

По-видимому, количество допустимых комбинаций в организме в целом будет существенно меньше в силу большой корреляции между отдельными частями организма, описать это в некоем грубом приближении может кинетическая модель метаболизма, показывающая сосуществование локально неравновесных частей [16]. Заметим, что создать такую систему из локально-равновесных частей не удастся. При гипотетическом предположении о возможности каким-то образом воссоздать сложную неравновесную живую систему, неизбежно встает вопрос об очень больших затратах энтропии для реализации. При этом

оценка требует статистической формулы энтропии.

Чтобы «перевести» систему из состояния с высокой энтропией в состояние с низкой энтропией, тем более в столь высокоорганизованное состояние, как биосистема со сложной взаимозависимой структурой отдельных органов, требуется выделение ввне большого количества энтропии. Однако управление такой биологической системой, как организм человека, к примеру, может потребовать совсем немного информации: важно, чтобы информация эта была послана и получена на высоком уровне — скажем, на уровне нервной системы.

В работе [9] при рассмотрении стационарных биосистем на макроуровне при помощи кинетической модели метаболизма подтвержден шрёдингеровский тезис о том, что такая система поддерживается за счет «питания» «негэнтропией». Вычисление энтропии позволяет ввести критерий различия «живого» и «неживого» состояний. Первому отвечает меньшее значение статистической энтропии при локальной неравновесности, второму — большее значение энтропии при равновесности. На микроуровне показано, что энтропия уменьшается при увеличении кооперативности в системе.

#### ЭНТРОПИЯ И ИНФОРМАЦИЯ ПРИ ОПИСАНИИ НЕСТАЦИОНАРНЫХ ПРОЦЕССОВ

По-видимому, проблема применения понятий информации и энтропии для описания живых систем имеет больший масштаб, чем это представлялось в XX веке. Ее решение потребует фундаментального переосмысления многих привычных представлений, относящихся как к традиционным физическим взглядам на неживую материю, так и, возможно в большей степени, к нашему пониманию феномена жизни [17, 18].

Прежде всего, необходимо будет провести классификацию различных переходных типов физических систем, находящихся на границе живой и неживой материи. Не углубляясь здесь в детали, отметим важность более тщательного изучения явления самоорганизации, а также свойств иерархически организованных сложных систем (заметим, что только что вышли две статьи Е. Кунина с соавторами, посвященные этой проблеме [19, 20]). Переходный характер таких систем между живой и неживой материей с одной стороны позволяет проводить исследования, базируясь на стандартных физико-математических методах, а с другой — дает возможность разрабатывать универсальные методы описания явлений в живых и неживых системах.

Отдельная область биофизики посвящена теоретическому описанию морфогенеза (это направ-

ление связано с основополагающей работой Тьюринга [21]). Формообразование происходит в результате химических реакций и диффузии, что приводит к уменьшению энтропии в открытой системе. Здесь следует отметить известную монографию Б. Белинцева [22]. Приведем слова из его работы [23]: «Предварительно следует прояснить более принципиальный вопрос: сопряжен ли процесс детерминации клеток в развивающемся зародыше с возникновением новой информации? Иными словами, является ли такая детерминация результатом запоминания случайного выбора?» ([23], с. 56).

Также одна из проблем здесь состоит в выяснении и моделировании механизма перехода из недифференцированной среды зародыша (с относительно высокой энтропией) через цикл переходов к структурированному состоянию (с меньшей энтропией). Формальный результат Тьюринга сводится к появлению неустойчивости, нарушающей симметрию, что ведет к уменьшению энтропии в динамической системе «реакция–диффузия» (понятно, что при этом происходит отток энтропии из биосистемы).

Еще одной важной задачей является исследование информационных процессов в живых системах. Дело в том, что определение живых объектов, как объектов, обладающих способностью к самовоспроизведению, то есть к созданию дочерних объектов, которые наследуют характерные признаки родительских, неявным образом включает в себя акт передачи наследственной информации от родительского объекта дочернему. С другой стороны, классическое Шенноновское определение информации также неявным образом предполагает существование живых объектов, один из которых является первичным источником информации, а другой — ее конечным приемником. Поясним, что каким бы большим количеством промежуточных неживых приемников, передатчиков, перекодировщиков и устройств хранения информации не было бы на технических линиях передачи информации, конечные приемник и источник информации — живые объекты [3]. Кроме того, нужно учесть, что все технические устройства обработки информации были изготовлены человеком. Сильная гипотеза, которая может быть здесь высказана, заключается в том, что информация как некоторая характеристика существует только в живых системах, либо в системах, связанных с живыми объектами. Иными словами, во Вселенной до возникновения жизни не существовало информации в классическом Шенноновском представлении. В какой-то степени данная гипотеза концептуально перекликается с известным высказыванием Р. Декарта «Мыслю, значит существую».

В этой связи понятие информации должно каким-то образом вытекать из фундаментальных свойств живой материи, главным из которых, как

уже отмечалось, является способность к самовоспроизведению, что неизбежно вовлекает живые объекты в процесс эволюции. Здесь мы можем использовать модели, описывающие нестационарные процессы. Эволюцию, на наш взгляд, тоже можно описать при помощи подобных моделей [16]. Такие модели могут быть применимы для описания совершенствования организмов от поколения к поколению, а также изменений на уровне единичного организма – его рост, развитие, а также деградацию (старение) [24]. Таким образом, понятие информации должно неизбежно возникать в рамках эволюционного процесса. На первый взгляд, это утверждение кажется тривиальным. С одной стороны, ДНК – наверное, наиболее известный пример молекулы, несущей информационные сообщения, содержащиеся в живых объектах, с другой стороны, ДНК – главный инструмент и объект эволюции. Согласно синтетической теории эволюции – современного варианта дарвиновского естественного отбора – именно случайные мутации в ДНК являются двигателем эволюционного прогресса [25, 26]. Но сама синтетическая теория эволюции, возникшая на стыке генетики и дарвиновской теории, имеет две фундаментальные проблемы, которые необходимо решить, прежде чем появится возможность ее использования для решения следующего круга проблем.

Первая проблема состоит в том, что численные оценки вероятностей мутаций, приводящих к появлению многих эволюционно значимых признаков у отдельных организмов, дают исчезающе малые величины. Возможно, мутации в живых организмах не столь уж случайны: если они возникают в наиболее перегруженных работой участках генома и «эффективная для мутаций длина генома» уменьшается, то этот факт тоже можно объяснить в рамках представлений о целеполагании: организм как бы регулирует поток мутаций и скорость своей эволюции. Заметим, что общее представление об авторегулируемой эволюции развито в работе [3].

Существуют и другие предложения, как можно решить эту проблему. Одно из решений, предложенное в 1986 г. Г. Иваницким с соавторами [10], заключалось в том, что предлагалось рассматривать блочно-иерархический характер изменений ДНК, когда в ДНК изменениям подвергаются сразу крупные участки – блоки. Заметим, что подобные блоки выделяются и в белках (см. работы [27, 28]). Показано, что такой характер изменений ДНК может резко ускорить процесс эволюции посредством естественного отбора.

Но у синтетической теории эволюции есть еще и другая проблема. Дело в том, что сам генетический аппарат является продуктом эволюции. Причем настолько сложным, что вероятность одновременного появления всех составных частей этого аппарата представляется исчезающе малой.

Само появление таких молекул, как ДНК, м-РНК, т-РНК, рибосомальных комплексов требовало наличия некоторой предварительной эволюции. Эту эволюцию следовало бы назвать «догенетической эволюцией». Но как в условиях отсутствия генетического аппарата живой объект мог хранить наследуемую информацию?

Решение этого вопроса, на наш взгляд, следует искать в рамках подхода, который принято называть симбиогенезом.

## СИМБИОГЕНЕЗ

Российские ученые конца XIX – начала XX веков внесли большой вклад в изучение симбиотических отношений и в создание теории симбиогенеза. Так, А.С. Фаминцын совместно с О.В. Баранецким еще в 1867 г. показали симбиотическую природу лишайников [29]. А в 1905 г. К.С. Мережковский выдвинул гипотезу о ведущей роли симбиоза в прогрессивной эволюции органического мира (гипотеза симбиогенеза), рассматривая, например, хлоропласты цветковых растений как видоизмененные симбиотические водоросли. Можно также отметить труды Б.М. Козо-Полянского, П.А. Кропоткина и Л. Маргелис [30], работавшей уже в конце XX века и много сделавшей для популяризации работ своих предшественников и окончательного признания гипотез о симбиотическом происхождении эукариотических клеток вследствие захвата клеток прокариот (или архей) другими прокариотами.

Несмотря на длительную историю изучения этого вопроса, симбиотические отношения и симбиогенез обычно принято рассматривать лишь как пример удивительного многообразия живой природы, не наделяя их самостоятельным фундаментальным значением для понимания феномена жизни. Заметим, что в 2010 г. была опубликована работа В. Левченко и В. Котолупова о кооперонах, где симбиотические отношения между частями организма обсуждаются как необходимое условие его существования ([31], см. также работу [3]).

В этой связи хотелось бы обратить внимание на результаты экспедиции 1979–1980 гг., посвященной изучению микропланктона тропической области Атлантического океана, которую часто называют океанической пустыней из-за низкой биологической продуктивности. Во время этой экспедиции В.Н. Карнаухову с сотрудниками удалось установить факт практически полного доминирования симбиотических форм жизни в этой зоне Мирового океана [32]. Фактически это означало, что большая часть поверхности нашей планеты представляет собой территорию доминирования симбиотических организмов. И биосфера – это тоже надорганизменная симбиотиче-

ская система (заметим, что возможны *сезонные* кооперативные системы в водоемах: вначале — свободноживущие микроорганизмы, но потом они временно объединяются).

Этот факт имел эвристическое значение и заставил по-новому взглянуть на явление симбиоза. Более внимательный анализ показал, что вся живая природа буквально пронизана симбиотическими отношениями. Практически невозможно найти живое существо, которое не участвовало бы в тех или иных симбиотических отношениях с другими живыми существами или которое само не было бы продуктом симбиогенеза. Например, в человеке генетически «чужих» организмов по ряду оценок на порядок больше, чем собственных клеток (и это не только те, которые обитают в кишечнике).

Но особое значение явление симбиоза имеет для введения понятия негенетического наследования признаков, которое в свою очередь является базой для введения понятия наследственной информации. В качестве примера рассмотрим возникновение эукариотической клетки в результате симбиогенеза, объединения прокариотических клеток. Отметим, что как протомиохондрия, поселившаяся и выжившая внутри протоэукариотической клетки, так и сама протоэукариотическая клетка сравнительно мало что поменяли в своих геномах. Но при этом возник новый организм, обладавший принципиально новыми качествами. И эти качества устойчиво передавались дочерним эукариотическим организмам. Конечно, в этом новом эукариотическом организме содержится генетическая информация, доставшаяся ему от обоих симбионтов. Еще один яркий пример — лишайник, состоящий из организмов разных таксонов. Эти примеры можно рассматривать также в качестве иллюстраций блочно-иерархической эволюции отбора, о котором говорилось выше. В принципе можно представить себе организмы, не содержащие информации в форме ДНК или РНК — своеобразные симбиотические сообщества молекул, обеспечивающих взаимный катализ, которые возможно и были исходными предбиологическими динамическими структурами, содержащими информацию, наследуемую следующими поколениями подобных молекулярных симбиотических сообществ [33].

Представления о симбиогенезе связаны с концепцией кооперона. Традиционно все живое на Земле изучается в контексте структурно-морфологического подхода, в рамках которого рассматриваются различные живые системы, имеющие разные размеры, организацию и использующие различные ресурсы для своего существования. Однако любая живая система должна рассматриваться и как неразрывный структурно-функциональный комплекс, причем поддержание существования системы невозможно без процессов,

непрерывно происходящих в ней и направленных на сохранение этого комплекса. Это приводит к представлению о кооперонах — самосохраняющихся лишь как результат протекания различных специфически организованных кооперативных процессов [3, 31]. Структура кооперона является субстратом для поддержания процессов, обеспечивающих его сохранение. Примерами кооперонов могут служить:

- 1) одноклеточные организмы, у которых в качестве отдельных структурно-функциональных блоков — подсистем — выступают клеточные оргanelлы;
- 2) многоклеточные организмы, для которых подсистемами являются клетки, органы;
- 3) экосистемы, в которых подсистемами являются отдельные организмы и видовые популяции, или же — в крупных биогеоценозах — еще и другие экосистемы меньшего масштаба и ранга;
- 4) биосфера, для которой подсистемами являются биогеоценозы.

Заметим, что иногда в качестве отдельного структурного уровня выделяют также клетки многоклеточного организма.

В целом можно дать следующее определение: кооперативная система — это целостная система, свойства которой определяются совокупностью входящих в нее элементов, однако простое суммирование свойств составляющих элементов без учета их взаимоотношений друг с другом не позволяет объяснить все свойства такой системы как целого. Целое оказывается больше, чем простая сумма частей. Самосохраняющаяся кооперативная система представляет собой устойчивый структурно-функциональный комплекс и выступает как единое целое в некотором диапазоне внешних условий. Следует подчеркнуть, что специфические свойства частей столь же важны, как и общая структура кооперона для поддержания его существования.

Чисто морфологический метод прекрасно справляется с описанием строения мертвых организмов и неживых объектов, в том числе позволяет оценивать их энтропию, но не может обеспечить адекватное рассмотрение живого организма, «наполненного» еще и множеством взаимосогласованных кооперативных процессов. Нередко структурные уровни организации практически совпадают с очевидными уровнями кооперации. Например, клетки многоклеточного организма несомненно являются сравнительно автономными кооперонами. Весь организм — это тоже кооперон, а не просто некая механическая совокупность клеток, тканей и органов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Явление симбиоза в живых системах имеет ряд общих черт с явлениями самоорганизации, синергии, с кооперативными эффектами, наблюдаемыми на молекулярном уровне в клетке и в неживой природе и связано с концепцией кооперона (что согласуется с блочным принципом организации генома, упомянутым выше (см. работы [3, 10, 28, 30, 31])). Нам представляется целесообразным создание формализма, позволяющего единым образом описывать и анализировать круг явлений, связанный с самоорганизацией и образованием иерархических структур, подобно тому, как рассматриваются кооперативные явления при межмолекулярных взаимодействиях на основании теории адсорбции [34]. Заметим, что представления об иерархии структур развивает В.А. Твердислов (см., например, работу [35]). Мы надеемся, что на этом пути появится возможность универсальным образом сформулировать понятие информации и обобщить понятие энтропии, что позволит корректно применять его для живых систем. Как классические работы Л.А. Блюменфельда, С.Э. Шноля, М.В. Волькенштейна и соавторов, так и недавние работы современных авторов [3, 9, 24, 19, 20, 36] могут помочь подойти к решению этой задачи.

В данной работе мы наметили связь между представлениями теории эволюции, теории информации и подходами статистической физики к живым системам, которые развивались на протяжении XX века. Проблемы описания живых систем при помощи физических моделей, в частности термодинамики и кинетики, требуют для своего решения развития новой парадигмы. Заметим, что в работе [9] отмечается специфическое свойство живой системы: статистическая энтропия для локальных неравновесных распределений существенно меньше энтропии для локальных равновесных распределений, что сопоставляется с «неживым» состоянием системы. Подходы при помощи теории нейронных сетей и теории обучения могут помочь здесь лишь в определенной степени. С другой стороны, представления о том, что аллостерические взаимодействия способны играть центральную роль в интеграции клеточной информации, могут быть весьма продуктивными [36].

В настоящее время высказаны разные взгляды на применимость понятия энтропии для описания биосистем. Концепция энтропии подходит для описания ограниченных в пространстве фрагментов живых систем, для которых четко указаны составляющие элементы. Но можно ли при помощи понятия энтропии подойти к объяснению самого феномена жизни? Ведь для этого необходимо учесть функциональные взаимоотношения между элементами, обеспечивающие жизнедеятельность живой системы как целого.

Как следует из работы [9], с определенной осторожностью можно сделать вывод, что корректное использование статистической энтропии может описывать и составляющие элементы биосистемы, и ее свойства в целом, с опорой на кинетическую модель метаболизма, подтверждая и конкретизируя постулат Шрёдингера о поддержании ее за счет «питания» негэнтропией.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить Н.Г. Есипову, А.С. Бучельникова, И.А. Лавриненко и Р.В. Полозова за полезные обсуждения.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (тема 121052600299-1).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Э. Шрёдингер, *Что такое жизнь с точки зрения физики* (Иностранная литература, М., 1947).
2. Л.А. Блюменфельд, *Проблемы биологической физики* (Наука, М., 1984).
3. В.Ф. Левченко, *Биосфера: этапы жизни (эволюция частей и целого)* («Свое издательство», СПб., 2012). [http://nfss.evol.nw.ru/lab38/wp-content/uploads/2018/11/levchenko2012\\_biosfera.pdf](http://nfss.evol.nw.ru/lab38/wp-content/uploads/2018/11/levchenko2012_biosfera.pdf)
4. C. S. Pittendrigh, in *Behavior and Evolution*, Ed. By A. Roe and G. G. Simpson (Yale University Press, New Haven, 1958).
5. К. Х. Уоддингтон, *Морфогенез и генетика* (Мир, М., 1964).
6. Л. С. Берг, *Номогенез, или эволюция на основе закономерностей* (Гос. изд-во, Петроград, 1922).
7. П. К. Анохин, *Узловые вопросы теории функциональных систем* (Наука, М., 1980).
8. Н. А. Бернштейн, *Современные искания в физиологии нервного процесса* («Смысл», М., 2003).
9. V. V. Aristov, A. S. Buchelnikov, and Yu. D. Nechipurenko, *Entropy*, **24**, 172 (2022)
10. Г. Р. Иваницкий, Н. Г. Есипова, Р. А. Абагян и С. Э. Шноль, *Биофизика*, **30** (3), 418 (1986).

11. Г. П. Шанкин, *Ценность информации. Вопросы теории и приложений* («Филоматис», М., 2004).
12. А. О. Авсентьев, Докл. Томского гос. университета систем управления и радиоэлектроники. **19** (1), 21 (2016).
13. Ю. Д. Нечипоренко, Россия XXI, № 11–12, 153 (1994). <https://yuniko.ru/index.php/statii/mkulturologia/15-ckult/120-nformaciae>
14. М. В. Волькенштейн, *Энтропия и информация* (Наука, М., 1986).
15. E. N. Trifonov, J. Biomol. Struct. Dyn., **29** (2), 259 (2011).
16. V. V. Aristov, Results in Physics, **13**, 102232 (2019).
17. Г. Р. Иваницкий, *Выражи закономерностей* (Наука, М., 2011).
18. К. Саган, *Голубая точка. Космическое будущее человечества* (Альпина Паблишер, М., 2015).
19. V. Vanchurin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **119** (6), e2120037119 (2022).
20. V. Vanchurin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **119** (6), e2120042119 (2022).
21. A. M. Turing, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sciences, **237** (641), 37, (1952)
22. Б. Н. Белинцев. *Физические основы биологического формообразования* (Наука, М., 1991).
23. Б. Н. Белинцев, Успехи физ. наук, **141** (1), 55 (1983)
24. А. В. Карнаухова и Е. В. Карнаухова, Биофизика, **54** (4), 726, (2009).
25. Ю. В. Чайковский, *Активный связный мир: опыт теории эволюции жизни* (Т-во науч. изд. КМК, М., 2008).
26. Ф. Хойл, *Математика эволюции* (Ин-т компл. исслед., М.–Ижевск, 2012).
27. A. A. Anashkina, I. Y. Petrushanko, R. N. Ziganshin, et al., Entropy, **23** (12), 1647 (2021).
28. Е. П. Харченко., В. Ф. Левченко и др., Биохимия, **52**, 279 (1987).
29. А. С. Фаминцын, *Обмен веществ и превращение энергии в растениях*, под ред. А. Л. Курсанова (Наука, М., 1989).
30. Л. Маргелис, *Роль симбиоза в эволюции клетки* (Мир, М., 1983)
31. В. Ф. Левченко и В. А. Котолупов, Журн. эволюц. биохимии и физиологии, **46** (6), 84 (2010).
32. В. Н. Карнаухова, *Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды* (Наука, М., 2001).
33. М. Эйген, *Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул* («Мир», М., 1973).
34. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т компл. исслед., М.–Ижевск, 2015).
35. В. А. Твердислов, Биофизика, **58** (1), 159 (2013).
36. J. W. Biddle, et al., E-life, **10**, e65498 (2021).

## Entropy and Information in the Description of Biosystems

V.V. Aristov\*, A.V.Karnaukhov\*\*, V.F.Levchenko\*\*\*, and Yu. D. Nechipurenko\*\*\*\*

\*Federal Research Center “Computer Science and Control”, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 44, Moscow, 119333 Russia

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

\*\*\*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Prosp. Thoreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia

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

The concept of entropy, long known in thermodynamics, has not yet been widely used in biophysics. In this paper, an attempt is made to analyze in a general way the possibilities of using the concepts of entropy (negentropy) and information as tools that can describe the essential aspects of biosystems. This study highlights the importance of statistical entropy for the description of local non-equilibrium distributions, which are a necessary condition for the existence of a living system. The application of statistical methods to the analysis of entropy in biosystems is associated with the name of L.A. Blumenfeld. We consider the development of these concepts in the context of nonequilibrium processes. The concept of entropy can play an essential role in the construction of theories of aging, where degradation is a sort of manifestation of the second law of thermodynamics for open non-equilibrium systems. This paper presents a discussion of various stationary and non-stationary processes for biosystems for which the concepts of information and entropy are very significant. Particular attention is paid to symbiosis in living systems, the phenomenon that plays a crucial evolutionary role. Symbiosis shares a number of common features with the phenomena of self-organization; the concept of a cooperon associated with this phenomenon is discussed.

*Keywords: entropy, living systems, nomogenesis, telegony, information, evolution, symbiosis, cooperon, cooperative interactions*

## ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО КРАСНОГО СВЕТА ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ ПОСТАРИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЦЕ КРЫС

© 2022 г. О.В. Другова, А.П. Баврина, Н.В. Тиунова, В.В. Борзиков, С.Л. Малиновская

*Приволжский исследовательский медицинский университет,  
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1*

*E-mail: olgadругova@gmail.com*

Поступила в редакцию 11.10.2021 г.

После доработки 24.12.2021 г.

Принята к публикации 07.04.2022 г.

Изучены изменения электрических характеристик сердца крыс, обусловленные адреналиновой аритмией и эффекты их модуляции низкоинтенсивным красным светом. Работали с тремя группами экспериментальных животных: в контрольной группе животных не подвергали никаким воздействиям, в опытных группах моделировали адреналиновую аритмию. В первой опытной группе регистрировали десятиминутную электрокардиограмму по истечении 5 мин после моделирования адреналиновой аритмии, во второй опытной группе электрокардиограмму регистрировали при одновременном облучении проекционной зоны сердца светом красного светодиода (650 нм, интенсивность излучения 5 мВт/см<sup>2</sup>). Сравнительный анализ variability сердечного ритма после адреналинстимулируемой аритмии в двух опытных группах показал нормализацию красным светом моды и QT-интервала на фоне незначимо измененной частоты сердечных сокращений. Однако световое воздействие способствовало значительному снижению вариационного размаха; это позволяет предположить, что синоатриальный узел является наиболее чувствительной мишенью для красного света.

*Ключевые слова: фотобиомодуляция, красный свет, аритмия, сердечный ритм.*

DOI: 10.31857/S0006302922040135, EDN: IUAKZQ

В настоящее время светотерапия получила широкое применение в медицине. Фотобиомодуляция, или низкоуровневая лазерная терапия, показывает широкий спектр возможностей для коррекции многих патологий [1, 2]. В частности, ряд исследований свидетельствует о модуляции электрических характеристик кардиомиоцитов красным светом [3–7]. Преимущество терапевтического использования низкоэнергетического светового излучения в диапазоне видимого красного и ближнего инфракрасного света заключается в том, что оно достаточно глубоко проникает в ткань и не вызывает каких-либо повреждений. Однако первичные фотохимические и фотофизические превращения, вызванные поглощением световой энергии, до сих пор изучены крайне мало. К настоящему времени сформулировано несколько гипотез касательно первичного действия низкоуровневой лазерной терапии на организм.

*Сокращения:* ЭКГ — электрокардиограмма, Мо — мода, ЧСС — частота сердечных сокращений, ВР — вариационный размах, ВПР — вегетативный показатель ритма, СР — саркоплазматический ретикулум.

Одной из общепризнанных является фотобиологическая концепция, суть которой состоит в существовании акцептора светового излучения, максимум поглощения которого совпадает с максимумом излучения источника. Дальнейшие эффекты, обусловленные активацией акцептора, связывают с инициацией новых сигнальных путей, характерных для прикладываемого излучения.

Большинство современных исследователей ключевую роль в изменении физиологического состояния облученных красным светом объектов отводят митохондриям [8]. Считается, что конечный элемент дыхательной цепи цитохром с-оксидаза способен поглощать излучение в красной области спектра и изменять работу электронтранспортной цепи, запуская тем самым каскад реакций, приводящих в первую очередь к изменению уровня АТФ. Изменения уровня АТФ могут существенно влиять на клеточный метаболизм, в том числе увеличивать возможности экзогенных и эндогенных АТФаз, что может отражаться на ионных токах [9]. Низкоинтенсивное излучение

красного спектра способно активировать такие антиоксидантные системы клетки, как супероксиддисмутаза и каталаза, что, в свою очередь, также способствует более тесному сопряжению дыхания с фосфорилированием [10]. Неопровержимые доказательства в пользу активации антиоксидантных систем приведены в работах [11, 12]. В качестве первичных реакций рассматриваются также уменьшение количества NO, связанного в каталитическом центре цитохром *c*-оксидазы, и увеличение содержания активных форм кислорода [13]. Кроме того, было показано, что воздействие низкоэнергетическим излучением с длиной волны 650 и 808 нм способно вызывать повышение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в различных типах клеток [14–16]. В целом такие фотоиндуцированные колебания концентрации  $Ca^{2+}$  связываются с возможностью световой энергии специфически воздействовать на два основных пути регуляции концентрации  $Ca^{2+}$ , независимо от типа клеток: приток экзогенного  $Ca^{2+}$  в клетку и высвобождение эндогенного  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикула [14, 16]. Показана возможность низкоинтенсивного красного света изменять некоторые электрофизиологические параметры. В частности, ряд исследований свидетельствует о модуляции электрических характеристик кардиомиоцитов красным светом [3–7].

Обобщением всего накопленного экспериментального материала являются три фотохимических механизма, сформулированные Ю.А. Владимировым: 1) фотодинамическое действие лазерного излучения; 2) фотоактивация супероксиддисмутаза; 3) фотолиз соединений, содержащих NO [17, 18]. С.В. Москвиным была предложена термодинамическая модель действия низкоуровневой лазерной терапии, согласно которой пусковым механизмом фотоиндуцированных эффектов не является фотобиологическая реакция как таковая. Основной причиной он рассматривает кратковременный локальный термодинамический градиент на мембране, приводящий к выходу ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоль [10].

Учитывая имеющиеся к настоящему времени работы, свидетельствующие об изменении энергетического потенциала и мембранного потенциала клеток при фотобиомодуляции, мы предположили возможным обнаружить наличие подобных эффектов в сердце после аритмий, вызванных адреналином.

В данном исследовании анализировались изменения параметров электрокардиограммы (ЭКГ) сердца крыс, обусловленные адреналиновой аритмией и эффекты их модуляции низкоинтенсивным красным светом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на самцах аутбредных наркотизированных (золетил 100, 35 мг/кг, внутривенно) белых крыс с массой тела 150–200 г. Животные случайным образом были распределены на три группы: контрольную ( $n = 10$ ) и две опытные ( $n = 40$ ). В контрольной группе животных не подвергали никаким воздействиям, в опытных группах моделировали адреналиновую аритмию путем введения в подвздошную вену 10%-го раствора адреналина гидрохлорида в количестве 0.15 мл. Регистрацию электрических параметров сердца осуществляли с помощью ветеринарного электрокардиографа «Поли-Спектр 8В» (ООО «Нейрософт», Иваново) в течение 10 мин. В первой опытной группе, условно названной «Аритмия» ( $n = 25$ ) регистрировали ЭКГ по истечении 5 мин после моделирования адреналиновой аритмии (после прекращения желудочковых экстрасистол, вызванных адреналином), световое воздействие отсутствовало. Во второй опытной группе, условно названной «Красный свет» ( $n = 15$ ) через 5 мин после введения адреналина проводили облучение проекционной зоны сердца светом красного светодиода (спектральный центр 650 нм), интенсивность излучения  $5 \text{ мВт/см}^2$ , плотность энергии  $0.9 \text{ Дж/см}^2$ , площадь светового воздействия  $2 \text{ см}^2$ . ЭКГ регистрировали при одновременном облучении по той же схеме.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программы SPSS Statistic v. 21. Соответствие опытных данных нормальному распределению проверяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде медианы (*Me*) и интерквартильного диапазона (25%; 75%). Так как не все экспериментальные группы удовлетворяли нормальному закону распределения, для оценки межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при значении уровня значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ЭКГ крыс через 5 мин после внутривенного введения адреналина в обеих опытных группах не показал каких-либо изменений амплитудных характеристик относительно контрольных значений. Статистически значимые изменения были найдены только для временных показателей. Значения этих показателей приведены в таблице. Адреналиновая аритмия характеризовалась статистически значимым снижением интервала QT в сравнении с контролем. При этом было показано снижение  $Mo$  (наиболее часто встречающегося значения R-R-интервала). Это

## Временные показатели ЭКГ крыс после адреналиновой аритмии

Группа	Показатель	Медиана	Межквартильный диапазон	
			25%	75%
Контроль, $n = 10$	ЧСС, уд/мин	380	332	407
	QT, мс	63.8	59.5	65.9
	Qtc, мс	155.8	136.9	172.2
	Mo, с	0.157	0.1485	0.1845
	BP	1.135	0.62275	2.3375
	ВПР	3.88	2.465	12.09
Аритмия, $n = 25$	ЧСС, уд/мин	399.5	316	425.5
	QT, мс	56 *	46.8	63
	Qtc, мс	150.7	108.6	163.8
	Mo, с	0.1355 *	0.129	0.15275
	BP	0.805	0.44375	2.635
	ВПР	8.805	3.45	17.575
Красный свет, $n = 15$	ЧСС, уд/мин	412.5	310.75	448
	QT, мс	66.7**	58.4	73.7
	Qtc, мс	181.8	149.7	209.3
	Mo, с	0.144	0.13375	0.2035
	BP	0.5495 *	0.36925	0.943
	ВПР	12.8 *, **	6.9825	19.975

Примечание. \* – Статистически значимые отличия с контролем,  $p < 0.05$ ; \*\* – статистически значимые отличия с аритмией,  $p < 0.05$ .

может свидетельствовать о сдвиге сердечного ритма в область тахикардии, однако статистически значимых отклонений частоты сердечных сокращений (ЧСС) от контрольных значений не показано ни в одной из опытных групп (рис. 1).

Световое воздействие, в свою очередь, способствовало нормализации как QT-интервала, так и

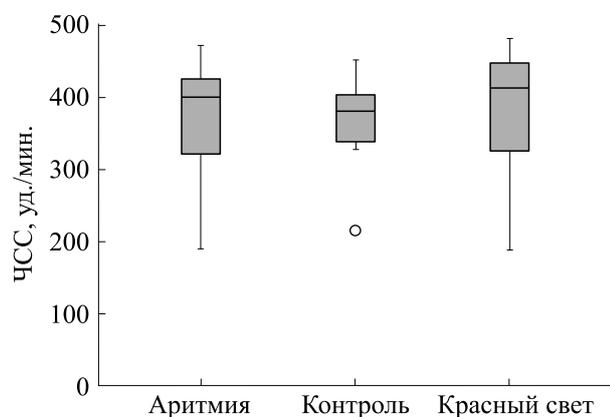


Рис. 1. Изменение ЧСС после адреналиновой аритмии.

Mo (рис. 2 и 3). Показательные различия в случае облучения зоны сердца красным светом относятся к характеристикам вариабельности сердечного

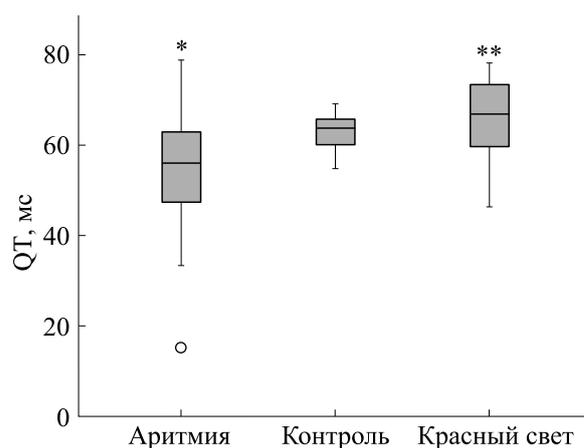
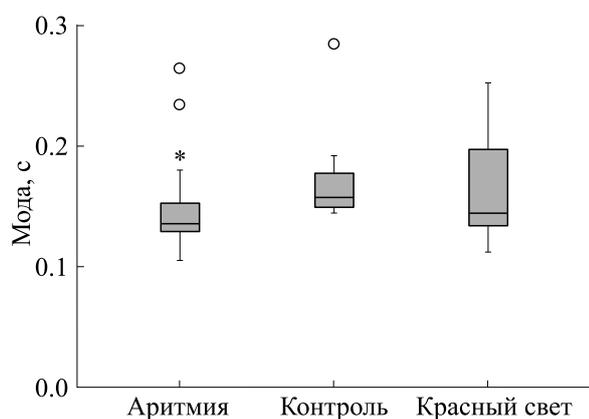
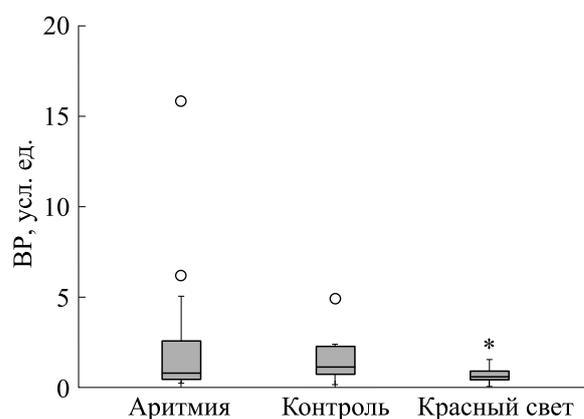


Рис. 2. Изменение QT-интервала после адреналиновой аритмии; \* – статистически значимые отличия с контролем,  $p < 0.05$ ; \*\* – статистически значимые отличия с аритмией,  $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Изменение моды после адреналиновой аритмии; \* – статистически значимые отличия с контролем,  $p < 0.05$ .



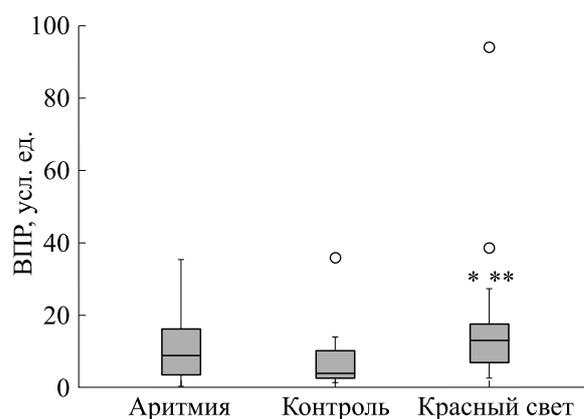
**Рис. 4.** Изменение ВР после адреналиновой аритмии; \* – статистически значимые отличия с контролем,  $p < 0.05$ .

ритма. Так, было установлено значимое снижение такого показателя, как вариационный размах (ВР) (рис. 4). ВР характеризует разность между максимальным и минимальным R-R-интервалами, соответственно, это значение свидетельствует о вариативности сердечного ритма. Один из показателей оценки вегетативной регуляции, а именно вегетативный показатель ритма,  $ВПР = 1/(Мо \cdot ВР)$  показал статистически значимое повышение в опыте, где проводился сеанс воздействия красным светом (рис. 5). В первой опытной группе, где световое воздействие было ложным, хотя и наблюдается увеличение этого показателя, но оно статистически не значимо. Предположительно, обусловленное светом повышение ВПР объясняется значительным снижением в ходе облучения ВР. Так как ВР стремится сузиться в результате приложения световой энергии, можно говорить о мягком управляющем воздействии красного света на основной водитель ритма (синоатриальный узел). Как известно [19], автоматизм синоатриального узла определяется характером фазы медленной диастолической деполяризации, скорость которой может быть значительно изменена внешними факторами.

В нашем случае в качестве первого внешнего фактора выступает адреналиновая стимуляция симпатического отдела вегетативной нервной системы в первой и второй опытных группах. Активация  $\beta$ -адренорецепторов в пейсмекерных клетках через цАМФ-путь увеличивает входящий не-селективный  $Na^+ - K^+$ -ток, характеризующий фазу медленной диастолической деполяризации ( $I_f$ -ток), а также время открытого состояния  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, что приводит к повышению скорости деполяризации, т. е. к положительному хронотропному эффекту [20, 21]. Через 5 мин после введения адреналина ЧСС значимо

не отличается от нормы, значит можно говорить о нивелировании описанных реакций. Во второй опытной группе через 5 мин после адреналинового фактора воздействия подается второй внешний фактор – красный свет, который, как видно из результатов исследования, никак не влияет на ЧСС, однако значительно ограничивает вариативность сердечного ритма.

Опираясь на описанные в литературе данные о возможности красного света повышать внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$ , логично предположить влияние светового излучения на медленные  $Ca^{2+}$  токи T- и L-типа. Очевидно, что  $I_f$ -токи не чувствительны к фотовоздействию, так как ЧСС не отличается от контрольных значений на фоне «жесткого» ритма, что свидетельствует о том, что фаза медленной диастолической деполяризации, скорость которой определяется этим то-



**Рис. 5.** Изменение ВПР после адреналиновой аритмии; \* – статистически значимые отличия с контролем,  $p < 0.05$ ; \*\*\* – статистически значимые отличия с аритмией,  $p < 0.05$ .

ком, не претерпевает значимых изменений. Вероятнее всего, свет способствует установлению особого устойчивого колебательного режима в системе, известной как «Ca-induced, Ca-release», которая представляет собой взаимодействие мембранного входящего  $\text{Ca}^{2+}$ -тока и  $\text{Ca}^{2+}$ -осциллятора, обеспечивающего пополнение  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикула (SR) ( $\text{Ca}^{2+}$ -clock). Центральным звеном этой системы можно рассматривать крупное депо  $\text{Ca}^{2+}$ -SR. RYR-рецепторы ( $\text{Ca}^{2+}$ -каналы саркоплазматического ретикула) чувствительны к изменениям концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и открываются только при превышении ее порогового значения. Адренергическая и холинергическая стимуляция могут регулировать работу  $\text{Ca}^{2+}$ -clock через цАМФ-пути управления скоростью обратного захвата  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы SR (SERCA) [19]. Логично предположить существование подобного адреналин-холинергическому эффекту регуляции эффекта «мягкого управления»  $\text{Ca}^{2+}$ -осциллятора красным светом. Кроме того, световое воздействие, возможно, активирует  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -насосы, являющиеся системами мембранного тока, повышающего внутриклеточный заряд. Нельзя не учитывать и активность store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на поверхности клеточных мембран. Скорее всего, красный свет, подстраивая «Ca-induced, Ca-release»-систему под регулярный колебательный режим функционирования, способен снижать вариабельность ритма, не изменяя при этом ЧСС.

Таким образом, основные выявленные в исследовании эффекты модуляции электрических характеристик сердца красным светом обусловлены, вероятнее всего, изменением  $\text{Ca}^{2+}$ -динамики кардиомиоцитов.

## ВЫВОДЫ

1. Воздействие красного света после аритмии способно нормализовать продолжительность QT интервала и значение  $M_o$ .
2. Синоатриальный узел, в пейсмекерной активности которого важную роль играют  $\text{Ca}^{2+}$ -токи, предположительно является наиболее чувствительной к красному свету мишенью.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (РК 208.094.01 121130100281-9).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с нормативами, указанными в руководстве «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011); а также с национальным стандартом РФ ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ПИМУ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. Heiskanen, M. Pfiffner, and T. Partonen, *Ageing Res. Rev.* **61**, 101089 (2020).
2. А. П. Баврина, В. А. Монич и С. Л. Малиновская, *Биофизика* **62** (5), 862 (2017).
3. G. M. Dittami, S. M. Rajguru, R. A. Lasher, et al., *J. Physiol.* **589** (6), 1295 (2011).
4. N. Kipshidze, V. Nikolaychik, M. Muckerheidi, et al., *Circulation* **104**, 1850 (2001).
5. J.C. Oishi, T.F. De Moraes, T.C. Buzinari, et al., *Life Sci.* **178**, 56 (2017).
6. S. Wang, L. Wu, Y. Zhai, et al., *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **30**, 1138 (2019).
7. G. Elbaz-Greener, M. Sud, O. Tzuman, et al., *J. Intervent. Cardiol.* **31**, 711 (2018).
8. T. Karu, *Photomedicine and Laser Surgery* **28** (2), 159 (2010).
9. C. Ferraresi, M. R. Hamblin, and N. A. Parizotto, *Photonics Lasers Med.* **1** (4), 267 (2012).
10. В. С. Улащик, *Здравоохранение (Минск)* **6**, 41 (2016).
11. Т. В. Мачнева, Д. М. Протопопов, Ю. А. Владимиров и А. Н. Осипов, *Биофизика* **53** (5), 894 (2008).
12. Т. В. Мачнева, *Источники и мишени свободных радикалов в крови человека* (ООО «МАКС Пресс», М., 2017).
13. Т. Й. Кару, *Успехи соврем. биологии* **121** (1), 110 (2001).
14. I. Golovynska, S. L. Golovynskyi, Y. V. Stepanov, et al., *J. Cell. Physiol.* **234** (9), 15989 (2019).
15. G. V. Kharkwal, S. K. Sharma, Y.-Y. Huang, et al., in *Proc. of SPIE Conf. BiOS, Mechanisms for Low-Light Therapy VI* (2011) 7887.
16. R. B. Oliveira, L. L. Petiz, R. Lim, et al., *J. Neurochem.* **149** (4), 471 (2019).
17. Ю. А. Владимиров, *Соровский образоват. журн.* **12**, 2 (1999).

18. Ю. А. Владимиров, Г. И. Клебанов, Г. Г. Борисенко и А. Н. Осипов, *Биофизика* **49** (2), 339 (2004).
19. A. R. Pérez-Riera, R. Barbosa-Barros, R. Daminello-Raimundo, et al., *J. Electrocardiol.* **57**, 112 (2019).
20. *Фундаментальная и клиническая физиология*, под ред. А. Г. Камкина и А. А. Каменского (Академия, М., 2004).
21. Е. И. Асташкин и М. Г. Глезер, *Кардиоваскулярная терапия и профилактика* **6** (8), 106 (2007).

## Possibilities of Using Low-Intensity Red Light for Modulation of Post-Arrhythmia Processes in the Rat Heart

O.V. Drugova, A.P. Bavrina, N.V. Tiunova, V.V. Borzikov, and S.L. Malinovskaya

*Privolzhsky Research Medical University, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

The study investigated the changes in the electrical characteristics of the rat heart caused by adrenaline-induced arrhythmia and the effects of their modulation by low-intensity red light. Three groups of experimental animals were examined: a control group of animals in which animals were not subjected to any procedure, and two groups of experimental animals in which animals were used as a model of adrenaline-induced arrhythmia. In one group of experimental animals, the electrocardiogram (ECG) recordings were obtained in animals for 10 minutes 5 min after simulation of adrenaline-induced arrhythmia. In the second experimental group, the ECG recordings were obtained in animals the heart projection areas of which were simultaneously exposed to red LED light (650 nm, the intensity of radiation 5 mW/cm<sup>2</sup>). Comparative analysis of heart rhythm variability after adrenaline-induced arrhythmia in two experimental groups revealed normalization of the modes and QT interval by red light against insignificant changes in the heart rate. However, light exposure contributed to a significant decrease in the variation range, thus suggesting the SA node as the most sensitive target for red light.

*Keywords: photobiomodulation, red light, arrhythmia, heart rate*

## ЧАСТОТНО-ВРЕМЕННОЙ АНАЛИЗ КОЛЕБАНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ И СЕРДЕЧНОГО РИТМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

© 2022 г. В.Г. Гришин<sup>\*, #</sup>, О.В. Гришин<sup>\*\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup>, В.С. Никульцев<sup>\*</sup>, В.В. Гулятьева<sup>\*\*\*\*</sup>,  
М.И. Зинченко<sup>\*\*\*\*</sup>, Д.Ю. Урюмцев<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий,  
просп. Академика Лаврентьева, 6, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>#</sup>E-mail: victor.grishin.nsk@gmail.com

<sup>\*\*</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>\*\*\*</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,  
ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630060, Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, ул. Тимакова, 4, Новосибирск, 630117, Россия

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 16.05.2022 г.

Принята к публикации 23.05.2022 г.

Исследованы колебательные процессы в VLF-диапазоне (диапазоне очень низких частот) показателей системы транспорта кислорода у человека в состоянии покоя и при физической нагрузке на велоэргометре. Исследования проведены на девяти здоровых испытуемых (пять мужчин и четыре женщины) в возрасте от 26 до 58 лет. В течение 30 мин регистрировали следующие показатели: концентрацию кислорода в конечной порции выдоха, концентрацию углекислого газа в конечной порции выдоха, частоту дыхания и дыхательный объём методом «breath-by-breath». Одновременно выполняли регистрацию частоты сердечных сокращений с помощью кардиографического комплекса «ПолиСпектр 8». Лёгочный газообмен оценивали по скорости поглощения O<sub>2</sub> из вдыхаемого воздуха. Интенсивность газообмена в легких при нагрузке была в три раза выше, чем в покое. Для анализа квазипериодических колебаний был применен метод частотно-временного распределения. Полученные результаты подтвердили устойчивость феномена периодических колебаний в VLF-диапазоне при физической нагрузке. При этом нагрузка вызывала увеличение значений частотных характеристик по всем показателям системы транспорта кислорода на 28–63%. Вариативность сохранялась в VLF-диапазоне, несмотря на многократное увеличение средних показателей внешнего дыхания и метаболизма и дополнительного влияния циклической нагрузки на велоэргометре. Полученные результаты подтверждают гипотезу, что синхронность медленных колебаний длительности RR-интервала электрокардиограммы, показателей легочной вентиляции и газообмена является закономерным феноменом. Можно предположить, что система дыхания и кровообращения объединены в единый циклический контур авторегуляции (самоорганизации), системообразующей функцией которого является обеспечение метаболизма на уровне клетки или целостного организма человека.

*Ключевые слова:* система транспорта кислорода, вариативность сердечного ритма, вариативность вентиляции, вариативность газообмена, квазипериодические колебания.

DOI: 10.31857/S0006302922040147, EDN: IUKFYZ

Вариативность паттерна спонтанного дыхания является неизбежным следствием сложности системы контроля, поскольку она постоянно взаимодействует с другими системами организма и должна сохранять эффективную регуляцию в ме-

няющихся условиях окружающей среды. Поэтому паттерн дыхания подвержен множеству источников нелинейности, что создает хаотическую динамику, которая может отражаться на всем диапазоне вариативности показателей газообмена, вентиляции и кровообращения. Одним из показателей, который обычно используется для количественной оценки скорости, с которой развивается это расходящееся поведение, является положительный показатель Ляпунова. Ключевой особенностью хаотической системы является то,

*Сокращения:* VLF – диапазон очень низких частот (0.003–0.04 Гц), СТК – система транспорта кислорода,  $f_{\max}$  – частота основной гармоники спектра,  $f_{\text{med}}$  – медианная частота спектра,  $f_{\text{цикл}}$  – счетчик оборотов (turns counts) или цикличность временного ряда, ПКВ – парный критерий Вилкоксона.

что при заданных начальных условиях, которые очень похожи, динамическое поведение, демонстрируемое этой системой, может очень сильно измениться через некоторое время [1].

Автор работы [2] Г. Дональдсон, учитывая взаимосвязь дыхательного и сердечного ритма, а также дополнительный многофакторный контроль частоты сердечных сокращений и определив показатель Ляпунова, предположил, что динамика дыхания здоровых людей носит хаотический характер. Однако впоследствии в работе [3] при использовании метода нелинейного прогнозирования (алгоритм Sugihara и May) эти результаты не подтвердились. Автор работы [4] Э. Брюс, не исключая наличие нестохастических механизмов, при объяснении низкочастотной вариабельности показателей дыхания тоже склонялся к действию хаотических факторов на том основании, что вариабельность дыхания может быть обусловлена влиянием случайных факторов на динамическое поведение контуров обратной связи по углекислому газу и механорефлексу.

За прошедшие 25 лет с момента публикации этих работ до сих пор остается открытым вопрос о том, к какой категории следует относить вариабельность сердечного ритма и паттерна дыхания в диапазоне очень низких частот (VLF-диапазоне, 0.003–0.04 Гц) – к нелинейной детерминированной изменчивости или к стохастической изменчивости. Очевидно, что определенная степень случайного шума всегда будет присутствовать в любых сложных физиологических системах. Вместе с этим наличие детерминированной изменчивости ставит вопрос о ее функциональном значении или, точнее, о том, какой процесс или тип «авторегуляции» лежит в ее основе. Исследования в этой области позволят установить механизмы обеспечения гомеостаза внутренней среды организма, являющейся, по сути, полуоткрытой системой в среде с вектором нарастающей энтропии.

В нашей предыдущей работе [5], посвященной исследованию колебательных процессов в VLF-диапазоне, было экспериментально показано, как метод измерения, создающий дополнительное сопротивление дыханию (респираторная маска), может увеличивать стохастическую составляющую. Было также показано, что независимо от метода измерения наблюдается совпадение частотных характеристик вариабельности показателей легочной вентиляции, газообмена и сердечного ритма. Совпадение частотных характеристик не зависело от методов регистрации, не зависело и от способа анализа данных. Таким образом, от способа регистрации зависела только выраженность «шумовой» составляющей вариабельности, которая, однако, не могла «поглотить» устойчивый характер вариабельности ключевых показателей системы транспорта кислорода в VLF-диапазоне. В той же работе методом дина-

мической визуализации впервые был установлен факт синхронного изменения спектров параметров дыхания и кровообращения, а методом кросс-корреляционного анализа была определена абсолютная величина фазового сдвига колебаний между ключевыми параметрами дыхания и сердечного ритма, равного в среднем 52 с.

Полученные результаты вполне согласовывались с литературными данными [6, 7] и позволили заключить, что характер синхронности медленных колебаний длительности RR-интервала электрокардиографии (F), показателей легочной вентиляции и газообмена является закономерным феноменом, а значит, может отражать функциональное состояние кардиореспираторной системы в целом. Проверить данное предположение, а также определить «устойчивость» данного феномена можно путем изучения вариабельности при изменении условий функционирования, например, при физической циклической нагрузке. Такие условия характеризуются тем, что на фоне кратного увеличения интенсивности функции имеет место воздействие дополнительного источника циклического влияния, например, вращение педалей на велоэргометре.

Таким образом, целью настоящей работы было исследование колебательных процессов в VLF-диапазоне показателей системы транспорта кислорода (СТК) у человека в состоянии покоя и при циклической физической нагрузке. При этом в качестве метода анализа квазипериодических колебаний был применен метод частотно-временного распределения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Контингент.** Исследования были проведены на девяти здоровых испытуемых (пятеро мужчин и четыре женщины) в возрасте от 26 до 58 лет. Все добровольцы перед исследованием были проконсультированы у терапевта. Условно здоровыми считали лиц, не имевших в день обследования жалоб, патологических симптомов и обострения хронических заболеваний.

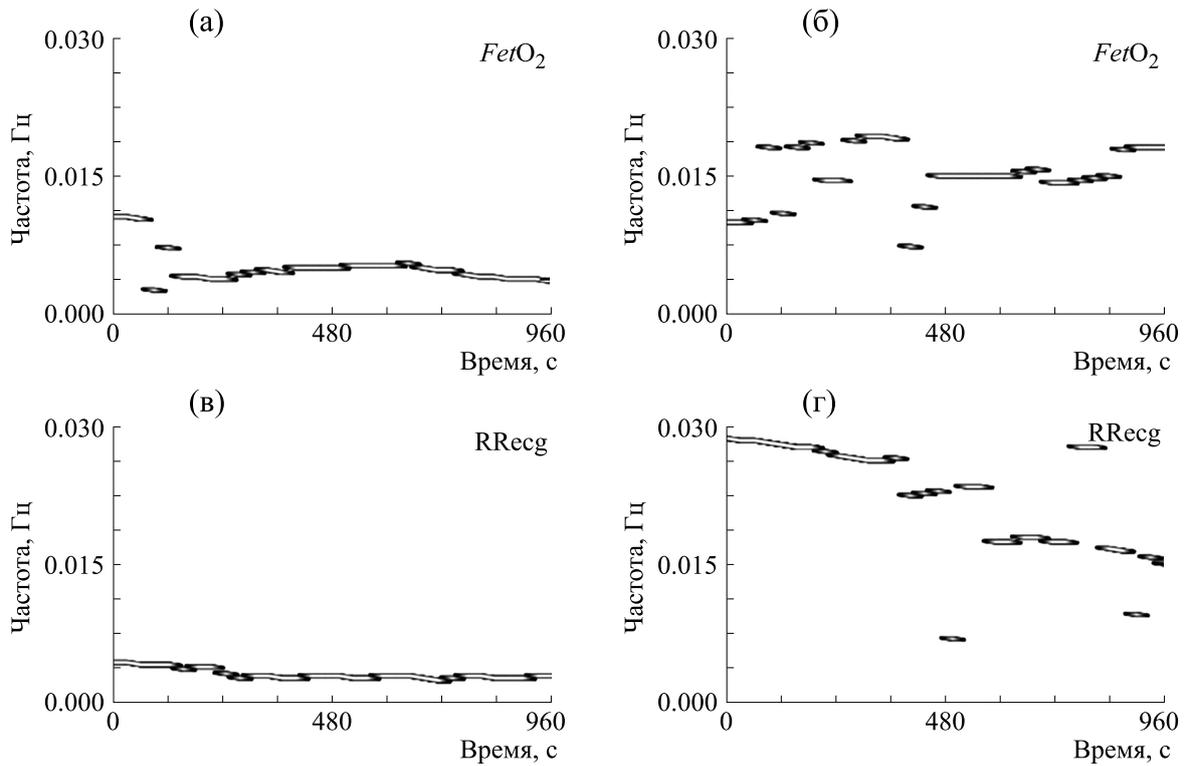
Нагрузка выполнялась на велоэргометре в положении сидя при вращении педалей со скоростью 60 об/мин. Нагрузку для каждого исследуемого рассчитывали индивидуально по формуле:

$$P = 0.6 \cdot TMT, \quad (1)$$

где  $P$  – мощность нагрузки в Вт,  $TMT$  – тощая масса тела, выраженная в кг.

**Дизайн исследования.** Первую часть исследования проводили в состоянии относительного покоя в положении сидя. Регистрацию показателей начинали через 5–10 мин после начала мониторинга. Длительность регистрации для последующего анализа вариабельности составляла 30 мин.

В тот же день проводили вторую часть исследования при легкой постоянной физической на-



**Рис. 1.** Фрагмент (960 с) распределений во времени частоты основной гармоники спектра ( $f_{\max}$ ) показателей  $FetO_2$  (а, б) и  $RRecg$  (в, г) для одного испытуемого в состоянии покоя (а, в) и при физической нагрузке (б, г). По оси абсцисс – время, с; по оси ординат – значения частоты, Гц.

грузке на велоэргометре. Регистрацию показателей для анализа variability в течение 30 мин начинали после выхода в режим «Steady state», который характеризовался постоянным потреблением кислорода.

**Методы исследования.** Для анализа variability показателей дыхания в VLF-диапазоне регистрировали показатели легочного газообмена и вентиляции легких методом «breath-by-breath». Регистрацию параметров за каждый дыхательный цикл проводили на метабологе Ultima PFX (США). Дыхание осуществлялось через лицевую маску. Анализ был проведен по следующим показателям:  $FetCO_2$  – концентрация углекислого газа в конечной порции выдоха, %;  $FetO_2$  – концентрация кислорода в конечной порции выдоха, %;  $Vt$  – дыхательный объем, мл;  $f$  – частота дыхания в мин;  $VO_2$  – потребление кислорода, мл/мин;  $VCO_2$  – выделение углекислого газа, мл/мин. Дыхательный коэффициент  $RQ$  рассчитывали по формуле  $RQ = VCO_2/VO_2$ . Одновременно с регистрацией показателей дыхания выполняли регистрацию частоты сердечных сокращений методом электрокардиографии в трех отведениях по НЭБУ с помощью кардиографического комплекса ПолиСпектр 8 (ООО «Нейрософт», Россия) с определением показателя  $RRecg$  – длительности

R-R-интервалов и собственно частоты сердечных сокращений в минуту.

**Анализ variability в VLF-диапазоне.** Для анализа variability применяли частотно-временной анализ временных рядов показателей системы транспорта кислорода – методом распределения частоты основной гармоники ( $f_{\max}$ ) спектра сигнала во времени [8]. Временное распределение было получено методом оконного преобразования Фурье с разрешением по частоте 1/512 Гц (окно в 512 отсчетов) и циклическим сдвигом окна по времени 10 с (частотно-временной анализ). Для графического представления распределения  $f_{\max}$  во времени использовали данные, находящиеся в диапазоне, превышающем 0.9 максимального значения основной гармоники с отображением на плоскость. На рис. 1 приведен пример распределения частоты основной гармоники во времени показателей  $FetO_2$  и  $RRecg$  для одного испытуемого в состоянии покоя и при физической нагрузке.

Наряду с частотой основной гармоники в спектральной характеристике исследуемых явлений мы использовали характеристику медианной частоты ( $f_{\text{med}}$ ), соответствующий медиане в исследуемом спектре. Медианная частота  $f_{\text{med}}$ , оцениваемая по формуле

**Таблица 1.** Средние значения показателей внешнего дыхания и метаболизма в состоянии покоя и при постоянной физической нагрузке в условиях «steady state»

Показатель	В покое ( $n = 9$ )	При нагрузке ( $n = 9$ )	ПКВ, $p$
$FetO_2$ , %	$14.4 \pm 0.5$	$14.6 \pm 0.5$	НЗ
$FetCO_2$ , %	$5.3 \pm 0.4$	$5.4 \pm 0.4$	НЗ
$V_t$ , мл	$536 \pm 129$	$1083 \pm 288$	$< 0.01$
$f$ , дыханий в мин.	$13.8 \pm 1.2$	$18.9 \pm 3.1$	$< 0.05$
$\dot{V}O_2$ , мл/мин	$231 \pm 54$	$709 \pm 156$	$< 0.01$
$\dot{V}CO_2$ , мл/мин	$200 \pm 46$	$648 \pm 136$	$< 0.01$
$RQ$	$0.86 \pm 0.5$	$0.91 \pm 1.30$	НЗ
Частота сердечных сокращений в мин	$67.8 \pm 8.1$	$97.2 \pm 12.6$	$< 0.01$

Примечание. Данные приведены в виде  $M \pm SD$ ; НЗ – незначимо,  $p > 0.05$ .

$$\int_{f_{\min}}^{f_{\text{med}}} S(f) df = \int_{f_{\text{med}}}^{f_{\max}} S(f) df,$$

где  $f_{\max}$  и  $f_{\min}$  – максимальные и минимальные частоты спектра, отражает перераспределение дисперсии сигнала по частотам.

В зависимости от формы спектрального распределения, значения  $f_{\max}$  и  $f_{\text{med}}$  по-разному отражают распределение энергетических свойств для спектральных характеристик, что полнее характеризует колебательные процессы. В нашем случае для показателей газообмена и внешнего дыхания распределение во времени  $f_{\text{med}}$  дает более стабильную картину поведения респираторной системы.

С целью дополнительной проверки результатов использовали частотную характеристику вариативности – счетчик оборотов (turns counts) или цикличность –  $f_{\text{цикл}}$ , первоначально предложенный в работе [9] для анализа электромиографических сигналов. Процедура включает подсчет количества колебаний (циклов) за все время исследования [10]. Таким образом, для сравнительного частотного анализа показателей системы транспорта кислорода в покое и при физической нагрузке было использовано три характеристики – частота основной гармоники спектра  $f_{\max}$ , медианная частота спектра  $f_{\text{med}}$  и показатель цикличности  $f_{\text{цикл}}$ .

Для каждого из девяти испытуемых было построено временное распределение частот  $f_{\max}$  и  $f_{\text{med}}$ . Затем были рассчитаны усредненные значения  $f_{\max}$  и  $f_{\text{med}}$  для каждого испытуемого в состоянии покоя и при физической нагрузке. Отдельно был выполнен расчет показателя цикличности  $f_{\text{цикл}}$  для каждого испытуемого в состоянии покоя и при физической нагрузке. Оценка статистической значимости различий показателей в состоянии покоя и при физической нагрузке была выполнена с применением парного критерия Вил-

коксона (ПКВ) [11]. Изменения или различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение показателей системы транспорта кислорода в покое и при физической нагрузке (табл. 1) показало ожидаемую стабильность содержания кислорода и углекислого газа в альвеолярном воздухе – динамика  $FetO_2$  и  $FetCO_2$  была не значима ( $p > 0.05$ ). При этом показатели паттерна дыхания ( $\dot{V}$ ,  $f_{br}$ ), скорости газообмена ( $\dot{V}O_2$ ,  $\dot{V}CO_2$ ) и частоты сердечных сокращений закономерно и достоверно увеличились при нагрузке. Интенсивность транспорта кислорода увеличилась в три раза, а частота сердечных сокращений – в полтора раза, что соответствует легкой физической нагрузке у здоровых людей [12]. Последнее подтверждается отсутствием достоверной динамики дыхательного коэффициента, который при нагрузке остается существенно меньше единицы, величины, соответствующей аэробному порогу.

При нагрузке имело место дополнительное циклическое «воздействие» на систему внешнего дыхания – вращение педалей со скоростью 60 об/мин. Это усиливало стохастическое влияние, и дополнительно «навязывался» иной (высокочастотный) дыхательный ритм, согласующийся с ритмичным движением ног [13].

В табл. 2–4 представлены средние значения частот  $f_{\max}$  и  $f_{\text{med}}$ , а также показателя  $f_{\text{цикл}}$ . Частотные характеристики колебаний достоверно различаются в состоянии покоя и при нагрузке. Обращает внимание, что при нагрузке наблюдается однонаправленное достоверное увеличение значений частотных характеристик по всем показателям на 28–63%. Недостоверной была только динамика  $f_{\max}$  сердечного ритма (RRecg).

На рис. 2 в графическом виде представлена динамика средних значений  $f_{\text{med}}$  показателей в VLF-диапазоне.

**Таблица 2.** Средние значения  $f_{\max}$  для показателей СТК в покое и при физической нагрузке

Показатели СТК	$f_{\max}$ (покой)	$f_{\max}$ (нагрузка)	ПКВ ( $p < 0.05$ )
$FetO_2$	66 ± 18	92 ± 17	★
$FetCO_2$	62 ± 16	95 ± 27	★
$V_t$	68 ± 13	111 ± 28	★
fbr	73 ± 15	92 ± 26	★
RRecg	74 ± 36	117 ± 50	–

Примечание. Данные приведены в виде  $M \pm SD$ ;  $n = 9$ .

**Таблица 3.** Средние значения  $f_{\text{med}}$  для показателей СТК в покое и при физической нагрузке

Показатели СТК	$f_{\text{med}}$ (покой)	$f_{\text{med}}$ (нагрузка)	ПКВ ( $p < 0.05$ )
$FetO_2$	93 ± 18	123 ± 20	★
$FetCO_2$	99 ± 18	127 ± 18	★
$V_t$	100 ± 18	142 ± 19	★
fbr	101 ± 13	126 ± 20	★
RRecg	108 ± 13	149 ± 37	★

Примечание. Данные приведены в виде  $M \pm SD$ ;  $n = 9$ .

**Таблица 4.** Средние значения  $f_{\text{цикл}}$  для показателей СТК в покое и при физической нагрузке

Показатели СТК	$f_{\text{цикл}}$ (покой)	$f_{\text{цикл}}$ (нагрузка)	ПКВ ( $p < 0.05$ )
$FetO_2$	86 ± 20	122 ± 29	★
$FetCO_2$	92 ± 16	130 ± 18	★
$V_t$	95 ± 18	136 ± 17	★
fbr	93 ± 12	122 ± 17	★
RRecg	116 ± 28	154 ± 25	★

Примечание. Данные приведены в виде  $M \pm SD$ ;  $n = 9$ .

Таким образом, в условиях нового функционального состояния, когда интенсивность обмена увеличилась в три раза, вариабельность всех показателей оставалась в том же диапазоне, что было в покое. Это позволяет сделать вывод, что установленный феномен низкочастотной вариабельности параметров системы транспорта кислорода наблюдается как в покое, так и при нагрузке.

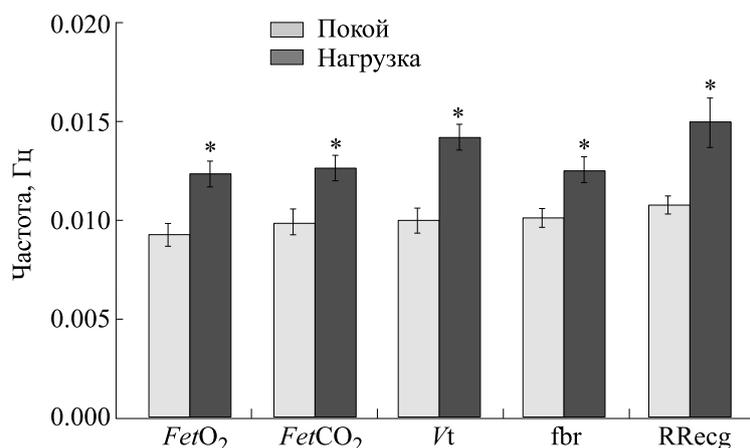
### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании установлено, что физическая нагрузка приводит к однонаправленному смещению частотных характеристик показателей системы транспорта кислорода в область с более высокой частотой, оставаясь при этом в пределах границ VLF-диапазона (0.04 Гц). Направленность смещения вполне согласуется с увеличением частоты циклических процессов задействованных систем – увеличение при нагрузке частоты дыхания и сердечных сокращений. Очевидно, что регуляция системы транспорта кислорода у здоровых людей при легкой физиче-

ской нагрузке демонстрирует закономерное и ожидаемое ускорение переноса кислорода из атмосферы к тканям. Это должно быть обеспечено согласованным усилением функций сопряженных звеньев, в частности, дыхания и кровообращения. В таком случае сохранение низкочастотной вариабельности при нагрузке указывает на детерминированный характер этого явления, которое проявляется при сложных взаимосвязанных циклических процессах.

Выявленный нами устойчивый феномен низкочастотной вариабельности показателей системы транспорта кислорода совпадает с результатами работы [14], в которой были изучены колебания индекса тканевого кислорода (tissue oxygen index – TOI) при физических нагрузках низкой и высокой интенсивности. В работе было показано, что частота основной гармоники спектра колебаний индекса тканевого кислорода смещается в сторону высокочастотной области при увеличении физической нагрузки.

В настоящее время закономерность медленных колебаний физиологических показателей



**Рис. 2.** Средние значения  $f_{med}$  показателей системы транспорта кислорода ( $n = 9$ ) в состоянии покоя (светлые столбики) и при физической нагрузке (темные столбики); \* – различия значимы,  $p < 0.05$ .

признаны большинством исследователей. Наметилось общее представление о наличии у большинства живых организмов явления медленных колебаний с периодами от одной до нескольких минут. Такие колебания обнаружены в системе дыхания и кровообращения [15, 16], системе терморегуляции [17] и даже на клеточном уровне – в митохондриях [18]. Сформировалось мнение о едином механизме синхронизации, при этом исследователи расходятся в том, где этот механизм реализован. Например, исследователи из Charitable Medical Healthcare Foundation предполагают, что во время вдоха происходит немедленное высвобождение электронов посредством окислительно-восстановительных реакций вместе с гиперполяризацией клеток по всему телу и в мозгу с последующей деполяризацией во время выдоха. Таким образом, полагают авторы, дыхание может действовать как глобальный организатор (управляющий параметр) нейронных колебаний во всем мозге человека.

Исследователь из Колумбийского университета А. Хэнсон в своей статье [20] развил теорию о всеобщем источнике низкочастотных колебаний, предложенную в работе [19]. Он утверждает, что такие спонтанные электрические низкочастотные колебания встречаются у самых разных форм жизни на Земле, от бактерий до людей. Автором рассмотрены доказательства существования спонтанных электрических низкочастотных колебаний в различных типах, начиная с гидры, и выдвинута гипотеза о потенциальной роли электрических «синхронизаторов» организма, что согласуется с представлениями о роли биоэлектричества как «шаблона» памяти развития в регенерации организма.

Центральное происхождение низкочастотных колебаний было поддержано авторами работы [21] на том основании, что вариабельность тканевого кислородного индекса совпадает с вари-

абельностью сердечного ритма. Это мнение согласуется с результатами нескольких независимых исследований. Так, в работе [22] была обнаружена тесная связь между низкочастотными колебаниями (0.008–0.03 Гц) показателей газов крови и показателями церебральной гемодинамики (изменение скорости церебрального кровотока). В работе [23] было показано, что когерентность колебаний скорости потребления кислорода, с одной стороны, и колебаний скорости центрального кровообращения, мозгового кровообращения и кислородной сатурации крови, с другой стороны, сильнее всего выражена в диапазоне VLF. Все это указывает на высокую вероятность того, что низкочастотная вариабельность связана с механизмами регуляции кровотока в головном мозге. С этим предположением согласуются также результаты исследований, показавших, что изменение кардиореспираторной когерентности в низкочастотном диапазоне (LF-диапазон) в ответ на гипоксическое [24] и гиперкапническое [25] воздействие зависит от уровня спортивной квалификации и тренированности спортсменов.

Однако унитарный тип формирования подобных колебаний, «исходящий» только из ЦНС или любого другого, но непременно «единственного» центра, не вполне согласуется с результатами работы [26], авторы которой показали, что низкочастотный характер вариабельности колебаний дезоксигенации, наблюдаемый в мышечной ткани во время тренировки, связан с эндотелий-зависимой вазодилатацией. В работе [27] были обнаружены колебания  $[Ca^{2+}]_i$  в эндотелиоцитах в интервале 0.005–0.018 Гц, совпадающие с эндотелиальным ритмом на целом животном. Авторы работы [27] выдвинули предположение, что синхронизованные низкочастотные колебания  $[Ca^{2+}]_i$  в эндотелиоцитах можно рассматривать

как модулятор низкочастотных колебаний кожной микрогемодинамики в эндотелиальном ритме *in vivo*. Значение «периферического типа» низкочастотной вариабельности было продемонстрировано в работах [28, 29] на математической модели организации митохондриального метаболизма, показавшей, что динамическое «управление» может проявляться в виде колебаний энергетического обмена на очень низких частотах.

В настоящее время основной теоретической концепцией физиологии и медицины является рефлекторная теория, которая объясняет авторегуляцию и функциональное единство отдельных систем организма и их взаимодействие, например, рефлекс Геринга–Брейера. Поддерживание напряжения кислорода в артериальной крови обеспечивается работой аортальных и каротидных хеморецепторов, реагирующих на изменение газового состава крови. Общая рефлекторная теория регуляции дыхания, основанная на рефлексах и некоторых граничных значениях («точка уставки»), значимых для «запуска» рефлекторной реакции, ни в коей мере не отрицаются в данной статье. Мы полагаем, что полученные данные позволяют предположить более тонкий механизм регуляции, точнее «автоматической подстройки» нескольких (двух и более) процессов для обеспечения некоторой единой, жизненно важной функции или сложного процесса. В нашем случае — это процесс транспорта кислорода. Гипотетические, предполагаемые нами механизмы саморегуляции (автоподстройки) реализуются в границах критических значений, за пределами которых включаются более «жесткие» рефлекторные механизмы (Геринга–Брейера, хеморефлексов и др).

Представленные литературные данные и собственные результаты позволяют выдвинуть гипотезу о том, что системы дыхания и кровообращения объединены в единый циклический контур авторегуляции (самоорганизации), системообразующей функцией которого является обеспечение метаболизма на уровне клетки, или органов или целостного организма человека. Такая «самоорганизация» функционально взаимосвязанных параметров метаболизма предполагает существование некоторого детерминированного источника низкочастотной вариабельности. Это может быть результатом взаимодействия нескольких сложных систем управления, одна из которых обеспечивает поддержание напряжения кислорода в оттекающей из легких артериальной крови, другая — гемодинамику, точнее скорость потока артериальной крови и прежде всего в головном мозге. Основой для выше указанной «самоорганизации» служит согласованный циклический характер функционирования дыхания и кровообращения. В какой из этих систем находится управляющий параметр низко-

частотной вариабельности, не имеет значения, так как, скорее всего, он «не закреплен» в каком-то определенном регуляторном звене, а блуждает в зависимости от функционального состояния системы транспорта кислорода или уровня авторегуляции — клетка, орган, организм. Более того, ряд литературных данных позволяет предположить, что управляющий параметр самоорганизации системы транспорта кислорода может «выходить» за пределы этой системы.

Таким образом, не оставляет сомнений существование феномена низкочастотной вариабельности показателей, характеризующих транспорт кислорода, а значит, и энергетического обмена в организме. Это ставит ряд новых вопросов, в частности, где находится «источник» (управляющий параметр) этой вариабельности, является ли он постоянным или может менять свою локализацию в зависимости от функционального состояния, как он проявляет себя в условиях патологии и, наконец, возможна ли внешняя «перенастройка» низкочастотной вариабельности.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке базового проекта фундаментальных исследований РАН: 122010800028-4 (ЕГИСУ), АААА-А21-121011990040-8.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.). От всех участников экспериментов было получено информированное согласие.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. C. Khoo, *Respir. Physiol.*, **122** (2–3), 167 (2000). DOI: 10.1016/S0034-5687(00)00157-2
2. G. C. Donaldson, *Respir. Physiol.*, **88**, 313 (1992). DOI: 10.1016/0034-5687(92)90005-H
3. J. O. Fortrat, Y. Yamamoto, and R. L. Hughson, *Biol. Cybern.*, **77**, 1 (1997). DOI: 10.1007/s004220050361
4. E. Bruce, in *Bioengineering Approaches to Pulmonary Physiology and Medicine*, Ed. by Khoo (Plenum Press, New York, 1996), pp. 149–159.
5. В. Г. Гришин, О. В. Гришин, В. С. Никульцев и др., *Биофизика*, **67** (1), 140 (2022). DOI: 10.31857/S000630292106015X
6. P. Hlastala, B. Wranne, and C. Lenfant, *J. Appl. Physiol.*, **34** (5), 670 (1973). DOI: 10.1152/jappl.1973.34.5.670

7. T. Yano, C.-S. Lian, T. Arimitsu, et al., *Acta Physiol. Hung.*, **100** (3), 312 (2013). DOI: 10.1556/APhysiol.100.2013.007
8. L. Cohen, *Proc. IEEE*, **77** (7), 941 (1989). DOI: 10.1109/5.30749
9. R. G. Willison. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **27** (5), 386 (1964). DOI: 10.1136/jnnp.27.5.386
10. R. M. Rangayyan, *Biomedical Signal Analysis – A Case-Study Approach* (IEEE and Wiley, New York, 2002).
11. Е. В. Гублер и А. А. Генкин. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях («Медицина», Л., 1973).
12. M. Guazzi, F. Bandera, C. Ozemek, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **70** (13), 1618 (2017). DOI: 10.1016/j.jacc.2017.08.012
13. D. J. Paterson, G. A. Wood, A. R. Morton, and J. D. Henstridge, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, **55** (5), 530 (1986). DOI: 10.1007/BF00421649
14. T. Yano, R. Afroundeh, T. Arimitsu, and T. Yunoki, *Bull. of Faculty of Education, Hokkaido University*, **135**, 43 (2019). DOI: 10.14943/b.edu.135.43
15. Р. М. Баевский, Прогнозирование состояний на грани нормы и патологии («Медицина», М., 1979).
16. L. Goodman, *IEEE Trans. Biomed. Engineer.*, **11** (3), 1 (1964).
17. A. Iberall. *J. Basic Eng.*, **82** (1), 96 (1960). DOI: 10.1115/1.3662562
18. S. Iotti, M. Borsari, and D. Bendahan, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1353 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.019
19. R. Jerath and C. Beveridge, *World J. Neurosci.*, **8** (4), 480 (2018). DOI: 10.4236/wjns.2018.84038
20. A. Hanson, *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **376** (1820), 20190763 (2021). DOI: 10.1098/rstb.2019.0763
21. N. Usuda, K. Shirakawa, K. Hatano, et al., *Physiol. Int.*, **106** (3), 261 (2019). DOI: 10.1556/2060.106.2019.25
22. S.-T. Chan, K. C. Evans, T.-Y. Song, et al., *PLoS One*, **15** (9), e0238946 (2020). DOI: 10.1371/journal.pone.0238946
23. Э. А. Бурых, *Вестн. образования и развития науки РАЕН*, № 1, 70 2016.
24. D. Y. Uryumtsev, V. V. Gulyaeva, M. I. Zinchenko, et al., *Front. Physiol.*, **11**, 630 (2020). DOI: 10.3389/fphys.2020.00630
25. V. V. Gulyaeva, D. Y. Uryumtsev, M. I. Zinchenko, et al., *Front Physiol.*, **12**, 673570 (2021). DOI: 10.3389/fphys.2021.673570
26. T. Yano, C.-S. Lian, R. Afroundeh, et al., *Biol. Sport*, **31**, 15 (2014). DOI: 10.5604/20831862.1083274
27. Д. А. Серов, А. В. Танканаг и М. Е. Асташев, в *Сб. статей междунар. конф. «Рецепторы и внутриклеточная синхронизация»* (Пушино, 2021), т. 1, сс. 250–258.
28. S. Lotti, G. Gottardi, V. Clementi, and B. Barbiroli, *Biochim. Biophys. Acta*, **1608**, 131 (2004). DOI: 10.1016/j.bbabi.2003.11.003
29. S. Lotti, M. Borsari, and D. Bendahan, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1353 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.019

## Time Frequency Analysis of Variability in External Respiration and Heart Rate in Humans during Exercise

**V.G. Grishin\***, **O.V. Grishin\*\***, **\*\*\***, **V.S. Nikultsev\***, **V.V. Gulyaeva\*\*\*\***,  
**M.I. Zinchenko\*\*\*\***, and **D.Yu. Uryumtsev\*\*\*\***

*\*Federal Research Center for Information and Computational Technologies,  
prosp. Akademika Lavrentieva 6, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*\*Novosibirsk National Research State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*\*\*Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630060 Russia*

*\*\*\*\*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, ul. Timakova 4, Novosibirsk, 630117 Russia*

The aim of this study was to investigate how the parameters of human oxygen transport system at rest and during the light physical exercise on the bicycle ergometer affect the oscillatory processes in the ultralow frequency oscillation (ULFO) band. Nine healthy subjects (5 male, 4 female) aged 26–58 years participated in this study. Within 30 minutes, the following indicators were recorded: oxygen concentration in the final portion of exhalation, concentration of carbon dioxide in the final portion of exhalation, respiratory rate and tidal volume using the “breath-by-breath” method. Heart rate was simultaneously recorded using the PolySpectrum 8 ECG system. Pulmonary gas exchange was assessed by the rate of absorption of O<sub>2</sub> from the inhaled air. A model for the distribution of signals in time and frequency was applied for analyzing quasi-periodic oscillations. The results obtained confirmed the stability of the phenomenon of periodic oscillations in the ULFO band during physical activity. Herewith, physical exercise caused an increase of 28–63% in the values of the frequency characteristics for all oxygen transport system parameters. The variability persisted in the ULFO band despite the multiple increase in the pulmonary gas exchange rate and the additional effect of cyclic exercise on the bicycle ergometer. The results obtained confirm the hypothesis that synchronization of slow oscillations in the RR-intervals in ECG signal with pulmonary ventilation and gas exchange signals is expected. It can be assumed that the respiratory and circulatory system represents one cyclic circuit of auto-regulation (self-organization), the system-forming function of which is to supply oxygen through metabolic pathways needed to cells or human body as a whole.

*Keywords: oxygen transport system, heart rate variability, ventilation variability, gas exchange variability, quasi-periodic oscillations*

## ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАБОТЫ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА В СИСТЕМЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ: ЭФФЕКТЫ ИЗМЕНЕНИЯ ЧАСТОТЫ СОКРАЩЕНИЙ И АПИКАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

© 2022 г. Ф.А. Сёмин\*,#, А.Р. Хабибуллина\*, А.К. Цатурян\*

\*Научно-исследовательский институт механики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Мичуринский просп., 1, Москва, 119192, Россия

#E-mail: f.syomin@imec.msu.ru

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 25.04.2022 г.

Представлена многомасштабная математическая модель работы левого желудочка сердца в системе кровообращения. Для описания свойств миокарда левого желудочка использована новая электромеханическая модель, объединяющая модели генерации и распространения потенциалов действия, электромеханического сопряжения и механики. При этом были учтены пассивные и активные механические напряжения и конечность деформаций. Сам желудочек аппроксимирован толстостенным телом вращения с реалистичным распределением направления мышечных волокон в его стенке. Остальные камеры сердца и элементы сосудистого русла представлены моделью с сосредоточенными параметрами. Проведено численное моделирование влияния частоты сердечных сокращений, частичной блокады проведения возбуждения от предсердий к желудочкам и апикального инфаркта на гемодинамику и геометрию левого желудочка в сердечном цикле. Расчеты показали, что модель описывает наблюдаемые реакции насосных характеристик сердца на эти воздействия. Результаты работы позволяют понять, как особенности электромеханического сопряжения в миокарде, реализуемые на клеточном уровне, помогают поддерживать макроскопическую насосную функцию сердца при патологиях и подстраивать ее к возрастающим потребностям при физической нагрузке.

*Ключевые слова:* миокард, электромеханика сердца, левый желудочек сердца, сердечно-сосудистая система, математическое моделирование, моделирование сердца, сердечный ритм, инфаркт миокарда, атриовентрикулярная блокада.

DOI: 10.31857/S0006302922040159, EDN: IULMNY

Несмотря на значительный прогресс в развитии методов диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, достигнутый в последние десятилетия, именно эти заболевания по-прежнему являются наиболее частой причиной смерти в развитых и развивающихся странах. Трудность понимания природы заболеваний сердца и оценки эффективности различных подходов к их лечению в значительной степени связана с тем, что в основе работы сердца лежит сложная цепочка процессов, происходящих на молекулярном, клеточном, тканевом и, наконец, органном уровне. Эти процессы включают в себя ионные токи через мембраны клеток сердечной мышцы, кардиомиоцитов, приводящие к электрической активации, т.е. генерации потенциала

действия (ПД), распространяющегося по сердечной мышце — миокарду. Процесс электромеханического сопряжения обеспечивает потенциал-зависимое изменение концентрации различных веществ, в первую очередь, ионов  $Ca^{2+}$  в кардиомиоцитах, обратимое связывание  $Ca^{2+}$  с регуляторными белками, управляющее взаимодействием сократительных белков актина и миозина, и, наконец, развитие активных механических напряжений и деформаций в стенках камер сердца. Активные напряжения, возникающие в результате актин-миозинового взаимодействия, вызывают сокращение стенок камер сердца и выброс крови в артерии малого и большого круга кровообращения. В силу сложности и взаимозависимости этих процессов одним из полезных инструментов изучения работы сердца на разных масштабных уровнях в норме и при патологиях оказывается математическое моделирование [1–3]. Наиболее развитым направлением математи-

*Сокращения:* ПД — потенциал действия, ЛЖ — левый желудочек, ОДУ — обыкновенные дифференциальные уравнения.

ческого моделирования, отчасти уже нашедшим применение в клинической практике, является моделирование электрофизиологических процессов [4]. Моделирование механических процессов, происходящих на уровне отдельных кардиомиоцитов, миокардиальной ткани и сердца как органа, развито гораздо меньше. Наконец, набор процессов и экспериментально наблюдаемых явлений, описываемых существующими электромеханическими моделями миокарда, а, тем более, многомасштабными моделями насосной функции сердца, как правило, весьма ограничен.

Нашей группой недавно была предложена электромеханическая модель сердечной мышцы [5], которая объединяет модифицированные версии феноменологической модели электрофизиологии миокарда [6], модели электромеханического сопряжения [7] и модели механики миокарда [8]. Эта новая модель описывает широкий круг экспериментально наблюдаемых явлений: зависимость длительности ПД и амплитуды сокращений от длительности интервалов между стимулами и частоты стимуляции, быстрые и медленные ответы активного механического напряжения на изменение длины мышцы, связь сила-скорость и жесткость-скорость в активно сокращающейся сердечной мышце, грузозависимое расслабление и др. Вопрос о том, насколько такая модель способна описать изменения работы сердца, в первую очередь, его наиболее мощного отдела, левого желудочка (ЛЖ), при физической нагрузке, которая сопровождается увеличением частоты сокращений и снижением периферического сопротивления, остается открытым. Также неизвестно, способна ли такая модель описать нарушения насосной функции левого желудочка сердца в системе кровообращения, наблюдаемые при различных заболеваниях, например, при остром апикальном инфаркте ЛЖ или при частичной блокаде проведения ПД от предсердий к желудочкам.

Ранее мы построили многомасштабную осесимметричную модель работы ЛЖ в системе кровообращения, которая исходно включала только большой круг кровообращения [9], а затем была расширена за счет добавления описания сокращений правого желудочка и предсердий, а также малого круга кровообращения [10]. Модель применили для исследования работы сердечно-сосуди-

стой системы в норме и при некоторых патологиях, включая нарушения проведения волны возбуждения от предсердий к ЛЖ, стеноза или недостаточности аортального и митрального клапанов и при нарушениях связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с регуляторными белками в кардиомиоцитах, характерных для некоторых врожденных кардиомиопатий. В этих работах была использована модель механики сердечной мышцы [8], в которой концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоцитах полагали заданной функцией времени. Процессы генерации и распространения ПД по миокарду ЛЖ при этом не учитывали, как и процесс электромеханического сопряжения. В данной работе насосную функцию ЛЖ сердца моделировали с помощью полной электромеханической модели [5] и исследовали влияние изменения частоты сердечных сокращений и нарушения проведения и возбуждения при апикальном инфаркте миокарда на системную и легочную гемодинамику и геометрию ЛЖ в цикле сокращения–расслабления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использовали модели, ранее разработанные нашей группой и другими авторами. Модели осесимметричной аппроксимации левого желудочка сердца и сердечно-сосудистой системы подробно описаны в работах [9, 10]. Для описания электромеханики миокарда в стенке ЛЖ использовали недавно разработанную нами модель [5].

**Модель электромеханики миокарда.** Для описания распространения волны электрической активации по стенке ЛЖ, его механического сокращения и электромеханического сопряжения использовали модель [5]. Эта модель объединяет в себе несколько блоков. Блок модели, описывающий электрофизиологию кардиомиоцита, представляет собой феноменологическую модель Алиева–Панфилова [6], задаваемую двумя уравнениями: уравнением в частных производных для безразмерной величины разности электрического потенциала  $u$  на мембране кардиомиоцитов и обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) для кинетической переменной  $v$ , характеризующей ионные токи через мембрану клетки. Уравнения для  $u$  и  $v$  имели следующий вид [6]:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \text{div}(\mathbf{D}\text{grad}(u)) - \frac{ku(u-a)(u-1) + uv}{\tau} + I_{\text{stim}}, \quad (1)$$

$$\frac{dv}{dt} = \psi(u, v),$$

где  $\mathbf{D}$  – тензор проводимости, а вид функции  $\psi$  приведен в работе [6],  $I_{stim}$  – стимулирующий ток, который задавали в некоторой области ЛЖ, чтобы промоделировать его электрическое возбуждение, передаваемое по проводящей системе сердца. Модель Алиева-Панфилова успешно воспроизводит основные особенности динамики ПД: порог возбуждения, период рефрактерности и релаксацию (уменьшение длительности ПД в ответ на возрастание частоты стимуляции).

Механический блок модели [5] основан на модели механики миокарда [8]. В рамках этой модели миокард рассматривали как трансверсально-

изотропную несжимаемую сплошную среду, в которой развиваются пассивные напряжения в ответ на деформацию и активные напряжения, вызванные механо-химическими процессами, происходящими на клеточном уровне. Ось трансверсальной изотропии направлена вдоль мышечных волокон: активные механические напряжения, вызванные силами, действующими вдоль волокна на площадку, перпендикулярную волокну, значительно превышают другие компоненты напряжений. Определяющее соотношение для механического напряжения  $\mathbf{T}$  записывали в виде

$$\mathbf{T} = \left( \frac{\partial \Phi(I_1, I_2)}{\partial I_1} + I_1 \frac{\partial \Phi(I_1, I_2)}{\partial I_2} \right) \mathbf{F} - \frac{\partial \Phi(I_1, I_2)}{\partial I_2} \mathbf{F}^2 - p \mathbf{E} + \mathbf{B}(T_{tit} + T_A), \quad (2)$$

учитывая гиперупругий изотропный ответ на деформацию, определяемый упругим потенциалом  $\Phi$ , и напряжения, вызванные силами, действующими вдоль мышечных волокон. В уравнении (2)  $\mathbf{F}$  – тензор меры деформации Фингера, а  $I_1$  и  $I_2$  – его первый и второй инварианты;  $\mathbf{E}$  – единичный метрический тензор,  $p$  – множитель Лагранжа, характеризующий давление, вызванное несжимаемостью материала;  $\mathbf{B}$  – тензор анизотропии, равный диаде единичного вектора, направленного вдоль мышечного волокна в деформированном миокарде.  $T_{tit}$  описывает нелинейно упругий ответ на деформацию мышечного белка титина, расположенного вдоль мышечных волокон, и задается выражением для силы длинных полимерных цепей (worm-like chain) [8].

Активное напряжение  $T_A$  определяли из системы ОДУ, записываемых для множества кинетических переменных  $w_j$ . Это множество включает в себя переменные, характеризующие следующие группы процессов: взаимодействие сократительных белков актина и миозина в кардиомиоците, взаимодействие регуляторных белков кардиомиоцита с ионами кальция  $\text{Ca}^{2+}$  и обмен  $\text{Ca}^{2+}$  между вне- и внутриклеточными фазами.  $T_A$  задавали как функцию двух переменных первой группы: количества комплексов вступивших во взаимодействие сократительных белков, образующих так называемые поперечные мостики, и их средней микродеформации, а также длины области перекрытия нитей актина и миозина, зависящей от длины  $L_S$  структурной единицы поперечно-полосатых мышц – саркомера. Необходимо отметить, что скорость изменения микродеформации поперечных мостиков зависит от скорости деформации мышцы, а некоторые из процессов массообмена ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и их взаимодействия с регуляторными белками зависят от  $L_S$  и  $u$ . Среди

переменных набора  $w_j$ , характеризующих процессы второй и третьей групп, можно выделить концентрацию комплексов, образованных ионами кальция  $\text{Ca}^{2+}$  с регуляторными белками в зоне перекрытия нитей и вне ее, и концентрации свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток миокарда, которые, собственно, и связываются с регуляторными белками, запуская актин-миозиновое взаимодействие. В свою очередь, увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме происходит в результате обмена ионами  $\text{Ca}^{2+}$  между различными вне- и внутриклеточными структурами: саркоплазматическим ретикуломом и узким зазором между мембранами клетки и саркоплазматическим ретикуломом. Концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в этих структурах также были включены в число кинетических переменных  $w_j$ . Описание межфазного обмена  $\text{Ca}^{2+}$ , включающего пассивный и активный транспорт, было заимствовано из работы [7] с некоторыми изменениями и упрощениями, позволившими уменьшить жесткость системы кинетических ОДУ и увеличить шаг по времени при численном интегрировании уравнений [5]. Отметим, что межфазный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  зависит от мембранного потенциала  $u$ . Это является одним из ключевых механизмов электромеханического сопряжения: ряда процессов, благодаря которым электрическая стимуляция приводит к активации сокращения ионами кальция и сокращению мышцы. В общем случае, когда емкость клеточной мембраны или проводимость миокарда зависят от деформации, при решении задачи необходимо решать уравнения движения (или равновесия) для объекта, состоящего из миокардиальной ткани совместно с первым уравнением системы (1), а в систему ОДУ для  $w_j$  необходимо включать уравнение для  $v$  из системы уравнений (1).

Выражение для активных напряжений  $T_A$  и кинетические уравнения для  $w_j$  имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} T_A &= f(w_j, L_S), \\ \frac{dw_i}{dt} &= g_j\left(w_j, L_S, \frac{dL_S}{dt}, u\right). \end{aligned} \quad (3)$$

Как показано в работах [5, 8], такая модель успешно воспроизводит важные эффекты повышения пиковой силы и ускорения расслабления мышцы при повышении частоты электрической стимуляции, мгновенный и медленный ответы развиваемой силы на изменение длины мышцы (закон сердца Франка–Старлинга). При этом, в отличие от детальных электрофизиологических моделей и ранней версии нашей модели [8], мо-

дель задается нежесткой системой ОДУ, что позволяет численно интегрировать уравнения явным методом Эйлера с относительно большим шагом по времени. Модель также включает в себя описание механо-кальциевой и механо-электрической обратных связей, что позволяет исследовать влияние деформаций как на электромеханику кардиомиоцита, так и на сердечную функцию в целом.

**Аппроксимация левого желудочка сердца.** В рамках модели геометрию ЛЖ аппроксимировали телом вращения, задаваемым в криволинейных координатах  $\gamma$  и  $\psi$ , характеризующих положение точки по толщине стенки и от основания к верхушке соответственно, согласно уравнениям

$$\begin{aligned} r &= (r_{in} + \gamma(r_{out} - r_{in}))(\varepsilon \cos \psi + (1 - \varepsilon)(1 - \sin \psi)), \\ z &= (h_{in} + \gamma(h_{out} - h_{in}))(1 - \sin \psi) + (1 - \gamma)(h_{out} - h_{in}), \end{aligned} \quad (4)$$

где  $r_{in}$  и  $r_{out}$  – внутренний и внешний радиус при координате  $\psi = 0$ , а  $h_{in}$  и  $h_{out}$  – расстояния по оси симметрии между основанием желудочка и наиболее удаленной от основания точкой на внутренней и внешней поверхности желудочка соответственно. Параметр  $\varepsilon$  отвечает за изменение формы тела вращения от конуса при  $\varepsilon = 0$  до более изогнутого сечения при  $\varepsilon = 1$ . Этот параметр выбран больше единицы, чтобы описать сужение желудочка в области клапанного кольца, располагающегося у основания желудочка. Характерные размеры желудочка составляли 2–3 см по радиальной координате и 7–8 см по осевой координате. Толщина стенки в конце систолы была около 1 см. Также задавали ход мышечных волокон  $f_0$  в недеформированном состоянии. Волокна были направлены по спиралям, угол наклона которых менялся при продвижении от внутренней поверхности стенки ЛЖ к наружной. Материал стенки желудочка описывали моделью, изложенной выше. При этом учитывали дополнительные локальные изменения свойств материала. В области сужения клапана вводили дополнительное

слагаемое, соответствующее жестким коллагеновым волокнам, расположенным в окружном направлении. Считали, что концентрация коллагеновых волокон растет с уменьшением  $\psi$  и от внешней границы стенки к внутренней. Кроме того, вводили дополнительное изотропное механическое напряжение в области верхушки, зависящее от концентрации взаимодействующих сократительных белков, что позволяло грубо аппроксимировать более хаотичное расположение ориентации волокон в этой области, наблюдаемое в сердцах человека и животных с помощью ЯМР. Детали аппроксимации ЛЖ и параметры, определяющие форму желудочка, приведены в работе [9].

**Модель сердечно-сосудистой системы.** Предсердия, правый желудочек и несколько разделов кровеносного русла (аорту, крупные артерии и вены большого и малого кругов кровообращения) описывали моделью с сосредоточенными параметрами. Для давлений в предсердиях и правом желудочке выделяли пассивную  $P_{Pas}$  и активную  $P_{Act}$  части, задаваемые уравнениями вида

$$\begin{aligned} P_{Pas} &= E_1 \cdot \left( e^{E_2 V(t)} - e^{E_2 V_0(t)} + \mu_1 \frac{\partial V(t)}{\partial t} \right), \\ \tau \frac{\partial P_{Act}(t)}{\partial t} + P_{Act}(t) &= F_{Act}(e(t), V(t)) \cdot \left( \mu_2 \frac{\partial V(t)}{\partial t} + E_2 \right). \end{aligned} \quad (5)$$

Функция  $F_{Act}$ , зависящая от косинусоидальной функции активации  $e(t)$  и объема камеры  $V$ , обеспечивала выполнение закона Франка–Старлинга: рост пикового систолического давления с ростом конечно-диастолического объема. Другие части сосудистого русла рассматри-

вали как упругие резервуары с постоянными податливостями  $C_r$ , давлениями  $P_r$ , расходами крови на входе  $Q_{rin}$  и выходе  $Q_{rout}$  и объемами  $V_r$  (тут  $r$  – номер соответствующего участка сосудистого русла). Уравнения гемодинамики записывали в виде

$$C_r \frac{dP_r}{dt} = \frac{dV_r}{dt} = Q_{rin} - Q_{rout}, \quad L_r \frac{dQ_{rin}}{dt} + R_r Q_{rin} = P_r - P_{r+1}, \quad (6)$$

где  $L_r$  и  $R_r$  — инерционное и гидравлическое сопротивления потока;  $r$  — индекс, характеризующий данный участок сосудистого русла. Учитывали артериальный и венозные отделы большого и малого кругов кровообращения и периферические сопротивления между ними; в большом круге отдельно учитывали аорту и более мелкие артерии, что позволило приблизить форму кривой давления в аорте к наблюдаемой у человека. Модель гемодинамики была детально описана в работе [10].

**Постановка задачи и метод ее численного решения.** Основной задачей данного исследования было моделирование эффектов частоты сердечного ритма и нарушений возбудимости, проводимости и сократительной способности стенки ЛЖ при верхушечном (апикальном) инфаркте на его функцию. При этом на данной стадии исследования не планировали изучение влияния деформаций на процессы распространения в стенке ЛЖ волн электрической активации, поскольку корректно описать такое влияние в рамках осесимметричной модели ЛЖ невозможно. В связи с этим в целях упрощения пренебрегали зависимостью емкости кардиомиоцита от деформаций и полагали, что скорость проведения сохраняется в материальных координатах деформированного базиса. При этих предположениях поставленную задачу можно разбить на две отдельные задачи: задачу о распространении волны электрической активации по недеформированному ЛЖ и задачу о сокращении ЛЖ в системе кровообращения. Постановка первой задачи включает уравнение (1) с граничными условиями «непротекания» электрического тока вида  $\mathbf{Dgrad}(u)\mathbf{n}$ , где  $\mathbf{n}$  — внешняя нормаль к поверхности ЛЖ. Начальное значение  $u$  во всей области стенки ЛЖ было равно нулю; начальное значение  $v$  во всей области полагали равным ее значению, полученному при решении нульмерной задачи о периодической стимуляции и однородном сокращении цилиндрического волокна сердечной мышцы под постоянной нагрузкой. Активацию запускали внешним периодическим стимулирующим током  $I_{stim}$  длительностью 3 мс, приложенным к точке на внутренней стенке желудочка в области верхушки. Форму левого желудочка строили согласно уравнению (4), подобрав параметры так, чтобы объем ЛЖ был равен примерно 45 мл, что соответствует его состоянию в конце систолы. Мышечные волокна направляли вдоль спиралей, закручивающихся вокруг поверхностей  $\gamma = const$  с углом наклона к основанию, меняющимся линейно по  $\gamma$  от  $+80^\circ$  на внутренней стенке ( $\gamma = 0$ )

до  $-55^\circ$  на внешней стенке ( $\gamma = 1$ ). Компоненты тензора проводимости вдоль и поперек мышечных волокон составляли 65 и 7  $cm^2/c$  соответственно. Проводящую систему ЛЖ моделировали добавлением тонкого слоя проводящих волокон, расположенных у внутренней поверхности ЛЖ и направленных вдоль этой поверхности в плоскости осевого сечения ЛЖ. Проводимость вдоль этих волокон, моделирующих волокна Пуркинье в 2D-осесимметричной постановке, была увеличена до 174  $cm^2/c$ , а проводимость поперек этих волокон была такой же, как и для рабочего миокарда ЛЖ. При моделировании реакции системы кровообращения на физическую нагрузку одновременно повышали частоту сердечных сокращений с 1 до 2 Гц и снижали периферическое сопротивление большого круга с 1600 до 800  $дин\cdot c/cm^5$ , чтобы воспроизвести так называемую «рабочую гиперемия», т.е. увеличение диаметров прекапиллярных сосудов в работающих скелетных мышцах.

Механику стенки ЛЖ описывали уравнением равновесия

$$\nabla \mathbf{T} = \mathbf{0} \quad (7)$$

для тензора механических напряжений (2). Инерционные силы не учитывали, поскольку они малы по сравнению с механическими напряжениями. Граничные условия для напряжений на внутренней и внешней поверхностях ЛЖ имели вид  $\mathbf{T}\cdot\mathbf{n} = -P_{LV}\mathbf{n}$  и  $\mathbf{T}\cdot\mathbf{n} = \mathbf{0}$  соответственно. Таким образом, напряжение на внутренней границе стенки ЛЖ было равно давлению крови в его полости, а напряжениями на его внешней поверхности пренебрегали. На верхней поверхности основания ЛЖ задавали нулевые осевые и угловые перемещения, чтобы избежать его движений как твердого тела.

Напряжения выражали через компоненты вектора перемещений и переменные  $w_j$ , для определения которых решали систему обыкновенных дифференциальных уравнений (3) во всех точках стенки ЛЖ. Наконец, систему уравнений замыкали уравнения гемодинамики (5) и (6). В качестве начальных условий задавали начальные объемы камер сердца, давление в сосудах разного типа, нулевые расходы между участками сердечно-сосудистой системы и однородные по пространству распределения  $w_j$ , полученные при решении нульмерной задачи о периодической стимуляции и сокращении цилиндрического волокна сердечной мышцы под постоянной нагрузкой. Так как форма желудочка, использованная в задаче об электрической активации, не соответствует нена-

груженному состоянию (давление в желудочке перед началом диастолы может быть отрицательным), то мы находили ненагруженное состояние следующим образом. Сначала начинали расчет с конечно-систолической формы ЛЖ с длинами саркомеров миокарда стенки желудочка, равными 1.7 мкм, считая это исходное состояние ненагруженным. Затем мы моделировали заполнение кровью расслабленного ЛЖ до тех пор, пока значение длин саркомеров в большей части его стенки не становилось равным 1.9 мкм, что примерно соответствует началу диастолы, во время которой давление в ЛЖ близко к нулю. Эту форму принимали за ненагруженное состояние (отчетную конфигурацию) во всех приведенных здесь расчетах.

Таким образом, первая задача состояла в решении системы уравнений (1) с граничными условиями непротекания тока и локальным внешним воздействием в виде стимулирующего тока  $I_{stim}$ . Результаты расчета поля потенциала  $u$  в различных точках стенки ЛЖ были использованы при решении второй, механической задачи. Эта задача состояла в решении уравнения равновесия (7) с соответствующими граничными условиями с одновременным решением системы ОДУ (3), в правую часть которой входит  $u$ . Систему уравнений замыкали уравнения (5) и (6), которые задавали связь напряжений в стенке ЛЖ с гемодинамикой.

Обе задачи решали методом конечных элементов, сформулированным в малых приращениях. На каждом шаге по времени уравнения линеаризовали по малым приращениям неизвестных величин: безразмерного потенциала  $u$  (для задачи активации) и перемещений, давлений, т.е. множителей Лагранжа (2) в узлах и внутри конечных элементов в стенке ЛЖ, а также давления крови в ЛЖ (для задачи сокращения). Использовали треугольную сетку с линейной аппроксимацией перемещений и потенциала и одним неизвестным множителем Лагранжа на каждые два треугольных элемента. Первое уравнение из системы уравнений (1) и уравнение (7), записываемые для каждого узла, интегрировали по всем элементам, содержащим данный узел, методом квадратуры Гаусса по трем точкам. ОДУ на переменные  $w_j$  (3) решали в каждой точке интегрирования явным методом Эйлера, используя полученное решение на следующем шаге для вычисления компонент матрицы жесткости (матрицы перед столбцом малых неизвестных приращений переменных задачи).

**Моделирование апикального инфаркта миокарда.** Для моделирования острого инфаркта ЛЖ в области верхушки выделяли область, занимающую примерно треть высоты недеформированного желудочка, в которой изменяли следующие параметры модели: повышали порог возбуждения

(параметр  $a$  в уравнении (1)) в пять раз и уменьшали правую часть первого уравнения (1) также в пять раз, что соответствовало ухудшению проводимости ткани и снижению величин ионных токов в данной области. При этом не затрагивали проводящую способность и возбудимость в районе, в котором моделировали расположение волокон Пуркинье. Чтобы обеспечить непрерывность значений параметров модели в миокарде стенки желудочка, «пораженную» область склеивали со «здоровой» переходным участком, в котором коэффициент повышения порога задавали выражением

$$a_{inf} = \frac{(1 - a_{inf0})(z - z_0)}{z_0 - z_1} + 1,$$

где  $a_{inf0} = 5$ , а коэффициент, характеризующий уменьшение величины ионных токов в правой части уравнения (1), выражением

$$b_{inf} = b_{inf0} + \frac{(1 - b_{inf0})(z - z_1)}{z_0 - z_1}.$$

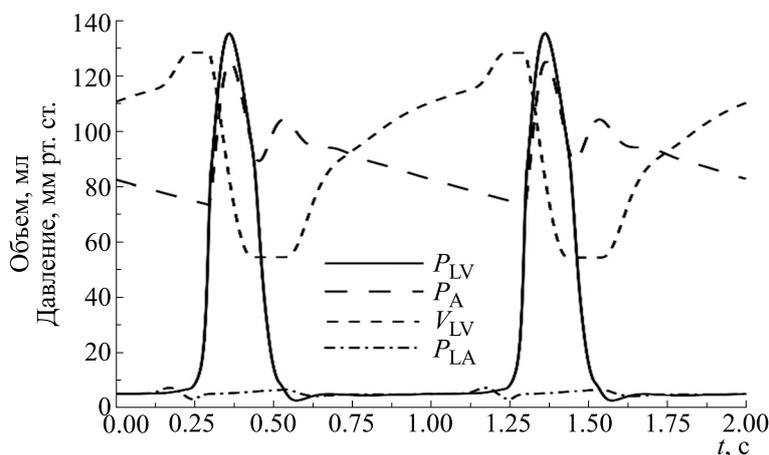
В этих выражениях  $z_0$  и  $z_1$  – осевые координаты границы переходного участка с областями соответственно «здорового» миокарда и миокарда, пораженного инфарктом,  $b_{inf0} = 0.2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчет сокращения ЛЖ проводили до установления периодического режима. Временной ход основных гемодинамических переменных, полученный в результате решения задачи о сокращении сердца в системе кровообращения с частотой 60 ударов в минуту, показан на рис. 1.

При преднагрузке (конечно-диастолическом давлении в ЛЖ), равной 6.5 мм рт. ст. при объеме 128 мл и лежащей в диапазоне значений, характерном для здорового сердца человека в покое, были получены величины давлений и объемов камер сердца, также характерные для здорового сердца. Максимальное и минимальное давления в аорте, равные 125 и 73 мм рт. ст. соответственно, были близки к их нормальным значениям. Ударный объем (объем крови, выброшенный из желудочка в систолу) и фракция выброса (отношение ударного объема к конечно-диастолическому) при данной преднагрузке равнялись 74 мл и 58% соответственно.

Результаты моделирования распространения электрической активации по ЛЖ с областью инфаркта показали отсутствие распространения ПД в область верхушки за исключением области волокон Пуркинье. На рис. 2 показана карта активации для случаев нормального ЛЖ (рис. 2а) и ЛЖ с апикальным инфарктом (рис. 2б) спустя 60 мс после начала очередного внешнего возбуждающего стимула. Задержка распространения ПД



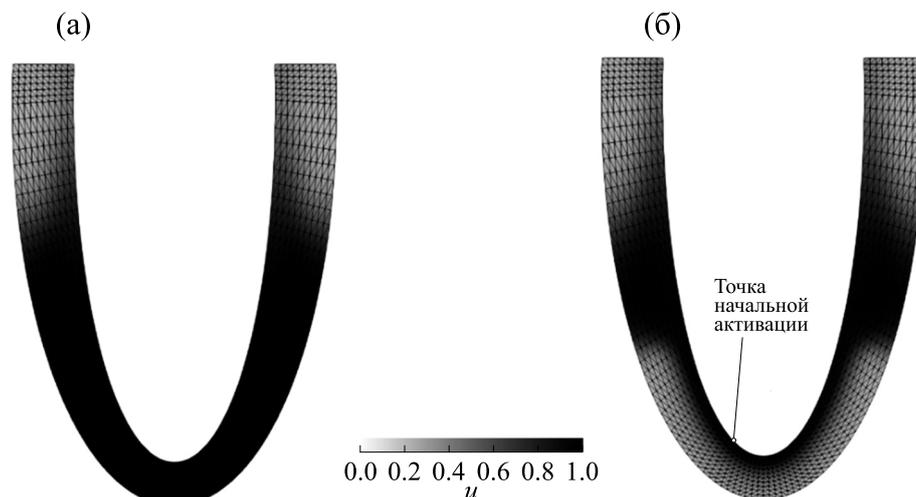
**Рис. 1.** Временной ход основных переменных левого сердца, полученный в результате моделирования сокращения сердца с частотой 1 Гц. Показаны значения давления ( $P_{LV}$ ) и объема ( $V_{LV}$ ) левого желудочка, а также давление в левом предсердии ( $P_{LA}$ ) и аорте ( $P_A$ ). Давления приведены в мм рт. ст., объемы — в мл. Расшифровка типов линий для каждой из переменных приведена на рисунке.

по стенке ЛЖ в норме (рис. 2а) составляла 85 мс, что близко к длительности QRS-комплекса на кардиограмме сердца здорового человека.

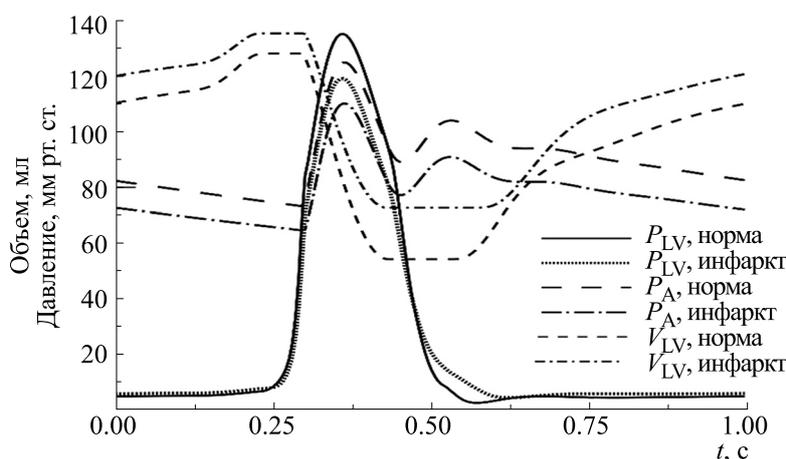
Моделирование работы ЛЖ с апикальным инфарктом при тех же значениях параметров модели, характеризующих другие камеры сердца и сосудистой системы, как и при расчете работы нормального ЛЖ, показанного на рис. 1, показало падение производительности сердца и значительное изменение деформаций ЛЖ в систолу. На рис. 3 приведено сравнение основных величин гемодинамики левого сердца при сокращении с

частотой 60 ударов в минуту в норме и в случае инфаркта.

Расчеты показали падение пикового давления в ЛЖ и аорте (со 135 и 125 мм рт. ст. до 119 и 110 мм рт. ст. соответственно) и падение ударного объема (с 74 мл до 63 мл) в условиях повышения конечно-диастолического объема, т.е. увеличения преднагрузки, что говорит о существенном снижении сократительной функции ЛЖ. Фракция выброса ЛЖ также уменьшилась до 47%. На рис. 4 показана форма ЛЖ в начале и конце систолы в норме и при апикальном инфаркте.



**Рис. 2.** Карта активации ЛЖ, полученная в результате моделирования активации ЛЖ с частотой 1 Гц в норме (а) и при наличии инфаркта в области верхушки (б) спустя 60 мс после начала очередного внешнего возбуждающего стимула. Показаны значения безразмерного потенциала действия  $u$ . Указана область, куда подается внешний стимулирующий ток. На схеме распространения активации по ЛЖ с инфарктом можно заметить область волокон Пуркинье, по которой даже в пораженной области распространяется потенциал действия.



**Рис. 3.** Временной ход основных переменных левого сердца, полученный в результате моделирования сокращения сердца с частотой 1 Гц в норме и в случае инфаркта. Показаны значения давления ( $P_{LV}$ ) и объема ( $V_{LV}$ ) левого желудочка и давление аорте ( $P_A$ ). Давления приведены в мм рт. ст., объемы — в мл. Расшифровка типов линий для каждой из переменных приведена на рисунке.

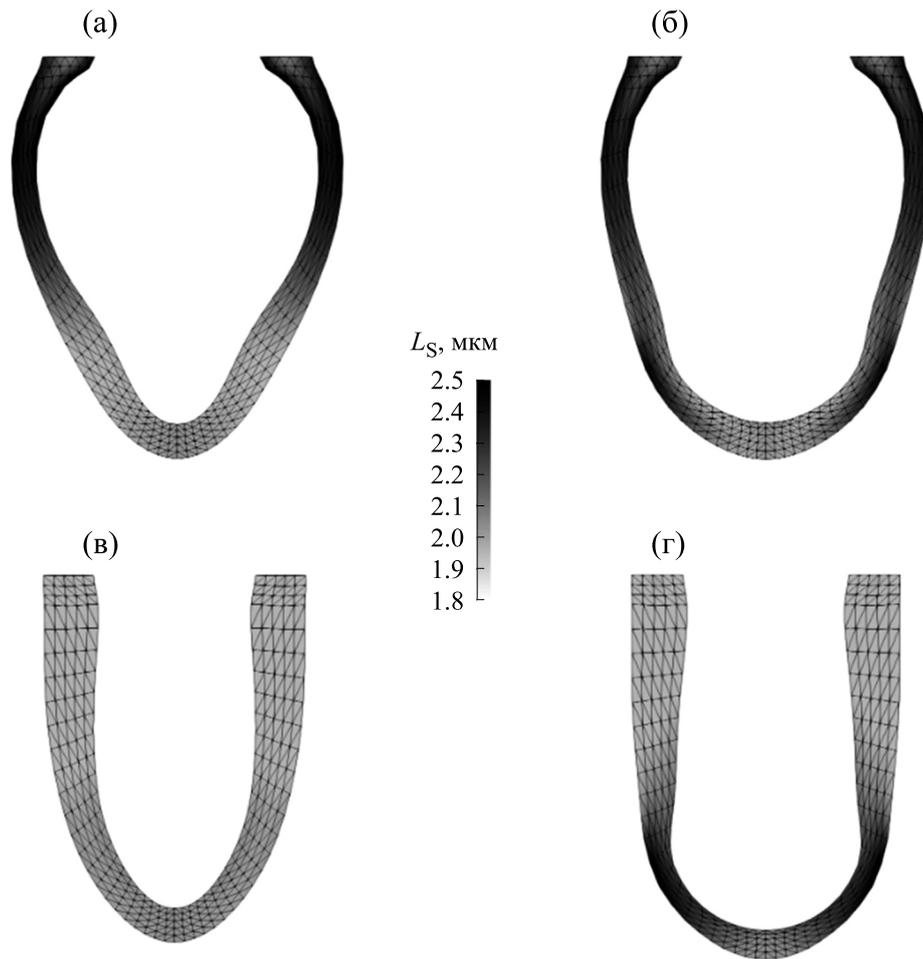
При моделировании инфаркта наблюдали концентрации деформаций и длин мышечных волокон в районе верхушки и в начале (рис. 4б), и в конце систолы (рис. 4г). Заметно, что стенка в области верхушки не сокращается, и общая осевая деформация желудочка существенно уменьшена. Такие изменения геометрии ЛЖ и распределения деформаций в его стенке наблюдаются при эхокардиологическом обследовании пациентов с апикальным инфарктом миокарда ЛЖ [11].

Чтобы исследовать проявление ответа мышцы на частоту стимуляции, учтенного в клеточной модели, на работу всего сердца при физической нагрузке, провели моделирование работы сердечно-сосудистой системы при увеличении частоты сердечного ритма до 120 ударов в минуту и одновременном двукратном снижении периферического сопротивления большого круга кровообращения. Полученные результаты для основных переменных гемодинамики показаны на рис. 5.

Результаты показывают значительный рост пиковых давлений в ЛЖ и аорте (до 170 и 156 мм рт. ст.), а также ударного объема и фракции выброса (87 мл и 75%) при уменьшении конечно-диастолического объема до 117 мл при начальных условиях, задающих даже слегка больший начальный общий объем крови, чем в расчетах сокращения с частотой 1 Гц. Полученный рост давлений и ударного объема, а также снижение конечно-диастолического объема обусловлены ростом и пиковой, и диастолической внутриклеточной концентрации свободных ионов  $Ca^{2+}$  с частотой стимуляции. Динамика  $Ca^{2+}$  и концентрации образованных комплексов кальция с регуляторными белками в зоне пере-

крытия нитей сократительных белков  $A_1$  при сокращении ЛЖ с частотами 1 и 2 Гц в центре стенки желудочка в его экваториальной (самой широкой в диастолу) части показаны на рис. 6. Видно, что увеличение частоты стимуляции приводило к двукратному увеличению пиковой концентрации  $Ca^{2+}$  в клетках миокарда и существенному увеличению доли активированных комплексов регуляторных белков с ионами  $Ca^{2+}$ . Именно таким увеличением уровня систолической активации клеток сердечной мышцы в значительной степени объясняются результаты моделирования работы сердца при повышенной частоте сокращения, показанные на рис. 5.

Мы также провели расчет работы сердечно-сосудистой системы в условиях, моделирующих один из вариантов атриовентрикулярной блокады — заболевания, при котором нарушена передача электрического сигнала от предсердий к желудочкам. Сигнал может приходить в желудочки с задержкой, совсем не передаваться к желудочкам или передаваться лишь периодически. Моделируя блокаду последнего типа, полагали, что для каждого четвертого сокращения с постоянной частотой 1 Гц  $I_{stim} = 0$ , в то время как предсердия сокращались в нормальном ритме. Результаты расчета, включая данные о гемодинамике, динамике изменения концентрации  $Ca^{2+}$  и уровня активации тонких нитей в стенке ЛЖ в районе экватора, представленного как относительная концентрация комплексов регуляторных белков с ионами  $Ca^{2+}$ , показаны на рис. 7, где «пропущено» второе из четырех сокращений ЛЖ.

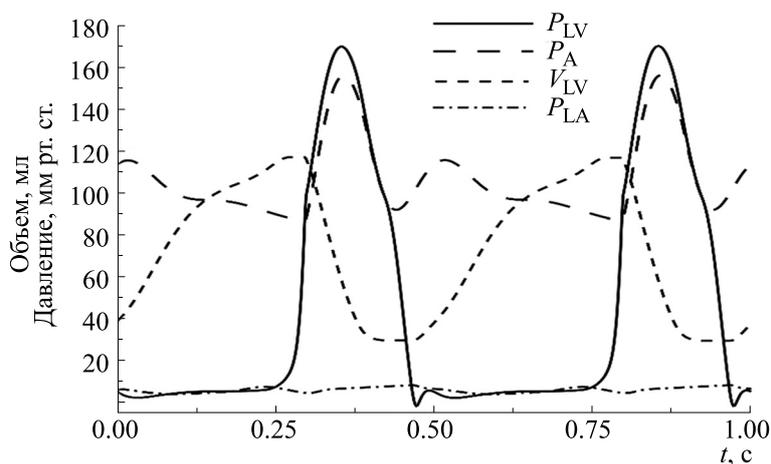


**Рис. 4.** Форма ЛЖ и распределение длины саркомеров, полученная в результате моделирования сокращения ЛЖ с частотой 1 Гц в норме (а, в) и при наличии инфаркта в области верхушки (б, г) в начале систолы желудочков (а, б) и в ее конце (в, г). Показаны значения длин саркомеров  $L_S$  в мкм.

Расчеты показали значительный рост ударного объема до 101 мл сразу после паузы при его значении 67 мл в сокращении до паузы (рис. 7а). Такой ответ в расчете обусловлен тем, что используемая клеточная модель воспроизводит ответ внутриклеточной концентрации свободного кальция  $Ca^{2+}$  и силы на паузу в периодической стимуляции (рис. 7б), включая зависимость этого ответа от величины паузы [5]. Несмотря на такую компенсацию ударного объема за счет кратковременного повышения амплитуды первого сокращения после паузы, минутный ударный объем в рассмотренном случае атриовентрикулярной блокады немного уменьшался. Кроме того, снижалась сократимость ЛЖ в последующих, не пропущенных из-за блокады сокращениях: при конечно-диастолических объемах 126–128 мл пиковое давление в аорте падало до 109–115 мм рт. ст., а ударный объем снижался до 63–67 мл (рис. 7а).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы использовали нашу новую электромеханическую модель сердечной мышцы [5] для многомасштабного моделирования работы ЛЖ сердца в системе кровообращения и применили ее для численных расчетов эффектов физической нагрузки, инфаркта в области верхушки ЛЖ и частичной блокады проведения электрических импульсов от предсердий к желудочкам на производительность сердца. Включение в модель явного описания распространения волны электрического возбуждения по стенке ЛЖ и системы электромеханического сопряжения, в основе которой лежит изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в различных компартментах клеток миокарда, позволило получить более реалистичное описание работы ЛЖ по сравнению с ранней версией модели [9, 10], в которой сокращение ЛЖ запускали, задавая внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  как однородную по всему объему стенки ЛЖ задан-



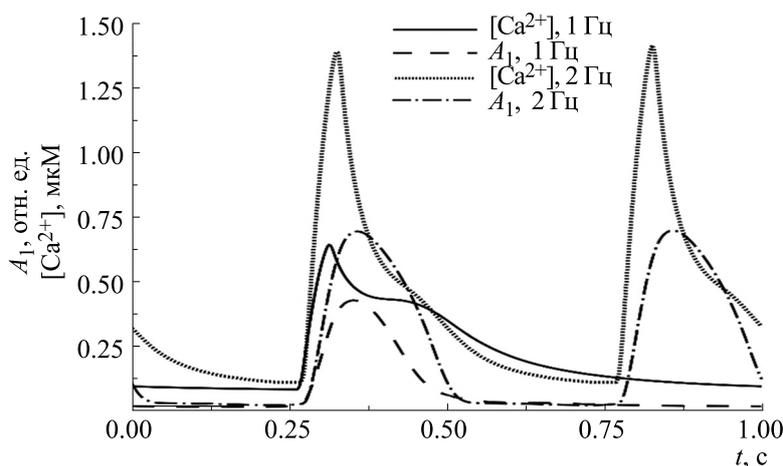
**Рис. 5.** Временной ход основных переменных левого сердца, полученный в результате моделирования сокращения сердца с частотой 2 Гц. Показаны значения давления ( $P_{LV}$ ) и объема ( $V_{LV}$ ) левого желудочка, а также давление в левом предсердии ( $P_{LA}$ ) и аорте ( $P_A$ ). Давления приведены в мм рт. ст., объемы – в мл. Расшифровка типов линий для каждой из переменных приведена на рисунке.

ную функцию времени. Поскольку запуск ПД в модели начинали вблизи верхушки сердца, сокращение полости ЛЖ также начиналось от верхушки, а затем распространялось к экватору и основанию, как происходит при нормальной работе сердца.

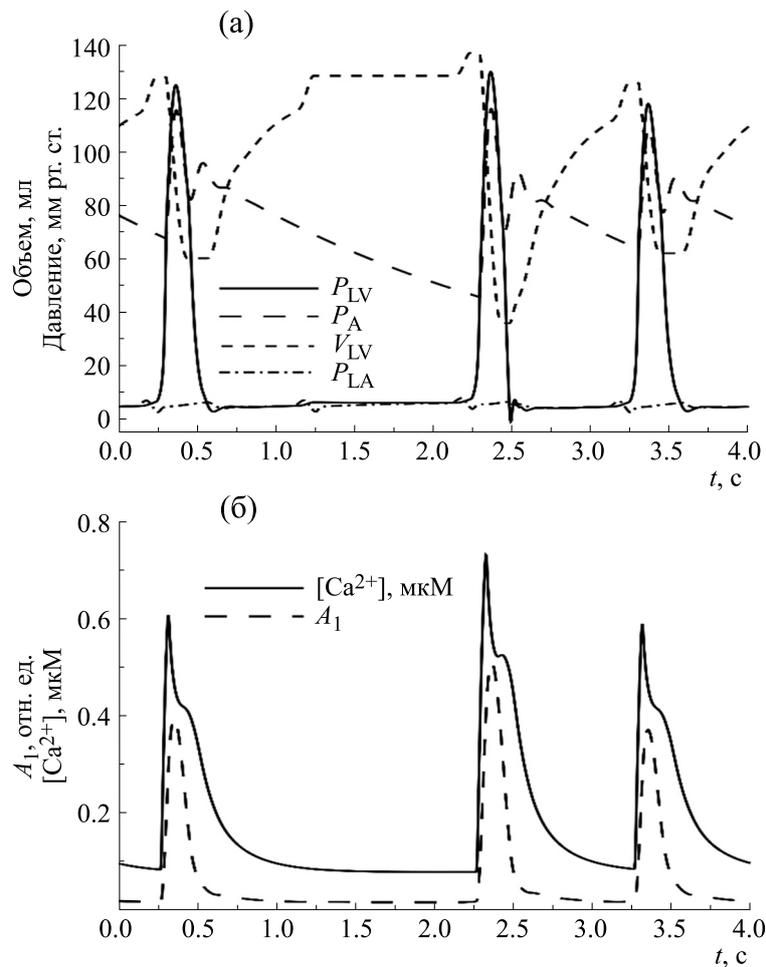
Чтобы промоделировать влияние инфаркта в области верхушки сердца на геометрию ЛЖ и параметры гемодинамики, в области инфаркта повышали порог возбуждения и снижали ионные токи и проводимость миокарда. Появление мало-возбудимой области привело к существенному изменению геометрии ЛЖ во время систолы

(рис. 4) и заметному падению артериального давления, фракции выброса и ударного объема ЛЖ (рис. 3). Изменения кинематики сокращения (в частности, дискинезия в области верхушки), полученные при моделировании апикального инфаркта, были близки к тем, которые наблюдаются в клинике [11].

Для моделирования влияния физической нагрузки на работу сердца и сосудистой системы частоту сердечных сокращений увеличивали до  $120 \text{ мин}^{-1}$  и одновременно снижали периферическое вдвое сопротивление сосудов большого круга кровообращения, чтобы промоделировать рас-



**Рис. 6.** Временной ход концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клетки комплексов  $\text{Ca}^{2+}$  с регуляторными белками в зоне перекрытия нитей сократительных белков  $A_1$ , полученные в центре стенки желудочка в его экваториальной части. Результаты приведены для моделирования сокращения с частотами 1 и 2 Гц. По оси ординат отложены значения в безразмерных единицах для  $A_1$  и мкМ для  $\text{Ca}^{2+}$ . Расшифровка типов линий для каждой из переменных приведена на рисунке.



**Рис. 7.** Результаты моделирования атриовентрикулярной блокады: (а) – временной ход основных гемодинамических переменных левого сердца, полученный в результате моделирования сокращения сердца с частотой 1 Гц в условиях атриовентрикулярной блокады. Показаны значения давления ( $P_{LV}$ ) и объема ( $V_{LV}$ ) левого желудочка, а также давление в левом предсердии ( $P_{LA}$ ) и аорте ( $P_A$ ); (б) – временной ход внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и относительной доли активированных комплексов регуляторных белков в зоне перекрытия тонких и толстых нитей в саркомерах  $A_1$  в середине стенки ЛЖ в области экватора. Давления приведены в мм рт. ст., объемы – в мл, концентрация  $Ca^{2+}$  – в мкМ. Левый желудочек «пропускает» сокращение в интервале от 1.2 до 2.2 с. Расшифровка типов линий для каждой из переменных приведена на рисунке.

ширение сосудов мышц при рабочей гиперемии (рис. 5). Несмотря на снижение сопротивления, увеличение частоты сердечных сокращений при модельных расчетах привело к возрастанию артериального давления до 154/74 мм рт. ст. и более чем двукратному росту минутного кровотока. Такой выраженный рост производительности сердца обусловлен двумя обстоятельствами. Во-первых, с увеличением частоты сердечных сокращений длительность систолы уменьшается не так значительно, как длительность диастолы. Поэтому доля длительности сердечного цикла, приходящаяся на систолу, возрастает, что приводит к увеличению сердечного выброса. Во-вторых, увеличение частоты приводит к увеличению

концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме миокардиальных клеток (рис. 6), что приводит к росту изометрического напряжения в экспериментах с образцами миокарда человека, без признаков сердечной недостаточности [12, 13]. Моделирование таких экспериментов с помощью нашей электро-механической модели показало, что этот эффект связан с накоплением  $Ca^{2+}$  в саркоплазматическом ретикулуме [5]. Таким образом, наши расчеты показали, что увеличение уровня активации сократительных белков миокарда ЛЖ с ростом частоты сердечных сокращений является существенным фактором, способствующим поддержанию повышенного уровня кровоснабжения организма при физической нагрузке (рис. 5 и 6).

Результаты расчетов центральной гемодинамики (рис. 5) согласуются с данными наблюдений [14].

Наконец, результаты моделирования работы сердца в условиях частичной атриовентрикулярной блокады, показывают, как особенности реакции системы электромеханического сопряжения в миокарде на изменения межстимульных интервалов помогают поддерживать необходимый уровень кровоснабжения при этом виде нарушения сердечного ритма (рис. 7). Эти результаты качественно согласуются с данными наблюдений [15].

Следует заметить, что на данном этапе мы разделяли задачи электрической активации ЛЖ и его механического сокращения, решая их поочередно, хотя модель [5] позволяет учитывать влияние деформаций миокарда на скорость проводимости электрического возбуждения по стенке ЛЖ. Полная электромеханическая задача сокращения ЛЖ при нормальных условиях была решена в рамках предложенного исследования, но полученные результаты лишь незначительно отличались от приведенных результатов моделирования с разделением задач. Это может быть связано с применением осесимметричной постановки, в рамках которой невозможно корректно описать некоторые локальные изменения проводимости и деформации. В связи с тем, что для сходимости решения полной электромеханической задачи требуется меньший шаг сетки по пространству, было решено остановиться на двухэтапной постановке. В дальнейшем планируется ставить и решать полные электромеханические задачи активации и сокращения ЛЖ и других камер сердца в 3D-постановке, в том числе исследуя локальные эффекты деформаций на электрическую активацию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты показывают, что модель сердечно-сосудистой системы, в которой левый желудочек представлен телом вращения, изготовленным из материала, описываемого нашей новой электромеханической моделью [5], воспроизводит некоторые реакции сердца на увеличение частоты сокращений, частичную атриовентрикулярную блокаду и нарушения работы левого желудочка при апикальном инфаркте. Результаты расчетов также показывают, что особенности реакции уровня активации и активного механического напряжения кардиомиоцитов на изменение межстимульных интервалов, наблюдаемые и исследованные на клеточном уровне, играют важную роль в поддержании необходимого уровня кровоснабжения организма при физической нагрузке и некоторых патологиях, т.е. помогают оптимизировать макроскопическую работу сердца как насоса.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 20-74-00046.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. A. Niederer, J. Lumens, and N. A. Trayanova, *Nat. Rev. Cardiol.*, **16**, 100 (2019).
2. M. Peirlinck, F. S. Costabal, J. Yao, et al., *Biomech. Model. Mechanobiol.*, **20**, 803 (2021).
3. N. A. Trayanova, *Circ. Res.*, **108** (1), 113 (2011).
4. N. A. Trayanova and K. C. Chang, *J. Physiol.*, **594** (9), 2483 (2016).
5. F. Syomin, A. Osepyan, and A. Tsaturyan, *PLoS ONE*, **16** (7), e0255027 (2021).
6. R. R. Aliev and A. V. Panfilov, *Chaos, Solitons & Fractals*, **7** (3), 293 (1996).
7. K. H ten Tusscher and A. V. Panfilov, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **291** (3), H1088 (2006).
8. F.A. Syomin and A. K. Tsaturyan, *J. Theor. Biol.*, **420**, 105 (2017).
9. F. A. Syomin and A. K. Tsaturyan, *Russ. J. Numer. Anal. Math. Model.*, **32**, 327 (2017).
10. F. A. Syomin, M. V. Zberia, and A. K. Tsaturyan, *Int. J. Numer. Method. Biomed. Eng.*, **35**, e3216 (2019).
11. G. Joseph, T. Zaremba, M. B. Johansen, et al., *Echo. Res. Pract.*, **6** (4), 81 (2019).
12. L. A. Mulieri, G. Hasenfuss, B. Leavitt, et al., *Circulation*, **85** (5), 1743 (1992).
13. N. R. Alpert, B. J. Leavitt, F. P. Ittleman, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **93** (Suppl. 1), 23 (1998).
14. K. Wielemborek-Musial, K. Szmigielska, J. Leszczynska, et al., *Biomed. Res. Int.*, Article ID 5607507 (2016).
15. T. Kerola, A. Eranti, A. L. Aro, et al., *JAMA Netw. Open*, **2** (5), e194176 (2019).

# **Numerical Modeling of Heart Left Ventricle Work in the Circulatory System: the Effects of Changes in the Frequency of Contractions and Apical Myocardial Infarction**

**F.A. Syomin\*, A.R. Khabibullina\*, and A.K. Tsaturyan\***

*\*Institute of Mechanics, Lomonosov Moscow State University, Michurinsky prosp. 1, Moscow, 119192 Russia*

We present a multiscale mathematical model of the pumping function of the left ventricle (LV) of the heart in the circulatory system. The properties of the LV myocardium were described with a new electromechanical model that combines models of the generation and propagation of action potential, electromechanical coupling, and mechanics, including passive and active mechanical stress and finite strain. The left ventricle was considered being a thick-walled axisymmetric body with a realistic distribution of the muscle fibers in its wall. Blood flow in other heart chambers and blood vessels was represented by a lumped parameter model. We carried out numerical modeling of the effect of the heart rate, partial atrioventricular block, and apical LV infarction on the hemodynamics and geometry of the LV. The calculations showed that the model describes the observed responses of the LV pumping characteristics to these effects. The results allow one to understand how the cell-level peculiarities of the electromechanical coupling in cardiac muscle help the heart to maintain its pumping function in pathologies and to adjust it to the increasing needs during physical activity.

*Keywords: myocardium, electromechanics of the heart, left ventricle of the heart, cardiovascular system, mathematical modeling, modeling of the heart, heart rate, myocardial infarction, atrioventricular block*

## ИЗМЕНЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ КРОВИ ПРИ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ У КРЫС МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

© 2022 г. С.В. Пинчук\*,#, И.Б. Василевич\*, А.Ю. Молчанова\*\*, А.А. Басалай\*\*, И.Д. Волотовский\*

\*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Республика Беларусь

#E-mail: pinchuksv@mail.ru

\*\*Институт физиологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 28, Минск, 220072, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 28.02.2022 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принята к публикации 19.04.2022 г.

Проведено исследование динамики окислительного стресса в организме крыс после механической травмы (повреждение ахиллова сухожилия) и влияния на данный процесс мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани после их локальной инъекции в область повреждения. Полученные результаты свидетельствуют о развитии окислительного стресса в организме животных в посттравматический период, что проявляется в увеличении содержания в крови продуктов перекисного окисления липидов, изменении средней интенсивности аутофлуоресценции эритроцитов по данным проточной цитофлуориметрии, увеличении общей антиоксидантной активности плазмы крови. Полученные результаты указывают на то, что мезенхимальные стволовые клетки оказывают защитное действие при развитии окислительного стресса, что позволяет сбалансировать ответ организма на усиление окислительных повреждений и расширяет сведения о механизмах терапевтического действия стволовых клеток при лечении травм.

*Ключевые слова:* травма ахиллова сухожилия, окислительный стресс, мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия.

DOI: 10.31857/S0006302922040160, EDN: IUVDBD

Результаты применения стволовых клеток в клинической практике, полученные отечественными и зарубежными учеными в последнее десятилетие, убедительно свидетельствуют о высоком потенциале методов клеточной терапии в лечении заболеваний человека и животных [1, 2]. Наиболее широкое применение получили биомедицинские клеточные продукты на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из различных тканей, прежде всего жировой ткани, костного мозга, ткани пуповины [3, 4]. Это обусловлено доступностью донорского материала, высокой пролиферативной активностью МСК в условиях *in vitro*, отработанными методами культивирования и ана-

лиза их функционального состояния. Терапевтическое действие МСК связывают со способностью данных клеток дифференцироваться в соматические клетки тканей и органов, а также с осуществлением ими паракринной активности – синтезом во внеклеточную среду цитокинов и ростовых факторов, оказывающих противовоспалительное, антиапоптотическое, иммуномодулирующее, стимулирующее пролиферацию действие, способствуя тем самым восстановлению клеточного пула функционально активных клеток в очаге повреждения [3, 4].

В ряде исследований показано, что применение МСК снижает развитие окислительного стресса в организме экспериментальных животных после моделирования у них патологических состояний: колитов [5–7], инсульта [8], дисфункции печени [9, 10] и почек [11], астмы [12], а также при действии ионизирующего излучения [13]. Предполагается, что МСК способны оказывать

*Сокращения:* МСК – мезенхимальные стволовые клетки, АФК – активные формы кислорода, ПОЛ – перекисное окисление липидов, ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота, ОАА – общая антиоксидантная активность, АВТС – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота).

регуляторное действие на прооксидантно/антиоксидантный баланс в клетках в условиях активации окислительных повреждений клеточных компонентов. Однако роль данного возможного механизма терапевтического действия МСК практически не изучена, в частности, не известен спектр патологий, при которых он проявляется. Вместе с тем, очевидно, что более полное представление о механизмах действия МСК при различных патологиях имеет важное значение для совершенствования методов клеточной терапии (определение оптимальных доз клеточного материала, кратности инъекций, временных интервалов между инъекциями и др.).

Проведенные многочисленные исследования убедительно свидетельствуют, что окислительный стресс лежит в основе развития многих патологических состояний человека и животных, является причиной прогрессирования их осложнений, сопровождается усилением воспалительных реакций и снижением репаративных процессов в организме. Развитие окислительного стресса обусловлено интенсификацией свободно-радикальных повреждений липидов, белков и ДНК в клетках, что в конечном итоге способно приводить к снижению их функциональной активности и, как следствие, к нарушению функционирования тканей и органов. Важная роль окислительного стресса показана в патогенезе онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний, при диабете, болезнях печени и почек и др. [14, 15]. Имеются данные об участии окислительного стресса в патогенезе травм опорно-двигательного аппарата, в том числе сухожилий. На экспериментальных животных показано, что травмирование ахиллова сухожилия приводит к увеличению содержания активных форм кислорода (АФК) в сыворотке крови [16], росту количества продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижению концентрации восстановленного глутатиона в тканях сухожилия [17–19]. В условиях стимуляции окислительного стресса (локальная инъекция перекиси водорода) эффективность восстановления экспериментально травмированного сухожилия снижается и наблюдаются изменения, характерные для развития тендинопатии [20]. Напротив, применение таких антиоксидантов как кверцетин или аскорбат оказывает позитивное влияние на процесс восстановления травмированного сухожилия [18, 19].

Повреждения сухожилий и связок составляют около 50% всех травм мышечно-скелетной системы и являются одной из основных причин развития болевых синдромов и физической недееспособности, оказывая тем самым крайне негативное влияние на физическое состояние пациентов [21, 22]. Для терапии таких заболеваний в настоящее время в основном применяются методы консервативного лечения и хирургические вмеша-

тельства. Однако при их использовании заживление сухожилий, как правило, происходит очень медленно, а поврежденные ткани не могут полностью восстановиться до их естественного состава, структуры и механических свойств, что ведет к ухудшению функционирования сухожилия и возрастанию риска повторных травм [23]. В последнее время появились обнадеживающие данные о перспективности применения в лечении повреждений сухожилий МСК [24, 25]. Проведенные нами ранее исследования [26] показали, что применение МСК при лечении травмированного ахиллова сухожилия у экспериментальных животных (крысы) оказывает положительное влияние на восстановление поврежденной ткани, сопровождается проявлением выраженного антиноцицептивного действия. Целью данной работы являлось исследование развития окислительного стресса в организме крыс после травмирования ахиллова сухожилия и влияние на данный процесс клеточной терапии на основе МСК жировой ткани.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на половозрелых белых крысах-самцах линии Wistar массой 230–250 г. Моделирование травмы ахиллова сухожилия осуществляли хирургическим путем в Институте физиологии НАН Беларуси, как описано ранее [26].

Животные были разделены на следующие группы: группа I – крысы с травмой ахиллова сухожилия без лечения ( $n = 24$ ); группа II – крысы с травмой ахиллова сухожилия, которым провели однократную трансплантацию МСК в область травмы ( $n = 24$ ); группа III – интактные животные ( $n = 6$ ).

Выделение, культивирование и характеристику функционального состояния МСК из жировой ткани крыс проводили согласно использованным ранее методам [27]. Введение суспензии МСК осуществляли в условиях седации животного локально в область травмы на первые сутки после нанесения механической травмы ахиллова сухожилия в дозе 250000 клеток на животное.

Перекисное окисление липидов в крови животных оценивали по образованию продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Концентрацию ТБК-активных продуктов оценивали спектрофотометрически, принимая величину коэффициента молярной экстинкции при  $\lambda = 535$  нм равной  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

Для измерения интенсивности автофлуоресценции эритроцитов 5 мкл цельной крови разводили в 3.5 мл изотонического фосфатно-солевого буфера (рН 7.4). Суспензию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II

(Becton Dickinson and Company, США), выделяли гейт эритроцитов на диаграмме прямого/бокового рассеивания и определяли интенсивность флуоресценции эритроцитов в канале FITC. Среднюю интенсивность автофлуоресценции оценивали по результатам анализа 30000 клеток.

Общую антиоксидантную активность (ОАА) плазмы крови определяли по обесцвечиванию катион-радикала 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS) [28]. Образование радикала индуцировали инкубацией данного соединения (7 мМ) в дистиллированной воде в присутствии персульфата калия (2.45 мМ) в течение 10 ч при комнатной температуре. Полученный препарат разводили в 0.02 М натрий-фосфатном буфере (рН 7.3) до получения рабочего раствора с оптической плотностью при 734 нм, равной  $0.70 \pm 0.01$ . К 1.5 мл рабочего раствора добавляли 10 мкл плазмы крови и регистрировали кинетику обесцвечивания радикала ABTS в течение 10 с [29] с использованием спектрофлуориметра CM2203 (SOLAR, Беларусь). ОАА выражали в единицах концентрации антиоксиданта тролокса.

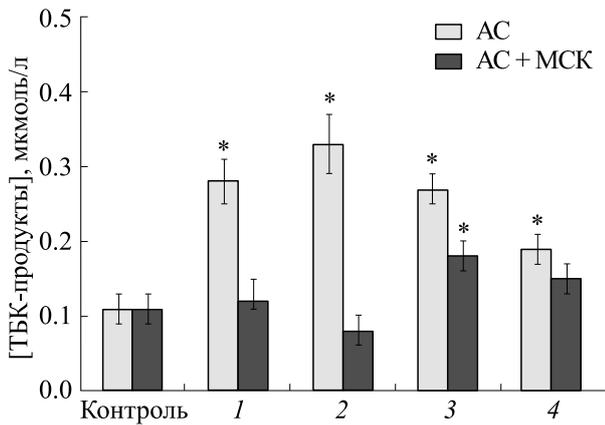
Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel с определением среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего. Статистическую значимость между отдельными экспериментальными группами определяли с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента, принимая значение  $P < 0.05$  как статистически достоверное различие.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

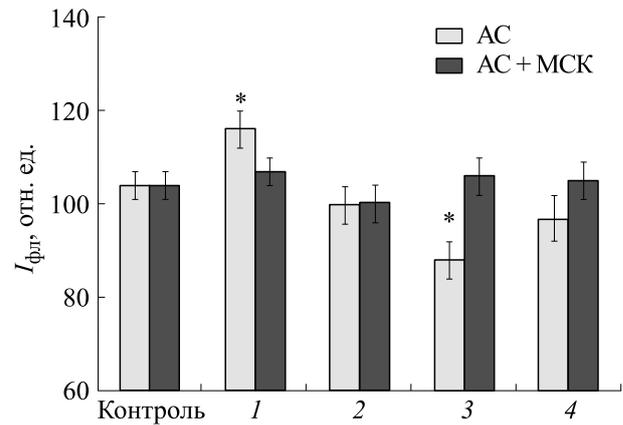
Окислительный стресс в биологических системах индуцируется действием АФК, представляющих собой высоко реакционноспособные соединения, вызывающих окислительные повреждения биологически важных молекул в клетках: нуклеиновых кислот, белков и липидов. Вместе с тем образование АФК в клетках необходимо для реализации ряда важных физиологических процессов и в условиях нормы происходит в определенном диапазоне концентраций, что обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. Сохранение баланса между скоростью образования АФК, их нейтрализацией и восстановлением окисленных продуктов является важнейшим условием для обеспечения функционирования клеток. Нарушение окислительно-антиоксидантного баланса может существенно увеличить содержание АФК в клетках, что ведет к окислительным повреждениям клеточных компонентов и, как следствие, к развитию окислительного стресса.

В общем, окислительный стресс представляет собой сложный, многофакторный процесс, а адекватная его оценка является непростой задачей. Ситуация усложняется тем, что в организме неизбежно запускаются ответные реакции по компенсации неблагоприятного воздействия окислительного стресса. Для оценки развития окислительного стресса регистрируют так называемые маркеры данного процесса. В качестве таких маркеров используют содержание в клетках и тканях продуктов окислительной модификации биомолекул, активность системы антиоксидантной защиты или ее компонентов, оценку функционального состояния клеток и др. [30]. В нашей работе для оценки протекания окислительного стресса в организме экспериментальных животных использовались следующие маркеры: содержание продуктов ПОЛ в крови, интенсивность флуоресценции эритроцитов, общая антиоксидантная активность плазмы крови. Такой подход позволяет охарактеризовать окислительный стресс как на молекулярно-клеточном уровне, так и оценить реакцию на него организма в целом.

**Исследование содержания продуктов перекисного окисления липидов в крови экспериментальных животных.** Определение содержания в крови продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК (ТБК-продукты), является одним из наиболее часто используемых подходов к мониторингу развития окислительного стресса в организме [30]. Проведенные нами исследования показали, что моделирование травмы ахиллова сухожилия приводит к увеличению содержания в крови экспериментальных животных данных продуктов. Как видно из рис. 1, количество ТБК-продуктов увеличивается более чем в два раза через неделю после моделирования и составляет  $0.28 \pm 0.03$  мкмоль/л крови, тогда как у контрольных животных данный показатель равен  $0.11 \pm 0.02$  мкмоль/л. Через две недели наблюдений количество ТБК-продуктов возрастает до  $0.33 \pm 0.04$  мкмоль/л и далее постепенно снижается, приближаясь через четыре недели к значениям контрольных животных ( $0.19 \pm 0.02$  мкмоль/л). Эти данные указывают на увеличение окислительных повреждений липидов и свидетельствуют в пользу развития окислительного стресса в организме животных в результате моделирования травмы ахиллова сухожилия. Окислительная модификация липидов имеет важнейшее значение в проявлении негативных последствий окислительного стресса. Окисление липидов ведет к нарушению целостности мембран клеток и снижению их барьерных свойств, изменению активности мембранно-ассоциированных белков, функционирования липопротеиновых комплексов. Сами продукты окисления липидов (малоновый диальдегид) могут оказывать токсическое действие на клетки.



**Рис. 1.** Содержание ТБК-продуктов в крови крыс в разные сроки после травмы ахиллова сухожилия без (светлые столбики) и с инъекцией МСК (темные столбики). Период наблюдения после моделирования травмы: 1 – 1 неделя, 2 – 2 недели, 3 – 3 недели, 4 – 4 недели; \* –  $p < 0.05$  относительно интактного контроля.

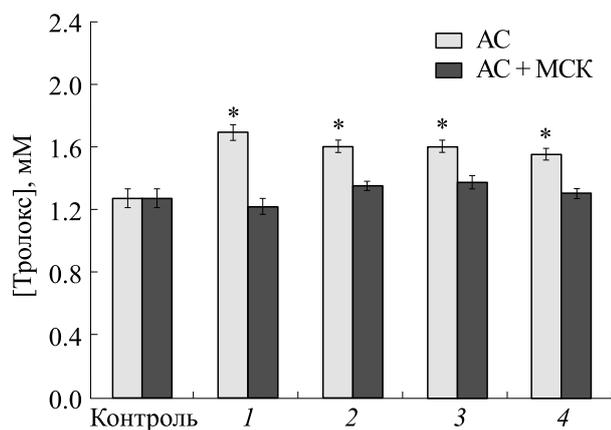


**Рис. 2.** Средняя интенсивность автофлуоресценции в канале FITC проточного цитофлуориметра эритроцитов крови крыс в разные сроки после травмы ахиллова сухожилия без (светлые столбики) и с инъекцией МСК (темные столбики). Период наблюдения после моделирования травмы: 1 – 1 неделя, 2 – 2 недели, 3 – 3 недели, 4 – 4 недели; \* –  $p < 0.05$  относительно интактного контроля.

Измерение содержания продуктов ПОЛ в крови животных с травмированным ахилловым сухожилием и получивших инъекцию МСК в дозе 250000 клеток показало, что в течение первых двух недель посттравматического периода (время интенсивного роста продуктов ПОЛ в крови травмированных крыс без клеточной терапии) данный параметр практически не изменяется и соответствует значениям для контрольной группы (рис. 1). Через три и четыре недели наблюдения содержание продуктов ПОЛ несколько возрастает, но остается ниже по сравнению с травмированными животными без введения клеток. Эти данные указывают на то, что в результате введения МСК окислительные повреждения липидов в ответ на травму ахиллова сухожилия, которые наблюдаются у травмированных животных без инъекции клеток, резко снижаются.

**Исследование интенсивности автофлуоресценции эритроцитов крови экспериментальных животных.** Эритроциты представляют собой основную клеточную фракцию крови, при этом данные клетки проявляют высокую чувствительность к окислительному воздействию. В частности, показано, что интенсивность автофлуоресценции эритроцитов в зеленой области (530 нм), измеренная методом проточной цитофлуориметрии при использовании синего лазера (488 нм) для возбуждения, увеличивается при развитии окислительного стресса в клетках [31, 32]. В экспериментах на мышах установлено, что популяция молодых эритроцитов (до 40 дней) характеризуется значительно более низкой (в полтора-два раза) интенсивностью автофлуоресценции по сравнению с популяцией старых эритроцитов [33]. Хро-

мофорами данной флуоресценции выступают продукты окисления липидов и белков [32, 34]. Как видно из представленных на рис. 2 данных, интенсивность автофлуоресценции эритроцитов изменяется после моделирования травмы ахиллова сухожилия. У контрольных животных данный показатель составляет  $104 \pm 3$  отн. ед. Через неделю после моделирования интенсивность автофлуоресценции при том же режиме измерения возрастает до  $116 \pm 4$  отн. ед. Однако далее она снижается и через три недели принимает минимальное значение ( $88 \pm 4$  отн. ед.). К концу периода наблюдения интенсивность автофлуоресценции повышается. Рост интенсивности автофлуоресценции через неделю после моделирования травмы ахиллова сухожилия указывает на увеличение в эритроцитах продуктов окислительной модификации белков и липидов и свидетельствует в пользу развития окислительного стресса в данных клетках. Наблюдаемое далее снижение интенсивности, очевидно, является следствием изменения популяционного состава эритроцитов, отличающихся интенсивностью флуоресценции. Можно полагать, что в результате развития окислительного стресса в период более одной недели после моделирования травмы ахиллова сухожилия происходит ускоренное элиминации старых эритроцитов из крови из-за накопившихся до критического уровня окислительных повреждений в данных клетках. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о снижении содержания эритроцитов в крови экспериментальных животных через две недели после формирования травмы ахиллова сухожилия на 7.5% и восстановление к исходному уровню к концу периода наблюдения. Очевидно,



**Рис. 3.** Общая антиоксидантная активность в эквиваленте концентрации тролокса плазмы крови крыс в разные сроки после травмы ахиллова сухожилия без (светлые столбики) и с инъекцией МСК (темные столбики). Период наблюдения после моделирования травмы: 1 – 1 неделя, 2 – 2 недели, 3 – 3 недели, 4 – 4 недели; \* –  $p < 0.05$  относительно интактного контроля.

что ускорение элиминации старых эритроцитов приведет к росту в крови доли молодых и снижению средней интенсивности автофлуоресценции в общем пуле клеток. Кроме этого, снижение концентрации эритроцитов в крови может стимулировать эритропоэз, что приведет к еще большему росту доли молодых эритроцитов в крови и еще большему снижению средней интенсивности автофлуоресценции. Снижение оказалось максимальным на третьей неделе посттравматических наблюдений – средняя интенсивность автофлуоресценции эритроцитов травмированных животных оказалась даже ниже, чем у интактных.

Изменение интенсивности автофлуоресценции эритроцитов крови травмированных крыс после введения МСК имеет похожую динамику с изменениями данного параметра у экспериментальных животных без инъекции клеток, однако величина данных изменений значительно ниже. Как видно из рис. 2, через неделю после травмирования ахиллова сухожилия средняя интенсивность автофлуоресценции эритроцитов имеет лишь тенденцию к росту ( $107 \pm 3$  отн. ед.). Минимальная интенсивность наблюдалась через две недели после травмирования ( $100 \pm 4$  отн. ед.). В более поздний посттравматический период интенсивность аутофлуоресценции практически соответствовала значениям для контрольных животных. Эти результаты показывают, что после введения МСК в крови травмированных животных окислительные повреждения эритроцитов менее выражены, а элиминация старых эритроцитов снижена.

**Исследование ОАА плазмы крови экспериментальных животных.** Важной характеристикой состояния организма, особенно при протекании

патологических процессов, индуцирующих окислительный стресс, является активность системы антиоксидантной защиты, т.е. способность тканей и органов противостоять повреждающему действию АФК. Для характеристики антиоксидантной системы крови экспериментальных животных проведено исследование по определению ОАА плазмы крови по ее способности дезактивировать катион-радикал АВТS+. Данный радикал можно получить в лабораторных условиях инкубацией АВТS в присутствии персульфата калия [28]. Особенностью радикала является его относительно высокая стабильность в водных растворах в отсутствие восстановителей, а также оптическая активность в видимом диапазоне, что позволяет определять его концентрацию, регистрируя оптическую плотность стандартными фотометрами. Наиболее часто измерение проводят при длине волны 734 нм, при которой элементы крови оптически неактивны. При добавлении в растворы АВТS+ плазмы крови или таких присутствующих в крови и проявляющих антиоксидантную активность соединений, как токоферол, аскорбат, восстановленный глутатион, билирубин наблюдается обесцвечивание раствора, свидетельствующее о дезактивации радикала [35]. Проведенные нами измерения показали, что ОАА плазмы крови контрольных животных составляет  $1.27 \pm 0.06$  ммоль/л в эквиваленте концентрации тролокса – водорастворимого аналога антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола. Полученное значение коррелирует с ОАА плазмы крови человека, измеренной с использованием данного метода [35]. В крови животных с моделированной травмой ОАА плазмы увеличивается: через неделю после травмирования активность составляет  $1.69 \pm 0.05$  ммоль/л и далее снижается до  $1.55 \pm 0.04$  ммоль/л к концу периода наблюдения. Увеличение ОАА в крови наблюдается и при других патологических состояниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса [36, 37]. Предполагается, что увеличение активности системы антиоксидантной защиты в крови или других тканях при развитии окислительного стресса является ответной реакцией организма, направленной на сдерживание интенсификации окислительных повреждений [38]. Однако следует отметить, что направленность и масштаб изменения активности антиоксидантной системы зависит от вида патологии, интенсивности развития окислительного стресса, длительности его протекания и других факторов.

Определение ОАА плазмы крови у травмированных животных, получивших инъекцию МСК, показало, что данный параметр, как и содержание продуктов ПОЛ в крови и интенсивность флуоресценции эритроцитов, мало изменяется в период наблюдения и остается близкой к ОАА контрольных животных (рис. 3). Полученные результаты указывают на то, что МСК оказывают

защитное действие при развитии окислительного стресса после травмы ахиллова сухожилия, что позволяет сбалансировать ответ организма на усиление окислительных повреждений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о развитии окислительного стресса в организме животных после формирования травмы ахиллова сухожилия. Это проявляется в увеличении содержания в крови продуктов ПОЛ, изменении средней интенсивности автофлуоресценции эритроцитов в зеленой области спектра, увеличении общей антиоксидантной активности в плазме крови в посттравматический период. Применение МСК при экспериментальной травме ахиллова сухожилия в виде локальной инъекции в область повреждения оказывает защитное действие от развития окислительного стресса и позволяет оптимизировать реакцию организма в ответ на интенсификацию окислительных процессов. Эффект проявляется в снижении индуцированных травмированием накопления ТБК-активных продуктов ПОЛ в крови, изменений интенсивности автофлуоресценции эритроцитов и ОАА плазмы крови. В целом полученные результаты расширяют имеющиеся сведения о механизмах терапевтического действия стволовых клеток при лечении патологических состояний травматической этиологии.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. E. Rodríguez-Fuentes, L. E. Fernández-Garza, J. A. Samia-Meza, et al., *Arch. Med. Res.*, **52** (1), 93 (2021).
2. Н. И. Костюк, С. В. Пинчук, И. Б. Василевич и др., *Экология и животный мир*, **1**, 70 (2020).
3. A. Andrzejewska, B. Lukomska, and M. Janowski, *Stem Cells*, **37** (7), 855 (2019).
4. R. M. Samsonraj, M. Raghunath, V. Nurcombe, et al., *Stem Cells Transl. Med.*, **6** (12), 2173 (2017).
5. T. Sun, G. Z. Gao, R. F. Li, et al., *Am. J. Transl. Res.*, **7** (5), 891 (2015).
6. F. C. Goncalves, M. Grings, N. S. Nunes, et al., *Bio-technol. Lett.*, **39** (4), 613 (2017).
7. M. Inan, E. Bakar, A. Cerkezayabekir, et al., *J. Pediatr. Surg.*, **52** (7), 1196 (2017).

8. M. L. Calió, D. S. Marinho, G. M. Ko, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **70**, 141 (2014).
9. M. Ayatollahi, Z. Hesami, A. Jamshidzadeh, and B. Gramizadeh, *Int. J. Organ Transplant. Med.*, **5** (4), 166 (2014).
10. Y. Ge, Q. Zhang, Z. Jiao, et al., *Life Sci.*, **214**, 62 (2018).
11. F. Zahran, A. Nabil, A. E. Karef, et al., *J. Stem Cell Res. Ther.*, **1** (4), 150 (2016).
12. M. Malaquias, L. Oyama, P. Jericó, et al., *Allergol. Immunopathol.*, **46** (2), 136 (2018).
13. Y. Shen, X. Jiang, L. Meng, et al., *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2018**, 5942916 (2018).
14. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39** (1), 44 (2007).
15. A. Phaniendra, D. B. Jestadi, and L. Periyasamy *Indian J. Clin. Biochem.*, **30** (1), 11 (2015).
16. P. Li, H. Zhou, T. Tu, and H. Lu, *J. Orthop. Surg. Res.*, **16** (1), 293 (2021).
17. L. I. Fillipin, J. L. Mauriz, K. Vedovelli, et al., *Lasers Surg. Med.*, **37** (4), 293 (2005).
18. L.-K. Hung, S.-C. Fu, Y.-W. Lee, et al., *J. Bone Joint Surg. Am.*, **95**, e41(1-7) (2013).
19. Y. Liang, K. Xu, P. Zhang, et al., *BMC Musculoskelet. Disord.*, **21** (1), :608 (2020).
20. S.-C. Fu, M.-Y. Yeung, C. G. Rolf, et al., *J. Orthop. Res.*, **36** (12), 3268 (2018).
21. T. A. H. Järvinen, P. Kannus, N. Maffulli, and K. M. Khan, *Foot Ankle Clin.*, **10** (2) 255 (2005).
22. S. T. Clark, M. Zhu, G. D. Gamble, et al., *Inj. Epidemiol.*, **7** (1), 5 (2020).
23. V. Gulati, M. Jaggard, S. S. Al-Nammari, et al., *World J. Orthop.*, **6** (4), 380 (2015).
24. A. de Mattos Carvalho, A. L. G. Alves, P. G. Gomes de Oliveira, et al., *J. Equine Vet. Sci.*, **31**, 26 (2011).
25. C. A. Uysal, M. Tobita, Hyakusoku, and H. Mizuno, *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, **65** (12), 1712 (2012).
26. А.-М. В. Ерофеева, И. П. Жаворонок, О. А. Антипова и др., *Докл. НАН Беларуси*, **64**, 574 (2020).
27. И. Б. Василевич, С. В. Пинчук, Е. С. Лобанок и др., *Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук*, **2**, 82 (2014).
28. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 1231 (1999).
29. A. Balcerczyk, A. Grzelak, A. Janaszewska, et al., *Biofactors*, **17**, 75 (2003).
30. J. Frijhoff, P. G. Winyard, N. Zarkovic, et al., *Antioxid. Redox. Signal.*, **23** (14), 1144 (2015).
31. A. el-Rahman, A. M. A. Hammouda, and A. Fakeir, *Cytometry*, **20**, 19 (1995).
32. E. Nagababu, F. J. Chrest, and J. M. Rifkind, *Free Radic. Biol. Med.*, **29** (7), 659 (2000).
33. S. Khandelwal and R. K. Saxena *J. Biosci.*, **32**, 1139 (2007).
34. E. Nagababu, J. G. Mohanty, S. Bhamidipaty, et al., *Life Sci.*, **86** (3-4), 133 (2010).
35. O. Erel, *Clin. Biochem.*, **37**, 277 (2004).
36. O. Savu, C. Ionescu-Tirgoviste, V. Atanasiu, et al., *J. Int. Med. Res.*, **40** (2), 709 (2012).
37. T. A. Watson, R. Callister, and R. D. Taylor, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **37** (1), 63 (2005).
38. K. Fisher-Wellman, H. K. Bell, and R. J. Bloomer, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2** (1), 43 (2009).

## **Changes in Blood Antioxidant Parameters in Rats with Achilles Tendon Injury Treated by Mesenchymal Stem Cell Therapy**

**S.V. Pinchuk\*, I.B. Vasilevich\*, A.Y. Molchanova\*\*, A.A. Basalai\*\*, and I.D. Volotovskii\***

*\*Institute of Biophysics and Cellular Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,  
Akademicheskaya ul. 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus*

*\*\*Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Akademicheskaya ul. 28, Minsk, 220072, Republic of Belarus*

This study aimed to explore the dynamics of oxidative stress in rats after lesion induction (damage to the Achilles tendon) and elucidate the effects adipose-derived mesenchymal stem cells have on this process after the local injection of these cells at the injury site. The results obtained confirm that oxidative stress is present in animals in the post-traumatic period, as evidenced by elevated blood levels of lipid peroxidation products, a change in the average intensity of autofluorescence of erythrocytes registered by flow cytometry, and an increase in the total antioxidant activity in blood plasma. Our findings indicate that in the process of oxidative stress, mesenchymal stem cells exert a protective effect, thus providing the possibility to balance the body's response to increased oxidative damages. Data collected expand the knowledge of therapeutic mechanisms of action of stem cells in injury treatment.

*Keywords: Achilles tendon injury, oxidative stress, mesenchymal stem cells, cell therapy*

УДК 577.3

## ПЕРОКСИРЕДОКСИН 6 ПРЕДОТВРАЩАЕТ РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОРАЖЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПОЧКИ КРЫСЫ

© 2022 г. А.Е. Гордеева<sup>\*,#</sup>, М.Г. Шарاپов<sup>\*</sup>, Р.Г. Гончаров<sup>\*</sup>, В.И. Новоселов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биофизики клетки — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

<sup>#</sup>E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 12.05.2022 г.

Принята к публикации 17.05.2022 г.

Ишемически-реперфузионное поражение является причиной снижения жизнеспособности донорских органов после длительной консервации. В настоящей работе для повышения устойчивости донорской почки к ишемически-реперфузионному поражению использовали фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6. Для определения эффективности применения пероксиредоксина 6 оценивали морфофункциональные критерии изолированной почки, уровень экспрессии гена для маркера поражения почек КИМ-1 и уровень малонового диальдегида в ткани. Было показано, что холодовая консервация почки в растворе DMEM, неадаптированном под эти цели, приводит к гибели органа при перфузии. Напротив, использование раствора «Кустодиола» позволяет почке пережить эпизод длительной ишемии и перфузии. Комбинирование пероксиредоксина 6 с раствором «Кустодиола» показало лучшие результаты при перфузии. На фоне снижения поражения структур нефрона отмечено падение уровня малонового диальдегида в 2.3 раза, что указывает на нейтрализацию гиперпродукции активных форм кислорода. В четыре раза возрастает скорость выделения мочи, скорость клубочковой фильтрации и количество мочевины в моче, что указывает на сохранение тубулярных структур и подтверждается снижением уровня маркера поражения почек КИМ-1 в полтора раза. Таким образом, использование экзогенного белка-антиоксиданта пероксиредоксина 6 при перфузии повышает устойчивость донорской почки к ишемически-реперфузионному поражению после продолжительной холодовой консервации в растворе «Кустодиола».

*Ключевые слова:* изолированная почка, пероксиредоксины, перфузия.

DOI: 10.31857/S0006302922040172, EDN: IUYPNA

В современном мире наиболее оптимальным методом заместительной почечной терапии является трансплантация самой почки. Одной из важных задач трансплантологии является сохранение органов и тканей вне организма физиологически полноценными и пригодными для практического применения в течение длительного срока. Для уменьшения повреждений донорских почек в клинической практике широко используют статическую холодовую консервацию и гипотермическую пульсационную аппаратную перфузию. Стандартными консервирующими растворами, которые сейчас применяют при взятии донорских органов (в частности донорской почки) являются Celsior, раствор Висконсинского университета (UW) и «Кустодиол» [1]. Несмотря на консервацию, в любом эксплантационном органе

развивается целый каскад патобиологических процессов, при этом отсутствие кровотока и дефицит кислорода в ткани играют ведущую роль. Второй повреждающий компонент — реперфузия, которая многократно усиливает ущерб, нанесенный при ишемии. Ишемически-реперфузионное (И-Р) поражение вызвано в первую очередь гиперпродукцией активных форм кислорода, ростом свободнорадикальных процессов в донорских тканях и повреждением их структуры. Это осложнение возникает практически всегда и является основной причиной первичной дисфункции трансплантата и снижения его жизнеспособности [2–5]. В связи с этим основным направлением в трансплантации может стать применение высокоэффективных ферментов-антиоксидантов, направленных на подавление гиперпродукции активных форм кислорода в клетках/тканях.

*Сокращения:* И-Р — ишемия-реперфузия, Ptx6 — пероксиредоксин 6, МДА — малоновый диальдегид.

Среди множества ферментов антиоксидантного действия наибольший интерес представляет семейство пероксиредоксинов. Эти ферменты широко распространены в организме, многофункциональны и играют важную роль в гомеостазе редокс-статуса [6–9]. Среди представителей семейства пероксиредоксин 6 (Ргх6) обладает идеальными антиоксидантными свойствами (широкий спектр нейтрализуемых гидропероксидов) и одновременно имеет высокую биодоступность благодаря способности проникать в клетки, повышая их антиоксидантный статус [10]. Неоднократно было показано, что Ргх6 – эффективный терапевтический агент при свободнорадикальных патологиях [11–15], в том числе для preconditionирования трансплантата сердца у крыс [16]. Целью данного исследования была оценка возможности применения Ргх6 в перфузионных растворах для повышения устойчивости донорской почки к И-Р-поражению.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 230 г.

Рекомбинантный Ргх6 был получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН по ранее описанной методике. Пероксидазная активность Ргх6 составляет 200 нмоль/мг/мин по  $H_2O_2$  и 100 нмоль/мг/мин по трет-бутилпероксиду.

**Перфузия изолированной почки.** Модель перфузии изолированной почки включала стадии эксплантации почки, хранения почки в консервационном растворе, этап перфузии изолированного органа.

**Эксплантация почки.** Перед началом операции крысы были наркотизированы путем внутривенного введения 0.5 мл 3.5%-го (3 мг/кг) золетила 100 (Virbac Sante Animale, Франция). Гепарин (5000 ЕД/мл) использовали для предотвращения тромбозов. После декапитации животного в течение 5 мин проводили изолирование правой почки от общей сосудистой системы путем последовательного наложения лигатур на сосуды и катетеризацию почечной артерии через брюшную аорту. Проводили отсечение нижней полой вены. Правый мочеточник был изолирован и катетеризован [12, 17]. Удаляли кровь из сосудистого русла изолированной почки путем ее перфузии раствором «Кустодиола» (Dr. Franz Kohler Chemie GMBH, Германия) ( $t^0 = 5–8^\circ C$ ) в течение 5–8 мин. Скорость перфузии 3 мл/мин, давление 90–110 мм рт. ст. (в месте ввода каноли в корень почечной артерии). По окончании санации кровяного русла почку эксплантировали и помещали в стерильную емкость с раствором «Кустодиола». Емкость обкладывали льдом и далее хранили поч-

ку в течение 6 ч,  $t^0 = 4^\circ C$ . Общее время ишемии составляло 6 ч.

**Этап перфузии.** После ишемии изолированная почка была перфузирована перфузионным буферным раствором DMEM (GIBCO-Invitrogen, США) с содержанием глюкозы 1.0 г/л. В DMEM включали мочевины (5 мМ/л) и креатинин (80 мкМ/л). Перед перфузией раствор оксигенировали смесью  $O_2/CO_2$  (95%/5%), рН 7.4,  $t^0 = 35–37^\circ C$ .

Для определения эффектов Ргх6 в 10 мл перфузионного буфера DMEM добавляли Ргх6 в концентрации 0.2 мг/мл и перфузировали им изолированную почку на начальном этапе перфузии в течение 5 мин. Скорость перфузии на данном этапе – 3 мл/мин.

Общее время перфузии изолированной почки – 50 мин. Скорость от 6 до 10 мл/мин, что соответствовало перфузионному давлению 90–100 мм рт. ст. В течение всего срока перфузии каждые 10 мин осуществляли сбор мочи из мочеточника. По окончании перфузии почечную ткань использовали для дальнейшего исследования.

Животные были разделены на три группы по 10 особей: 1) для холодной статической консервации изолированной почки использовали среду DMEM; 2) использовали раствор «Кустодиола»; 3) использовали раствор «Кустодиола» и на начальном этапе перфузии Ргх6. В группах анализировали морфологические, функциональные и биохимические показатели почки через 50 мин перфузии.

**Гистология и морфометрия.** Гистологические исследования проводили на парафиновых срезах почечной ткани, окрашенных гематоксилин-эозином (VITROSTAIN Biovitrum, Россия). Микроскопический анализ проводили на микроскопе Leica DM 6000 с цифровой камерой Leica DFC 490. Морфометрическое исследование паренхиматозных структур почки проводили с помощью стандартной программы для анализа на микроскопе Leica DM 6000.

**Анализ критериев функционирования изолированной почки.** Определяли [18]: 1) перфузионное давление, которое поддерживали на уровне 90–100 мм. рт. ст и регулировали изменением скорости перфузии; 2) скорость выделения мочи; 3) скорость клубочковой фильтрации [12, 19]; 4) потребление глюкозы [12, 18, 19]; 5) количество мочевины в моче [12]. Концентрацию креатинина и мочевины в исследуемых пробах мочи определяли на приборе Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария), концентрацию глюкозы – на глюкометре Accu-Chek (Roche, Германия).

**Определение уровня малонового диальдегида в почечной ткани.** Уровень малонового диальдегида

(МДА), отражающий степень перекисного окисления липидов в почечных тканях, определяли с помощью 1-метил-2-фенилиндола (Sigma-Aldrich, США) по методике, описанной в работе [20].

**Определение уровня мРНК гена КИМ-1 в почечной ткани.** Уровень экспрессии гена КИМ-1 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Общую РНК из образцов почечной ткани получали с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия). Для обратной транскрипции использовали по 2 мкг общей РНК, обратную транскриптазу MMLV («Евроген», Россия) и стандартный олигонуклеотид dT<sub>15</sub>. Полученную кДНК использовали для ПЦР с ген-специфическими олигонуклеотидами:

rKIM1-F (5'-ATGGGCTCTCTGAGCTTTGT-3'),  
rKIM1-R (5'-GATGCACAATCGCTGCGTTC-3').

Для нормирования результатов использовали housekeeping ген Rplp2 (60S acidic ribosomal protein P2) с соответствующими олигонуклеотидами:

Rplp2-F (5'-CTCAACAAGGTCATCAGTGA-3'),  
Rplp2-R (5'-AGCAGAAACAGCCACAGCCCCAC-3').

ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе «DTprime» («ДНК-Технология», Россия) с использованием HSTaq ДНК полимеразы и интеркалирующего красителя SYBR GreenII («Евроген», Россия). Определение значений порогового цикла *Ct* проводили с помощью программного обеспечения «ДНК-Технология» (Россия). Расчет  $\Delta\Delta Ct$  проводили по формуле  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Контроль}) - \Delta Ct(\text{опыт})$ . Каждое значение  $\Delta Ct$  рассчитывали, как  $\Delta Ct = Ct(\text{КИМ-1}) - Ct(\text{Rplp2})$  [21].

**Электрофорез и иммуноблоттинг.** Ткань почек гомогенизировали, центрифугировали и супернатант использовали для электрофореза в полиакриламидном геле и последующего переноса на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Amersham, США). Пробы нормировали по концентрации белка. Выявление КИМ-1 проводили с помощью первичных кроличьих антител к белку КИМ-1 (Cell Signaling Technology, США), вторичные антитела – иммуноглобулины кролика («ИМТЭК», Россия), конъюгированные с пероксидазой хрена. Связавшиеся антитела детектировали с помощью набора для хемилюминесцентной детекции Novex ECL (Invitrogen, США) на установке iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific, США).

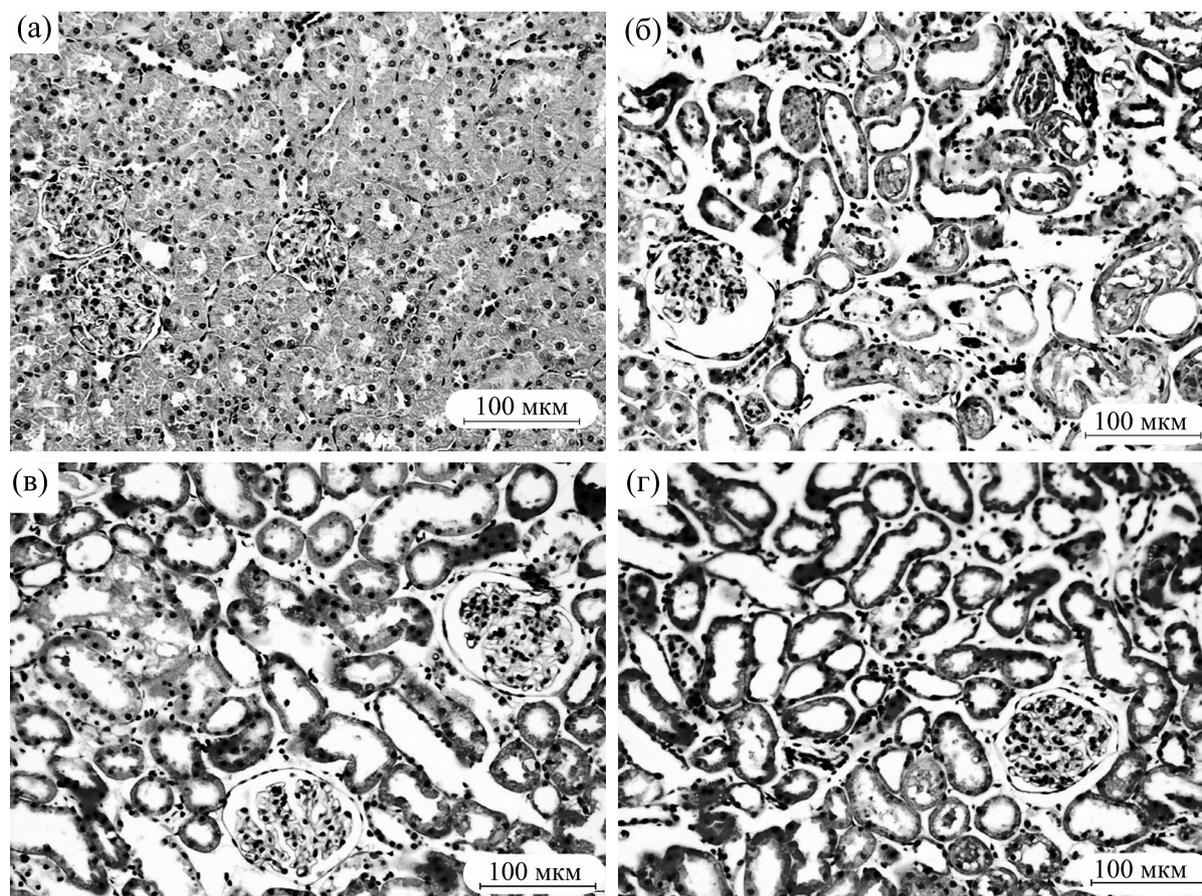
Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения SigmaPlot 11.0 Software (Systat Software Inc., США). Результаты выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Значение  $P < 0.05$  принимали статистически достоверным.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологические показатели.** После шестичасовой консервации и последующей перфузии изолированной почки наблюдается повреждение нефронов и изменение общей архитектуры почечной паренхимы во всех экспериментальных группах по сравнению с интактным контролем (рис. 1). В морфометрическом аспекте отмечено увеличение площади капсулы Боумена и площади ее просвета, а также изменение архитектуры извитых каналов, особенно дистальных (рис. 2). Наибольшее поражение в структуре нефронов отмечено при использовании DMEM в качестве консервационного раствора (группа 1) (рис. 1б). В корковом слое почки к концу перфузии наблюдается полное разрушение структуры 60% нефронов. Для сохраненных нефронов отмечено увеличение площади капсулы Боумена и площади ее просвета (рис. 2а). В извитых канальцах наблюдается дистрофия эпителия и расширение канальцев, особенно дистальных (рис. 2б). Просвет канальцев заполнен гомогенными массами и клеточным мусором. При использовании раствора «Кустодиола» (группа 2) отмечено снижение повреждения нефронов по сравнению с группой 1 (рис. 1в): уменьшение площади капсулы Боумена и площади ее просвета в 1.3 раза (рис. 2а); уменьшение очагов дистрофии и десквамация эпителия в извитых канальцах (рис. 1в). Морфометрия сохраненных извитых канальцев в группе 1 и 2 достоверно не отличается (рис. 2б). В условиях использования RxB морфология нефронов сходна с группой 2 (рис. 1г), однако в морфометрическом аспекте отмечается уменьшение площади капсулы Боумена и площади ее просвета в 1.2 и 1.7 раза; для дистальных каналов – уменьшение внутреннего диаметра в 1.3 раза (рис. 2).

**Функциональные показатели донорской почки.** Введение RxB в перфузионный раствор приводит к улучшению функциональных показателей донорской почки по сравнению с другими группами к концу перфузии. На фоне снижения в полтора раза скорости перфузии в четыре раза возрастают скорость клубочковой фильтрации, скорость выделения мочи и количество мочевины в моче. При консервации в растворе «Кустодиола» и DMEM показатели не отличаются. При использовании DMEM не отмечено потребления глюкозы изолированной почкой (рис. 3).

**Уровень МДА в тканях почек.** Оценка уровня перекисного окисления липидов в ренальной ткани показала, что после шестичасовой консервации изолированной почки в растворе DMEM (группа 1) и последующей перфузии изолированной почки наблюдается двадцатикратный рост уровня МДА относительно контроля. Использование для консервации почки раствора «Кустодиола» снижает уровень МДА в семь раз относи-



**Рис 1.** Ткань изолированной почки после шестичасовой консервации и последующей перфузии: (а) — контроль; (б) — для консервации использовали среду DMEM; (в) — для консервации использовали раствор «Кустодиола»; (г) — для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Rgh6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии.

тельно показателей в группе 1. Комбинирование рекомбинантного Rgh6 с раствором «Кустодиола» снижает уровень МДА более чем в 15 раз относительно показателей в группе 1, что указывает на мощное антиоксидантное действие экзогенного Rgh6 (рис. 4).

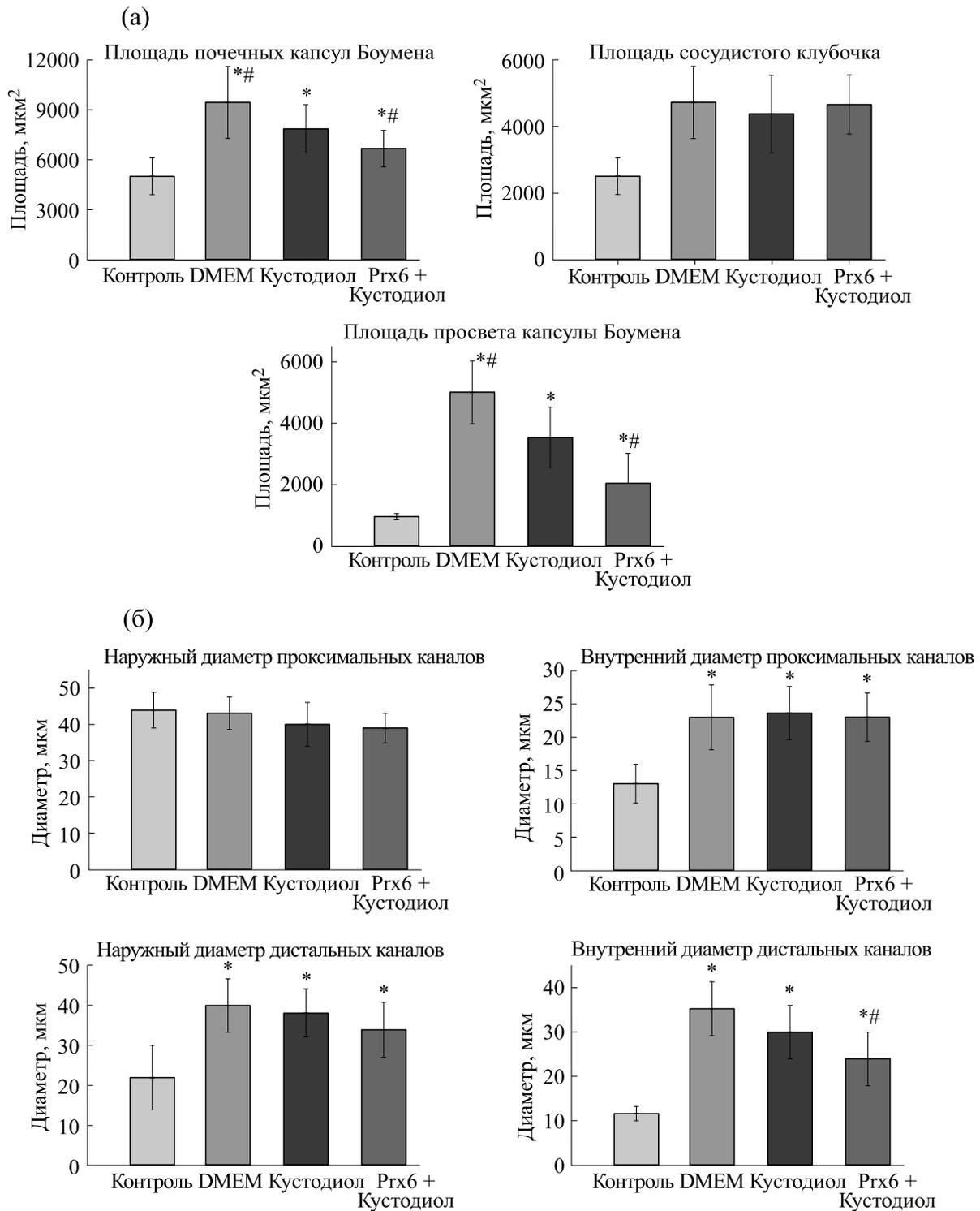
**Экспрессия КИМ-1.** Оценка уровня мРНК гена КИМ-1 показала, что после шестичасовой консервации изолированной почки в растворе DMEM (группа 1) и последующей перфузии изолированной почки наблюдается рост экспрессии этого гена в 2.5 раза. При этом консервация изолированной почки в растворе «Кустодиола» или комбинирование рекомбинантного Rgh6 с раствором «Кустодиола» достоверно снижают экспрессию гена КИМ-1 до значений контрольной почки (рис. 5). Иммуноблоттинг почечной ткани показал примерно двенадцатикратный рост уровня белка КИМ-1 после шестичасовой консервации изолированной почки в растворе DMEM. При этом консервация изолированной почки в растворе «Кустодиола» или комбинирование рекомбинантного Rgh6 с раствором «Кустодиола» приво-

дила к значимому снижению уровня белка КИМ-1 (рис. 6), как и в случае с мРНК.

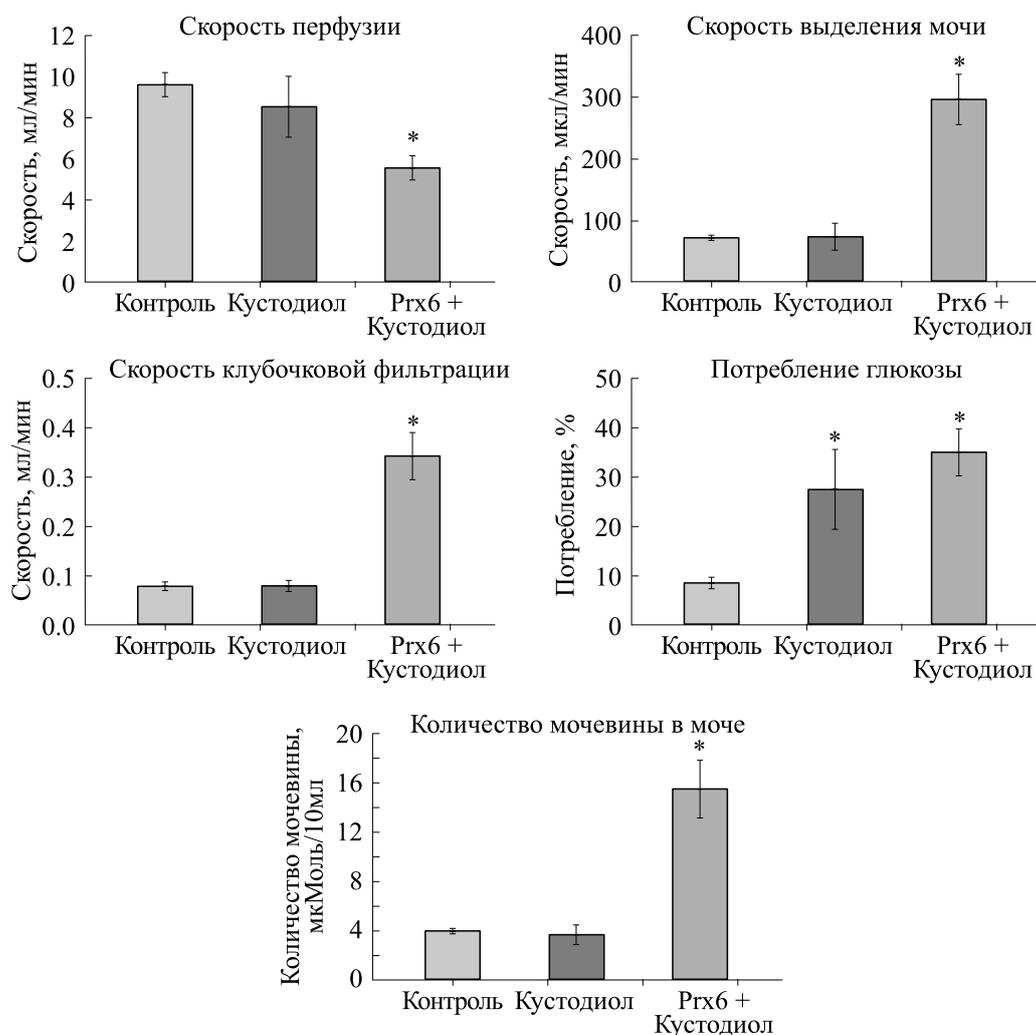
## ОБСУЖДЕНИЕ

Одна из важных задач трансплантологии — донести почечный аллограф от донора к реципиенту с минимальными повреждениями. Для решения этой задачи обычно используют консервационные растворы Celsior, раствор Висконсинского университета (UW) или «Кустодиол», которые должны обеспечивать защиту трансплантата от отека, служить буфером для поддержания баланса pH, нести энергетические субстраты для жизнедеятельности клеток, а также обеспечивать защиту от И-Р-поражения. Однако повреждение, опосредованное консервацией, является основным фактором, способствующим ранней дисфункции трансплантата. Исследователи называют И-Р-повреждение основной причиной ранней дисфункции трансплантата [1–4].

В данной работе мощный фермент-антиоксидант Rgh6 был использован для предотвращения



**Рис 2.** (а) – Морфометрические показатели капсулы Боумена; (б) – морфометрические показатели извитых канальцев почки после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Prx6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Prx6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.05$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно раствора «Кустодиола».



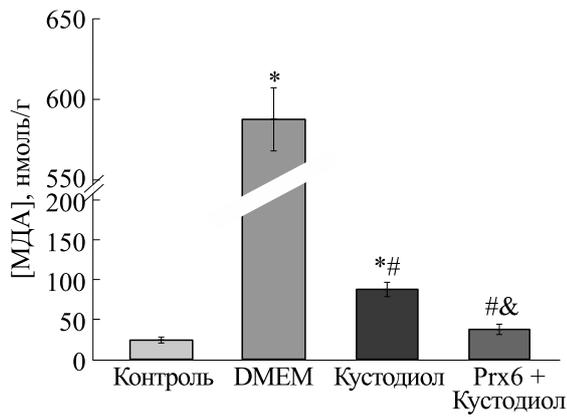
**Рис. 3.** Показатели функционирования почки после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Prx6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Prx6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.05$  относительно DMEM.

свободнорадикального повреждения почечного трансплантата при И-Р. Ранее было показано, что экзогенный Prx6 эффективен в повышении антиоксидантного статуса в тканях при свободнорадикальных патологиях [11–15]. Использование Prx6 для защиты изолированных органов от реперфузионного поражения – новое направление. Экспериментальные исследования показали, что Prx6 эффективен в предупреждении реперфузионных поражений изолированного сердца и его сохранении при трансплантации [16]; показана эффективность Prx6 на коротких сроках тепловой ишемии при перфузии изолированной почки синтетическими средами [12].

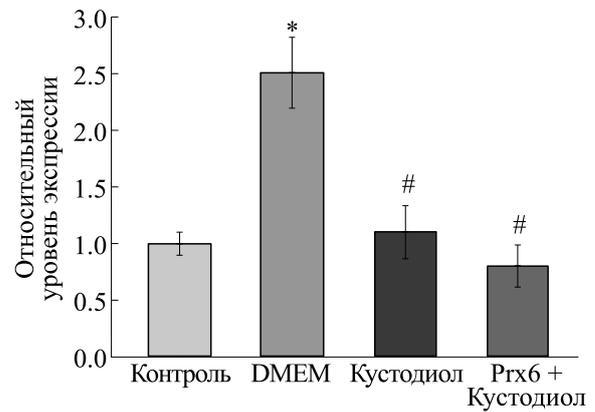
В настоящей работе мы сравнивали состояние изолированной почки при ее перфузии после холодной шестичасовой консервации в различных растворах. Использовали питательную среду

DMEM, которая не предназначена для целей консервации, стандартный консервационный раствор «Кустодиола», который продлевает устойчивость органов к гипоксии, и стандартный консервационный раствор «Кустодиола» в комбинации с антиоксидантным белком-ферментом Prx6.

Реперфузионное поражение было максимальным после использования в качестве консервационного раствора среды DMEM. Это полное разрушение структуры 60% нефронов на фоне глобального окислительного стресса, на что указывал двадцатикратный рост уровня МДА. Напротив, использование раствора «Кустодиола» существенно снижало уровень МДА, поражение нефронов и в итоге уменьшало выраженность реперфузионного поражения почечной паренхимы на этом фоне.



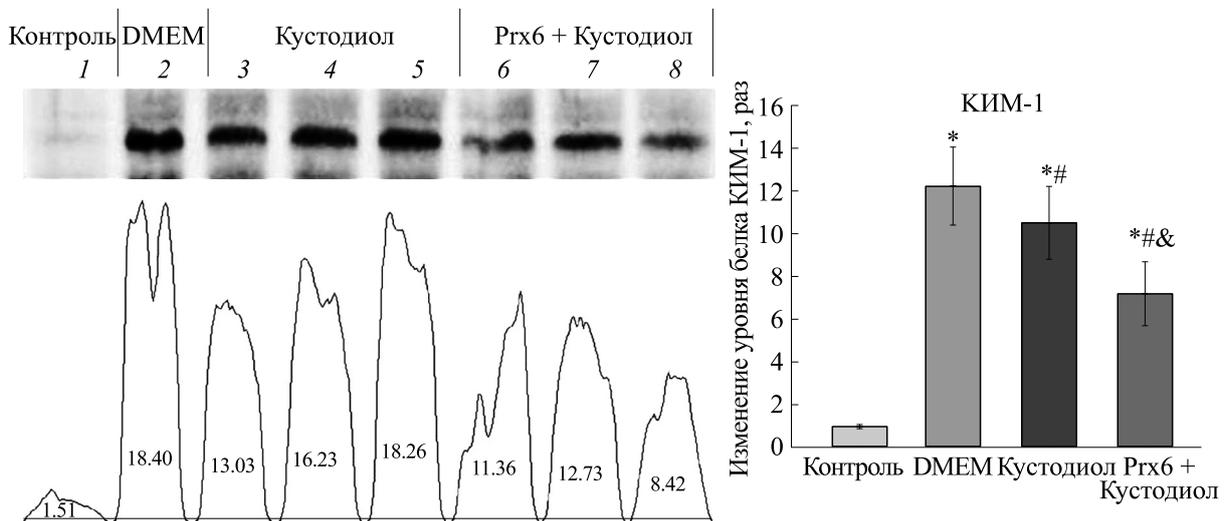
**Рис. 4.** Уровень МДА в тканях почек после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Ргх6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Ргх6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.01$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно DMEM, & –  $p < 0.05$  относительно DMEM и «Кустодиола».



**Рис. 5.** Изменение уровня мРНК гена КИМ-1 в тканях почек после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Ргх6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Ргх6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.05$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно DMEM.

С другой стороны, после использования DMEM и раствора «Кустодиола» функциональные и морфометрические показатели изолированной почки не отличались. При использовании DMEM такая ситуация может быть отражением активного компенсаторно-приспособительного процесса только для сохранившихся структур нефронов. В пользу поражения тубулярных

структур нефронов указывает отсутствие потребления глюкозы почкой, увеличение как уровня белка КИМ-1 в ренальной ткани, так и уровня экспрессии гена этого белка. Белок КИМ-1 является чувствительным маркером почечного повреждения, а уровень его экспрессии возрастает именно в проксимальном тубулярном эпителии при поражении. По-видимому, индукция синтеза



**Рис. 6.** Иммуноблоттинг почечных тканей на белок КИМ-1 после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Ргх6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Ргх6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.01$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно DMEM, & –  $p < 0.05$  относительно DMEM и «Кустодиола».

КИМ-1 является адаптивным ответом на повреждение почечных канальцев [22, 23].

Значительно большее улучшение состояния изолированной почки было отмечено при ее консервации в растворе «Кустодиола» в комбинации с антиоксидантным белком-ферментом R<sub>gh</sub>6, который использовали на начальном этапе перфузии. На это указывает уменьшение очагов поражения структур нефрона, что приводит к росту функциональных показателей изолированной почки. Рост показателей скорости перфузии, скорости клубочковой фильтрации и количества мочевины в моче указывает на улучшение процессов фильтрации, секреции и реабсорбции ультрафильтрата при использовании R<sub>gh</sub>6. Рост количества мочевины в моче напрямую указывает на наличие процессов транспорта этого метаболита через функциональные проксимальные и тонкие канальцы. Сохранение морфологии и функциональности тубулярных структур подтверждается снижением уровня экспрессии генов для маркера повреждения почек КИМ-1 и падением уровня самого белка КИМ-1 в ренальной ткани. Защитный эффект R<sub>gh</sub>6 объясняется прежде всего его мощными антиоксидантными свойствами – торможение развития окислительного стресса в начальный период перфузии, на что указывает значительное снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов в паренхиме изолированной почки при его применении. Именно с началом реперфузии наблюдается развитие окислительного стресса, что приводит к максимальному поражению ткани, в связи с этим принципиально использование антиоксидантов на данном этапе [24].

С антиоксидантными свойствами R<sub>gh</sub>6 прежде всего связывают его пероксидазную активность, которая позволяет нейтрализовать гиперпродукцию активных форм кислорода, образующихся при И-Р-поражении органов [9, 11, 14]. Тем не менее, R<sub>gh</sub>6 – полифункциональный белок, который не только является антиоксидантом, но и участвует во многих процессах в клетке [7, 8, 10]. В связи с этим можно предположить, что реализация R<sub>gh</sub>6 своих протекторных функций для повышения устойчивости донорской почки к И-Р-поражению связана не только с его антиоксидантными свойствами.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Для получения микрофотографий, представленных в публикации, было использовано оборудование, предоставленное Сектором оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Пущинского научного центра биологических исследований РАН № 075-01512-22-00.

#### 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. Основным документом, регламентирующим проведение исследования, являлось «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 39 от 04.12.2018 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Kable, A. Alcaraz, K. Budde, et al., *Клинические рекомендации Европейской Ассоциации Урологов* (перевод с англ под ред. Д. В. Перлина) (АБВ-Пресс, М., 2010).
2. R. Anaya-Prado and J. A. Delgado-Vázquez, *Curr. Opin. Organ. Transplant.*, **13** (2), 129 (2008).
3. Д. В. Артемов и А. Б. Зулькарнаев. *Практическая медицина*, **16** (9), 28 (2018).
4. С. Ф. Багненко, Ю. Г. Мойсюк, А. Е. Скворцов и др., *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*, **11**(3), 17 (2009).
5. E. Y. Plotnikov, A. V. Kazachenko, M. Y. Vyssokikh, et al., *Kidney Int.*, **72** (12), 1493 (2007).
6. S. G. Rhee, *Mol. Cells*, **39** (1), 1 (2016).
7. Z. A. Wood, E. Schröder, J. R. Harris, et al., *Trends Biochem.*, **28** (1), 32 (2003).
8. M. G. Sharapov, V. K. Ravin, V. I. Novoselov, *Mol. Biol. (Moscow)*, **48** (4), 600 (2014).
9. M. G. Sharapov, S. V. Gudkov, V. Z. Lankin, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **86** (11), 1418 (2021).
10. M. G. Sharapov, O. V. Glushkova, S. V. Parfenyuk, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830 (2021).
11. R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.*, **378** (2), 319 (2019).
12. А. Е. Гордеева, М. Г. Шарапов и В. И. Новоселов, *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*, **23** (3), 122 (2021).
13. E. G. Novoselova, O. V. Glushkova, S. M. Lunin, et al., *J. Immunopathol. Pharmacol.*, **35**, 20587384211005645 (2021).
14. М. Г. Шарапов, А. Е. Гордеева, Р. Г. Гончаров и др., *Биофизика*, **62** (6), 998 (2017).
15. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, S. V. Gudkov, *Antioxidants (Basel)*, **8** (1), 15 (2019).

16. Н. В. Грудинин, В. К. Богданов, М. Г. Шарапов и др., Вестн. трансплантологии и искусственных органов, **22** (2), 158 (2020).
17. J. Czogalla, F. Schweda, and J. Löffing, J. Vis. Exp., **117**, e54712 (2016). DOI: 10.3791/54712
18. D. R. Taft, Curr. Drug Discov. Technol., **1**, 97 (2004).
19. H. H. Chang, B. Choong, A. Phillips, et al., Exp. Anim., **62** (1), 19 (2013).
20. D. Gérard-Monnie, I. Erdelmeier, K. Régnard, et al., Chem. Res. Toxicol., **11** (10), 1176 (1998).
21. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, Nat. Protocol., **3** (6), 1101 (2008).
22. J. V. Bonventre, Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc., **125**, 293 (2014).
23. T. Ichimura, C. R. Brooks, and J. V. Bonventre, Kidney Int., **81** (9), 809 (2012).
24. A. E. Gordeeva, M. G. Sharapov, I. V. Tikhonova, et al., Cells Tissues Organs, **203** (6), 353 (2017).

## Peroxiredoxin 6 Prevents Reperfusion Injury to Isolated Rat Kidney

A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, R.G. Goncharov, and V.I. Novoselov

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

Ischemia-reperfusion injury causes reduction in viability of donor organs following long-term conservation. In the present study, peroxiredoxin 6 as an antioxidant enzyme was used to increase resistance of a donor kidney to IR injury. To find out the efficiency of peroxiredoxin 6 application, morphological and functional evidence of the isolated kidney, the expression level of kidney injury molecule-1 (KIM-1) as a marker of kidney damage and malonic dialdehyde level in the tissue were evaluated. It was shown that cold storage of the kidney in DMEM solution, that was not customized, resulted in organ death during perfusion. In contrast, the use of Custodiol solution allowed the kidney to survive the episode of prolonged ischemia and perfusion. The combination of peroxiredoxin 6 with Custodiol solution led to better outcome over perfusion. Along with decreased damage to nephron structures, a 2.3-fold reduction of the malonic dialdehyde level was registered, this finding suggests neutralization of reactive oxygen species hyperproduction. The urinary flow rate, glomerular filtration rate and the amount of urea in the urine increase fourfold, thereby indicating that tubular structures are preserved, as confirmed by a 1.5-fold decrease in the level of KIM-1. Thus, the use of peroxiredoxin 6, the exogenous antioxidant protein, during perfusion increases resistance of the donor kidney to ischemia-reperfusion injury after prolonged cold storage in Custodiol solution.

*Keywords: isolated kidney, peroxiredoxins, perfusion*

## АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО НИКОТИНАМИДА НА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

© 2022 г. М.В. Васин<sup>\*,#</sup>, Л.А Ильин<sup>\*\*</sup>, И.Б. Ушаков<sup>\*\*</sup>

*\*Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России,  
123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1*

*\*\*Государственный научный центр – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА  
России, 123182, Москва, ул. Живописная, 46*

*#E-mail: mikhail-v-vasin@yandex.ru*

Поступила в редакцию 24.01.2022 г.

После доработки 31.01.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

На основе современных знаний о влиянии никотинамида на метаболические процессы проведена оценка потенциальных механизмов реализации его нейропротекторного действия в условиях острой летальной кратковременной гипоксии. На фоне развития воспалительной реакции при травме или ишемии головного мозга обращено внимание на роль митохондриальной дисфункции и эксайтотоксичности с последующей дегенерацией аксонов и апоптозом нейроцитов и нейроглии. Снижение в клетках уровня АТФ при воздействии гипоксии отражается на генерации митохондриального мембранного потенциала, способствует повышению мембранной проницаемости, выходу из митохондрий НАД, поступлению натрия в клетку и развитию внутриклеточного отека. Активация поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1, индуцируемая повреждениями ДНК при реоксигенации, снижает в клетке уровень НАД как субстрата ее реакции и тем самым вызывает дисфункцию дыхательного митохондриального комплекса. В больших дозах никотинамид обладает нейропротекторными свойствами при травматических повреждениях головного мозга, ишемии и инсульте, а также при нейродегенеративных заболеваниях – болезнях Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона. Принято считать, что нейропротекторное действие никотинамида, во-первых, связано с тем, что он, являясь субстратом для синтеза никотинамидмононуклеотида и далее НАД<sup>+</sup>, может поддерживать и предотвращать его снижение в условиях острой гипоксии. Во-вторых, никотинамид, являясь блокатором поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1, тем самым также может обеспечивать необходимый уровень НАД<sup>+</sup> в клетке, снижая его реализацию в реакциях с данной полимеразой. В-третьих, никотинамид, будучи субстратом для синтеза НАД<sup>+</sup>, поддерживает НАД<sup>+</sup>/НАДН-комплекс, важный для функционирования антиоксидантной системы дыхательной митохондриальной цепи в условиях острой гипоксии. Высказывается сомнение, что отмеченные механизмы достаточны для реализации действия никотинамида по той причине, что не выявлено снижения уровня НАД в митохондриях в условиях кратковременной летальной гипоксии во время гибели животных в течение ее воздействия. Рассмотрен вариант реализации действия никотинамида через ГАМК/бензодиазепиновые рецепторы, вызывающие торможение активации глутаматных рецепторов нейроцитов при острой гипоксии. При воздействии гипоксии происходит избыточная гиперактивация глутаматных рецепторов и развитие острой клеточной гипоксии, влекущей за собой гибель клеток от перевозбуждения (эксайтотоксичности). Никотинамид снижает гибель нейроцитов от эксайтотоксичности, воздействуя на бензодиазепиновые рецепторы. Таким путем ГАМК-агонисты препятствуют реализации действия глутамата при реализации эксайтотоксичности.

*Ключевые слова: никотинамид, НАД, поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1, ГАМК-агонисты, острая гипоксия головного мозга, нейропротекторы.*

**DOI:** 10.31857/S0006302922040184, **EDN:** IUZABU

Никотинамид и никотиновая кислота относятся к группе витаминов В, важных для функци-

*Сокращения: АФК – активные формы кислорода, PARP-1 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1.*

онирования центральной и периферической нервной системы [1]. В больших дозах никотинамид обладает нейропротекторными свойствами при травматических повреждениях головного мозга, ишемии и инсульте, а также при нейроде-

генеративных заболеваниях: болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [2]. Как витамин В3, он применяется в дозе 20 мг, в лечебных целях — в больших дозах (0.5–5.0 г) [3]. Предложены возможные косвенные пути реализации действия никотинамида, снижающие проявления вторичного каскада эффектов тканевого повреждения головного мозга (воспаление, генерация свободных радикалов, гибель нейроцитов от эксайтотоксичности и другие) [4]. Тем не менее, при многовекторности эффекта никотинамида в организме нет полной ясности по механизму его нейропротекторных свойств с учетом конкретных сценариев патологии и его фармакодинамики по тем или иным проявлениям фармакологического действия препарата. Представленный краткий обзор посвящен анализу возможных потенциальных механизмов реализации нейропротекторных свойств никотинамида в условиях острой кратковременной летальной гипоксии.

### ЧЕРТЫ ПАТОФИЗИОЛОГИИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Общая картина повреждения острой гипоксией ткани головного мозга отличается ролью митохондриальной дисфункции, перевозбуждением нейроцитов (эксайтотоксичностью), генерацией восстановительного и окислительного стресса с последующим развитием воспалительной реакции, дегенерации аксонов и гибелью клеток [5–7]. Характерной чертой головного мозга является его высокое энергопотребление, превышающее в десятки раз энергопотребление других тканей. При отсутствии поступления кислорода в мозг человек теряет сознание в течение 15–45 с [5, 8]. По этой же причине может наступить смерть организма при различных заболеваниях вследствие энергетической остановки функционирования головного мозга.

Первый основной признак проявления острой тканевой гипоксии — резкое снижение в клетках уровня АТФ, последующее снижение активности К/Na-АТФазы в ближайшие несколько минут, нарушение мембранного ионного градиента с избыточным поступлением в клетку натрия и выходом из нее ионов калия и глутамата. Повышение мембранной проницаемости отражается на генерации митохондриального мембранного потенциала, способствует выходу из митохондрий  $\text{НАД}^+$  и калия, и, как итог, избыточному поступлению в клетку и митохондрии кальция. Данные процессы сопровождаются ускорением потока электронов, ростом свободно-радикальной активности и развитием цитотоксического отека [5, 9, 10].

Недостаток кислорода приводит к затруднениям рециклизации в цикле Кребса в паре

$\text{НАДН}/\text{НАД}^+$ , без чего невозможна генерация АТФ. В митохондриях увеличивается уровень восстановленного  $\text{НАДН}$  и других восстановительных эквивалентов с развитием восстановительного стресса. Адаптивные процессы, поддерживающие перенос электронов через комплекс II дыхательной цепи путем использования кетоглутаратдегидрогеназного комплекса с участием сукцинил- $\text{CoA}$ , могут обеспечивать окислительное фосфорилирование при умеренной степени гипоксии [11–13]. Снижение окисления сульфидов, участвующих в переносе электронов в дыхательной цепи, приводит к аккумуляции сульфидов. Избыток сульфидов при пролонгации гипоксического состояния способствует активации продукции  $\text{NO}$  и активных форм кислорода (АФК), которые вместе с сульфидами вызывают расщепление окислительного фосфорилирования и подавление клеточного дыхания [14]. Окислительный стресс в процессе реоксигенации снижает уровень основного в клетке антиоксиданта восстановленного глутатиона и подавляет антиоксидантную систему митохондрий с последующей гипероксидацией  $\text{НАД}^+$  и снижением ее содержания в ткани [15].

Образующиеся перекисные продукты вызывают в том числе повреждения ДНК. Деградация в клетках ДНК приводит к активации ее репарации посредством поли-АДФ-рибозилирования, что влечет за собой снижение уровня  $\text{НАД}^+$  в клетке как субстрата данной реакции и увеличение в итоге содержания никотинамида как продукта распада  $\text{НАД}^+$ . Накопление в клетке никотинамида по механизму обратной связи может препятствовать течению реакции [8, 16–19]. Другой механизм активации поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP-1) осуществляется в организме через инозитол(1,4,5)-трифосфат/кальциевый путь альфа1-адреноагонистов прежде всего под действием эндогенного норадреналина [20]. Таким образом, проявление стресса при острой гипоксии головного мозга провоцирует процессы поли-АДФ-рибозилирования.

$\text{НАДН}$  и  $\text{НАДФН}$  являются ключевыми регуляторами окислительно-восстановительных реакций и состояния антиоксидантной системы тканей. Поэтому снижение уровня  $\text{НАД}^+$  в митохондриях приводит к дисбалансу в антиоксидантной системе с последующим ростом в них продукции АФК и деполяризации мембран, что завершается апоптозом или некрозом клеток. Снижение содержания  $\text{НАД}^+$  в цитозоле отражается на активности семейства сиртуина, важного для предотвращения эксайтотоксичности [21].

PARP-1 помимо большой роли в репарации ДНК является кофактором в активации ядерного фактора  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  и связанного с ним семейства

провоспалительных цитокинов, т.е. усиливает воспалительные процессы при ишемии головного мозга и способствует дегенеративным процессам при его инсульте [22]. Активация PARP-1 в ответ на поломки ДНК влечет за собой подавление митохондриальной функции, снижение содержания глутатиона и АТФ на фоне усиления окислительного стресса. Активность PARP в организме ограничивается поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой, участвующей в ее метаболизме, при подавлении которой в поврежденных клетках процессы апоптоза усиливаются [20].

Как неотложная адаптивная реакция на снижение в клетке АТФ и рост АФК при гипоксии [23], предшествующая вовлечению NIF-1 $\alpha$ , ядерного фактора, запускающего геномную регуляцию данного процесса [24], происходит активация 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы, которая подавляет анаболизм, снижая потребность в АТФ, и усиливает катаболизм в клетке за счет стимуляции бета-окисления жирных кислот через усиление митохондриального дыхания и биогенеза, поставляя в клетку необходимую АТФ [25]. Одновременно 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа, повышая в клетке отношение НАД<sup>+</sup>/НАДН, активирует через сиртуин-1 PGC-1 $\alpha$ -индуцируемый антиоксидантный ответ на рост АФК при гипоксии [26, 27]. Сиртуин-1 превращает НАД в никотинамид, который по механизму обратной связи подавляет активность сиртуинов и усиливает синтез НАД [28].

#### ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ЭКЗОГЕННОГО НИКОТИНАМИДА ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Нейропротекторный эффект никотинамида на модели инсульта головного мозга был обнаружен на рубеже конца 1990-х и начала 2000-х годов в ряде лабораторий мира независимо друг от друга [29–36]. М.Р. Хоане с соавторами [37–40] выявили и изучили временные параметры терапевтического действия никотинамида при инсульте, в том числе при его повторном применении. Подобным нейропротекторным и терапевтическим действием обладает никотинамидмононуклеотид [41–43].

Механизм нейропротекторного действия никотинамида по настоящее время недостаточно ясен. Принято считать, что его нейропротекторное действие, во-первых, связано с тем, что, являясь субстратом для синтеза никотинамидмононуклеотида и далее НАД<sup>+</sup>, никотинамид может регулировать его уровень в клетке, поддерживая и предотвращая его снижение в гипоксических

условиях. Во-вторых, никотинамид, являясь блокаторм PARP-1, тем самым также может обеспечивать необходимый уровень НАД<sup>+</sup> в клетке, снижая его реализацию в реакциях с PARP. В-третьих, никотинамид, являясь субстратом для синтеза НАД<sup>+</sup>, важен для функционирования дыхательной митохондриальной цепи в условиях острой гипоксии [43]. Никотинамид через НАД<sup>+</sup> может подавлять генерацию АФК путем активации антиоксидантной системы через ядерный эритроидный фактор 2, отвечающий за экспрессию антиоксидантных генов. Ядерный эритроидный фактор 2 ограничивает по механизму обратной связи окислительный стресс, вызывая детоксикацию супероксида. Одновременно этот фактор регулирует интенсивность воспалительного процесса через блокаду NF-kB-пути и продукции провоспалительных цитокинов. Установлено, что НАД<sup>+</sup> увеличивает в клетках уровень глутатиона через активацию регулятора антиоксидантной системы ядерного эритроидного фактора 2 [44]. Это достигается также при стимуляции сиртуинов, прежде всего, сиртуина-1, который предотвращает митохондриальную деполаризацию и фрагментацию, а также последующую каспазную активацию. Подавление апоптоза никотинамидом может также осуществляться через mTOR-путь. Никотинамид снижает митохондриальный стресс через активацию 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы и тем же путем стимулирует биогенез митохондрий [43, 44]. Посредством данных механизмов путем стимуляции антиоксидантной системы клеток за счет снижения генерации АФК никотинамид поддерживает функционирование митохондрий [43, 45–47]. В данном случае влияние никотинамида на антиоксидантную систему также осуществляется через НАД<sup>+</sup>.

Тем не менее, есть ряд фактов, требующих разъяснения при устоявшейся логике обоснования механизма действия никотинамида. Во-первых, никотинамид способен увеличивать содержание НАД<sup>+</sup> в цитозоле клетки, но не в митохондриях. Во-вторых, при кратковременной острой гипоксии уровень НАД не снижается в клетке, и далее только при последующей реоксигенации на фоне активации PARP-1, необходимой для репарации поврежденной ДНК, имеет место неизбежное его снижение, когда экзогенный никотинамид может реализовать свое действие по блокировке PARP-1 или синтезу НАД<sup>+</sup> [8]. Поэтому неясно, по какому механизму никотинамид может снижать смертность животных в течение воздействия кратковременной острой гипоксии, когда имеет место проявление восстановительного стресса и сохранение уровня НАД в клетке и еще не успевают в полной мере проявиться отмечен-

ные выше патофизиологические сдвиги при реоксигенации, на которые мог влиять никотинамид через поддержку функции НАД [48].

Можно рассмотреть другой вариант реализации прямого действия никотинамида через ГАМК/бензодиазепиновые рецепторы, стимуляция которых приводит к подавлению гиперактивации глутаматных рецепторов нейроцитов, наблюдаемой при острой гипоксии, со снижением эксайтотоксичности и гибели клеток. Данное явление, специфическое для нервной ткани, обусловлено чрезмерным высвобождением нейротрансмиттера глутамата из нейроцитов и нейроглии в гипоксических условиях с последующей гиперактивацией глутаматных рецепторов, что усиливает входение в нейроциты ионов кальция с чрезмерным усилением всех связанных с кальцием процессов в клетке, включая каскад дегенеративных ферментов и клеточную аноксию, приводящих к гибели нейроцитов через развитие апоптоза или некроза [49, 50]. При острой гипоксии происходит также нарушение функционирования тормозной ГАМК-ергической системы, что препятствует сохранению баланса возбуждение/торможение в головном мозге и провоцирует проявление эксайтотоксичности [51, 52]. Гибель животных при воздействии острой гипоксии сопровождается проявлением клонико-тонических судорог, которые связаны с гиперактивацией СА3 пирамидальных нейронов в области гиппокампа [52, 53]. Никотинамид, действуя через бензодиазепиновые рецепторы, тормозит перевозбуждение нейронов, что влечет снижение гибели клеток от эксайтотоксичности [54–56]. ГАМК-агонисты, препятствуя чрезмерной активации глутаматных рецепторов и развитию эксайтотоксичности, таким путем осуществляют часть своих нейропротекторных свойств [57]. На второй фазе развития последствий воздействия острой гипоксии никотинамид препятствует снижению НАД в клетке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе современных знаний о влиянии никотинамида на метаболические процессы проведена оценка возможных потенциальных механизмов реализации его нейропротекторного действия в условиях острой летальной кратковременной гипоксии. Рассмотрены патофизиологические закономерности развития острой гипоксии головного мозга. На фоне развития воспалительной реакции при травме или ишемии головного мозга обращено внимание на роль в патогенезе окислительного стресса, митохондриальной дисфункции, эксайтотоксичности с последующей дегенерацией аксонов и апоптозом нейроцитов и нейроглии. Основным признаком проявления тканевой гипоксии является снижение в клетках уровня АТФ, что отражается на генерации митохондриального мембранного потенциала, способствует повышению мембран-

ной проницаемости, выходу из митохондрий НАД<sup>+</sup>, поступлению натрия в клетку и развитию внутриклеточного отека. Особое значение в патофизиологии острой гипоксии головного мозга имеют процессы, связанные с развитием восстановительного стресса и активацией поли-АДФ-рибозилирования при реоксигенации ткани. PARP-1, снижая уровень НАД в клетке, вызывает дисфункцию дыхательного митохондриального комплекса; являясь кофактором в активации ядерного фактора NF-κB усиливает воспалительные процессы при ишемии головного мозга и способствует дегенеративным процессам при инсульте. В больших дозах никотинамид обладает нейропротекторными свойствами при травматических повреждениях головного мозга, ишемии и инсульте, а также при нейродегенеративных заболеваниях: болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона. Отмечены первые пионерские работы по открытию нейропротекторных свойств никотинамида. Принято считать, что нейропротекторное действие никотинамида, во-первых, связано с тем, что, являясь субстратом для синтеза никотинамидмононуклеотида и далее НАД<sup>+</sup>, может регулировать его уровень в клетке, поддерживая и предотвращая его снижение в гипоксических условиях. Во-вторых, никотинамид, являясь блокатором PARP-1, тем самым может также обеспечивать необходимый уровень НАД<sup>+</sup> в клетке, снижая его реализацию в реакциях с PARP. В-третьих, никотинамид, являясь субстратом для синтеза НАД<sup>+</sup>, важен для функционирования антиоксидантной системы в дыхательной митохондриальной цепи в условиях острой гипоксии. Все отмеченные потенциальные механизмы нейропротекторного действия никотинамида связаны с функционированием НАД, уровень которого не снижается во время развития восстановительного стресса в условиях кратковременной летальной гипоксии. Это ставит под определенное сомнение роль отмеченных выше механизмов в реализации эффекта никотинамида. Рассмотрен вариант реализации действия никотинамида через ГАМК/бензодиазепиновые рецепторы, вызывающие блокировку активации глутаматных рецепторов нейроцитов при острой гипоксии путем стабилизации плазматического мембранного потенциала, что влечет снижение гибели нейроцитов от эксайтотоксичности. Данное явление обусловлено чрезмерным высвобождением глутамата при гипоксии и гиперактивацией под его воздействием тканевого дыхания нейроцитов с развитием острой клеточной гипокситензии, влекущей за собой гибель клетки. Это происходит на фоне снижения эффективности тормозной ГАМК-ергической системы головного мозга, отмечаемой при его ишемии различного генеза. Гибель животных происходит при развитии клонико-тонических судорог, провоцируемых гиперактивностью пирамидальных нейроцитов гиппокампа, где рас-

положены ГАМК-ергические рецепторы, на фоне проявления эксайтотоксичности под воздействием острой гипоксии. ГАМК-агонисты препятствуют чрезмерной активации глутаматных рецепторов и развитию эксайтотоксичности, таким образом осуществляя свои нейропротекторные свойства. На второй фазе развития последствий воздействия острой гипоксии никотинамид препятствует снижению НАД в клетке.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Moretti and C. Peinkhofer, *Int. J. Vol. Sci.* **20** (22), 5797 (2019). DOI: 10.3390/ijms20225797
2. R. A. Fricker, E. L. Green, S. I. Jenkins, and S. M. Griffin, *Int. J. Tryptophan Res.* **11**, 1178646918776658 (2018). DOI: 10.1177/1178646918776658
3. E. S. Hwang and S. B. Song, *Biomolecules* **10** (5), 687 (2020). DOI:10.3390/biom10050687
4. J. R. Tribble, A. Otmani, S. Sun S, et al., *Redox Biol.* **43**, 101988 (2021). DOI: 10.1016/j.redox.2021.101988
5. Т. А. Воронина, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии* **14** (1), 63 (2016). DOI: 10.17816/RCF14163-70
6. M. E. Watts, R. Pocock, and C. Claudianos, *Front. Mol. Neurosci.* **11** (216) (2018). DOI: 10.3389/fn-mol.2018.00216
7. S. Y. Ng and A. Y. W. Lee, *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 528 (2019). DOI: 10.3389/fncel.2019.00528
8. G. Qi, Y. Mi, and F. Yin, *Front. Physiol.* **10**, 1531 (2020). DOI: 10.3389/fphys.2019.01531
9. M. S. Sekhon, P. N. Ainslie, and D. E. Griesdale, *Crit. Care.* **21** (1), 90 (2017). DOI: 10.1186/s13054-017-1670-9
10. K. Shetty, F. Galeffi, and D. A. Turner, *Neurobiol. Dis.* **62**, 469 (2014). DOI: 10.1016/j.nbd.2013.10.025
11. C. Chinopoulos, *Exp. Neurol.* **327**, 113218 (2020). DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113218
12. М. В. Васин, И. Б. Ушаков и И. В. Бухтияров, *Изв. РАН. Сер. биол.* № 1, 83 (2018). DOI: 10.7868/S0002332918010113
13. P. Belenguer, J. M. N. Duarte, P. F. Schuck, and G. C. Ferreira, *Neurotox. Res.* **36** (2), 219 (2019). DOI: 10.1007/s12640-019-00061-7
14. E. Marutani, M. Morita, S. Hirai, et al., *Nat. Commun.* **12** (1), 3108 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-23363-x
15. N. Klimova, A. Fearnow, and T. Kristian, *Brain Sci.* **10** (7), 449 (2020). DOI: 10.3390/brainsci10070449
16. O. P. Mishra, W. Akhter, Q. M. Ashraf, and M. Delivoria-Papadopoulos, *Neuroscience* **119** (4), 1023 (2003). DOI: 10.1016/s0306-4522(03)00166-0
17. P. Jagtap and C. Szabo, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (5), 421 (2005). DOI: 10.1038/nrd1718
18. R. P. Strosznajder, K. Czubowicz, H. Jesko, and J. B. Strosznajder, *Mol. Neurobiol.* **41** (2–3), 187 (2010). DOI: 10.1007/s12035-010-8124-6
19. K. Erdélyi, P. Pacher, L. Virág, and C. Szabo, *Int. J. Mol. Med.* **32** (2), 339 (2013). DOI: 10.3892/ijmm.2013.1397
20. S. Tanuma, A. Sato, T. Oyama, et al., *Curr. Prot. Pept. Sci.* **17** (7), 668 (2016). DOI: 10.2174/1389203717666160419150014
21. W. Ying, *Antioxid. Red. Signal.* **10** (2), 179 (2008). DOI: 10.1089/ars.2007.1672
22. T. Neira-Peña, E. Rojas-Mancilla, V. Munoz-Vio, et al., *Neurotox. Res.* **27** (4), 453 (2015). DOI: 10.1007/s12640-015-9517-0
23. B. M. Emerling, F. Weinberg, and C. Snyder, *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1386 (2009).
24. J. M. Martí, A. Garcia-Diaz, and D. Delgado-Bellido, *Redox Biol.* **41**, 101885 (2021). DOI: 10.1016/j.redox.2021.101885
25. E. Dengler, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (7), 2428 (2020). DOI: 10.3390/ijms21072428
26. R. C. Rabinovitch, B. Samborska, B. Faubert, et al. *Cell Report* **21** (1), 1 (2017). DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.026
27. C. Cantó, Z. Gerhart-Hines, J. N. Feige, et al., *Nature* **458** (7241), 1056 (2009). DOI: 10.1038/nature07813
28. J. Brandauer, S. G. Vienberg, M. A. Andersen, et al. *J. Physiol.* **591** (20), 5207 (2013). DOI: 10.1113/jphysiol.2013.259515
29. A. Y. Sun and D. S. Cheng, *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **19** (2), 104 (1998).
30. М. В. Васин, Т. В. Рясина и Ю. Н. Чернов, *Цитология* **41** (9), 812 (1999).
31. Т. В. Рясина, М. В. Васин, Л. Д. Смирнов и др., *Успехи геронтологии* (6), 67 (2001).
32. J. Yang, L. K. Klaidman, A. Nalbandian, et al., *Neurosci. Lett.* **333** (2), 91 (2002). DOI: 10.1016/s0304-3940(02)01005-4
33. J. Yang, L. K. Klaidman, M. L. Chang, et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **73** (4), 901 (2002). DOI: 10.1016/s0091-3057(02)00939-5
34. M. L. Chang, J. Yang, S. Kem, et al., *Neurosci. Lett.* **322** (3), 137 (2002). DOI: 10.1016/s0304-3940(01)02520-4
35. L. Klaidman, M. Morales, S. Kem, et al., *J. Pharmacology.* **69** (3), 150 (2003). DOI: 10.1159/000072668
36. M. R. Hoane, S. L. Akstulewicz, and J. J. Toppen, *Neurotrauma* **20** (11), 1189 (2003). DOI: 10.1089/089771503770802871
37. M. R. Hoane, J. L. Pierce, M. A. Holland and G. D. Anderson., *Neuroscience* **154** (3), 861 (2008). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.044
38. M. R. Hoane, J. L. Pierce, N. A. Kaufman, and J. E. Beare, *Oxid. Med. Cell Longevity* **1** (1), 46 (2008). DOI: 10.4161/oxim.1.1.6694
39. A. M. Goffus, G. D. Anderson, and M. R. Hoane, *Oxid. Med. Cellul. Longevity* **3** (2), 145 (2010). DOI: 10.4161/oxim.3.2.11315

40. C. Vonder Haar, G. D. Anderson, and M. R. Hoane, *Behav. Brain Res.* **224**, (2), 311 (2011). DOI: 10.1016/j.bbr.2011.06.009
41. J. H. Park, A. Long, K. Owens, and T. Kristian, *Neurobiol. Dis.* **95**, 102 (2016). DOI: 10.1016/j.nbd.2016.07.018
42. C. C. Wei, Y. Y. Kong, G. Q. Li, et al., *Sci. Rep.* **7** (1), 717 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-00851-z
43. N. Klimova, A. Fearnow, A. Long, and T. Kristian, *Exp. Neurol.* **325** (113144) (2020). DOI: 10.1016/j.expneurol.2019.113144
44. J. Zhang, Y. Hong, W. Cao, et al., *Front. Mol. Neurosci.* **12** (108) (2019). DOI: 10.3389/fnmol.2019.00108
45. Y. F. Lai, L. Wang, and W. Y. Liu, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23** (4), 1797 (2019). DOI: 10.26355/eurrev\_201902\_17143
46. K. Maiese, *Curr. Neurovasc. Res.* **17** (5), 765 (2020). DOI: 10.2174/1567202617999201111195232
47. N. Klimova, A. Long, and T. Kristian, *J. Neurosci. Res.* **97** (8), 975 (2019). DOI: 10.1002/jnr.24397
48. Ю. Н. Чернов, М. В. Васин, и И. Б. Ушаков, *Экспер. клин. фармакол.* **84** (3), 32 (2021). DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-3-8-10
49. D. Belov Kirdajova, J. Kriska, J. Tureckova, and M. Anderova, *Front. Cell Neurosci.* **14** (51), (2020). DOI: 10.3389/fncel.2020.00051
50. D. W. Choi, *Front. Neurosci.* **14**, 579953 (2020). DOI: 10.3389/fnins.2020.579953
51. C. Chen, X. Zhou, J. He et al., *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, 4028394 (2019). DOI: 10.1155/2019/4028394
52. C. Vinnakota, K. Govindpani, W. P. Tate, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **21** (9), 3284 (2020). DOI: 10.3390/ijms21093284
53. H. Song, S. M. Mylvaganam, J. Wang, et al., *Front. Cell Neurosci.* **12** (278), (2018). DOI: 10.3389/fncel.2018.00278
54. H. Möhler, P. Polc, R. Cumin, et al., *Nature* **278**, 563 (1979)
55. J. Prousky, *J. Orthomol. Med.* **19** (2), 104 (2004)
56. M. Slomka, E. Zieminska, E. Salinska, and W. Laza-rewicz, *Folia Neuropathol.* **46** (1), 69 (2008)
57. D. Mayor and M. Tymianski, *Neuropharm.* **134** (Pt B), **178** (2018). DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.050

## Analysis of Exogenous Nicotinamide Effects on Bioenergy Processes in Brain during Acute Hypoxia Exposure

M.V. Vasin\*, L.A. Ilyin\*\*, and I.B. Ushakov\*\*

*\*Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Barrikadnaya 2/1, Moscow, 123995 Russia*

*\*\*State Research Center – Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, ul. Zhivopisnaya 46, Moscow, 123182 Russia*

Based on modern knowledge about the effects of nicotinamide on metabolic processes, the current study evaluated the potential mechanisms underlying its neuroprotective effect during short-term lethal acute hypoxia. When the inflammatory responses occurred in relation to trauma or cerebral ischemia, the study focused on the role of mitochondrial dysfunction and excitotoxicity followed by degeneration of axons and apoptosis of neurocytes and neuroglia. A decrease in ATP level in cells when exposed to hypoxia affects the generation of mitochondrial membrane potential, contributes to increased membrane permeability, promoting the exit of NAD from mitochondria, the entry of sodium ions into the cell and the development of intracellular edema. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, induced by DNA damage during reoxygenation, reduces the level of NAD in the cell as a substrate of its reaction thereby causing dysfunction of the respiratory mitochondrial complex. In large doses, nicotinamide has neuroprotective properties in traumatic brain injuries, ischemia and stroke, as well as in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases. It is commonly believed that the neuroprotective effect of nicotinamide is firstly due to the fact that, nicotinamide as a substrate for the synthesis of nicotinamide mononucleotide followed by its amidation to NAD<sup>+</sup> can maintain and prevent its decrease during acute hypoxia. Secondly, nicotinamide as an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase 1 can also provide the necessary level of NAD<sup>+</sup> in the cell, reducing its implementation in reactions with this polymerase. Thirdly, nicotinamide as a substrate for the synthesis of NAD<sup>+</sup> supports the NAD<sup>+</sup>/NADH complex, which is important for the functioning of the antioxidant respiratory system. It is doubtful whether the said mechanisms are sufficient for the implementation of the action of nicotinamide, by reason of the fact that no decrease in the level of NAD in mitochondria was observed in animals which were found dead in the course of exposure to short-term lethal hypoxia. A mechanism of action for nicotinamide was also explored via GABA/benzodiazepine receptors that cause inhibition of activation of glutamate receptors of neurocytes in acute hypoxia. Under these conditions, with excessive release of glutamate and subsequent hyperactivation of glutamate receptors, there is the development of acute cell hypoxia, which entails cell death from excitation (excitotoxicity). Nicotinamide reduces neurocyte death from excitotoxicity by affecting benzodiazepine receptors. In this way, GABA agonists inhibit the effect of glutamate on excitotoxicity.

*Keywords: nicotinamide, NAD, poly(ADP-ribose) polymerase 1, GABA-agonists, acute brain hypoxia, neuroprotectors*

УДК 577.3

## ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА (АУРУМАКРИЛ) И ОБЛУЧЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2022 г. Л.А. Островская<sup>\*,#</sup>, Д.Б. Корман<sup>\*</sup>, А.Б. Шевелев<sup>\*\*</sup>, А.В. Шибаева<sup>\*</sup>, А.А. Липенгольц<sup>\*\*\*</sup>, Н.В. Блюхтерова<sup>\*</sup>, М.М. Фомина<sup>\*</sup>, В.А. Рыкова<sup>\*</sup>, Т.К. Лобжанидзе<sup>\*\*\*\*</sup>, Н.В. Позднякова<sup>\*\*\*</sup>, В.А. Скрибицкий<sup>\*\*\*</sup>, В.В. Спиридонов<sup>\*\*\*\*\*</sup>, В.А. Кузьмин<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

<sup>#</sup>E mail: larros@list.ru

<sup>\*\*</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119991, Россия

<sup>\*\*\*</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Каширское шоссе, 23, Москва, 115478, Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>АО «Научно-исследовательский институт технической физики и автоматизации», Варшавское шоссе, 46, Москва, 115230, Россия

<sup>\*\*\*\*\*</sup>Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия

Поступила в редакцию 19.04.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 25.04.2022 г.

Изучена способность потенциального противоопухолевого препарата «Аурумакрил» (полиакрилат золота) к повышению чувствительности опухоли (меланома B-16/F10) мышей к радиационному терапевтическому воздействию. Установлено, что применение аурумакрила приводит к небольшому, но достоверному повышению ростиингибирующего эффекта облучения – с 81 до 90% торможения роста опухоли по сравнению с контролем, регистрируемому через 32 сут после воздействия. Показано, что удельная скорость роста опухолей в результате проведенной комплексной терапии замедляется в 2.5 раза по сравнению с контролем, а при воздействии только облучения – в 1.9 раза. Комплексная терапия и облучение вызывают практически одинаковое увеличение продолжительности жизни мышей – соответственно на 42 и 46% по сравнению с контролем.

*Ключевые слова:* полиакрилат золота (аурумакрил), радиационное облучение, экспериментальная противоопухолевая химиотерапия, меланома B-16/F10 мышей.

DOI: 10.31857/S0006302922040196, EDN: IVKCPP

Одним из путей повышения эффективности лучевой терапии злокачественных опухолей является использование различного рода соединений, обладающих способностью выступать в качестве радиосенсибилизаторов.

В последние десятилетия фиксируется возрастающий интерес к возможностям применения для биомедицинских целей наночастиц неорганических материалов с высоким Z-числом (атомным номером), обладающих рядом уникальных химических, физических и биологических свойств, которые определяются их размерами, формой, особыми поверхностными свойствами. Наибольшее внимание исследователей привлекают наночастицы золота благодаря простоте их получения и высокой биосовместимости [1].

Исследования последних лет показали обособленность экспериментального изучения возможности применения металлических наночастиц, в том числе наночастиц золота, в качестве радиосенсибилизирующих агентов для повышения эффективности лучевой терапии опухолей. Интерес к использованию для этих целей наночастиц золота обусловлен их высокой способностью к поглощению энергии рентгеновского излучения и тем самым к усилению действия излучения, что приводит к дополнительной гибели клеток по механизму термоабляции.

Мультидисциплинарными экспериментальными исследованиями установлено, что применение наночастиц золота способно существенно повышать эффективность лучевой терапии ряда опухолей животных, при этом степень противоопухолевого эффекта определяется как физико-

Сокращение: в/б – внутрибрюшинное введение.

химическими свойствами используемых наночастиц (размер, способность к агрегации), так и такими факторами, как тип опухоли и характер облучения [1–3].

Важным условием достижения хорошего радиосенсибилизирующего эффекта любого радиосенсибилизатора, в том числе наночастиц золота, является создание в опухоли достаточной концентрации действующего вещества. Решение этой задачи с помощью экзогенного введения в организм металлических наночастиц осложняется тем, что циркулирующие в крови наночастицы могут быстро захватываться гепатоцитами при прохождении через печень и выводиться из организма с желчью, что препятствует аккумуляции их в опухоли. Серьезным препятствием к использованию наночастиц золота с точки зрения перспектив клинического применения является также достаточно высокая общая токсичность металлического золота [4].

В этой связи представляет интерес изучение радиосенсибилизирующих свойств комплексных золотосодержащих соединений, интенсивно исследуемых в последние два десятилетия в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов [5].

Одним из таких соединений является препарат аурумакрил (полиакрилат золота), обладающий значительной противоопухолевой и цитотоксической активностью, способный генерировать в физиологических условиях наночастицы золота путем восстановления находящегося в составе полимера трехвалентного золота ( $Au^{+3}$ ) до нульвалентного металла в условиях *in vivo* [6, 7].

Представляется весьма вероятным, что использование полиакрилата золота в качестве радиосенсибилизирующего агента, обеспечивающего адресную доставку в ткани опухоли наночастиц золота путем их образования *in situ*, может оказаться более перспективным, чем экзогенное введение наночастиц металлического золота, как с точки зрения ожидаемого противоопухолевого эффекта, так и снижения токсичности терапии.

Приведенные соображения послужили основанием для проведения экспериментального исследования целесообразности применения аурумакрила в качестве радиосенсибилизатора с целью повышения эффективности лучевой терапии опухолей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Лабораторные животные.** Эксперименты с привлечением лабораторных животных выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, которые регламентированы специальными правилами, принятыми Европейской Конвенцией по

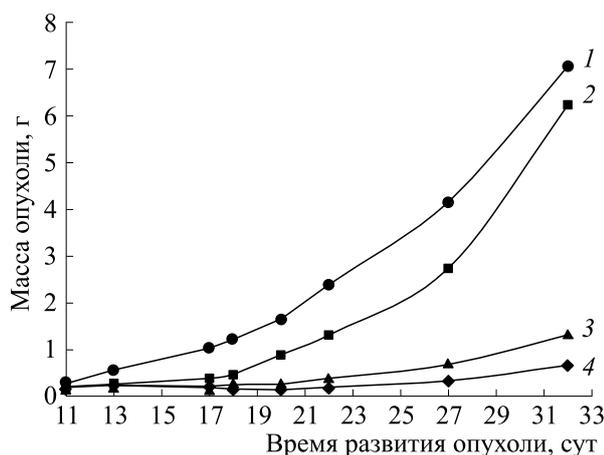
защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей [8, 9]. Эксперименты проведены на 100 инбредных мышях BDF<sub>1</sub> – гибридах первого поколения f<sub>1</sub>(C<sub>57</sub>Bl/6 × DBA<sub>2</sub>), самцах с массой тела 18–20 г разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России». Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из 12 мышей при 16 животных в контроле.

**Экспериментальная модель.** В качестве опухолевой тест-системы служила солидная опухоль – меланома В-16/F10, полученная из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Перевивку опухоли осуществляли в соответствии со стандартной методикой путем введения под кожу правой задней лапы мышей  $2 \cdot 10^5$  опухолевых клеток, содержащихся в 0.05 мл раствора Хенкса [9].

**Препарат.** Исследуемый препарат – полиакрилат золота, имеющий условное название аурумакрил, представляет собой неполную металлическую соль полиакриловой кислоты, содержащую ионы трехвалентного золота. Способ получения аурумакрила основан на взаимодействии водных растворов полиакриловой кислоты и золотохлористоводородной кислоты ( $HAuCl_4$ ). В качестве исходного реагента для синтеза использован коммерческий препарат полиакриловой кислоты (Sigma Aldrich, США) со средней молекулярной массой 140000 Да. К предварительно деионизированному 10%-му раствору полиакриловой кислоты по каплям добавляли 60 мкл водного раствора золотохлористоводородной кислоты, содержащего 28.4 мг  $HAuCl_4$ . Концентрации компонентов были подобраны таким образом, что соотношение аниона  $AuCl_4^-$  к звену полиакриловой кислоты составляло 1 : 5. Реакция проводилась в течение 24 ч при комнатной температуре при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 60 об/мин. Полученные образцы золотосодержащего полимера очищали от низкомолекулярных компонентов методом точного диализа [10].

Препарат вводили животным однократно при достижении опухолью пальпируемого размера (масса ~ 200 мг) на одиннадцатые сутки после перевивки в дозе 60 мкг/кг внутривенно (в/в) в виде водного раствора, приготовленного на апиrogenной дистиллированной воде для инъекций, в объеме 0.2 мл.

**Облучение.** Облучение животных выполняли однократно на рентгеновском аппарате Comet MXR/225/22 при максимальном напряжении 225 кВ с использованием алюминиевого фильтра толщиной 1 мм. Расстояние от источника излуче-



**Рис. 1.** Влияние сочетанного применения аурумакрила и облучения на развитие меланомы В-16/F10 мышей BDF1: 1 — контроль; 2 — аурумакрил, 60 мкМ/кг, в/б, однократно, одиннадцатые сутки после перевивки опухоли; 3 — облучение, 20 Гр, однократно, тринадцатые сутки после перевивки опухоли; 4 — аурумакрил, 60 мкМ/кг, однократно, одиннадцатые сутки + облучение, 20 Гр, однократно, двенадцатые сутки после перевивки опухоли.

ния до облучаемой опухоли составляло 26 см. Мощность дозы при проведении облучения составляла 4.6 Гр/мин. Размер поля рентгеновского излучения составлял 36×26 мм. Лапа с опухолевым узлом при облучении располагалась таким образом, чтобы в поле излучения находился участок от тазобедренного сустава до пятки. Контроль позиционирования лапы мыши в поле излучения осуществляли при помощи рентгеновского плоскопанельного детектора. Сопроводительную дозиметрию проводили при помощи дозиметрических пленок Gafchromic EBТ3 индивидуально для каждого животного.

Перед проведением процедуры облучения осуществляли общую анестезию мышей путем в/б инъекции смеси препаратов фентанила (0.05 мг/кг), мидазолама (5 мг/кг) и медетомидина (0.5 мг/кг), содержащейся в 0.9%-м растворе хлорида натрия.

Животных, получавших воздействие только лучевой терапии, подвергали облучению на тринадцатые сутки развития опухоли. Животные, подвергавшиеся сочетанному воздействию аурумакрила и облучения, получали сеанс лучевой терапии через 24 ч после воздействия препарата — на двенадцатые сутки после перевивки опухоли.

**Оценка противоопухолевого эффекта.** Показателями ростингибирующего эффекта примененных воздействий служили различия в кинетике роста опухолей и средней продолжительности

жизни у леченых (Т) и контрольных (С) животных. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение трех взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида:  $V = abc/2$ , где  $a$  — длина,  $b$  — ширина,  $c$  — высота опухолевого узла. Масса опухоли соответствует ее объему, поскольку плотность опухолевой ткани принято считать равной  $1 \text{ г/см}^3$  [9].

Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %) вычисляли из соотношения  $TPO = (P_C - P_T)/P_C, \%$ , где  $P_C$  и  $P_T$  — средняя масса опухоли мышей в группах контрольных и леченых животных соответственно. Изменение средней продолжительности жизни (СПЖ,  $\Delta\tau, \%$ ) мышей определялось как  $\Delta\tau = (\tau_T - \tau_C)/\tau_C, \%$ , где  $\tau_T$  и  $\tau_C$  — средняя продолжительность жизни мышей в группах леченых и контрольных животных соответственно.

Удельную скорость роста опухоли  $\phi$  определяли из соотношения  $(\ln Pt_2 - \ln Pt_1)/t_2 - t_1$ , где  $Pt_1$  и  $Pt_2$  — средняя масса опухоли в момент терапевтического воздействия  $t_1$  и в момент оценки эффекта  $t_2$ . Кинетический критерий эффективности  $\chi$  определялся из соотношения  $(\phi_C - \phi_T)/\phi_C$ , где  $\phi_C$  и  $\phi_T$  — удельные скорости роста опухоли в группах контрольных и леченых животных соответственно [11].

**Статистический анализ результатов.** Статистическую обработку полученных результатов проводили при вычислении стандартного квадратичного отклонения для средних значений с использованием пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» и «Statistica 8.0». Результаты представлены как среднее из 12 индивидуальных измерений для каждого экспериментального животного. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Различия признаются достоверными при условии, что вычисленные значения  $t$  превышают значения критерия Стьюдента для определенных уровней значимости ( $p < 0.01$ ) при заданном числе степеней свободы  $f$  [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние сочетанного применения аурумакрила и облучения на кинетику развития меланомы В-16/F10 охарактеризовано данными, представленными на рис. 1 и в табл. 1.

Как видно из представленных данных, при оценке эффекта на 32-е сутки развития опухоли

**Таблица 1.** Противоопухолевый эффект аурумакрила, облучения и их сочетанного применения на модели меланомы В-16/F10 мышей BDF<sub>1</sub>

Группа	Время воздействия, сутки развития опухоли	Средняя масса опухоли в момент воздействия, г	Оценка противоопухолевого эффекта на 32 сутки развития опухоли		Удельная скорость роста опухоли, г/сутки ( $\varphi$ )	Кинетический критерий эффективности ( $\chi$ )
			Средняя масса опухоли, г	ТРО, %		
Аурумакрил 60 мкМ/кг, в/б	11	0.20 ± 0.02	6.25 ± 1.45	11	0.16	-0.06
Облучение 20 Гр	13	0.25 ± 0.03	1.32 ± 0.1	81	0.08	0.46
Аурумакрил 60 мкМ/кг, в/б + облучение, 20 Гр	11	0.20 ± 0.02	0.67 ± 0.13	90	0.06	0.6
	12	0.22 ± 0.02				
Контроль	11	0.28 ± 0.04	7.06 ± 1.19	—	0.15	—

**Таблица 2.** Достоверность различий между средними значениями массы опухоли в сравниваемых группах мышей (число степеней свободы  $f=18$ )

Группа	Аурумакрил	Облучение	Аурумакрил + Облучение	Контроль
Аурумакрил	—	$t = 10.9 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	$t = 12.4 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	$t = 1.39 < t_{0.1} = 3.92$ Различия незначимы
Облучение	$t = 10.9 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	—	$t = 13.0 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	$t = 15.1 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы
Аурумакрил + облучение	$t = 12.4 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	$t = 13.0 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	—	$t = 16.8 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы
Контроль	$t = 1.39 < t_{0.1} = 3.92$ Различия незначимы	$t = 15.1 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	$t = 16.8 > t_{0.1} = 3.92$ Различия значимы	—

раздельное применение аурумакрила и лучевой терапии приводит к торможению роста опухоли на 11 и 81% по сравнению с контролем соответственно. Совместное применение аурумакрила и облучения с интервалом в 24 ч приводит к достоверному повышению ростингибирующего эффекта до 90% торможения роста опухоли (рис. 1, табл. 1 и 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что меланома В-16/F10 проявляет достаточно выраженную исходную чувствительность к проведенной лучевой терапии. Дополнительное применение аурумакрила приводит к достоверному

повышению ростингибирующего эффекта облучения – с 81 до 90% торможения роста опухоли по сравнению с контролем, регистрируемому через 32 суток после воздействия (табл. 1 и 2).

При этом следует отметить, что масса опухоли (0.2 г) у животных, подвергавшихся сочетанному воздействию аурумакрила и облучения, увеличилась в 3.3 раза с момента проведения терапии (11-е – 12-е сутки) до момента оценки эффекта (32-е сутки). В контроле масса опухоли за указанный период наблюдения увеличилась в 25 раз (рис. 1, табл. 1).

**Таблица 3.** Влияние аурумакрила, облучения и их сочетанного применения на среднюю продолжительность жизни мышей BDF<sub>1</sub> с меланомой B-16/F10

Группа	Средняя продолжительность жизни мышей, сутки	Увеличение средней продолжительности жизни мышей, %
Аурумакрил 60 мкМ/кг, в/б	34.8 ± 9.9	0
Облучение 20 Гр	50.4 ± 3.0	46
Аурумакрил 60 мкМ/кг, в/б + облучение, 20 Гр	49.17 ± 7.7	42
Контроль	34.5 ± 5.1	—

Значения удельных скоростей роста опухолей составляют 0.06 г/сутки для мышей, получавших комплексную терапию, и 0.08 г/сутки для животных, получавших только облучение, при удельной скорости роста опухоли в контроле, равной 0.15 г/сутки. У мышей, получавших только аурумакрил, удельная скорость роста опухолей примерно такая же, и даже чуть выше, чем в контроле — 0.16 и 0.15 г/сутки соответственно (табл. 1).

Сопоставление значений удельных скоростей роста опухолей у леченых и контрольных животных свидетельствует о том, что в результате проведенной комплексной терапии удельная скорость роста опухолей замедляется в 2.5 раза по сравнению с контролем, а при воздействии только облучения — в 1.9 раза.

Кинетический критерий эффективности  $\chi$ , позволяющий количественно сопоставить скорости развития опухолевого процесса у леченых и контрольных животных, имеет значение 0.6 для мышей, получавших облучение в сочетании с аурумакрилом, что соответствует значительному ингибированию роста опухоли под влиянием комплексной терапии на протяжении всего периода наблюдения в течение 32 суток после воздействия (табл. 1).

Средняя продолжительность жизни мышей, подвергавшихся облучению и комплексному воздействию аурумакрила и облучения, увеличивается на 46 и 42% по сравнению с контролем соответственно (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные в настоящей статье данные, свидетельствующие о небольшом, но достоверном увеличении противоопухолевого эффекта облучения под влиянием аурумакрила, в опреде-

ленной мере подтверждают полученные ранее в цитируемой работе результаты.

Вместе с тем необходимо отметить, что использованная экспериментальная модель опухоли — меланома B-16/F10 — обладает весьма значительной исходной чувствительностью к радиационному воздействию, что делает затруднительной оценку эффективности применения аурумакрила в качестве радиосенсибилизатора.

Очевидно, что для заключения о целесообразности продолжения изучения способности аурумакрила к повышению чувствительности опухоли к лучевой терапии необходима экспериментальная оценка радиосенсибилизирующего эффекта полиакрилата золота на радиорезистентной модели опухоли и/или при использовании облучения в существенно меньших дозах.

Следует также отметить, что наблюдающийся в данном эксперименте весьма низкий эффект аурумакрила связан с тем, что однократный режим применения не является оптимальным для данного препарата, вызывающего при многократном введении торможение развития солидных опухолей (в том числе и меланомы B-16) на 70–90% по сравнению с контролем [6, 12–16]. Аурумакрил обладает также значительным цитотоксическим эффектом в отношении ряда клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы, легких, толстой кишки), наиболее выраженным в отношении клеток меланомы [17].

В целом представляется, что применение в качестве радиосенсибилизаторов соединений, обладающих также и собственной противоопухолевой активностью, может оказаться весьма перспективным. При такой комплексной терапии можно ожидать не только локального эффекта в результате сенсибилизации опухоли к облучению и одновременного действия на нее противоопу-

холевого агента, но и от системного действия препарата, приводящего к ингибированию процесса метастазирования.

Известно, что одним из основных принципов разработки комбинированных методов лечения рака является сочетание агентов, воздействующих на разные молекулярные мишени, имеющие принципиальное значение для возникновения и прогрессии опухолей.

Важным доводом в пользу изучения золотосодержащих соединений в качестве потенциальных радиосенсибилизаторов могут служить данные, свидетельствующие о различии мишеней, на которые направлено действие облучения и золотосодержащих комплексных соединений. Основной внутриклеточной мишенью для действия ионизирующего излучения является ДНК, свободно-радикальное поражение которой индуцирует гибель опухолевых клеток преимущественно по p53-зависимому пути апоптоза. Основной мишенью для действия золотосодержащих комплексных соединений является селенсодержащий интрацеллюлярный антиоксидантный фермент тиоредоксинредуктаза, ингибирование которого индуцирует оксидативное повреждение митохондриальных мембран и гибель клеток по митохондриальному пути апоптоза [18].

Сочетание облучения с золотосодержащими комплексными соединениями, обладающими противоопухолевой активностью, может положительно сказаться и на столь важном показателе эффективности лечения злокачественных опухолей, как продолжительность жизни (выживаемость) опухоленосителей.

При этом важную роль играет режим и схема применения сочетаемых воздействий. Весьма вероятно, что при совместном использовании облучения и аурумакрила введение препарата не только до облучения, но и в течение определенного срока после лучевого воздействия, может положительно сказаться на конечном результате терапии.

Очевидно, что все эти соображения требуют проведения соответствующим образом организованных экспериментальных исследований.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты, проведенные с привлечением лабораторных животных, выполнены в соответ-

ствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, которые регламентированы специальными правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., *Биофизика*, **66** (6), 1229 (2021).
2. L. Gui, S. Her, G. R. Borst, et al., *Radiother. Oncol.*, **124** (30), 344 (2017).
3. S. M. Gardone, P. Zygmanski, and E. Sajo, *Nanomedicine*, **13** (8), 809 (2018).
4. K. Park, E. J. Park, I. K. Chun, et al., *Arch. Pharm. Res.*, **34** (1), 153 (2011).
5. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии*, **64** (6), 697 (2018).
6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020).
7. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и Л. А. Островская, *Изв. РАН. Сер. хим.*, № 12, 2314 (2017).
8. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes* (ETS, 123) (Strasbourg, 1986).
9. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др., ч. 1 («Гриф и К», М., 2012), сс. 642–657.
10. А. В. Шибаева, Н. В. Позднякова, В. В. Спиридонов и др., *Вестн. РГМУ*, № 5, 111 (2018).
11. Н. М. Эмануэль, Д. Б. Корман, Л. А. Островская и др., *Нитрозоалкилмочевины-новый класс противоопухолевых препаратов* (Наука, М., 1978).
12. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010).
13. L. A. Ostrovskaya, D. B. Korman, and N. V. Bluhterova, et al., *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **4** (4), 816 (2014).
14. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман и др., *Биофизика*, **59** (4), 785 (2014).
15. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, № 12, 2333 (2017).
16. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика*, **38** (12), 64 (2019).
17. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022).
18. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика*, **64** (3), 552 (2019).

## Antitumor Efficacy of the Combined Use of Aurum Polyacrylate (Aurumacril) with Radiation Therapy in the Experiment

L.A. Ostrovskaya\*, D.B. Korman\*, A.B. Shevelev\*\*, A.V. Shibaeva\*, A.A. Lipengolts\*\*\*, N.V. Bluhterova\*, M.M. Fomina\*, V.A. Rykova\*, T.K. Lobganidze\*\*\*\*, N.V. Pozdniakova\*\*\*, V. A. Skribitsky\*\*\*, V.V. Spiridonov\*\*\*\*\*, and V.A. Kus'min\*

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

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

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

\*\*\*\* Joint Stock Company "Research Institute of Technical Physics and Automation", Varshavskoe Shosse 46, Moscow, 115230 Russia

\*\*\*\*\*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

The ability of aurum polyacrylate (aurumacril) to increase the sensitivity of murine tumor (B-16/F10 melanoma) to radiation treatment was explored. It was found that radiation therapy given in combination with aurumacril leads to a moderate but significant inhibition of tumor growth from 81% to 90%, compared to the control (32 days after treatment). It was shown that the specific tumor growth rate decreased by 2.5 times after combined treatment and by 1.9 times after radiation therapy given alone. The combined treatment and radiation therapy extends lifespan in mice almost the same by 42% and 46%, respectively, as opposed to the control.

*Keywords: aurum polyacrylate (aurumacril), radiation therapy, experimental antitumor chemotherapy, B-16/F10 melanoma*

УДК 57.056

## МИКРОГЕМОДИНАМИКА КОЖИ И МЕХАНИЗМЫ ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

© 2022 г. И.В. Тихонова\*, А.А. Гриневич\*, А.В. Танканаг\*, В.Г. Сафронова\*.\*

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

#E-mail: safronova@icb.psn.ru

Поступила в редакцию 26.04.2022 г.

После доработки 19.05.2022 г.

Принята к публикации 20.05.2022 г.

Приведены современные представления о периферической микрогемодинамике, о подходах к анализу колебаний кожного кровотока и их диагностической значимости. Рассмотрены нарушения кожной микрогемодинамики при сахарном диабете 2 типа и возможность их интерпретации с позиций внешних и внутренних взаимосвязей между системами регуляции кожного кровотока, основанной на сравнении связей в норме и при патологиях, в том числе с использованием моделей патологий на животных. Обсуждены факторы и механизмы вазомоторной регуляции, включая рецепторы и сигнальные события в эндотелиальных и гладкомышечных клетках, рассматриваемых как модели микрососудов. Обращено внимание на нарушение  $Ca^{2+}$ -зависимой регуляции сопряжения между клетками сосудов и NO-зависимой регуляции вазодилатации при сахарном диабете. Основными механизмами устойчивости к инсулину при сахарном диабете 2 типа считаются дефект числа рецепторов инсулина и нарушение трансдукции сигнала от рецептора к фосфатидилинозит-3-киназе и нижележащим мишеням. Важную роль в нарушении функций сосудов при гипергликемии играют активные формы кислорода. Предполагается, что рассмотренные молекулярно-клеточные механизмы регуляции микрогемодинамики вовлечены в формирование колебаний кожного кровотока. Параметры микроциркуляции крови в коже могут рассматриваться как диагностические и прогностические маркеры для оценки состояния организма.

*Ключевые слова:* микроциркуляция, сахарный диабет 2 типа, амплитудно-частотный анализ, эндотелий, рецепторы вазоактивных факторов, сигнализация.

DOI: 10.31857/S0006302922040202, EDN: IVQOPR

### ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ГЕМОДИНАМИКИ И АНАЛИЗ КОЛЕБАНИЙ КОЖНОГО КРОВОТОКА

Для исследования периферической гемодинамики человека существует большое число как инвазивных, так и неинвазивных методик. Среди неинвазивных методик широкое применение получили видеокапилляроскопия, фотоплетизмография, термография, оптическая когерентная томография, лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ), а также разработанные на ее основе лазерная доплеровская визуализация и лазерная контрастная визуализация спеклов [1–8]. Состояние микроциркуляторного русла кожи и слизистых оболочек отражает как органоспецифические особенности кровотока, так и изменения, происходящие в системе микроциркуляции всего

организма [9–12]. Изменения в системе микроциркуляции кожи коррелируют со сдвигами в центральной гемодинамике, что позволяет использовать параметры микроциркуляции крови в коже в качестве диагностических и прогностических маркеров оценки здоровья и общего физического состояния организма [4, 11–14].

Известно, что кожный кровоток не является стабильным, а подвержен временным и пространственным вариациям, которые отражают важнейшие характерные особенности микроциркуляции: изменчивость и приспособляемость к постоянно меняющимся условиям гемодинамики и к потребности тканей в перфузии кровью [15, 16]. Поэтому в последние годы главным предметом исследования микроциркуляции становятся механизмы ее лабильности, поскольку именно ритмические флуктуации кровотока несут информацию о состоянии систем регуляции периферической микрогемодинамики.

В полосе частот от 0.005 до 2 Гц выделяют несколько неперекрывающихся частотных диапазонов колебаний скорости кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека [17]. Для

*Сокращения:* ЛДФ — лазерная доплеровская флоуметрия, СД — сахарный диабет, ФВК — фазовая вейвлет-когерентность, АФК — активные формы кислорода, TRP — транзитный рецепторный потенциал, SOC — депо-зависимый кальциевый канал (Store Operated Channel), eNOS — эндотелиальная NO синтаза (endothelial NO synthase), NOX — NADPH-оксидаза.

каждого из диапазонов характерны свои частотные интервалы, колебания в которых отражают влияние сердечных сокращений, движений грудной клетки, миогенной активности гладкомышечных клеток сосудов, нейрогенной регуляции активности стенки сосудов и сосудодвигательной активности эндотелия сосудов. Наибольший интерес представляют низкочастотные колебания кровотока (0.005–0.2 Гц), которые отражают влияние локальных регуляторных процессов, связанных с активностью гладкомышечных клеток стенок сосудов (0.06–0.2 Гц – диапазон миогенного ритма) [18, 19], нейрогенным контролем (0.02–0.06 Гц – диапазон нейрогенного ритма) [20] и эндотелиальной активностью (0.005–0.02 Гц – диапазон эндотелиального ритма) [17, 21].

Регистрация колебаний кожного кровотока методом ЛДФ с последующим амплитудно-частотным анализом полученных ЛДФ-грамм позволяет исследовать миогенную, нейрогенную и эндотелиальную системы регуляции микроциркуляторного русла кожи как в покое, так и при проведении функциональных тестов (окклюзионная, температурная и ионофоретическая пробы). Функциональные тесты используются для оценки состояния систем регуляции периферического кровотока и выявления их адапционных резервов к условиям кратковременной ишемии [22–25], изменению температуры [4, 22, 26–29], в ответ на действие вазоактивных веществ (ацетилхолин, нитропруссид, кальциевые блокаторы) [4, 11, 30–33] и для оценки патологических изменений при социально-значимых заболеваниях, в том числе при сахарном диабете [34].

#### НАРУШЕНИЯ КОЖНОЙ МИКРОГЕМОДИНАМИКИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа) — хроническое метаболическое заболевание, проявляющееся нарушением углеводного обмена с развитием гипергликемии вследствие инсулинорезистентности, секреторной дисфункции бета-клеток, а также нарушением липидного обмена. Эта форма охватывает лиц с относительной (а не абсолютной) недостаточностью к инсулину и периферической резистентностью к инсулину. Хотя конкретная этиология неизвестна, аутоиммунного разрушения бета-клеток не происходит, и у пациентов нет никаких других известных причин диабета. Большинство пациентов с диабетом 2 типа имеют избыточный вес или ожирение [35]. Одной из основных причин осложнений и смертности пациентов с СД 2 типа является развитие макро- и микрососудистых нарушений [36, 37]. Диабет сопровождается развитием сердечно-сосудистых заболеваний и макрососудистых осложнений, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и заболевания периферических артерий, и является фактором, отягчающим течение коронавирусной болезни (COVID-19) [38–44].

Наиболее часто диагностируемые осложнения у больных СД связаны с нарушением микроциркуляции, что ведет к язвам стоп, ретинопатии, нейропатии, диабетической дермопатии и ослабленному заживлению ран [40, 41, 45]. Эти связанные с диабетом микрососудистые дисфункции могут в конечном итоге привести к более тяжелым осложнениям, что указывает на необходимость выявления микрососудистых нарушений как на ранней стадии заболевания, когда патологические изменения еще обратимы, так и на более поздних стадиях для предотвращения усугубления тяжести заболевания и адекватной коррекции лечения. Ранее была показана роль микрососудистых изменений в патогенезе СД в отношении метаболизма [46, 47], влияния оксида азота (NO) [48], изменений периферической микроваскуляризации [49], кожной нейроваскулярной дисфункции [50], микрососудистой дисфункции [51–54] и венозного растяжения [55]. Нарушения микроциркуляции при диабете происходят в различных органах, в том числе в почках, глазах и коже. Наиболее доступным и удобным объектом неинвазивного исследования микрососудистых нарушений является кожа. С использованием метода ЛДФ было показано нарушение кожной микроциркуляции уже на ранних стадиях заболевания [56]. У предиабетических больных и больных СД выявлены изменения кровотока и свойств сосудов [57–62]. Одним из наиболее часто используемых и удобных функциональных тестов оценки реактивности микрососудов кожи у больных СД 2 типа является тепловая проба (локальный нагрев кожи), которая позволяет оценить роль механизмов, участвующих в регуляции вазодилатации, и выявить изменение адапционных возможностей микрососудистого русла [26, 40, 63–68]. Однако в большинстве исследований кожной микрогемодинамики методом ЛДФ анализируются только интегральные параметры, характеризующие перфузию кожи кровью (показатель микроциркуляции), и уделяется мало внимания спектральному составу сигналов, который позволяет оценивать регуляторные системы кровотока и его адапционные возможности. Кроме того, полученные разными авторами данные бывают порой противоречивыми. Спектральный анализ ЛДФ-грамм, зарегистрированных на ноге (лодыжка), показал, что у больных СД относительная спектральная мощность в частотных диапазонах эндотелиальной, нейрогенной и миогенной активности была значительно ниже соответствующего показателя у здоровых испытуемых даже в покое [69]. В то же время другие авторы обнаружили повышение перфузии кожи кровью у больных СД 1 и 2 типов, а также снижение амплитуд колебаний кровотока в частотном диапазоне эндотелиальной и нейрогенной активности относительно здоровых добровольцев в покое [34]. Локальный нагрев также приводил к уменьшению вазодилаторного ответа и амплитуд спектральных компонент в частотных диапазонах эндотелиальной и нейрогенной активности [34].

В другом исследовании, наоборот, наблюдалась исходно более низкая микрососудистая перфузия и больший сосудорасширяющий резерв при локальном нагреве у пациентов с СД по сравнению с указанными параметрами в контрольной группе [29]. Несмотря на многообразие исследований микроциркуляции у больных СД, сложно сравнивать данные различных исследований между собой, а также собственные данные с результатами, полученными другими авторами. Причины могут быть в следующем: 1) не всегда указывается тип СД, либо исследования проводятся в смешанной группе больных СД 1 и 2 типов, без разделения на типы; 2) в большинстве исследований методом ЛДФ оцениваются только интегральные параметры кожного кровотока без проведения спектрального анализа, что не позволяет оценить изменения в функционировании регуляторных систем микрогемодинамики при патологии; 3) регистрация параметров микроциркуляции проводится на разных участках кожного покрова; 4) часто анализ результатов является некорректным из-за формирования групп, когда в качестве контроля выступают условно здоровые добровольцы молодого возраста (до 35 лет), тогда как средний возраст больных СД 2 типа более 50 лет; 5) при проведении тепловой пробы разными исследовательскими группами температура, скорость и длительность локального нагрева сильно варьируют. Указанные причины объясняют противоречивость результатов исследований кожной микроциркуляции у человека. Решением проблемы может быть корректное планирование и стандартизация протоколов экспериментов с целью воспроизводимости и возможности сравнения результатов, полученных разными группами.

#### ВНЕШНИЕ И ВНУТРЕННИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СИСТЕМАМИ РЕГУЛЯЦИИ КОЖНОГО КРОВОТОКА В НОРМЕ, ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

В настоящее время ряд исследований направлен на поиск и оценку внешних и внутренних взаимосвязей между системами регуляции кожного кровотока. Оценка внешних взаимосвязей как между регуляторными системами, так и между процессами регуляции кожного кровотока на различных участках микроциркуляторного русла производится при помощи функции фазовой вейвлет-когерентности (ФВК) [70, 71], групповой ФВК [72], или нелинейного моделирования и Байесовского метода [73, 74].

В низкочастотной области спектра в интервалах нейрогенного и миогенного ритмов показано изменение ФВК между колебаниями температуры и кровотока кожи у здоровых добровольцев в ответ на холодовой стресс [70, 75]. При оценке ФВК кожного кровотока на предплечьях между контрлатеральными участками у здоровых добровольцев в покое нами выявлены высокие досто-

верные медианные значения в сердечном, респираторном и миогенном интервалах [71]. Показано изменение внешних взаимосвязей между процессами регуляции кожной гемодинамики верхних и нижних конечностей у условно здоровых добровольцев при ортостазе [72]. У здоровых испытуемых ортостаз увеличивал групповую ФВК между колебаниями кожного кровотока на стопе и вариабельностью сердечного ритма или дыханием, а также между колебаниями кожного кровотока на предплечье и стопе на частоте дыхания (~0.3 Гц).

Изменение внешних взаимосвязей между процессами регуляции периферической микроциркуляции наблюдается с возрастом и при патологиях. У больных СД 1 типа обнаружено ослабление фазовых взаимосвязей между респираторной активностью и периферическим пульсом, реконструированным при помощи алгоритма мульти-гауссового моделирования из экспериментальных ЛДФ-сигналов [29]. При исследовании взаимосвязей между вариабельностью сердечного ритма, дыхательным ритмом и колебаниями микрогемодинамики кожи у здоровых молодых и пожилых добровольцев и пожилых пациентов с гипертонической болезнью показано различие ФВК между группами. Была выявлена направленность и функциональная зависимость силы связей от частоты спектральных компонент измеряемых сигналов: с возрастом сила внешних взаимосвязей между системами регуляции кожной микрогемодинамики снижается, а у пациентов с гипертонической болезнью практически исчезает на частоте 0.1 Гц [76].

Активность сердца и дыхательные экскурсии определяют центральный механизм регуляции кожной микрогемодинамики, обуславливающий высокочастотные колебания (кардио- и респираторный ритмы). Они формируются за счет пассивного изменения давления крови в микрососудах при дыхании и сердечном выбросе, что приводит к эластичному растяжению стенок сосудов, в том числе их мышечных компонент. Пассивное растяжение гладкомышечных клеток способствует увеличению концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_i$ ) [77, 78]. Изменение активности сердца характеризуется колебаниями вариабельности сердечного ритма. Эти колебания формируются вегетативной и центральной нервной системой, активностью баро- и хеморецепторов, респираторной и эндокринной регуляцией [79, 80]. Известно, что барорефлекс и прямое взаимодействие между парасимпатической и симпатической системами регуляции определяют доли низкочастотных и высокочастотных компонент в спектре колебаний вариабельности сердечного ритма, характеризующих симпато-вагальный баланс [81]. Нарушения симпато-вагального баланса могут происходить при патологиях: у пациентов с гипертонической болезнью за счет сниженной барорефлекторной активности [82], у больных СД 2 типа вследствие автономной нейропатии [50, 83—

85]. Эффекторами эндотелиального и нейрогенного воздействий являются гладкомышечные клетки микрососудов [6, 13, 86–89]. Существует также взаимодействие между эндотелиоцитами и периферическими нейронами при посредстве NO, кальцитонин-ген связанного пептида (CGRP) и других медиаторов [86, 87, 90]. Более того, гладкомышечные клетки обладают собственной спонтанной активностью, которая обуславливает миогенную регуляцию микроциркуляторного кровотока.

Анализ литературы показал, что внутренние связи не исследованы, тогда как внешние связи исследованы фрагментарно только у здоровых добровольцев, у больных СД 2 типа они остаются неизученными. Нами впервые была проведена оценка внутренних связей, характеризующих взаимодействие между регуляторными процессами, протекающими в одном участке микроциркуляторного русла в малом объеме ткани [91]. Обнаружены перекрывающиеся области смежных частот со средними и сильными внутренними связями, что характеризует взаимосвязи между механизмами регуляции кожного кровотока: центральными (респираторным и сердечным) и локальными (эндотелиальным, нейрогенным и миогенным). Выявлено, что с возрастом происходит увеличение количества внутренних связей как между локальными, так и между локальными и центральными механизмами регуляции. Мы предполагаем, что изменения в описанных выше механизмах, вызванные патологическими нарушениями, будут приводить к изменению количества и силы внешних и внутренних связей между процессами, регулирующими кожную перфузию. Формирование представлений о внутренних и внешних связях между процессами регуляции микроциркуляторного кровотока может дать основание для их рассмотрения в качестве надежных неинвазивных биомаркеров функционального состояния сердечно-сосудистой системы при патологических изменениях в организме человека.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ЖИВОТНЫХ НА МОДЕЛЯХ ПАТОЛОГИЙ (НА ПРИМЕРЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА)

В настоящее время основная часть работ по исследованию микроциркуляции методом ЛДФ проводится с участием добровольцев и пациентов с патологиями. Однако такие исследования имеют ряд этических и методических ограничений, поэтому становится необходимым проведение исследований с привлечением моделей патологий на животных. Исследование кожного кровотока у лабораторных животных по соответствующим этическим протоколам позволяет экспериментально подтверждать гипотезы, проверка которых невозможна в исследовании с участием добровольцев. Известны работы, посвященные исследованию микроциркуляции кожи у животных, преимущественно у крыс. В частности, исследованы особенности периферической

микродинамики у крыс в различных условиях (старение, стресс, острая и хроническая гипоксия, переохлаждение, синдром ишемии/реперфузии) и на модели СД 2 типа [92–104]. Значительное количество исследований направлено на изучение влияния физиологически активных соединений и фармакологических препаратов на процессы, протекающие в микроциркуляторном русле кожи животных [105–110]. Следует отметить, что в большинстве исследований на животных изменение микроциркуляции под действием стимулов оценивается только по общей перфузии кожи. Встречаются единичные исследования ритмических компонент периферической кожной микродинамики [102, 111]. Вероятно, это является следствием того, что необходимость обездвиживания животного для измерений и проведения функциональных проб с использованием традиционных методов анестезии может приводить к изменениям в механизмах регуляции кожной гемодинамики. Использование комбинированной инъекционно-газовой анестезии «золетил–закись азота» позволило адекватно оценить параметры микроциркуляции животных в условиях, приближенных к условиям нормального сна [112, 113]. В настоящее время наблюдается значительный рост заболеваемости сахарным диабетом, преимущественно 2-го типа, который опасен хроническими осложнениями, что диктует необходимость проведения широких исследований для поиска эффективных мер его профилактики и лечения [114]. Частично решить эту проблему позволяют экспериментальные модели на животных, наиболее чувствительных к развитию СД, с использованием адекватных методов его индуцирования. Существует множество способов создания моделей диабета на животных, например, с применением антиинсулиновой сыворотки или антагонистов рецептора инсулина, панкреатэктомии, инфузии глюкозы, цитотоксических для бета-клеток агентов и вирусов, а также вызванных диабетогенными питательными и гормональными факторами [115–117]. Однако большинство используемых в настоящее время экспериментальных моделей СД (хирургическая, химическая, эндокринная, иммунная, генетическая) не подходят для изучения СД 2 типа, поскольку связаны или вызывают значительную деструкцию бета-клеток в островках Лангерганса поджелудочной железы, что характерно для СД 1 типа.

Патофизиология СД 2 типа основана главным образом на снижении чувствительности тканей к инсулину, что в дальнейшем приводит к снижению его секреции. Эти процессы вызывают гипергликемию с последующим повреждением различных органов. Создание и использование в исследованиях модели СД 2 типа на животных, близкой по этиологии и течению к СД 2 типа у человека, сложно, но очень важно, так как это поможет понять патофизиологию заболевания, а также даст новые идеи для научных работ, связанных с терапевтическими процедурами [118]. Как показал анализ современной

литературы, для моделирования СД 2 типа наиболее подходящими животными являются грызуны (преимущественно мыши), а также мини-свиньи. Используются следующие подходы: моно- или полигенное ожирение, диета с высоким содержанием жиров, модель без ожирения и генетически индуцированная модель [115, 116]. В большинстве моделей провоцируется ожирение, что отражает состояние людей, у которых ожирение является одной из основных причин развития СД 2 типа [119]. В экспериментальных моделях СД 2 типа используются как генетически модифицированные животные (мыши C57BL/KsJYLeprdb/+, мыши db/db, мыши New Zealand Obese, мыши TALLYHO/Jng, крысы Obese Zucker Diabetic Fatty – OZDF), так инбредные и аутбредные линии грызунов (мыши C57BL/6 и BALB/c, крысы Wistar) [115, 116, 120–126]. Так как у человека в этиологии СД 2 типа (так же как и ожирения) основное значение имеет избыточное по калорийности питание, наиболее адекватными представляются индуцированные диетой модели на различных видах животных. Рацион питания оказывает существенное влияние на развитие патологии. Так, для развития ожирения и СД 2 типа у мышей C57BL/6 требуется высокожировая рацион питания, включающий до 60% жира, причем более быстрый и выраженный эффект достигается при добавлении в рацион большого количества сахарозы или фруктозы [127, 128]. Рацион с высоким содержанием фруктозы (35–60% ккал за счет фруктозы) был использован для индукции инсулинорезистентности у крыс линии Wistar [124, 129]. Для индукции СД 2 типа у мини-свиней также рекомендовалось использовать высокожировую рацион с добавлением большего количества сахарозы [130].

Таким образом, наиболее близкими по этиологии и механизмам развития к СД 2 типа у человека являются модели, индуцированные диетами, среди которых наиболее эффективны высокожировые и высокоуглеводные рационы. Некоторые авторы для ускорения развития диет-индуцированного СД 2 типа рекомендуют использовать небольшие, индивидуально рассчитанные дозы стрептозотоцина, позволяющие не разрушать полностью бета-клетки поджелудочной железы, как это имеет место при СД 1 типа [104, 116, 131]. Однако инъекция стрептозотоцина является дополнительным стрессовым фактором и может привести к усилению тяжести и развитию более поздних прогрессирующих стадий заболевания [132]. Кроме того, такие модели чрезвычайно трудоемки и требуют постоянного мониторинга метаболических параметров.

Основными критериями развития СД и эффективности используемых лечебно-профилактических мероприятий являются содержание глюкозы, инсулина и гликозилированного гемоглобина в плазме крови, количество бета-клеток в островках поджелудочной железы, результат глюкозотолерантного теста, индекс инсулинорезистентности, а

также результаты гистологии и гистохимии поджелудочной железы и других органов [35].

### ФАКТОРЫ И МЕХАНИЗМЫ ВАЗОМОТОРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Эндогенные и экзогенные вазоактивные факторы действуют на кровеносные сосуды, вызывая вазоконстрикцию или вазодилатацию. Вазоактивными являются гормоны, пептиды, продукты липидного обмена, протеазы, внеклеточные везикулы, низкомолекулярные вещества (например, оксид азота – NO, пероксид водорода – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), факторы внешней и внутренней среды (температура, сдвиговый стресс, давление, pH, парциальное давление кислорода или CO<sub>2</sub>). Их действие опосредовано активацией определенных рецепторов, сигнальных путей или действием на внутриклеточные компоненты в эндотелиальных и гладкомышечных клетках [4, 13, 133–139].

В регуляции вазоактивности участвуют мембранные рецепторы и ионные каналы: Ca<sup>2+</sup>-активируемый K<sup>+</sup>-канал высокой проводимости, потенциалозависимый K<sup>+</sup>-канал, механочувствительные ионные каналы, рецепторы – ионные каналы (пуриновые, изоформы транзиторного рецепторного потенциала (TRP), никотиновые рецепторы ацетилхолина); рецепторы, сопряженные с гетеротримерными GTP-связывающими белками (адренорецепторы, рецепторы аденозина, серотонина, вазопрессина, эндотелина и другие), рецепторы – тирозиновые киназы (инсулиновый рецептор, Tie1-2, рецепторы факторов роста) [140–142], протеин-тирозиновые фосфатазы рецепторного типа [143–145]. Примерами принципиальных схем активации компонентов внутри- и межклеточной коммуникации при действии вазоактивных факторов могут служить следующие последовательности передачи сигнала: 1) фосфолипаза A2 → → 828цитохром P450 → эйкозаноиды → Ca<sup>2+</sup>-активируемый K<sup>+</sup>-канал высокой проводимости, активация которого приводит к гиперполяризации мембраны гладкомышечных клеток и последующей релаксации сосуда (например, при сдвиговом стрессе); 2) эндотелиальная NO-синтаза → выброс NO → гладкомышечные клетки – растворимая гуанилатциклаза → → цГМФ → протеинкиназа G → изменение концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитозоле → Ca<sup>2+</sup>-активируемый K<sup>+</sup>-канал высокой проводимости; 3) оксидазы (NADPH-оксидаза, ксангиноксидаза и другие) → активные формы кислорода (АФК) → понижение уровня NO и/или повышение уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Приведенные схемы могут быть детализированы трансдукцией сигналов от определенных рецепторов вазоактивных агентов, участвующих в формировании внешних или внутренних связей до внутриклеточных эффекторных молекул. Каждая из приведенных схем активации не является полной и в определенной степени условна, так как представляет собой обобщение результатов исследований сосудов разных органов человека и жи-

вотных, тогда как известно, что регуляция кровотока в микрососудистом русле является видо- и тканеспецифичной [146–148]. В некоторых случаях ингибиторы и активаторы определенных сигнальных компонентов вводились ионофоретическим способом, при котором возможно влияние агентов на окружающие ткани [13, 149]. Кроме того, схемы построены с включением результатов, полученных на крупных сосудах, поэтому их приложение к микрососудистому руслу требует дальнейших исследований. Следует обратить внимание, что изложенные представления фактически не объясняют механизмы формирования колебаний периферического кровотока, которые характеризуют более полно состояние микрососудистого русла и значительно изменяются при патологиях, в том числе при СД 2 типа [150–153].

### ИЗМЕНЕНИЕ $Ca^{2+}$ -ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ СОПРЯЖЕНИЯ МЕЖДУ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ И МЫШЕЧНЫМИ КЛЕТКАМИ СОСУДОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Основными механизмами регуляции сократимости гладкомышечных клеток считаются изменения мембранного потенциала и  $Ca^{2+}$ -метаболизм. Среди регуляторных факторов следует особо отметить NO,  $Ca^{2+}$ , метаболиты арахидоновой кислоты, АФК, а также редокс- и потенциалочувствительность регуляторных партнеров. Вопрос о  $Ca^{2+}$ -сигнализации в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках микрососудов в норме и при СД 2 типа требует уточнения. Упомянутый выше  $Ca^{2+}$ -активируемый  $K^+$ -канал высокой проводимости, включенный в эндотелиально-мышечную коммуникацию, исследован в основном на крупных сосудах человека или животных [135, 154, 155]. В кальциевом метаболизме в эндотелиальных клетках разных тканей участвуют: рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата, ответственные за выброс  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума, изоформы катионного канала транзитного рецепторного потенциала (TRP), члены ORAI семейства кальциевых каналов, депо-зависимые кальциевые каналы (SOC), эндотелиальный T-тип потенциалозависимых кальциевых каналов,  $Ca^{2+}$ -АТФаза 2а эндоплазматического ретикулума (SERCA2a),  $Ca^{2+}$ -АТФазы плазматической мембраны (PMCA1 и PMCA4),  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменник [156–161]. В гладкомышечных и эндотелиальных клетках, а также в перичитах микрососудов ионные каналы вносят важный вклад в регуляцию взаимодействия клеток и функций микрососудов путем генерации сигналов внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и мембранного потенциала [162–164]. При СД  $Ca^{2+}$ -гомеостаз и механизмы регуляции концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле эндотелиоцитов кровеносных сосудов могут быть изменены. Так, в эндотелии аорты крыс линии OZDF (тучные диабетические крысы – Obese Zucker Diabetic Fatty rat) выявлено понижение SOC-зависимого входа  $Ca^{2+}$ , тогда как различия в пуле  $Ca^{2+}$ , высвобождаемого

под действием инозитол-1,4,5-трифосфата из эндоплазматического ретикулума, не обнаружены [165]. Было показано, что каналы с транзитным рецепторным потенциалом (каналы семейства TRP: TRPC – канонические, TRPV – ванилоидные, TRPM – меластатиновые, TRPML – муколипиновые) вовлечены в изменения и дисфункцию сосудов при диабете и ожирении или потенциально связаны с сосудистой дисфункцией [166]. Гипергликемия и диабет приводили к уменьшению экспрессии каналов TRPV4 и его функциональной активности в эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки глаза [167]. Показано уменьшение экспрессии  $Ca^{2+}$ -чувствительного рецептора на эндотелиальных и гладкомышечных клетках аорты у мышей с ожирением и СД 2 типа, что может вовлекаться в развитие диабетической васкулопатии [168]. Изменение активности потенциалозависимых каналов кардиомиоцитов, наблюдаемое при диабетической кардиомиопатии, сопровождающей СД 2 типа, приводит к изменению сердечного ритма и сократительной функции сердца [169]. Предполагается, что следствием этого будет изменение профиля вариабельности сердечного ритма, которое повлияет на спектральные характеристики и отразится на внешних и внутренних связях. Также при СД 2 типа нарушены  $Ca^{2+}$ -зависимые механизмы активации NADPH-оксидазы, связанные с нарушением полимеризации актина и  $Ca^{2+}$ -транспорта [170, 171]. В нейтрофилах больных СД 2 типа наблюдается повышение базового уровня  $[Ca^{2+}]_i$  и снижение пика  $Ca^{2+}$ -ответов на стимулы [172]. Предполагается, что это связано с нарушениями либо входа  $Ca^{2+}$ , либо его высвобождения из внутриклеточных депо или обоих процессов. Перечисленные нарушения  $Ca^{2+}$  регуляции в сосудах при СД 2 типа исследованы главным образом на клетках крупных сосудов. Остается неизвестным, как  $Ca^{2+}$ -регуляция участвует в формировании ритмических процессов в микроциркуляторном русле.

### NO-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВАЗОДИЛАТАЦИИ И ЕЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Одним из универсальных трансмиссиверов, участвующих в вазодилатации, является NO. Он продуцируется из L-аргинина с помощью NO синтаз в присутствии кофакторов, включая тетрагидробиоптерин, ФАД, СаМК и другие [173]. Активность эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) регулируется на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях [90, 174]. Одним из основных механизмов посттрансляционной модификации eNOS является фосфорилирование, которое может осуществляться протеинкиназой С, протеинкиназой В,  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназой,

протеинкиназой А, PI3K/протеинкиназой В, АМФ-активируемой протеинкиназой, активируемые через рецепторы – тирозиновые киназы, G-белок-сопряженные рецепторы или сдвиговым стрессом [135, 174]. Активация eNOS может происходить  $Ca^{2+}$ -зависимым или  $Ca^{2+}$ -независимым образом, например,  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназой и сдвиговым стрессом соответственно [173]. На культуре эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга человека показан  $Ca^{2+}$ -зависимый выброс NO, инициированный арахидоновой кислотой [175].

Роль перечисленных сигнальных компонентов исследована фрагментарно в колебательных процессах в микроциркуляторном русле. Так, спектральный анализ с применением вейвлет-преобразования выявил значительное снижение амплитуд колебаний микроциркуляции поджелудочной железы у спонтанно гипертензивных крыс в эндотелиальном диапазоне при развитии от 8- до 18-недельного возраста, что частично может быть объяснено увеличением уровней нитрита/нитрата в плазме, эндотелина-1, малонового диальдегида и интерлейкина-6 и снижением уровня супероксиддисмутазы в крови [176]. В комплексном исследовании спектральных характеристик осцилляций кожной микрогемодинамики мыши и колебаний концентраций  $Ca^{2+}$  и NO в цитоплазме культивируемых эндотелиоцитов микрососудов мыши показано наличие низкочастотных осцилляций концентраций как  $Ca^{2+}$ , так и NO в частотном интервале, совпадающем с интервалом NO-независимой эндотелиальной активности кожной микроциркуляции [177]. В гладкомышечных клетках NO вызывает цГМФ-зависимое уменьшение частоты агонист-индуцированных колебаний  $Ca^{2+}$  за счет снижения мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных запасов [178]. Таким образом, колебательные межклеточные сигналы, исходящие из эндотелиальных клеток, могут взаимодействовать с колебаниями в гладкомышечных клетках. Предполагается, что такое взаимодействие осцилляторов может отражаться на изменении силы внешних и внутренних связей в микроциркуляторном русле.

При СД 2 типа происходит нарушение регуляции eNOS в связи, как минимум, с двумя факторами: инсулинорезистентностью и гипергликемией. Инсулин играет важную роль в функционировании микрососудов, повышая экспрессию генов eNOS и фактора роста эндотелия сосудов VEGF в эндотелиальных клетках, увеличивая плотность капиллярной сети и усиливая NO-опосредованную вазодилатацию [4]. Резистентность к инсулину обычно определяется как снижение чувствительности к инсулину или скорости реагирования на метаболическое действие инсулина. В различных клетках здорового организма связывание инсулина с рецептором вызы-

вает его автофосфорилирование по тирозиновым остаткам и последующее фосфорилирование субстрата инсулинового рецептора-1 (IRS-1), активирующего затем  $Ca^{2+}$ -независимый сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназа/фосфоинозитид-зависимая киназа-1/протеинкиназа В. Дальнейшими событиями являются активация eNOS в эндотелиальных клетках, транслокация транспортера глюкозы GLUT4 в плазматическую мембрану, регуляция синтеза гликогена, белков, липидов и потребления глюкозы [179–181]. В клетках разных тканей существуют особенности действия инсулина, регуляции транспорта глюкозы и метаболизма. Следует отметить, что в эндотелии сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназа/протеинкиназа В обеспечивает вазодилатацию и плейотропное действие инсулина на метаболизм. Инсулин через сигнальный путь Sos/Ras/Raf/MAPK (Sos – адаптерный белок (Son of sevenless), Ras – малая ГТФаза семейства протоонкогенов Ras (Retrovirus associated DNA sequences), Raf – серин/треониновая протеинкиназа семейства протоонкогенов Raf (Rapidly accelerated fibrosarcoma), MAPK – митогенактивируемая протеинкиназа (mitogen activated protein kinase)) активирует продукцию эндотелина-1, молекул адгезии (VCAM-1 и E-селектина), что ведет к вазоконстрикции, регулирует экспрессию генов, пролиферацию и рост клеток [179–181]. У мышей, находящихся на высокожировом рационе, наблюдались гипертензия и сосудистая дисфункция не в результате дефектной передачи сигналов с рецептора инсулина через ПКВ, а из-за опосредованного свободными жирными кислотами уменьшения уровня фосфорилирования eNOS.

Устойчивость эндотелия к инсулину обычно сопровождается подавлением фосфатидилинозитол-3-киназа/NO-сигнального пути и усилением или сохранением интактного состояния сигнализации MAPK/эндотелин-1 [182, 183]. Так, в эндотелиальных клетках подкожных микрососудов, полученных из малых биопсий больных СД 2 типа, выявлено увеличение фосфорилирования ERK1/2 и повышение уровня экспрессии mPDK эндотелина-1, действием которого можно объяснить избыточную активацию MAPK (ERK1/2), наблюдаемую у больных [184].

#### ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСУЛИНУ

Считается, что причинами развития устойчивости к инсулину являются липотоксичность, глюкозотоксичность, воспалительный статус, дисфункция митохондрий, стресс эндоплазматического ретикулума, гиперинсулинемия на ранних стадиях СД 2 типа, а в некоторых случаях – понижение экспрессии рецептора инсулина или мутации [185–188]. К основным механизмам устойчивости к инсулину в разных тканях относят дефект числа рецепторов инсулина и нарушение трансдукции сигнала от рецептора к PI3K и нижележащим мишеням [189]. Кроме

того, причиной может быть нарушение фосфорилирования рецептора инсулина и сигнальных компонентов вследствие активации Ser/Thr протеинкиназ [190]. «Диабетогенные» факторы, особенно свободные жирные кислоты, воспалительные цитокины, АФК, гиперинсулинемия, чрезмерно увеличивают активность различных сериновых протеинкиназ, регулирующих гомеостаз глюкозы, в том числе N-концевой киназы c-Jun, изоформ протеинкиназы C, Rho-ассоциированной киназы [188, 191, 192]. Однако устойчивость к инсулину, как показано, является гетерогенным патологическим признаком, возникающим по разным причинам в различных тканях, но первичный механизм этого эффекта включает единый путь инсулинорезистентности [193]. Этот механизм остается малоисследованным в микрососудах, и его роль в установлении внешних и внутренних взаимосвязей между системами регуляции кожного кровотока не изучена. В то же время сосудистые осложнения — основная причина заболеваемости и смертности у больных СД, при этом микрососудистые осложнения, такие как невропатия, нефропатия и ретинопатия, способствуют значительному снижению качества жизни при СД 2 типа [183]. Кровеносные сосуды страдают как от прогрессирующего повреждения симпатических и парасимпатических ганглиев, так и от прямого повреждения эндотелиальных клеток. Последнее является результатом уменьшения биодоступности NO вследствие повреждающего действия гипергликемии на eNOS или на кальциевые каналы типа TRPV-4, либо уменьшения биодоступности L-аргина, субстрата eNOS. В качестве причины также рассматривается окислительный стресс, возникающий вследствие избыточной продукции АФК как эндотелиальными, так и циркулирующими иммунными клетками. Образующийся при этом пероксинитрит служит дополнительным фактором повреждения.

#### РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НАРУШЕНИИ ФУНКЦИЙ СОСУДОВ ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Источниками АФК в эндотелиальных клетках считаются NADPH-оксидазы, дыхательная цепь митохондрий, NOS, ксантинооксидазы, пероксидазы, циклооксигеназы и липоксигеназы [194–196]. Центральная роль при этом принадлежит NADPH-оксидазе, катализирующей образование супероксид-анион-радикала, предшественника других АФК. В нормальных условиях супероксид-анион-радикал и продукт его дисмутации пероксид водорода регулируют эндотелий-зависимую релаксацию и сократимость гладких мышц сосудов. При патологиях повышенная экспрессия и активность NADPH-оксидазы приводит к понижению уровня NO, ослаблению функций эндотелия, значительному повышению сократимости [196]. Включение в сигнальные схемы обобщенного образа NADPH-оксидазы (NOX)

требует уточнения, так как в настоящее время в эндотелии определено присутствие изоформ NOX1, NOX2, NOX4 и NOX5 (имеет сайты связывания  $Ca^{2+}$ ) с высокой степенью гомологии, которые отличаются по активационным механизмам [196–201]. Например, в активации NOX4 не участвуют цитоплазматические компоненты, она имеет высокую конститутивную активность и обеспечивает в сосудах базовую продукцию АФК, а NOX5 отсутствует у грызунов. Активный комплекс NADPH-оксидазы на основе NOX2 включает мембранную субъединицу p22phox, цитоплазматические субъединицы p47phox, p67phox, p40phox и малый ГТФ-связывающий белок Rac1. Наиболее интенсивно супероксидные радикалы при активации NOX2 продуцируют полиморфно-ядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы), к тому же они генерируют вторичные окислители за счет активности миелопероксидазы. При сахарном диабете нейтрофилы, самая многочисленная и крайне реактивная популяция клеток крови, играют значительную роль в нарушении окислительно-восстановительного баланса, ведущего к окислительному стрессу [202].

В развитии СД 2 типа окислительный стресс играет важную роль: повышенный уровень АФК в крови является важным патогенетическим фактором, способствующим дисфункции эндотелия сосудов и гладких мышечных клеток [42]. Образование АФК, модифицирующее состояние сосудов в различных органах, является результатом активности множества ферментов и биохимических путей как в самих клетках, так и в клетках крови. Основные источники образования АФК при гипергликемии и диабете — автоокисление глюкозы, полиольный путь метаболизма глюкозы, образование конечных продуктов гликирования, NADPH оксидазы, митохондриальная электронная транспортная цепь, несопряженная активность eNOS, ксантинооксидаза [203–205]. Потенцирование эндогенной антиоксидантной системы и применение терапевтических препаратов, понижающих уровень АФК, может улучшать состояние сосудистой системы в условиях гипергликемии [206]. В частности, бетаин, способствующий выработке глутатиона, ингибирует патологическую неоваскуляризацию роговицы глаза [207]. Благоприятное действие на состояние сосудов оказывает также метформин, имеющий множественное терапевтическое действие при СД 2 типа, в том числе в качестве антиоксиданта, осуществляя прямой захват гидроксильного радикала, усиливая активность глутатион редуктазы, каталазы и супероксиддисмутазы и подавляя активность NADPH-оксидазы [208]. NADPH-оксидаза является мишенью гипергликемии, которая вызывает нарушения в механизмах активации фермента, связанные с фагоцитозом и состоянием внутриклеточных сигнальных систем, в том числе зависимых от  $Ca^{2+}$  [171]. Прямое окисление сульфгидрильных боковых

цепей является основным механизмом модификации белков при действии АФК. Мишенями становятся каналы, рецепторные белки, малые G-белки, ферменты. Так,  $H_2O_2$  активирует TRP каналы в культуре эндотелиальных клеток легочных микрососудов человека и мыши [209]. Кроме того, в условиях гипергликемии при СД 2 типа на фоне увеличенного уровня АФК и метаболического истощения запасов антиоксидантов наблюдается повреждение ДНК и изменение транскрипции генов. Сложная взаимосвязь между метаболизмом и эпигенетическими изменениями может обеспечить концептуальную основу для понимания того, как патологические стимулы управляют развитием осложнений при СД 2 типа [210]. Исследования роли АФК в этиологии СД 2 типа перспективны в значительной степени для разработки фармацевтических препаратов на основе ингибиторов NOX [211]. Взаимодействие сигнальных путей, включающих активацию кальциевого обмена и образование АФК, может реализоваться в виде синергизма кальциевых ответов эндотелиальных клеток на вазоактивные агенты [212]. Кроме того, АФК, генерируемые в гладкомышечных клетках сосудов с участием NOX4 и NOX5, могут создавать обратную связь [196, 213, 214].

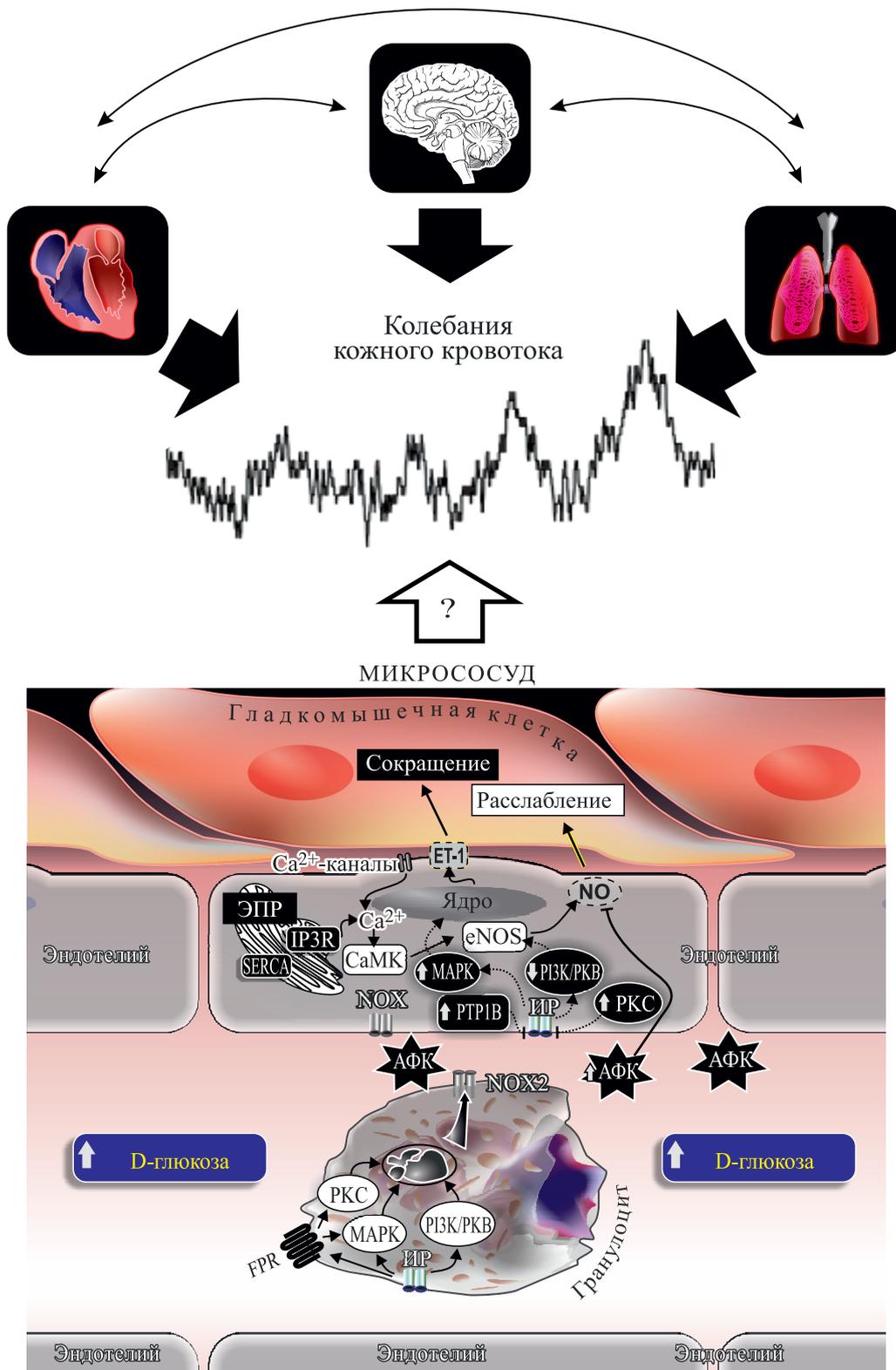
### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сахарный диабет 2 типа сопровождается развитием макро- и микрососудистых осложнений [36, 37]. Гипергликемия, ключевая особенность диабета, считается основным механизмом, создающим условия для возникновения микрососудистых нарушений, являющихся основной причиной развития ретинопатии, нефропатии, диабетической кардиомиопатии и периферической невропатии. Механизмы, способствующие развитию диабетической микроангиопатии, включают окислительный стресс, нарушение регуляции регенерации сосудов и функций клеток сосудов (эндотелиальных, гладкомышечных и стромальных клеток, перицитов), а также иммунных клеток, взаимодействующих с эндотелием. Эндотелиальная дисфункция при СД характеризуется ослаблением эндотелий-зависимой вазодилатации и относительным преобладанием вазоконстрикции, гиперкоагуляцией и увеличением проницаемости сосудистой стенки. Все это приводит к нарушению кровотока в микрососудистой системе и развитию диабетических осложнений. Поэтому в настоящее время актуален поиск эффективных маркеров функционального состояния микрососудов для ранней диагностики сосудистых нарушений. Анализ характерных частотных режимов осцилляций кожного микроциркуляторного кровотока, формируемых под влиянием нервной системы, легких, сердца и эндотелия сосудов (рис. 1), может внести значительный вклад в решение этой проблемы. Симпто-вагальный баланс с участием эндогенных вазоактивных агентов обуславливает центральный

и локальный механизмы регуляции кожного кровотока и влияет на взаимосвязи регуляторных систем. Однако связи между интегральными характеристиками микроциркуляторного кровотока и процессами их регуляции, включающими характерные режимы осцилляций концентраций вне- и внутриклеточных сигнальных посредников ( $Ca^{2+}$ , NO, АФК и другие), остаются малоисследованными как в норме, так и при патологиях. В изменение баланса внешних и внутренних связей между процессами регуляции кожной микрогемодинамики в норме и при СД 2 типа вносят вклад компоненты основных сигнальных путей в эндотелиальных клетках при регуляторном воздействии лейкоцитов крови. Хотя сигнализация в самих эндотелиальных клетках и при их взаимодействии с гладкомышечными клетками изучена довольно подробно, обращает на себя внимание то, что схемы сигнальных событий построены с включением результатов, полученных преимущественно на крупных сосудах. Однако требуется большая осторожность при экстраполяции закономерностей, полученных на эндотелиальных клетках макрососудов, на микрососуды разнообразных тканей и органов. Ограничение накладывает то, что, несмотря на общее мезодермальное происхождение, они имеют фенотипическую, структурную и функциональную гетерогенность [215–218], а экспрессия генов и их продуктов в клетках, адаптированных к условиям культивирования, и в нативных эндотелиальных клетках может различаться вследствие различного локального микроокружения и эпигенетической модификации [159, 217, 218]. Кроме того, нет однозначного понимания соответствия молекулярно-клеточных механизмов интегральным параметрам микроциркуляторного кровотока. Необходимы комплексные исследования на целом организме и на культивируемых клетках, чтобы создать основу для понимания молекулярно-клеточных механизмов регуляции ритмических процессов кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека, а также оценить роль внутриклеточных мишеней вазоактивных воздействий в формировании колебаний периферического кровотока и его модуляции при СД 2 типа. Развитие представлений о внутренних и внешних связях между процессами регуляции микроциркуляторного кровотока может дать основание для их рассмотрения в качестве надежных неинвазивных биомаркеров функционального состояния сердечно-сосудистой системы при патологических изменениях в организме человека.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00215).



**Рис. 1.** Схема взаимосвязей в регуляции колебаний кожного кровотока у человека и животных. Белые стрелки указывают на изменения активности ферментов или количества метаболитов при сахарном диабете 2 типа; черные стрелки показывают направление передачи регуляторного сигнала.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- C. Puissant, P. Abraham, S. Durand, et al., *Plos One*, **8** (4), e61320 (2013).
- P. Tafner, F. K. Chen, R. F. Rabello, et al., *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, **29** (2), 238 (2017).
- R. T. Junejo, C. J. Ray, and J. M. Marshall, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **119** (3), 665 (2019).
- J. L. Cracowski and M. Roustit, *Compr. Physiol.*, **10** (3), 1105 (2020).
- D. A. Low, H. Jones, N. T. Cable, et al., *Eur. J. Appl. Physiol.*, **120** (1), 1 (2020).
- A. Dara, A. Arvanitaki, M. Theodorakopoulou, et al., *Mediterr. J. Rheumatol.*, **32** (1), 6 (2021).
- Y. P. Wang, R. H. Cheng, Y. He, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 786615 (2021).
- A. Lazaridis, A. Triantafyllou, K. Dipla, et al., *Hypertens. Res.*, **45** (3), 445 (2022).
- В. И. Козлов, в сб. *Материалы III Всероссийского симпозиума «Применение лазерной доплеровской флоуметрии в медицинской практике»* (Москва, 2000), сс. 5–15.
- R. G. Ijzerman, R. T. de Jongh, M. A. Beijk, et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, **33** (7), 536 (2003).
- L. A. Holowatz, C. S. Thompson, C. T. Minson, et al., *J. Physiol.*, **563** (Pt 3), 965 (2005).
- L. A. Holowatz, C. Thompson-Torgerson, and W. L. Kenney, *Front. Biosci.*, **15** (2), 718 (2010).
- M. Roustit and J. L. Cracowski, *Trends Pharmacol. Sci.*, **34** (7), 373 (2013).
- Y. K. Jan, *Diagnostics (Basel)*, **12** (3), 620 (2022).
- J. A. Schmidt, P. Borgstrom, G. P. Firestone, et al., *J. Vasc. Surg.*, **18** (2), 207 (1993).
- A. J. Chipperfield, M. Thanaj, E. Scorletti, et al., *Microcirculation*, **26** (5), e12538 (2019).
- A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo, *IEEE Trans. Biomed. Engineer.*, **46** (10), 1230 (1999).
- W. Funk, B. Endrich, K. Messmer, et al., *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, **2** (1), 11 (1983).
- J. Kastrup, J. Bulow, and N. A. Lassen, *Int. J. Microcirc.*, **8** (2), 205 (1989).
- M. E. Muck-Weymann, H. P. Albrecht, D. Hager, et al., *Microvasc. Res.*, **52** (1), 69 (1996).
- H. D. Kvernmo, A. Stefanovska, K. A. Kirkeboen, et al., *Microvasc. Res.*, **57** (3), 298 (1999).
- Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем. Колебания, информация, нелинейность: Руководство для врачей*, под ред. А. И. Крупаткина и В. В. Сидорова (Либроком, М., 2013).
- M. Rossi, S. Bertuglia, M. Varanini, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **59** (5), 233 (2005).
- G. B. Yvonne-Tee, A. H. Rasool, A. S. Halim, et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **52** (2), 286 (2005).
- J. L. Cracowski, C. T. Minson, M. Salvat-Melis, et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, **27** (9), 503 (2006).
- C. T. Minson, *J. Appl. Physiol.*, **109** (4), 1239 (2010).
- V. E. Brunt and C. T. Minson, *J. Appl. Physiol.*, **111** (1), 5 (2011).
- G. A. Tew, M. Klonizakis, J. Moss, et al., *Microvasc. Res.*, **81** (2), 177 (2011).
- M. Sorelli, P. Francia, L. Bocchi, et al., *Microvasc. Res.*, **124**, 91 (2019).
- M. Rossi, S. Taddei, A. Fabbri, et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **29** (3), 406 (1997).
- S. Blaise, M. Hellmann, M. Roustit, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **160** (5), 1128 (2010).
- R. S. Bruning, L. Santhanam, A. E. Stanhewicz, et al., *J. Appl. Physiol.*, **112** (12), 2019 (2012).
- A. Jekell, M. Kalani, and T. Kahan, *Heart Vessels*, **34** (3), 484 (2019).
- I. Mizeva, E. Zharkikh, V. Dremin, et al., *Microvasc. Res.*, **120**, 13 (2018).
- American Diabetes Association, *Diabetes Care*, **44** (Suppl. 1), S15 (2021).
- R. Madonna, C. R. Balistreri, Y. J. Geng, et al., *Vascul. Pharmacol.*, **90**, 1 (2017).
- R. Madonna, D. Pieragostino, C. R. Balistreri, et al., *Vascul. Pharmacol.*, **107**, 27 (2018).
- М. В. Шестакова, О. К. Викулова, М. А. Исаков и др., *Проблемы эндокринологии*, **66** (1), 35 (2020).
- A. Al-Awar, K. Kupai, M. Veszeka, et al., *J. Diabetes Res.*, **2016**, 9051426 (2016).
- D. Fuchs, P. P. Dupon, L. A. Schaap, et al., *Cardiovasc. Diabetol.*, **16** (1), 11 (2017).
- A. Carrizzo, C. Izzo, M. Oliveti, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (10), 2968 (2018).
- W. D. Strain and P. M. Paldanius, *Cardiovasc. Diabetol.*, **17** (1), 57 (2018).
- J. M. Gregory, J. C. Slaughter, S. H. Duffus, et al., *Diabetes Care*, **44** (2), 526 (2021).
- A. Yonekawa and N. Shimono, *Biology (Basel)*, **11** (3), 400 (2022).
- H. M. Murphy-Lavoie, A. Ramsey, M. Nguyen, et al., in *StatPearls [Internet]* (Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2021).
- N. E. Cameron, S. E. Eaton, M. A. Cotter, et al., *Diabetologia*, **44** (11), 1973 (2001).
- R. L. Greenman, S. Panasyuk, X. Wang, et al., *Lancet*, **366** (9498), 1711 (2005).
- L. A. Sokolnicki, S. K. Roberts, B. W. Wilkins, et al., *Am. J. Physiol. – Endocrinology*, **M 292** (1), E314 (2007).
- J. E. Tooke, *Cardiovasc. Res.*, **32** (4), 764 (1996).
- A. I. Vinik, T. Erbas, T. S. Park, et al., *Diabetes Care*, **24** (8), 1468 (2001).
- I. Kozlov, E. Zherebtsov, G. Masalygina, et al., *Diagnostics (Basel)*, **11** (2), 267 (2021).
- R. A. S. Sancho and G. M. Pastore, *Food Res. Int.*, **46** (1), 378 (2012).
- S. C. Sanka, D. C. Bennett, J. D. Rojas, et al., *Proc., SPIE*, **3924**, 56 (2000).
- M. Kalani, *Vasc. Health Risk Manag.*, **4** (5), 1061 (2008).
- J. D. Ward, A. J. Boulton, J. M. Simms, et al., *J. Roy. Soc. Med.*, **76** (12), 1011 (1983).
- A. E. Caballero, S. Arora, R. Saouaf, et al., *Diabetes*, **48** (9), 1856 (1999).
- K. M. Azadzo and I. Saenz de Tejada, *J. Urol.*, **148** (5), 1587 (1992).
- L. A. Suzuki, M. Poot, R. G. Gerrity, et al., *Diabetes*, **50** (4), 851 (2001).

59. V. Urbancic-Rovan, A. Stefanovska, A. Bernjak, et al., *J. Vasc. Res.*, **41** (6), 535 (2004).
60. J. Turner, J. J. Belch, and F. Khan, *Trends Cardiovasc. Med.*, **18** (4), 109 (2008).
61. P. C. Sun, C. S. Chen, C. D. Kuo, et al., *Microvasc. Res.*, **83** (2), 243 (2012).
62. H. F. Hu, H. Hsiu, C. J. Sung, et al., *Lasers Med. Sci.*, **32** (2), 327 (2017).
63. T. Forst, A. Caduff, M. Talary, et al., *Diabetes Technol. Ther.*, **8** (1), 94 (2006).
64. D. L. Kellogg, Jr., J. L. Zhao, Y. Wu, et al., *J. Appl. Physiol.*, **110** (5), 1406 (2011).
65. J. Petrofsky, D. Paluso, D. Anderson, et al., *Diabetes Technol. Ther.*, **13** (3), 365 (2011).
66. M. Roustit and J. L. Cracowski, *Microcirculation*, **19** (1), 47 (2012).
67. J. S. Petrofsky, F. Alshammari, G. S. Bains, et al., *Med. Sci. Monitor*, **19**, 257 (2013).
68. D. Lowry, M. Saeed, P. Narendran, et al., *J. Diabetes Sci. Technol.*, **11** (5), 914 (2017).
69. H. Hsiu, H. F. Hu, and H. C. Tsai, *Microvasc. Res.*, **115**, 1 (2018).
70. A. Bandrivskyy, A. Bernjak, P. McClintock, et al., *Cardiovasc. Engineer.*, **4** (1), 89 (2004).
71. A. V. Tankanag, A. A. Grinevich, T. V. Kirilina, et al., *Microvasc. Res.*, **95**, 53 (2014).
72. I. V. Tikhonova, A. A. Grinevich, I. E. Guseva, et al., *Microcirculation*, **28** (1), e12655 (2021).
73. Y. Shiogai, A. Stefanovska, and P. V. McClintock, *Phys. Rep.*, **488** (2-3), 51 (2010).
74. V. Ticcinelli, T. Stankovski, P. V. McClintock, et al., *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2015**, 7366 (2015).
75. M. Elstad, I. Zilakos, and T. K. Bergersen, *Physiol. Meas.*, **38** (5), 848 (2017).
76. V. Ticcinelli, T. Stankovski, D. Iatsenko, et al., *Front. Physiol.*, **8**, 749 (2017).
77. G. Gilbert, T. Ducret, R. Marthan, et al., *Cardiovasc. Res.*, **103** (2), 313 (2014).
78. G. Ji, R. J. Barsotti, M. E. Feldman, et al., *J. Gen. Physiol.*, **119** (6), 533 (2002).
79. F. Shaffer and J. P. Ginsberg, *Front Public Health*, **5**, 258 (2017).
80. F. Shaffer, R. McCraty, and C. L. Zerr, *Front. Psychol.*, **5**, 1040 (2014).
81. Heart Rate Variability. Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing Electrophysiology, *Circulation*, **93** (5), 1043 (1996).
82. T. E. Lohmeier and J. E. Hall, *Circ. Res.*, **124** (7), 1071 (2019).
83. A. I. Vinik, R. Freeman and T. Erbas, *Semin. Neurol.*, **23** (4), 365 (2003).
84. A. I. Vinik, T. Erbas and C. M. Casellini, *J. Diabetes Investig.*, **4** (1), 4 (2013).
85. V. L. Fisher and A. A. Tahrani, *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **10**, 419 (2017).
86. M. Shibasaki, D. A. Low, S. L. Davis, et al., *J. Appl. Physiol.*, **105** (5), 1504 (2008).
87. S. J. Smillie and S. D. Brain, *Neuropeptides* **45** (2), 93 (2011).
88. A. G. Goodwill and J. C. Frisbee, *Vascul. Pharmacol.*, **57** (5-6), 150 (2012).
89. J. L. Cracowski and M. Roustit, *Microcirculation*, **23** (5), 337 (2016).
90. N. Tran, T. Garcia, M. Aniga, et al., *Am. J. Biomed. Sci. Res.* **15** (2), 153 (2022).
91. A. Grinevich, A. Tankanag, I. Tikhonova, et al., *Microvasc. Res.* **126**, 103889 (2019).
92. Н. А. Лычева, Д.А. Макушкина и А. В. Седов, *Современные проблемы науки и образования*, **5** URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26992> (дата обращения: 18.04.2022) (2017).
93. S. Inoue, Y. Asai, and Y. Kawai, *Ann. Plast. Surg.*, **50** (1), 64 (2003).
94. G. J. Hodges, D. N. Jackson, L. Mattar, et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **297** (3), R546 (2009).
95. F. Polito, A. Bitto, M. Galeano, et al., *J. Vasc. Surg.*, **55** (2), 479 (2012).
96. J. Decorps, J. L. Saumet, P. Sommer, et al., *Ageing Res. Rev.*, **13**, 90 (2014).
97. S. Gohin, J. Decorps, D. Sigaudou-Roussel, et al., *Microvasc. Res.*, **101**, 103 (2015).
98. Y. Q. Liu, Y. F. Liu, X. M. Ma, et al., *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, **68** (7), e147 (2015).
99. K. X. Song, M. Z. Zhang, J. Q. Hu, et al., *BMC Surg.*, **15**, 92 (2015).
100. Y. D. Xiao, Y. Q. Liu, J. L. Li, et al., *J. Surg. Res.*, **199** (2), 732 (2015).
101. S. Hu, Z. L. Lin, Z. K. Zhao, et al., *J. Parenter. Enter. Nutr.*, **40** (7), 924 (2016).
102. X. Yuan, Q. Wu, F. Shang, et al., *Clin. Exp. Hypertens.*, **41** (4), 342 (2019).
103. J. S. Tan, C. C. Lin, and G. S. Chen, *BMJ Open Diabetes Res. Care*, **8** (1), e001004 (2020).
104. Y. Wei, H. Chen, Q. Chi, et al., *Med. Biol. Eng. Comput.*, **59** (5), 1151 (2021).
105. M. Amoroso, O. Ozkan, O. Ozkan, et al., *Plast. Reconstr. Surg.*, **136** (3), 512 (2015).
106. M. Aral, S. Tuncer, A. Sencan, et al., *J. Reconstr. Microsurg.*, **31** (7), 487 (2015).
107. B. Kaya, C. Çerkez, S. E. İşılğan, et al., *J. Plast. Surg. Hand Surg.*, **49** (6), 358 (2015).
108. D. W. Lee, H. J. Hong, H. Roh, et al., *Ann. Plast. Surg.*, **75** (1), 84 (2015).
109. Y. H. Qin, H. S. Jiao, A. S. Li, et al., *J. Plast. Surg. Hand Surg.*, **49** (6), 319 (2015).
110. W. Feng, S. Liu, C. Zhang, et al., *Theranostics*, **9** (20), 5854 (2019).
111. J. M. Newman, R. M. Dwyer, P. St-Pierre, et al., *J. Physiol.*, **587** (Pt 11), 2579 (2009).
112. М. Е. Асташев, Д. А. Серов и А. В. Танканаг, *Биофизика*, **63** (1), 159 (2018).
113. М. Е. Асташев, Д. А. Серов and A. V. Tankanag, *Skin Res. Technol.*, **25** (1), 40 (2019).
114. И. И. Дедов, М. В. Шестакова, О. К. Викулова и др., *Сахарный диабет*, **24** (3), 204 (2021).
115. S. Pandey and M. C. Dvorakova, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, **20** (1), 25 (2020).
116. С. Р. Д. Kottaisamy, D. S. Raj, V. Prasanth Kumar, et al., *Lab. Anim. Res.*, **37** (1), 23 (2021).
117. B. Proniewski, A. Bar, A. Kieronska-Rudek, et al., *Cells*, **10** (6), 1448 (2021).
118. F. Beguinot and C. Nigro, *Methods Mol. Biol.*, **933**, 219 (2012).
119. J. H. Kim and A. M. Saxton, *Methods Mol. Biol.*, **933**, 75 (2012).
120. В. К. Мазо, Ю. С. Сидорова и А. А. Кочеткова, *Вопросы питания*, **84** (6), 63 (2015).

121. О. И. Степанова, В. Н. Каркищенко, О. В. Баранова и др., *Биомедицина*, **2**, 28 (2009).
122. J. Molnar, S. Yu, N. Mzhavia, et al., *Circ. Res.*, **96** (11), 1178 (2005).
123. K. K. Wu and Y. M. Huan, *Atherosclerosis*, **191** (2), 241 (2007).
124. H. Poudyal, S. Panchal, and L. Brown, Br, J, *Nutr.*, **104** (9), 1322 (2010).
125. H.-G. Joost, H. Al-Hasani, and A. Schurmann, *Methods Mol. Biol.*, **933**, 325 (2012).
126. V. R. Konda, A. Desai, G. Darland, et al., *PLoS One*, **9** (1), e87848 (2014).
127. М.Н. Макарова и В. Г. Макаров, Лабораторные животные для научных исследований. URL: <https://labanimalsjournal.ru/ru/node/763> (дата обращения: 18.04.2022) (2018).
128. R. Kohen-Avraroglu, M. A. Laplante, K. Le Quang, et al., *Can. J. Diabetes*, **37** (5), 351 (2013).
129. A. Tominaga, N. Ishizaki, Y. Naruse, et al., *Acupunct. Med.*, **29** (4), 276 (2011).
130. S. Xi, W. Yin, Z. Wang, et al., *Int. J. Exp. Pathol.*, **85** (4), 223 (2004).
131. A. K. Azemi, S. S. Mokhtar, L. J. Hou, et al., *Biotech. Histochem.*, **96** (7), 498 (2021).
132. A. Heydemann, *J. Diabetes Res.*, **2016**, 2902351 (2016).
133. В. И. Евлахов и И. З. Поясов, *Ангиология и сосудистая хирургия*, **25** (3), 1 (2019).
134. А. Н. Иванов, Э. Б. Попыхова и Н. Е. Терешкина, *Успехи физиол. наук*, **51** (4), 82 (2020).
135. C. R. Triggle, S. M. Samuel, S. Ravishankar, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **90** (6), 713 (2012).
136. W. C. Cole, G. R. Gordon, and A. P. Braun, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1124**, 297 (2019).
137. L. Jaimes, R. Vinet, M. Knox, et al., *Animals (Basel)*, **9** (6), 288 (2019).
138. N. Mendez-Barbero, C. Gutierrez-Munoz, and L. M. Blanco-Colio, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (14), 7284 (2021).
139. J. L. Martin-Ventura, C. Roncal, J. Orbe, et al., *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 813885 (2022).
140. K. V. Woo and H. S. Baldwin, *Trends Cardiovasc. Med.*, **21** (4), 118 (2011).
141. K. J. Bubb, R. H. Ritchie, and G. A. Figtree, *Microcirculation*, **26** (2), e12501 (2019).
142. S. N. Baldwin, E. A. Forrester, L. McEwan, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **179** (7), 1338 (2022).
143. E. Boedtkjer, K. V. Hansen, D. M. B. Boedtkjer, et al., *J. Cerebr. Blood F. Met.*, **36** (5), 965 (2016).
144. K. Takahashi, R. Kim, C. Lauhan, et al., *PLoS One*, **12** (5), e0177192 (2017).
145. A. F. O. Justo and P. P. L. Afonso, *J. Cell Commun. Signal.*, **15** (3), 467 (2021).
146. H. G. Augustin and G. Y. Koh, *Science*, **357** (6353), eaal2379 (2017).
147. T. Minami, M. Muramatsu, and T. Kume, *Biol. Pharm. Bull.*, **42** (10), 1609 (2019).
148. L. Giffe-Renom, M. Daems, A. Luttun, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (3), 1477 (2022).
149. Z. Melik, P. Zaletel, T. Virtic, et al., *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **65** (3), 205 (2017).
150. И. В. Тихонова, А. В. Танканаг, Н. И. Косякова и др., *Пульмонология*, № 1, 57 (2008).
151. И. В. Тихонова, А. В. Танканаг, Н. И. Косякова и др., *Фундаментальные исследования*, **7** (2), 364 (2014).
152. И. В. Тихонова, Н. И. Косякова, А. В. Танканаг и др., *Вестн. РАМН*, **71** (3), 233 (2016).
153. I. V. Tikhonova, N. I. Kosyakova, A. V. Tankanag, et al., *Microcirculation*, **23** (1), 33 (2016).
154. J. M. Hughes, M. A. Riddle, M. L. Paffett, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299** (5), H1439 (2010).
155. Z. G. Wu, L. Gu, Y. K. Si, et al., *Endocr. Metab. Immune*, **21** (7), 1270 (2021).
156. M. L. Paffett, M. A. Riddle, N. L. Kanagy, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **334** (3), 753 (2010).
157. A. Filippini, A. D'Amore, and A. D'Alessio, *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (18), 4525 (2019).
158. F. Moccia, S. Negri, M. Shekha, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (16), 3962 (2019).
159. P. Thakore and S. Earley, *Compr. Physiol.*, **9** (3), 1249 (2019).
160. K. S. Hong and M. G. Lee, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **24** (4), 287 (2020).
161. S. Negri, P. Faris and F. Moccia, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (18), 9821 (2021).
162. W. F. Jackson, *Curr. Top. Membr.*, **85**, 1 (2020).
163. L. Liu, M. Guo, X. Lv, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 677661 (2021).
164. W. F. Jackson, *Front. Physiol.*, **13**, 805149 (2022).
165. R. Berra-Romani, A. Guzman-Silva, A. Vargaz-Guadarrama, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (1), 250 (2020).
166. R. D. A. Moraes, R. C. Webb, and D. F. Silva, *Front. Physiol.*, **12**, 645109 (2021).
167. K. Monaghan, J. McNaughten, M. K. McGahon, et al., *PLoS One*, **10** (6), e0128359 (2015).
168. Y. Guo, X. Yang, J. He, et al., *Life Sci.*, **209**, 217 (2018).
169. N. Ozturk, S. Uslu, and S. Ozdemir, *World J. Diabetes*, **12** (1), 1 (2021).
170. A. Advani, S. M. Marshall, and T. H. Thomas, *Diabetologia*, **45** (5), 719 (2002).
171. I. V. Tikhonova, A. A. Grinevich, I. E. Guseva, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **159**, 76 (2020).
172. S. S. Kappala, J. Espino, J. A. Pariente, et al., *Mol. Cell. Biochem.*, **387** (1–2), 251 (2014).
173. Y. Zhao, P. M. Vanhoutte, and S. W. Leung, *J. Pharmacol. Sci.*, **129** (2), 83 (2015).
174. J. Qian and D. Fulton, *Front. Physiol.*, **4**, 347 (2013).
175. R. Berra-Romani, P. Faris, S. Negri, et al., *Cells*, **8** (7), 689 (2019).
176. M. Liu, X. Song, B. Wang, et al., *Am. J. Hypertens.*, **34** (1), 100 (2021).
177. D. Serov, A. Tankanag, and M. Astashev, *Cell Biol. Int.*, **46** (3), 427 (2022).
178. J. F. Perez-Zoghbi, Y. Bai, and M. J. Sanderson, *J. Gen. Physiol.*, **135** (3), 247 (2010).
179. J. A. Kim, M. Montagnani, K. K. Koh, et al., *Circulation*, **113** (15), 1888 (2006).
180. H. Kolb, K. Kempf, M. Rohling, et al., *BMC Med.*, **18** (1), 224 (2020).
181. B. A. Lazar, G. Jancso, and P. Santha, *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (7), 2507 (2020).
182. R. Muniyappa and J. R. Sowers, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **14** (1), 5 (2013).
183. T. Maruhashi and Y. Higashi, *Antioxidants (Basel)*, **10** (8), 1306 (2021).
184. S. Gogg, U. Smith, and P. A. Jansson, *Diabetes*, **58** (10), 2238 (2009).
185. J. Boucher, A. Kleinriders, and C. R. Kahn, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6** (1), a009191 (2014).

186. I. S. Stafeev, A. V. Vorotnikov, E. I. Ratner, et al., *Int. J. Endocrinol.*, **2017**, 5076732 (2017).
187. A. V. Vorotnikov, I. S. Stafeev, M. Y. Menshikov, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **84** (11), 1329 (2019).
188. M. Khalid, J. Alkaabi, M. A. B. Khan, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (16), 8590 (2021).
189. M. C. Petersen and G. I. Shulman, *Physiol. Rev.*, **98** (4), 2133 (2018).
190. G. L. King, K. Park, and Q. Li, *Diabetes*, **65** (6), 1462 (2016).
191. P. Geraldès and G. L. King, *Circ. Res.*, **106** (8), 1319 (2010).
192. K. C. Nandipati, S. Subramanian, and D. K. Agrawal, *Mol. Cell. Biochem.*, **426** (1-2), 27 (2017).
193. D. E. James, J. Stockli, and M. J. Birnbaum, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **22** (11), 751 (2021).
194. N. V. Goncharov, A. D. Nadeev, R. O. Jenkins, et al., *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2017**, 9759735 (2017).
195. A. O. Kadlec and D. D. Gutterman, *Compr. Physiol.*, **10** (1), 229 (2019).
196. G. A. Knock, *Free Radic Biol. Med.*, **145**, 385 (2019).
197. A. C. Montezano, D. Burger, G. S. Ceravolo, et al., *Clin. Sci. (Lond.)*, **120** (4), 131 (2011).
198. B. K. Rodino-Janeiro, B. Paradelo-Dobarro, M. I. Castineiras-Landeira, et al., *Vasc. Health Risk Manag.*, **9**, 401 (2013).
199. A. Konior, A. Schramm, M. Czesnikiewicz-Guzik, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **20** (17), 2794 (2014).
200. M. Santillo, A. Colantuoni, P. Mondola, et al., *Front. Physiol.*, **6**, 194 (2015).
201. A. Vermot, I. Petit-Hartlein, S. M. E. Smith, et al., *Antioxidants (Basel)*, **10** (6), 890 (2021).
202. J. Johnson, R. M. Jagers, G. Sreejit, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, online ahead of print (2021).
203. S. W. Schaffer, C. J. Jong, and M. Mozaffari, *Vascul. Pharmacol.*, **57** (5-6), 139 (2012).
204. P. Newsholme, V. F. Cruzat, K. N. Keane, et al., *Biochem. J.*, **473** (24), 4527 (2016).
205. O. O. Oguntibeju, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, **11** (3), 45 (2019).
206. J. B. de Haan and M. E. Cooper, *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, **3** (2), 709 (2011).
207. S. W. Park, H. O. Jun, E. Kwon, et al., *Vascul. Pharmacol.*, **90**, 19 (2017).
208. N. Apostolova, F. Iannantuoni, A. Gruevska, et al., *Redox Biol.*, **34**, 101517 (2020).
209. K. Suresh, L. Servinsky, J. Reyes, et al., *Am. J. Physiol. Lung C*, **309** (12), L1467 (2015).
210. G. W. Davison, R. E. Irwin, and C. P. Walsh, *Free Radic. Biol. Med.*, **170**, 194 (2021).
211. S. Altenhofer, K. A. Radermacher, P. W. Kleikers, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **23** (5), 406 (2015).
212. P. V. Avdonin, A. D. Nadeev, G. Y. Mironova, et al., *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, 1701478 (2019).
213. M. Billaud, R. Marthan, J. P. Savineau, et al., *PLoS One*, **4** (7), e6432 (2009).
214. L. L. Camargo, A. C. Montezano, M. Hussain, et al., *Cardiovasc. Res.*, **118** (5), 1359 (2022).
215. K. Choi, M. Kennedy, A. Kazarov, et al., *Development*, **125** (4), 725 (1998).
216. W. C. Aird, *Circ. Res.*, **100** (2), 158 (2007).
217. W. C. Aird, *Circ. Res.*, **100** (2), 174 (2007).
218. W. C. Aird, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2** (1), a006429 (2012).

## Skin Microhemodynamics and Its Regulatory Mechanisms in Type 2 Diabetes Mellitus

I.V. Tikhonova, A.A. Grinevich, A.V. Tankanag, and V.G. Safronova

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

The paper presents modern concepts of peripheral microhemodynamics, approaches to the analysis of skin blood flow oscillations and their diagnostic significance. This study includes analysis of the disturbances in skin microhemodynamics in type 2 diabetes mellitus and proposes an algorithm to understand the occurrence of these disturbances in terms of relationships between external and internal factors that control skin blood flow, based on a comparison of relationships in normal and pathological conditions, as well as creating models of pathologies using animals. The factors and mechanisms of vasomotor regulation, including receptors and signaling events in endothelial and smooth muscle cells considered as model of microvessels, are discussed. Attention is drawn to the disorders of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of coupling between vascular cells and NO-dependent regulation of vasodilation in diabetes mellitus. The main mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus may occur due to defects in insulin binding caused by reduced receptor number and impaired signal transduction from the receptor to PI3K and downstream targets. Reactive oxygen species play an important role in vascular dysfunction in hyperglycemia. It is supposed that the studied molecular-cellular mechanisms that regulate microhemodynamics are involved in the formation of skin blood flow oscillations. The parameters of skin microcirculation can be used as diagnostic and prognostic markers for assessing the state of the organism.

*Keywords: microcirculation, type 2 diabetes mellitus, amplitude-frequency analysis, endothelium receptors, vasoactive factors, signaling*

УДК 577.3

## МЕТОД МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В АНАЛИЗЕ ПРОТИВОГЛАУКОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2022 г. Л.М. Балашова<sup>\*, \*\*, #</sup>, Н.А. Бакунина<sup>\*, \*\*, #</sup>, В.А. Намиот<sup>\*\*\*</sup>, И.И. Колесниченко<sup>\*\*\*\*</sup>,  
Ю.Д. Кузнецова<sup>\*, \*\*, #</sup>, А.А. Балашов<sup>\*\*</sup>, Ж.М. Салмаси<sup>\*</sup>, С.Н. Удалцов<sup>\*\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ,  
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997, Россия

<sup>#</sup>E-mail: blm1962@yandex.ru

<sup>\*\*</sup>НП Международный научно-практический Центр пролиферации тканей,  
ул. Пречистенка, 29/14, Москва, 119034, Россия

<sup>\*\*\*</sup>Институт ядерной физики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН,  
Ленинский просп., 31/4, Москва, 119071, Россия

<sup>\*\*\*\*\*</sup>ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
ул. Институтская, 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

Поступила в редакцию 23.05.2021 г.

После доработки 06.02.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Электрохимическим методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии изучена возможность определения в слезной жидкости ряда противоглаукомных препаратов (арутимола, пилокарпина, тусопта и др.). Показано, что метод эффективен для определения указанных препаратов. Рассмотрена динамика изменения их концентрации во времени. Таким образом, расширен список органических веществ, которые могут определяться методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии.

*Ключевые слова:* мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия, планарные электроды, противо-  
глаукомные препараты, арутимол, тимолол, тусопт, азопт, дорзопт, пилокарпин, фотил.

DOI: 10.31857/S0006302922040214, EDN: IVVGIO

Глаукома – одна из наиболее тяжелых форм офтальмопатологии, занимающая лидирующее место после катаракты среди причин слепоты и слабовидения населения Земли. До сих пор не существует эффективных методов лечения глаукомы, можно говорить только о более или менее удовлетворяющих методиках, как минимум приостанавливающих дальнейшее развитие заболевания.

В Российской Федерации в нозологической структуре слепоты и слабовидения доля глаукомы составляет 29%. Распространенность глаукомы среди населения России за последние годы выросла в 2,8 раза [1]. Глаукома занимает первое место в структуре первичной инвалидности по зрению в большинстве регионов Российской Федерации.

На практике используется большое число противо-  
глаукомных препаратов местного применения, различающихся по механизму действия. При

этом большинство из них ориентированы на снижение уровня внутриглазного давления, как за счет подавления продукции водянистой влаги, так и за счет активизации оттока внутриглазной жидкости из глаза. Для определения фармакокинетики и эффективного использования используемых противо-  
глаукомных препаратов существенна оценка динамики изменения их концентрации во времени после применения. С этой целью вполне успешно может быть задействован разработанный в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (Москва) метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии [2, 3]. Этим методом определяется изменение электрохимической активности катионов металлов в растворе в результате их взаимодействия с органическими веществами. Метод позволяет осуществлять идентификацию различных веществ на основании анализа характерных изменений вольтамперных кривых, происходя-

щих в результате введения различных веществ в исходную тест-систему. На получаемых вольтамперограммах при этом фиксируются изменения пиков токов растворения металлов, которые можно определить для каждого металла тест-системы по отдельности или оценить изменение всей вольтамперограммы интегрально. Измерения проводят на одном индикаторном электроде, что имеет большое преимущество по сравнению с мультисенсорными методами, использующими набор измерительных электродов.

Работоспособность и эффективность метода экспресс-диагностики биологических объектов с использованием мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии ранее была продемонстрирована нами при определении некоторых применяемых в офтальмологии анестетиков — наропина, хирокаина и лидокаина [4], ропивакаина [5], а также ряда других офтальмологических препаратов — визомитина [9], ланостерола и фентанила [10], в том числе противоглаукомного препарата бетоптика и некоторых его дженериков [11, 12].

В данной работе оценены возможности метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии при анализе ряда широко применяемых противоглаукомных препаратов (арутимола, азопта, тусупта и др., см. табл. 1) по оценке их содержания в слезной жидкости после инстилляций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение фоновой вольтамперограммы.** На планарные электроды производства ООО НПП «Автоком» (Москва) наносили 50 мкл тест-системы, состоящей из 0.05 М КС1 и катионов металлов ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Hg^{2+}$ , каждый в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М), затем снимали инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов  $-1.55$  В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой в анодную сторону до потенциала до 0.3 В. Полученная вольтамперограмма являлась фоновой (рис. 1, кривая 1).

**Влияние слезной жидкости здоровых людей на тест-систему.** Для изучения влияния на тест-систему слезной жидкости в конъюнктивальный мешок глаза помещали диск диаметром 8 мм из предварительно обработанного пористого материала (фильтровальной бумаги, которую предварительно тщательно промывали в спирте и дистиллированной воде и сушили при температуре  $80^{\circ}C$  в течение трех часов). Через определенное время (1 мин) этот бумажный диск извлекали из конъюнктивального мешка, помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой и снимали вольтамперограмму при тех же условиях, в которых получали фоновую вольтамперограмму.

На рис. 1 (кривая 2) показано влияние слезной жидкости на усредненную вольтамперограмму, полученную у десяти здоровых людей. Разброс (ошибка) результатов для слезной жидкости составляет 12%.

**Влияние исследуемых препаратов на тест-систему.** На планарные электроды фирмы «Автоком» наносили 50 мкл тест-системы, снимали инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов минус 1.55 В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой в анодную сторону потенциала до 0.3 В. Полученная вольтамперограмма являлась фоновой. Затем на электрод помещали 50 мкл свежего раствора тест-системы и исследуемые препараты в различной концентрации, после чего снова регистрировали вольтамперограммы.

**Влияние исследуемых препаратов на слезную жидкость.** Исследуемые препараты по одной капле вносили в конъюнктивальный мешок глаза и туда же помещали диск диаметром 8 мм из предварительно обработанного пористого материала (фильтровальная бумага). Через определенное время бумажный диск извлекали из конъюнктивального мешка и помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой (50 мкл). Измерения проводили через 3 мин, 1 ч, далее через каждый час в течение шести часов после инстилляций препаратов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

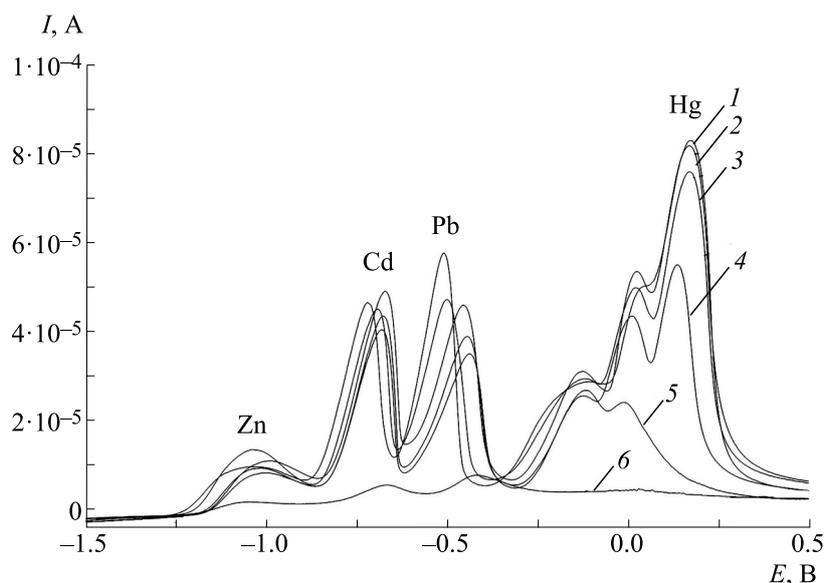
**Взаимодействие исследуемых препаратов с тест-системой.** На рис. 1 (кривые 3–6) показаны вольтамперограммы, полученные для тусупта в различных концентрациях *in vitro*. Можно видеть, что в присутствии тусупта токи ионов металлов, входящих в тест-систему, изменяются в разной степени в зависимости от концентрации тусупта: с ростом концентрации ток иона ртути возрастает, а у остальных металлов — уменьшается.

На рис. 2 и 3 приведены аналогичные данные соответственно для арутимолы и пилокарпина.

Так как в препарате дорзопт основное действующее вещество является тем же, что и в тусупте, влияние дорзопта на тест-систему аналогично влиянию тусупта и на отдельном рисунке не приводится. Также не приводится соответствующий рисунок для азопта, поскольку его действующее вещество — бринзоламид — влияет на тест-систему аналогично дорзоламиду.

Результаты по влиянию всех исследованных противоглаукомных препаратов на тест-систему приведены в табл. 1.

Видно, что с увеличением концентрации препаратов заметно уменьшаются токи свинца, кадмия и кобальта. Токи цинка, меди и ртути изменяются менее существенно.



**Рис. 1.** Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с тусоптом в различной концентрации: 1 – тест-система, 2 – слезная жидкость здоровых людей, 3 – 10%, 4 – 12%, 5 – 25%, 6 – 30%.

Таким образом, метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии может быть эффективным при определении в тест-системе исследованных противоглаукомных препаратов.

**Поведение исследуемых препаратов в слезной жидкости в зависимости от времени после их инстилляций.** Влияние слезной жидкости на тест-систему через 6 ч после инстилляций исследованных противоглаукомных препаратов показано в табл. 3. Так, при воздействии как арутимол, так и тусопта токи растворения металлов изменяются несущественно, откуда следует, что концентрации арутимол и тусопта в слезной жидкости в течение 6 ч также не меняются. Следовательно,

все перечисленные препараты через 6 ч после инстилляций продолжают оказывать действие на слезную жидкость. Что касается пилокарпина, то из рис. 4а (кривая 2) следует, что через 6 ч после инстилляций его действие на тест-систему ослабевает, в отличие от арутимол и тусопта (рис. 4б,в).

Данные о влиянии слезной жидкости на тест-систему через 12 ч после инстилляций препаратов приведены в табл. 4. Видно, что влияние препаратов тусопта, дорзопта, азопта, арутимол и фотила на тест-систему даже через 12 ч после инстилляций все еще достаточно велико. Следовательно, препараты достаточно устойчивы во

**Таблица 1.** Исследованные противоглаукомные препараты

№	Препарат	Активное вещество
1	Арутимол (Франция)	Тимолола гидромалеат
2	Тимолол (Московский эндокринный завод)	Тимолола малеат
3	Тусопт (Франция)	Дорзоламида гидрохлорид
4	Азопт (Бельгия)	Бринзоламид
5	Дорзопт (Румыния)	Дорзоламида гидрохлорид
6	Пилокарпин (Россия)	Пилокарпина гидрохлорид
7	Фотил (Россия)	Пилокарпина гидрохлорид, тимолола малеат, бензалкония хлорид

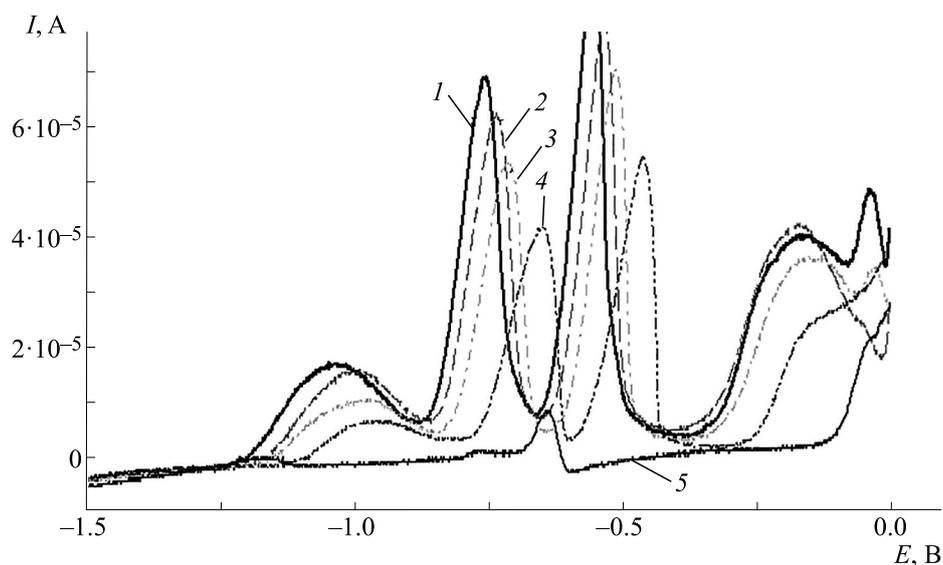


Рис. 2. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с арутимолом в различной концентрации: 1 – тест-система, 2 – слезная жидкость здоровых людей, 3 – 10%, 4 – 12%, 5 – 25%.

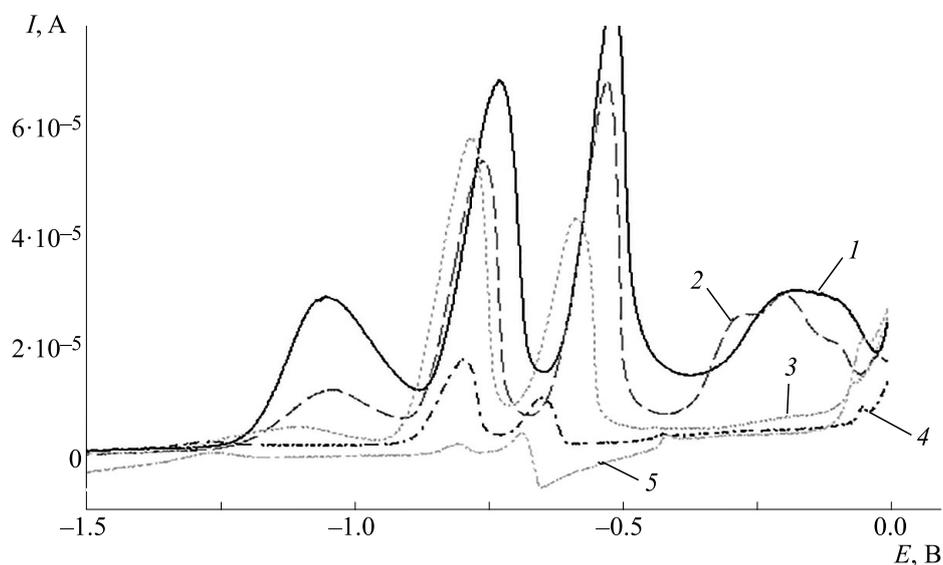


Рис. 3. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с пилокарпином в различной концентрации: 1 – тест-система, 2 – слезная жидкость здоровых людей, 3 – 10%, 4 – 12%, 5 – 25%.

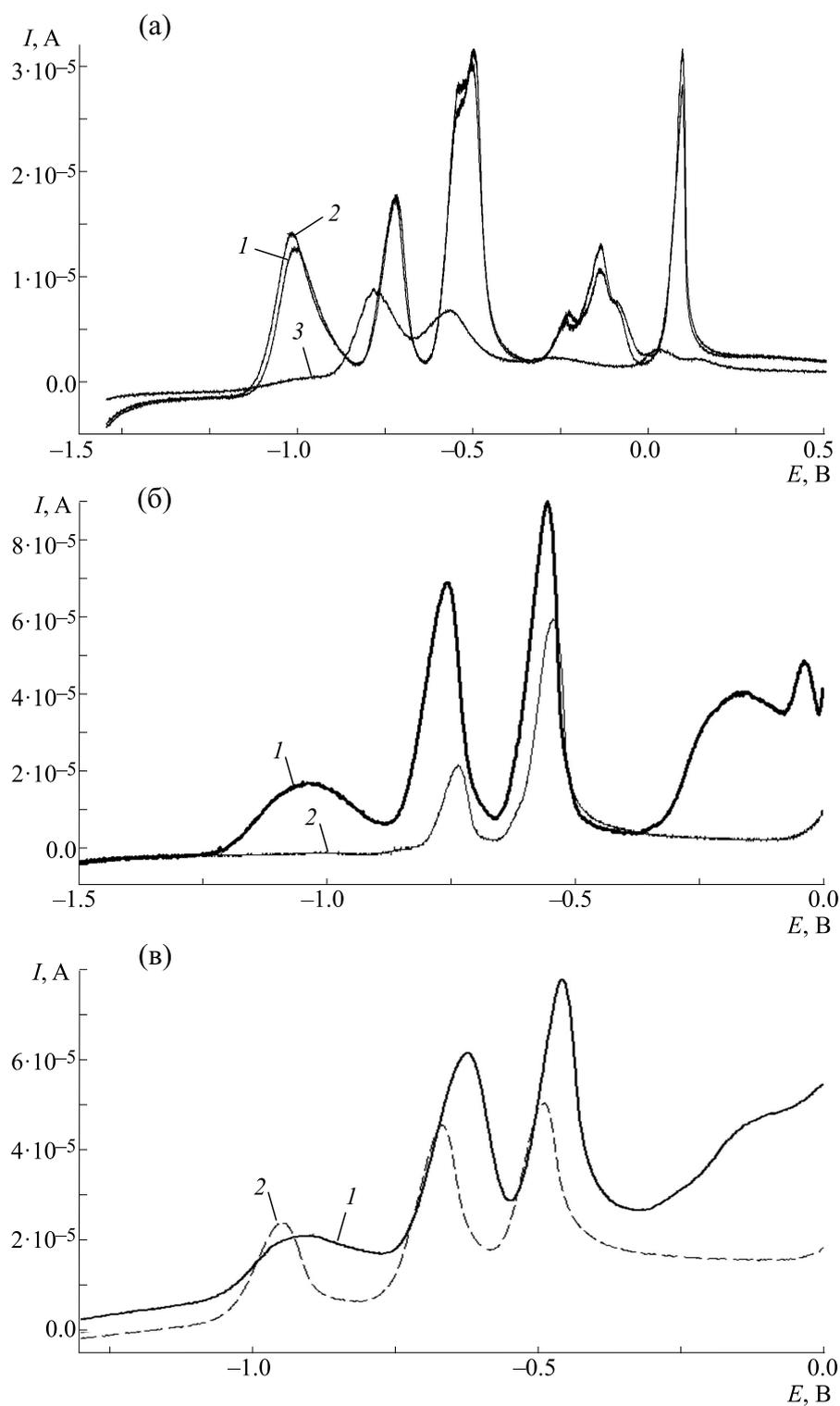
времени и через 12 ч после инстилляции продолжают оказывать действие на слезную жидкость и глазную поверхность.

Как видно из табл. 3 и 4, разные группы препаратов оказывают неодинаковое влияние на разные металлы, входящие в состав тест-системы. Например, препараты арутимол и тимолол оказывают достаточно сильное влияние на такие металлы как кобальт, медь и кадмий. Препараты трупот, дорзопт и азопт увеличивают пик тока ртути, но уменьшают пики токов цинка. Поэтому говорить о более сильном влиянии одной из

групп препаратов на тест-систему по сравнению с другой группой препаратов нельзя, так как это требует дополнительных исследований. Действие препарата фотил обусловлено, вероятно, наличием двух активных компонентов – пилокарпина гидрохлорида и тимолола малеата.

## ВЫВОДЫ

1. Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии позволяет анализировать в формате «Электронный язык» влияние



**Рис. 4.** (а) – Влияние слезной жидкости на тест-систему после инстилляциии пилокарпина: 1 – тест-система, 2 – через 3 мин после инстилляциии, 3 – через 6 ч после инстилляциии. (б) – Влияние слезной жидкости на тест-систему после инстилляциии арутимолла: 1 – тест-система, 2 – через 6 ч после инстилляциии. (в) – Влияние слезной жидкости на тест-систему после инстилляциии трусопта: 1 – тест-система, 2 – через 6 ч после инстилляциии.

**Таблица 2.** Влияние исследованных противоглаукомных препаратов на тест-систему

Препарат	Концентрация, %	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	—	16	45	58	32	40	80
Арутимол	10	20	48	60	20	30	80
	12	15	40	45	15	25	75
	25	15	25	30	10	15	85
	30	15	15	20	5	7	85
Тимолол	10	19	49	60	20	30	77
	12	16	42	44	15	23	78
	25	15	26	30	10	15	84
	30	15	15	22	5	7	85
Трусопт	10	20	40	50	15	20	75
	12	20	43	55	12	15	80
	25	21	50	60	10	15	85
	30	22	50	63	10	13	90
Азопт	10	15	35	40	15	20	65
	12	10	33	35	10	15	60
	25	9	25	30	10	12	55
	30	6	20	23	10	10	60
Дорзопт	10	20	40	50	15	20	75
	12	20	43	55	12	15	80
	25	21	50	60	10	15	85
	30	22	50	63	10	13	90
Пилокарпин	10	3	34	48	20	28	56
	12	15	60	62	36	38	85
	25	20	65	70	30	35	90
	30	25	65	72	25	30	95

**Таблица 3.** Влияние слезной жидкости на тест-систему через 6 ч после инстилляций исследованных противоглаукомных препаратов

Слезная жидкость	Пики токов растворения металлов, мкА					
	Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Тест-система	16	45	58.0	32	40.0	80.8
Здоровые люди	12	34.6	50.4	23.2	36	74.6
Больные глаукомой после инстилляций пилокарпина	22	40	50	20.3	30.1	75.5
Больные глаукомой после инстилляций трусопта	13	35.5	40.5	20.4	18.0	68.2
Больные глаукомой после инстилляций азопта	12	34	30	15	16	60
Больные глаукомой после инстилляций дорзопта	13	35	39	20	19	70
Больные глаукомой после инстилляций аруtimoла	12	31	42	19.5	20.0	65

**Таблица 4.** Влияние слезной жидкости на тест-систему через 12 ч после инстилляций исследованных противоглаукомных препаратов

Слезная жидкость	Пики токов растворения металлов, мкА					
	Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Тест-система	16	45	58.0	32	40.0	80.8
Здоровые люди	12	34.6	50.4	23.2	36	74.6
Больные глаукомой после инстилляций пилокарпина	22	40	50	20.3	30.1	75.5
Больные глаукомой после инстилляций трузопта	13	36	41	21	19	68
Больные глаукомой после инстилляций фотила	14	40	39	22	20	70
Больные глаукомой после инстилляций азопта	12	37	34	18	19	60
Больные глаукомой после инстилляций дорзопта	13	36	39	20	19	70
Больные глаукомой после инстилляций арутимола	12	36	42	19.5	20.0	67

исследованных противоглаукомных препаратов на слезную жидкость во времени.

2. Показано, что влияние препаратов трузопта, дорзопта, азопта, арутимола и фотила на тест-систему даже через 12 ч после инстилляций все еще достаточно велико. Следовательно, препараты достаточно устойчивы во времени и через 12 ч после инстилляций продолжают оказывать действие на слезную жидкость и глазную поверхность.

3. Показано, что пилокарпин менее устойчив во времени и через 6 часов после инстилляций его влияние на слезную жидкость уменьшается.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с участием пациентов соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников экспериментов получено письменное информированное согласие на проведение исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.П. Нестеров, *Глаукома* (Медицинское информационное агентство, М., 2014).
2. В. Н. Андреев, В. М. Ганшин, А. Н. Доронин и В. П. Луковцев, Патент РФ № 2375705, опубл. 10.12.2009.
3. В. П. Луковцев, А. Н. Доронин, В. А. Семенова и В. М. Ганшин, *Электрохимия*, **45** (7), 869 (2009).
4. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика*, **65** (6), 1211 (2020).
5. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика*, **67** (1), 134 (2022).
6. И. И. Колесниченко, Е. П. Кантаржи и А. Н. Доронин, в сб. *Труды 6-й Всероссийской науч.-практич. конф. «Измерения в современном мире – 2017»* (СПбПУ, СПб., 2017), сс. 33–37.
7. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология*, **23** (9–10), 6 (2017).
8. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика*, **63** (4), 825 (2018).
9. И. И. Колесниченко, Л. М. Балашова и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология*, **23** (9–10), 36 (2017).
10. И. И. Колесниченко, Л. М. Балашова и Л. С. Коробова, *Биофизика*, **66** (3), 577 (2021).
11. I. I. Kolesnichenko, L. M. Balachova, and E. P. Kantarzhii, *Am. J. Anal. Chem.*, **7** (7), 588 (2016).
12. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., *Биофизика*, **64** (6), 1088 (2019).

## A Multisensory Stripping Voltammetry Method for Analysis of Anti-Glaucoma Drugs

L.M. Balashova<sup>\*, \*\*</sup>, N.A. Bakunina<sup>\*, \*\*</sup>, V.A. Namiot<sup>\*\*\*</sup>, I.I. Kolesnichenko<sup>\*\*\*\*</sup>,  
Yu.D. Kuznetsova<sup>\*, \*\*</sup>, A.A. Balashov<sup>\*\*</sup>, G.M. Salmasi<sup>\*</sup>, and S.N. Udaltsov<sup>\*\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>*Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,  
ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

<sup>\*\*</sup>*International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, ul. Prechistenka 29/14, Moscow, 119034 Russia*

<sup>\*\*\*</sup>*Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

<sup>\*\*\*\*</sup>*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii prosp. 31/4, Moscow, 119071 Russia*

<sup>\*\*\*\*\*</sup>*Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",  
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

An electrochemical method for multisensory stripping voltammetry was used to explore whether it is appropriate for determination of anti-glaucoma drugs (arutimol, pilocarpine, trusopt, etc.) in tear fluid. It is shown that this method is effective for determination of above drugs. The dynamics of changes in drug concentrations over time was studied. As a result, the list of organic substances, that can be determined by the method of multisensory stripping voltammetry, is expanded.

*Keywords: multisensory stripping voltammetry, planar electrodes, antiglaucoma drugs, arutimol, timolol, trusopt, azopt, dorzopt, pilocarpine, fofil*

УДК 57.089:616.1:677.494

## НЕТКАНЫЕ СОСУДИСТЫЕ ПРОТЕЗЫ МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ НАНОВОЛОКОН ИЗ АРОМАТИЧЕСКОГО ПОЛИИМИДА

© 2022 г. А.Е. Чирятева<sup>\*,#</sup>, Н.А. Завражных<sup>\*</sup>, П.В. Попрядухин<sup>\*,\*\*</sup>, Г.Ю. Юкина<sup>\*,\*\*\*</sup>,  
А.В. Кривенцов<sup>\*\*\*\*</sup>, Е.М. Иванькова<sup>\*\*</sup>, В.Е. Юдин<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
ул. Политехническая, 29, Санкт-Петербург, 195251, Россия

<sup>#</sup>E-mail: chirateva.ae@gmail.com

<sup>\*\*</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Большой просп., 31, Санкт-Петербург, 199004, Россия

<sup>\*\*\*</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова,  
ул. Льва Толстого, 6-8, Санкт-Петербург, 197022, Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,  
ул. Академика Лебедева, 6Ж, Санкт-Петербург, 194044, Россия

Поступила в редакцию 02.12.2021 г.

После доработки 02.12.2021 г.

Принята к публикации 26.05.2022 г.

Одним из основных методов лечения сердечно-сосудистой патологии является хирургическая реконструкция сосудов, в том числе с использованием протезов на основе полимерных материалов; ведется разработка клинически приемлемого протеза малого диаметра. В данной работе протезы кровеносных сосудов диаметром 1.2 мм были получены методом электроформования из ароматического полиимида. Механические характеристики полученных протезов сравнимы с параметрами нативных сосудов крыс и человека. Протезы были имплантированы в брюшную часть аорты крыс на 1, 3 и 6 месяцев. В ходе эксперимента протезы проходимы, признаков образования аневризм и гиперплазии интимы не наблюдается, случаи тромбоза не зафиксированы. Морфологическое исследование показало образование на внутренней поверхности протеза неоинтимы, представленной эндотелием и тонким субэндотелиальным слоем, и заключение протеза в соединительно-тканную капсулу. Протезы на основе нановолокон полиимида продемонстрировали высокую биосовместимость и тромборезистентность, что позволяет рекомендовать дальнейшее их исследование в качестве тканеинженерных сосудистых имплантатов.

*Ключевые слова:* тканевая инженерия, тканеинженерный сосудистый имплантат, полиимид, ПМ-ДАДФЭ, электроформование.

DOI: 10.31857/S0006302922040226, EDN: IVWSHU

По данным Всемирной организации здравоохранения заболевания сердечно-сосудистой системы занимают ведущую позицию среди причин смерти в мире [1]. Одним из основных методов лечения данной патологии, после медикаментозной терапии, является хирургическая реконструкция сосудов – протезирование или шунтирование.

В качестве материала, замещающего нативный сосуд, используют аутооттрансплантаты или синтетические протезы. Забор аутоматериала сосуда приводит к нарушениям кровоснабжения в ткане-доноре и дополнительной травматизации пациента; также на отдаленных сроках наблюдается дегенерация стенок аутооттрансплантата. К тому же в случае проведения повторных или множественных операций и наличия сопутствующих заболеваний количество аутологичного оперативного

материала естественным образом ограничивается [2].

Одной из главных проблем при пластике сосудов с использованием синтетических протезов остается протезирование артерий малого диаметра: 6 мм и менее. Ввиду раннего тромбообразования, гиперплазии неоинтимы в районе анастомозов и других факторов до настоящего времени не разработан клинически приемлемый протез малого диаметра, ведется активный поиск новых полимерных материалов и разработка методов получения протезов [3, 4].

Протезы кровеносных сосудов из полимерных материалов имеют ряд существенных преимуществ перед аутологичными: позволяют использовать все разнообразие искусственных и природных материалов биомедицинского назначе-

ния, варьировать механические характеристики и функционализировать поверхность. В частности, для задач тканевой инженерии сосудов применяют протезы на основе биорезорбируемых и нерезорбируемых трубчатых нетканых полимерных матриц.

При использовании протезов из биорезорбируемых полимеров необходима сопряженность во времени процессов биорезорбции и ремоделирования вновь формируемого сосуда, так как ухудшение механических свойств протеза в процессе резорбции приводит к гиперплазии неоинтимы, возникновению аневризм, а также иммунному ответу организма при высокой концентрации продуктов резорбции. Протезы из нерезорбируемых полимеров лишены части этих недостатков, что в перспективе способствует быстрому и эффективному восстановлению кровеносного русла.

Одним из перспективных полимеров для получения матриц для протезирования кровеносных сосудов является полиимид. Благодаря своим механическим свойствам и биосовместимости полиимидные материалы получили широкое распространение в биомедицине в качестве компонентов имплантируемых микроэлектронных устройств, легочных мембран-оксигенаторов, систем хранения клеток, пакетов для низкотемпературного хранения крови [5, 6]. В эксперименте *in vitro* было показано отсутствие цитотоксичности ароматических полиимидов, что подтверждает перспективность использования этих материалов в сосудистой хирургии [7].

Одним из перспективных методов получения полимерных матриц, в том числе для сосудистых протезов, является метод электроформования (электроспиннинга), при котором из раствора или расплава полимера в электрическом поле высокого напряжения получают нетканый материал, состоящий из микро- и нановолокон. В процессе электроформования струя полимера с помощью инжекторного насоса подается через электрод-фильтру (иглу) в поле высокого напряжения, где в результате поляризации происходит деление на микроструи, отвердевающие в процессе дрейфа до принимающего электрода (коллектора). Волокна, осаждающиеся на коллектор, образуют волокнистый нетканый материал. Матрицы, полученные этим методом из биосовместимых полимеров, обладают пористой структурой, способствующей интеграции полученных на их основе протезов в организм реципиента, и стабильными деформационно-механическими свойствами в течение длительного времени [8].

Целью данной работы является исследование биосовместимости *in vivo* нетканой матрицы, полученной методом электроформования из ароматического полиимиды, для оценки возможности

ее использования в качестве тканеинженерного сосудистого протеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Традиционный способ получения пленочных и волокнистых полиимидных материалов из растворов полиамидокислоты обладает рядом недостатков, среди которых необходимость использования токсичных растворителей, нестабильность растворов во времени и высокая температура имидизации – реакции циклизации полиамидокислоты до химически инертного полиимиды [7]. В данной работе использованы более стабильные водорастворимые соли полиамидокислоты с пониженной температурой имидизации [9].

**Получение материала.** Для получения трубчатых пористых матриц использовали триэтиламонийную соль полиамидокислоты на основе пиромеллитового диангидриды и 4,4'-диаминодифенилового эфира (Sigma-Aldrich, Германия), растворенную в смеси этилового спирта и воды в соотношении 70/30 масс. %. Растворы соли полиамидокислоты с весовой концентрацией 10% перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре.

Матрицы получали методом электроформования на установке Nanon-01A (Mesc Co., Япония). Раствор полимера подавали через электрод-фильтру в электрическое поле высокого напряжения (25–30 кВ) с объемным расходом 0.5–1.0 мл/ч. Осаждение волокон происходило на цилиндрическом металлическом электроде диаметром 1.2 мм, вращающемся со скоростью 2500 об/мин на расстоянии 150 мм от фильтры. Матрицы далее подвергали термической имидизации в фиксированном на электроде состоянии в воздушной среде (нагрев до 250°C в течение 3 ч, выдерживание при 250°C в течение 30 мин). Полноту прохождения реакции циклизации полиамидокислоты и удаления триэтиламина (рис. 1) контролировали методом инфракрасной спектроскопии.

Микроструктуру полученных протезов изучали методом сканирующей электронной микроскопии в режиме регистрации вторичных электронов (Supra 55VP, Carl Zeiss, Германия) с предварительным нанесением платинового проводящего слоя. По микрофотографиям оценивали средний диаметр полученных волокон и поверхностную пористость материала.

Механические характеристики трубчатых протезов длиной 20 мм исследовали с помощью универсальной испытательной машины Instron 5943 (Instron, Великобритания). Регистрировали зависимость механического напряжения от деформации при растяжении матриц со скоростью

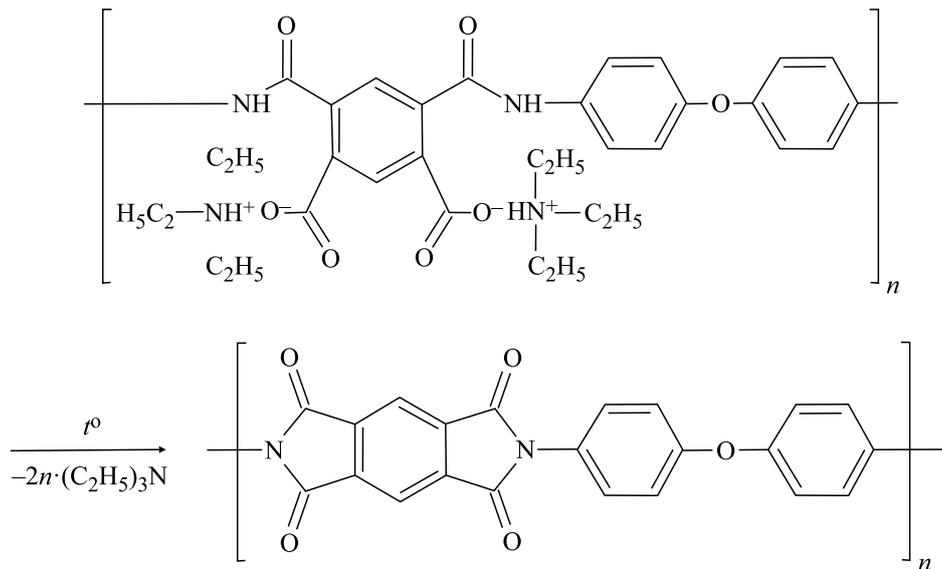


Рис. 1. Схема термической имидизации триэтиламмонийной соли полиаминокислоты с образованием полиимида.

10 мм/мин, вычисляли модуль упругости, прочность на разрыв и удлинение до разрыва.

**Эксперименты на животных.** В эксперименте *in vivo* использовали девять трехмесячных самцов крыс Wistar массой 200–250 г (питомник «Рапполово», Ленинградская обл.). Животных оперировали под общей анестезией: 0.1 мл Zoletil 100 (растворенного в 20 мл физиологического раствора) и 0.0125 мл Rometar (20 мг/мл) на 0.1 кг массы тела интраперитонеально, однократно. Выполняли Y-образную лапаротомию, проводили мобилизацию инфраренального отдела аорты и ее протезирование матрицей с наложением восьми швов на каждый анастомоз. Использовали атравматические иглы с нитью Prolen 9-0. Антикоагулянты и дезагреганты не использовали. Пройодимость сосудов оценивали классической методикой [10]. Операционную рану брюшной стенки послойно ушивали атравматическими иглами с нитью Prolen 4-0. В динамике оценивали общее состояние животных, цвет и температуру кожных покровов задних конечностей, двигательную активность.

**Морфологическое исследование.** Животных выводили из опыта через один, три и шесть месяцев. Оценивали проходимость аорты, состояние протеза и его морфологию. Для этого протезы с фрагментами нативной аорты иссекали и фиксировали в 10%-м нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH 7.4) не менее 24 ч, далее образцы обезживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксили-

ном Майера и эозином («Биовитрум», Россия). Для визуализации коллагена соединительной ткани использовали окраску по методу Маллори (реактивы от «Биовитрум», Россия). Микроскопический анализ препаратов с поперечным сечением протеза проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Leica, Германия), используя окуляр с увеличением 10× и объективы с увеличением 4, 10 и 40×. Запись цифровых изображений выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-механические параметры трубчатых протезов зависят от условий процесса электроформования (продолжительности, рабочего напряжения, расстояния между электродами и др.). В данной работе использовали матрицы с толщиной стенки от 250 до 350 мкм. По данным, полученным с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 2), средний диаметр волокон и средний размер пор в поверхностном слое материала составляют соответственно  $0.6 \pm 0.2$  мкм и  $5.5 \pm 1.5$  мкм, что сравнимо с линейными размерами клеток, следовательно, возможна миграция клеток вглубь материала матрицы.

Прочность и модуль упругости полученных трубчатых протезов сравнимы с параметрами нативных сосудов крыс [11] и превосходят их для человека [12]. Модуль упругости составляет 14–19 МПа (против 17 МПа для крыс и 1.0 МПа для человека), а прочность на разрыв — 1.8–2.2 МПа (против 2.3 МПа для крыс и 0.7 МПа для человека). Удлинение до разрыва для полиимидных протезов также сравнимо с удлинением нативных

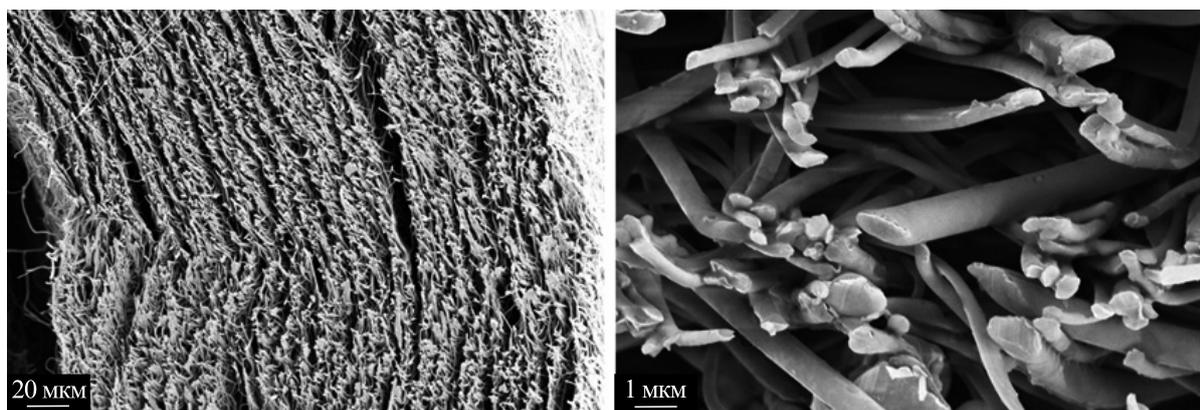


Рис. 2. Микрофотографии поперечного среза полиимидного протеза.

человеческих сосудов — 34% против 42% соответственно. Следует отметить, что протезы на основе полиимидов демонстрируют меньшую прочность, чем биорезорбируемые протезы сосудов аналогичного строения [11, 13]. Это можно объяснить необходимостью для биорезорбируемых протезов иметь значительный запас прочности, чтобы не допустить преждевременного разрушения, так как в процессе резорбции механические характеристики матрицы неизбежно ухудшаются.

Общее состояние и двигательная активность крыс-реципиентов описанных протезов вплоть до выведения из опыта не отличались от таковых интактных животных.

Через месяц после имплантации все протезы проходимы, аневризм не выявлено. Микроскопически в местах анастомозов наблюдается плавный переход интимы нативного сосуда на протез (рис. 3а–г). Большая часть неоинтимы представлена эндотелием и тонким субэндотелиальным слоем. Однако в одном из трех случаев определяется участок с выраженным субэндотелиальным слоем, представленным сформированными коллагеновыми волокнами. На данном участке между протезом и неоинтимой наблюдаются обширные кальцинаты. Между волокнами протеза выявляется незначительное число клеток, в основном макрофаги и фибробласты. Снаружи протез покрыт соединительнотканной капсулой, в которой расположены полнокровные сосуды.

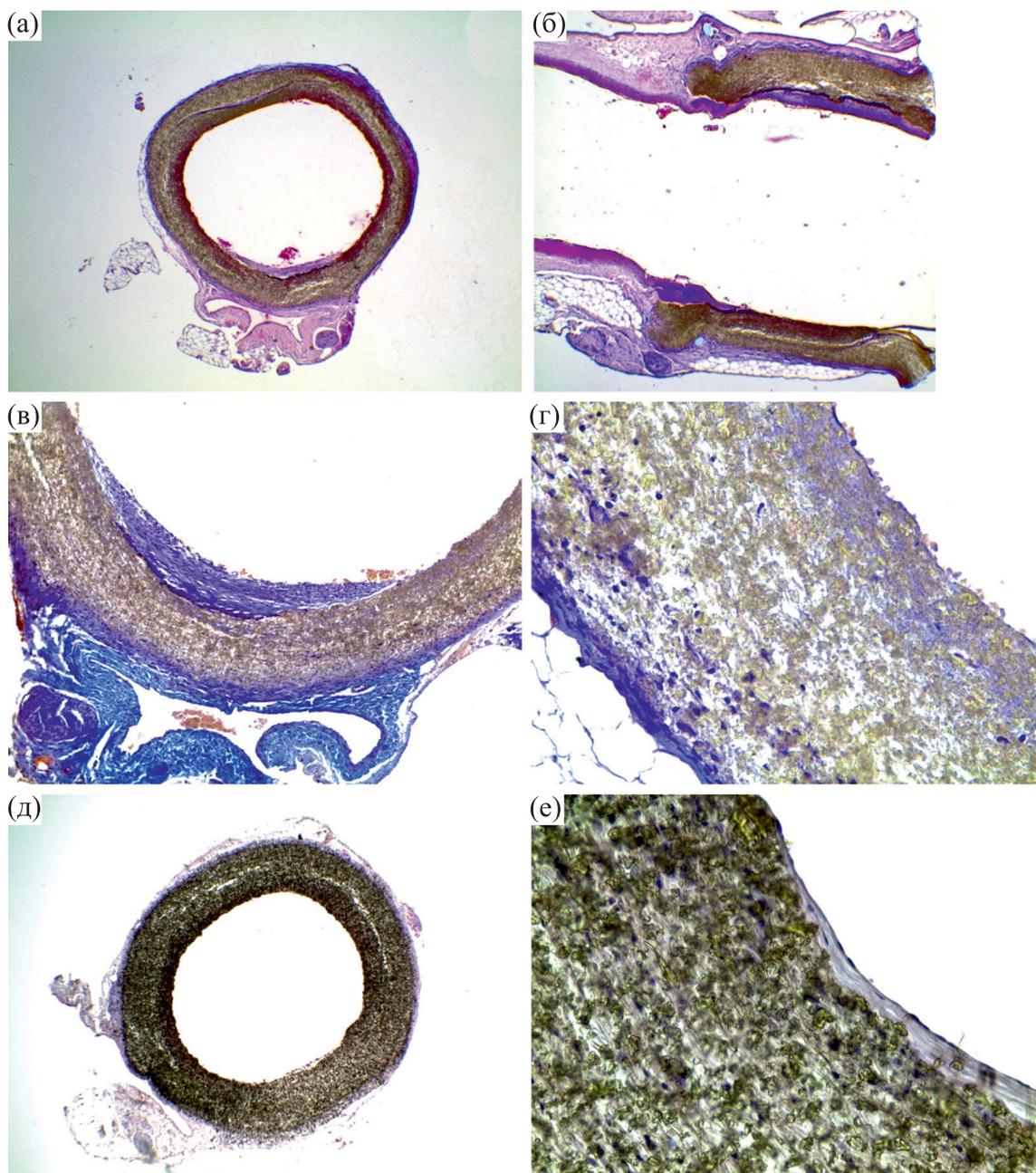
Через три месяца после имплантации два из трех протезов проходимы, аневризмы не выявлены. На данном сроке эксперимента вся внутренняя поверхность протеза выстлана неоинтимой, представленной эндотелием и тонким субэндотелиальным слоем. Весь объем стенки протеза заселен умеренным числом фибробластов и макрофагов. Между волокнами протеза определяются тонкие коллагеновые волокна. Снаружи протезы покрыты соединительнотканной капсулой с сосудами. Среди клеток соединительнотканной

капсулы, помимо фибробластов, выявляются гигантские многоядерные клетки инородных тел.

Через шесть месяцев после имплантации все протезы проходимы, аневризмы не выявлены. Микроскопически выраженная неоинтима представлена в основном коллагеновыми волокнами (рис. 3д,и). На границе между неоинтимой и матрицей в двух из трех случаев располагаются выраженные кальцинаты. Весь объем стенки протеза умеренно заселен фибробластами и макрофагами. Соединительнотканная капсула, окружающая протезы, представлена зрелыми коллагеновыми волокнами, в ней определяются полнокровные сосуды. На границе с внешней поверхностью наблюдаются гигантские многоядерные клетки инородных тел.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех экспериментах имплантация не сопровождалась значимым кровотечением сквозь стенку протеза или по линии анастомозов. На внутренней поверхности протезов в короткие сроки образуется сплошной монослой эндотелиальных клеток, уменьшающий риск тромбообразования. Гиперплазии интимы, сопутствующей развитию ишемии, не наблюдается даже в районе анастомозов, что является позитивным прогностическим признаком. Присутствие макрофагов и гигантских многоядерных клеток инородных тел в умеренном количестве говорит о средневыраженной реакции макроорганизма на инородное тело, что является проявлением типичной иммунной реакции. Однако обращает на себя внимание появление в ряде случаев кальцинатов на границе между формирующейся неоинтимой и протезом в районе анастомозов, возможной причиной которых может являться низкая скорость интеграции (врастания) тканей нативного сосуда в стенку протеза. Во всех экспериментах стенка сохраняла целостность, признаки появления аневризм не



**Рис. 3.** Гистологические срезы полиимидных протезов: (а), (б), (в), (г) – через месяц после имплантации; (д), (е) – через шесть месяцев после имплантации. (а), (б), (д), (е) – Окраска гематоксилином и эозином; (в), (г) – окраска по методу Маллори. Увеличение общее: (а), (б), (д) – 4×; (в) – 10×; (г), (е) – 40×.

выявлены, что свидетельствует о стабильности упругих свойств материала.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биосовместимость протезов на основе микроволокон ароматического полиимида обуславливается не только химической инертностью полимера, но и заключением протеза в соедине-

тельнотканную капсулу и формированием неоинтимы на внутренней поверхности. Сохранение проходимости сосуда в течение длительного времени подтверждает тромборезистентность обсуждаемых протезов.

Полученные результаты дают основание рекомендовать сосудистые протезы, полученные методом электроформования из ароматического полиимида, для дальнейшего их исследования в

качестве тканеинженерного сосудистого имплантата.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-30003).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными выполнена в соответствии с правилами использования экспериментальных животных (согласно принципам Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г. и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Re-*

*gion, 2000–2016* (2018). URL: [https://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/](https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/)

2. Г. И. Попов, П. В. Попрядухин, Г. Ю. Юкина и др., *Цитология*, **62** (1), 38 (2020).
3. P. C. Begovac, R. C. Thomson, J. L. Fisher, et al., *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **25** (5), 432 (2003).
4. N. K. Awad, H. Niu, U. Ali, et al., *Membranes (Basel)*, **8** (1), 1 (2018).
5. R. D. Rusu, M. D. Damaceanu, and P. C. Constantin, *Intelligent Polymers for Nanomedicine and Biotechnologies*, Ed. by M. Aflori (Taylor & Francis, Boca Raton, 2018).
6. D. Serbezeanu, T. Vlad-Bubulac, D. Rusu, et al., *Materials (Basel)*, **12** (19), 1 (2019).
7. P. Starr, C. M. Agrawal, and S. Bailey, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **104** (2), 406 (2016).
8. W. Lu, J. Sun, and X. Jiang, *J. Mater. Chem. B*, **2** (17), 2369 (2014).
9. V. M. Svetlichnyi, G. V. Vaganov, L. A. Myagkova, et al., *Russ. J. Appl. Chem.*, **93** (1), 35 (2020).
10. R. Acland, *Surgery*, **72** (5), 744 (1972).
11. P. V. Popryadukhin, G. I. Popov, G. Y. Yukina, et al., *Int. J. Biomater.*, **2017**, 1 (2017).
12. П. И. Бегун и П. Н. Афонин, *Моделирование в биомеханике*, под ред. Л. А. Савина (Высшая школа, М., 2004).
13. В. Н. Александров, А. В. Кривенцов, Е. В. Михайлова и др., *Вестн. Рос. воен.-мед. академии*, **2** (58), 120 (2017).

## Small Diameter Nonwoven Vascular Prostheses Based on Aromatic Polyimide Nanofibers

A.E. Chiriateva\*, N.A. Zavrazhnykh\*, P.V. Popryadukhin\*, \*\*, G.Yu. Yukina\*, \*\*\*,  
A.V. Kriventsov\*\*\*\*, E.M. Ivankova\*\*, and V.E. Yudin\*, \*\*

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

\*\*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bolshoy prosp. 31, Saint Petersburg, 199004 Russia

\*\*\*Pavlov First St. Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6-8, Saint Petersburg, 197022 Russia

\*\*\*\*Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, Saint Petersburg, 194044 Russia

One of the main methods of treating cardiovascular pathology is surgical reconstruction of blood vessels, including the use of polymer-based prostheses; a clinically acceptable small diameter prosthesis is under development. In this work, vascular prostheses with a diameter of 1.2 mm were fabricated by electrospinning of aromatic polyimide. The mechanical characteristics of new prostheses were comparable to the parameters of native vessels in rats and humans. The prostheses were implanted into the abdominal aorta of rats for 1, 3 and 6 months. During the experiment, the prostheses were permeable; no signs of aneurysm or intimal hyperplasia were observed, there were no symptoms of thrombosis. Morphological analysis showed the formation of neointima with endothelium and thin subendothelial layer on the inner surface of the prostheses, and the formation of connective tissue encapsulating the prostheses. Prostheses based on polyimide nanofibers have demonstrated high biocompatibility and thromboresistance, thereby prompting further research exploring polyimide nanofibers-based prostheses as tissue-engineered vascular implants.

*Keywords: tissue engineering, tissue-engineered vascular implants, polyimide, PM-ODA, electrospinning*