Том 66, номер 3, 2021

=

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Методы определения знака хиральности спиральных и суперспиральных структур белков	
А.Э. Сидорова, А.О. Луценко, Д.К. Шпигун, Е.В. Малышко, В.А. Твердислов	421
Термическая инактивация цистеиновых протеаз: «ключевые стадии»	
В.А. Королева, С.С. Ольшанникова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов	429
Структурная организация ядерного белка HMGB1 и ее влияние на формирование упорядоченных надмолекулярных комплексов	
Е.В. Чихиржина, Т.Ю. Старкова, А.М. Поляничко	440
Роль анионов фосфата в авто- и фотоиндуцированном окислении NADH	
О.Н. Бржевская, Е.Н. Дегтярев, С.Н. Холуйская	447
Исследование температурной зависимости времени жизни флуоресценции триптофана в диапазоне —170°C — +20°C в различных растворителях	
В.З. Пащенко, В.В. Горохов, Б.Н. Корватовский, П.П. Нокс, Н.П. Гришанова, С.Н. Горячев	454
Поиск агроостровков в геноме нута	
А.Б. Соколкова, С.В. Булынцев, П.Л. Чанг, Н. Карраскила-Гарсия, Д.Р. Кук, Э. Веттберг, М.А. Вишнякова, С.В. Нуждин , М.Г. Самсонова	466
Анализ химических соединений в растении <i>Ocimum gratissimum</i> методами газовой хроматографии-масс-спектроскопии и ИК-Фурье-спектроскопии	
Р. Селвараджу, П. Сакунтала, К.А. Джалили	473
БИОФИЗИКА КЛЕТКИ	
Ингибирующая эффективность липидного компонента растительных объектов в зависимости от полярности элюента	
Л.Н. Шишкина, Л.И. Мазалецкая, А.Н. Смирнова, В.О. Швыдкий	482
Влияние ресвератрола в различных концентрациях на структурное состояние мембран митохондрий, выделенных из листьев гороха, в норме <i>in vitro</i>	
Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, И.В. Жигачева, И.П. Генерозова, А.Н. Голощапов	489
Кинетика инициированного окисления липосом из фосфатидилхолина с введенными в них экстрактами алое и определение их антиокислительной активности	
Н.Н. Сажина, П.В. Лапшин, Н.В. Загоскина	495
Свойства ионных каналов, образованных при одностороннем действии амфотерицина и N-метилпроизводного амфотерицина в бислойных липидных мембранах	
Т.Д. Пашазаде, Х.М. Касумов	504
Кинетика продукции активных форм кислорода нейтрофилами после инкубации в гипомагнитном поле	

В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Е.Е. Фесенко

511

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Влияние страха на систему с задержкой «хищник—жертва» с убежищем для жертвы при наличии дополнительной пищи	
С. Мондал, Г.П. Саманта	516
Идеальное свободное распределение в модели «хищник—жертва» при многофакторном таксисе	
П.А. Зеленчук, В.Г. Цибулин	546
Изучение механизмов действия FMRF-подобных пептидов на мыщечное сокращение у планарий (Platyhelminthes)	
Н.Д. Крещенко	555
Влияние острой односторонней травматической денервации на пуринергическую сигнализацию в холинергическом синапсе	
А.Е. Хайруллин, Д.В. Ефимова, В.А. Маркосян, С.Н. Гришин, А.Ю. Теплов, А.У. Зиганшин	567
Продукция оксида азота в тканях крыс в постнатальном онтогенезе: исследование методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса	
Р.И. Зарипова, Г.Г. Яфарова, В.В. Андрианов, Х.Л. Гайнутдинов, Т.Л. Зефиров	572
Развитие метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии для анализа медицинских препаратов. Определение фентанила в слезной жидкости	
И.И. Колесниченко, Л.М. Балашова, Л.С. Коробова	577
Частотная модуляция электроэнцефалограммы при фотостимуляции	
Я.А. Туровский, С.В. Борзунов, В.Ю. Алексеев, М.А. Карпова	583
Анализ роли биоэнергетических процессов под действием альфа1-адрененергических агонистов в реализации их противолучевых свойств	
М.В. Васин, И.Б. Ушаков	590
Мультифрактальный и вейвлетный анализ изменения структуры паттернов непроизвольных колебаний руки человека при болезни паркинсона	
О.Е. Дик	597
ДИСКУССИИ Фундаментальные биофизические отличия опухолевой ткани от ткани нормальной	

А.Г. Маленков	605
Гипотеза об энтропийном инварианте для биологических организмов	
В.Т. Волов	611

Contents

Vol. 66, No. 2, 2021

in a Hypomagnetic Field

-

-

Molecular Biophysics

Methods for Determining the Chirality Sign of Helical and Superhelical Protein Structures	
A E Sideman A O Lutanda D K Shairan E K Mahahha and KA Trandislar	421
A.E. Slaorova, A.O. Lutsenko, D.K. Snpigun, E.V. Malysnko, and V.A. Tverdislov	421
Thermal Inactivation of Cysteine Proteases: "Key Stages"	
V.A. Koroleva, S.S. Olshannikova, M.G. Holyavka, and V.G. Artyukhov	429
Structural Organization of the Nuclear Protein HMGB1 and Its Effect on the Formation of the Ordered Supramolecular Complexes	
E.V. Chikhirzhina, T.Yu. Starkova, and A.M. Polyanichko	440
The Role of Phosphate Anions in Photoinduced Auto-Oxidation of NADH	
O.N. Brzevskaya, E.N. Degtyarev, and S.N. Kholuiskaya	447
The Study of the Temperature Dependence of Tryptophane Fluorescence Lifetime in the Range of -170° C to $+20^{\circ}$ C in Various Solvents	
V.Z. Paschenko, V.V. Gorokhov, B.N. Korvatovsky, P.P. Knox, N.P. Grishanova, and S.N. Goryachev	454
Search for Agroislands in Chickpea Genome	
A.B. Sokolkova, S.V. Bulyntsev, P.L. Chang, N. Carrasquila-Garcia, D.R. Cook, E. von Wettberg, M.A. Vishnyakova, S.V. Nuzhdin, and M.G. Samsonova	466
GC-MS and FTIR Analysis of Chemical Compounds in Ocimum Gratissimum Plant	
R. Selvaraju, P. Sakuntala, and K. A. Jaleeli	473
Cell Biophysics	
Inhibitory Efficiency of the Lipid Component of Plant Objects in Dependence on the Eluent Polarity	
L.N. Shishkina, L.I. Mazaletskaya, A.N. Smirnova, and V.O. Shvydkiy	482
Effects of Various Concentrations of Resveratrol on the Structural State of Mitochondrial Membranes Isolated from Pea Leaves <i>in vitro</i>	
N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, I.V. Zhigacheva, I.P. Generozova, and A.N. Goloshchapov	489
Kinetics of Initiated Oxidation of Phosphatidylcholine Liposomes with Introduced Aloe Extracts and Determination of Their Antioxidant Activity	
N.N. Sazhina, P.V. Lapshin, and N.V. Zagoskina	495
Ion Channel Properties in Response to One-Sided Action of Amphotericin B and Its N-Methyl Derivative in Bilayer Lipid Membranes	
T.D. Pashazade and Kh.M. Kasumov	504

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, and E.E. Fesenko

511

Kinetics of the Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils after Incubation

Complex Systems Biophysics

Impact of Fear Effect in a Delayed Predator-Prey System with Prey Refuge and Additional Food for Predators	
S. Mondal and G.P. Samanta	516
Ideal Free Distribution in the Predator–Prey Model with Multifactor Taxis	
P.A. Zelenchuk and V.G. Tsybulin	546
An Exploration of the Mechanisms of Action of FMRF-Like Peptides in Inducing Muscle Contraction in Planarians (Platyhelminthes)	
N.D. Kreshchenko	555
Effect of Acute Unilateral Denervation Injury on Purinergic Signaling in the Cholinergic Synapse	
A.E. Khairullin, D.V. Efimova, V.A. Markosyan, S.N. Grishin, A.Yu. Teplov, and A.U. Ziganshin	567
Nitric Oxide Production in Rat Tissues in Postnatal Ontogenesis: Studies by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy	
R.I. Zaripova, G.G. Jafarova, V.V. Andrianov, Kh.L. Gainutdinov, and T.L. Zefirov	572
Development of a Method of Multisensory Stripping Voltammetry for Analysis of Medical Preparations. Determination of Fentanyl in Lacrimal Fluid	
I.I. Kolesnichenko, L.M. Balashova, and L.S. Korobova	577
Frequency Modulation of Electroencephalogram under Photostimulation	
Ya.A. Turovsky, S.V. Borzunov, V.Yu. Alekseev, and M.A. Karpova	583
Analysis of the Role of Bioenergetic Processes under the Radioprotective Effects Mediated by Alpha-1-Adrenergic Agonists	
M.V. Vasin and I.B. Ushakov	590
Multifractal and Wavelet Analysis of Changes in the Structure of Patterns of Involuntary Oscillatory Hand Movements in Parkinson Individual	
O.E. Dick	597
Discussions	
Fundamental Biophysical Differences between Tumor Tissue and Normal Tissue and Their Use in Diagnostics and Treatment	
A.G. Malenkov	605
The Hypothesis about Entropy Invariant for Biological Organisms	
V.T. Volov	611

УДК 57.012, 57.012.5

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗНАКА ХИРАЛЬНОСТИ СПИРАЛЬНЫХ И СУПЕРСПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

© 2021 г. А.Э. Сидорова, А.О. Луценко, Д.К. Шпигун, Е.В. Малышко, В.А. Твердислов

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

E-mail: sky314bone@mail.ru Поступила в редакцию 29.12.2020 г. После доработки 04.01.2021 г. Принята к публикации 11.01.2021 г.

Предложен и разработан метод описания спиральных структур разного уровня организации в белках. Метод позволяет охарактеризовать знак хиральности/спиральности и выполнить количественную оценку для α -спиралей, 3_{10} -спиралей и coiled-coil-суперспиралей, что существенно для развития разработанной ранее концепции о знакопеременных иерархиях хиральных структур в белках и нуклеиновых кислотах. Достаточным условием метода является взаимное расположение α -углеродов в спирали, что позволяет на порядок снизить количество обрабатываемой информации и является значительным преимуществом при обработке больших массивов данных.

Ключевые слова: белки, хиральность, спирали, суперспирали, карта хиральности. **DOI:** 10.31857/S0006302921030017

Белковые полипептидные цепи сложены исключительно остатками L-аминокислот [1]. В ходе их укладки образуются, в частности, спиральные и суперспиральные структуры. Наиболее распространенной и энергетически выгодной регулярной белковой вторичной структурой является правая α -спираль [2, 3]. α -Спирали возникают лишь на тех участках первичной структуры, где имеются аминокислоты, способные последовательно образовать водородные связи с каждым четвертым аминокислотным остатком.

Другой тип спиральных структур, спирали 3_{10} , составляет 15–20% всех белковых спиралей [4]. Характерная длина спирали 3_{10} – три-пять аминокислотных остатков [5, 6], и полный виток такой спирали образован ровно тремя аминокислотными остатками. Часто данный тип спиралей локализуется на концах регулярных α -спиралей. Существуют и другие типы спиральных вторичных структур, но они встречаются гораздо реже.

Образование несколькими α-спиралями нетривиальных конструкций заинтересовало исследователей в результате исследований Л. Полинга и Ф. Крика [7, 8]: Полинг разработал модель α-спирали, а Крик – модель «coiled coil», суперспирали из α-спиралей. Согласно концепции Крика [8–10], для данного типа суперспирали характерен особый тип упаковки боковых цепей – «knobs into holes». При такой упаковке аминокислотный остаток одной спирали («knob») уклады-

вается в пространство между четырьмя остатками другой спирали («hole»). Последовательности, входящие в состав суперспиралей, составляют до 10% протеома организма [11, 12]. Самой простой конструкцией суперспирали является димер, при этом ориентация α-спиралей может быть как параллельной, так и антипараллельной. Встречаются суперспирали, состоящие из семи и более α-спиралей [13]. Для суперспиралей издвух α-спиралей шаг суперспирали составляет около 140 Å, для суперспиралей из трех-четырех α-спиралей около 200 Å [14]. Каноническая последовательность суперспирали состоит из гептад – повторяющихся семи аминокислотных остатков [15]. Позиции остатков в гептаде принято обозначать как a-b-c-d-e-f-g, где, как правило, в позициях *а* и *d* находятся гидрофобные остатки, формирующие гидрофобное ядро, а в позициях e и g – полярные аминокислотные остатки и имеют место ионные взаимодействия [16]. Чередование гидрофобных остатков попеременно с тремя и четырьмя остатками дает сдвиг периодичности: идеальная правая α-спираль имеет периодичность около 3.65 остатка на оборот, а левая суперспираль с гептадным повтором – до 3.5 остатка на оборот относительно оси пучка [15].

В иерархичных структурах белков переходы с нижнего на высший уровень сопровождаются чередованием знака хиральности структурных уровней L-D-L-D для белков и D-L-D-L для ДНК, что связано не только с изменением пространственных характеристик, но и с изменением механизмов их формирования, физических свойств и молекулярно-биологические функций [17, 18]. В развитии данной концепции существенным представляется получение количественных оценок хиральности белковых структур разных иерархических уровней. Решению вопроса оценки хиральности спиральных и суперспиральных структур белков посвящена настоящая работа.

МЕТОД ОЦЕНКИ ЗНАКА ХИРАЛЬНОСТИ СПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Плоский характер и фиксированная длина пептидных связей предопределяют практически единственную возможность для сворачивания пептидной цепи путем поворота плоскостей пептидных связей относительно их связей с α-углеродными атомами Са. Такое вращение было описано двугранными углами, значения которых лежат в основе оценки хиральности белков методом Рамачандрана, позволяющим увидеть преобладаконформацию элементов вторичной юшую структуры биомолекул [19]. Однако оказалось, что возможно существование конформаций полипептидной цепи и вне разрешенных областей карты Рамачандрана. (Подробный анализ различных методов оценки хиральности приведен в работе [20].)

В ранее представленном нами методе оценки степени хиральности в иерархических структурах белков [20, 21] для определения знака хиральности вторичной структуры достаточным условием анализа является только взаимное расположение Са. Для оценки знака хиральности было предложено использовать значение косинуса угла между вектором направления (суммой векторов между соседними атомами С_а) и вектором произведения (суммой всех векторных произведений). Этот метод был нами усовершенствован по следующим причинам. Во-первых, в качестве меры хиральности бралась длина вектора произведений, что приводило к неправильной оценке хиральности. Например, для двух последовательных правых спиралей, соединенных разными способами, получаются кардинально разные результаты. Вовторых, для оценки знака хиральности использовался знак косинуса угла между вектором направления и вектором произведения. Это могло привести к неверному определению знака хиральности.

В качестве экспериментальных объектов были использованы структуры белков, представленные в международной базе данных PDB [22].

Сущность предлагаемого метода оценки хиральности спиральных структур белков рассмот-



Рис. 1. Модельное изображение полипептидной цепи правой спирали.

рим на модели полипептидной цепи, состоящей из n аминокислотных остатков и имеющей соответственно n атомов С_{α} в качестве опорных точек. Между каждыми двумя соседними опорными точками строится вектор **v**_i. Для n опорных точек получаем (n-1) векторов (рис. 1).

Далее для каждых трех последовательных векторов рассчитываем их смешанное произведение (с учетом их координат):

$$([\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2], \mathbf{v}_3) = (y_1 z_2 - y_2 z_1) x_3 + (z_1 x_2 - z_2 x_1) y_3 + (x_1 y_2 - x_2 y_1) z_3.$$
(1)

Сумма всех смешанных произведений позволяет оценивать знак хиральности

$$\chi_{\text{total}} = \sum_{i=1}^{n-3} \left([\mathbf{v}_i, \mathbf{v}_{i+1}], \mathbf{v}_{i+2} \right).$$
(2)

Результат смешанного произведения — число, знак которого определяет взаимное расположение векторов: для правой тройки векторов знак положительный, для левой — отрицательный. Смешанные произведения не зависят друг от друга, любое изменение положения каждого атома влияет на несколько смешанных произведений (от одного до четырех, в зависимости от порядкового номера атома в цепи).

Исследована возможность нормировки хиральности спиральных белковых структур с соблюдением следующего принципа: величина хиральности должна стремиться к некоторому значению при увеличении числа опорных точек, расположенных на том же объекте (т.е. при увеличении плотности точек). Поэтому каждое смешанное произведение нормировалось на определенную степень к средней длины используемых в нем векторов:

$$C_i = \left(\frac{1}{3}\sum_{j=0}^2 |\mathbf{v}_{i+j}|\right)^k,\tag{3}$$

где *C_i* – нормировочный множитель.

Подбор степени k осуществлялся исходя из следующего: поскольку основными объектами исследования являются белковые структуры с четко определенным расположением атомов углерода, в качестве эталона была взята цилиндрическая винтовая линия с равномерно расположенными точками. Исследование показало, что для сохранения конечной ненулевой хиральности при неограниченном увеличении числа точек следует взять степень, равную пяти.

Окончательное выражение для нормированной хиральности имеет вид:

$$\chi_{\text{norm}} = \sum_{i=1}^{n-3} \frac{\left([\mathbf{v}_i, \mathbf{v}_{i+1}], \mathbf{v}_{i+2} \right)}{C_i}.$$
 (4)

Метод реализован в виде компьютерной программы на языке Python 3.7.

Посредством разработанного метода получены карты хиральности для белков-ферментов, представленных в базе данных PDB (рис. 2).

Анализ представленных данных свидетельствует о том, что, во-первых, α -спирали и 3₁₀-спирали представлены в основном правыми структурами (левые α -спирали составляют 0.06% от общего количества α -спиралей, а левые спирали 3₁₀ – 4.38% от общего количества спиралей 3₁₀), что адекватно отражает данные, представленные в научной литературе. Нормированное значение хиральности линейно зависит от числа атомов в спирали.

МЕТОД ОЦЕНКИ ЗНАКА ХИРАЛЬНОСТИ СУПЕРСПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Со времени открытия структур типа «coiled coil» предпринимались попытки их математического описания. Согласно работе [23], шаг суперспирали является ключевым фактором, определяющим внутри- и межмолекулярные взаимодействия. В соответствии с экспериментальными данными для суперпиральных структур, состоящих из двух спиралей, среднее значение длины шага составляет около 140 Å, что согласуется с наблюдаемым количеством остатков на виток в α-спиралях глобулярных белков. В работе [24] была предложена математическая модель определения знака хиральности суперспиральной структуры с учетом взаимосвязи между шагом и радиусом. В работе [23] изучается хиральность структур типа «coiled coil» и предлагается определять хиральность (т) «поверхностной кривой» отдельных α-спиралей. Под поверхностной кривой автором понимается некоторая линия, находяща-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

яся посредине между кривой, соединяющей гептадные остатки в двух позициях. Хиральность рассчитывается в зависимости от периодичности спирали (число остатков в повторе), угла между соседними остатками и сдвигом вдоль оси в расчете на аминокислоту. Знак хиральности определяется по знаку τ – для правых структур τ положительно, для левых – отрицательно. При последующем расчете поверхностная кривая получилась левой. Следует отметить, что в представленных методах не учитывалась возможность того, что суперспираль может быть правозакрученной. Таким образом, данные подходы не дают адекватной оценки знака хиральности суперспиральных структур.

В предлагаемом нами методе для оценки знака хиральности суперспиральных белковых структур типа «coiled coil» в качестве начальных условий используется информация о взаимном расположении α-углеродов аминокислотных остатков цепи. В основе метода лежит определение направления закрутки каждой отдельной α-спирали относительно оси всей суперспирали. В качестве критерия для определения этого направления выбран угол между осью суперспирали и осями образующих ее спиралей. Ориентация этого угла относительно оси суперспирали (по часовой или против часовой стрелки) служит показателем для определения знака хиральности суперспирали. Для определения ориентации угла используется свойство векторного произведения образовывать правые тройки векторов.

В качестве примера рассмотрен белок 1ВВ1 [https://www.rcsb.org/structure/1BB1], состоящий из трех α-спиралей (на рис. За показано его отображение в базе данных PDB). Поскольку в α-спирали на один виток в среднем приходится 3.6 аминокислотных остатка, в качестве условного центра витка спирали взят геометрический центр четырех последовательных атомов (для первого витка – точки С₁, С₂, С₃, С₄ и т.д.) – точки осей спиралей $A_1, A_2, ..., A_n$, через которые проводится ось α-спирали (рис. 3б). Далее строятся «средняя спираль», где геометрический центр первых атомов каждой α-спирали (C_{1,1}, C_{2,1}, C_{3,1}) является первой точкой «средней спирали» и т.д., и ось «средней спирали» (рис. 3в). В общем случае как ось средней спирали, так и оси α-спиралей являются ломаными линиями в трехмерном пространстве. Но для данного метода достаточно информации о взаимных направлениях осей только в узком поперечном сечении суперспирали (два полных витка α-спиралей), на таком интервале оси можно рассматривать как прямые линии, что позволяет непосредственно строить для них векторы направления. Поскольку метод оценивает лишь знак хиральности, такое приближение вполне уместно.



Рис. 2. Карты хиральности белков-ферментов. По горизонтальной оси – нормированное значение хиральности, по вертикальной оси – длина вторичной структуры в аминокислотных остатках.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗНАКА ХИРАЛЬНОСТИ



Рис. 3. Схематическое изображение работы метода по определению знака хиральности структуры типа «coiled coil» на примере белка 1ВВ1.

Определение знака хиральности суперспирали сводится к определению направления угла между осью суперспирали и осью составляющей спирали. Геометрический анализ суперспиралей показывает, что для левой суперспирали составляющие спирали будут отклонены в правую сторону относительно оси суперспирали и угол между векторами \mathbf{v}_s и \mathbf{v}_{ci} будет отсчитываться против часовой стрелки (рис. 4а). Воспользуемся свойством векторного произведения образовывать правые тройки векторов. Обозначим вектор от оси суперспирали к оси *i*-й спирали через \mathbf{v}_{ki} , а векторное произведение векторов \mathbf{v}_{ci} и \mathbf{v}_s — через \mathbf{v}_{pi} . Если вектор \mathbf{v}_{ci} отклонен от вектора \mathbf{v}_s вправо, т.е. по часовой стрелке (суперспираль в этом случае является левой), то векторы \mathbf{v}_{ki} и \mathbf{v}_{pi} будут противонаправлены (рис. 46). Если вектор \mathbf{v}_{ci} отклонен от вектора \mathbf{v}_s влево (суперспираль правая), то векторы \mathbf{v}_{ki} и \mathbf{v}_{pi} будут сонаправлены. Величина угла между \mathbf{v}_{ki} и \mathbf{v}_{pi} определяется с помощью скалярного произведения, которое для тупых углов отрицательно, для острых – положительно.

Оценка знака хиральности суперспирали рассчитывается с помощью усреднения значения косинуса соответствующего угла для всех спиралей, образующих суперспираль:



Рис. 4. Определение знака хиральности структуры типа «coiled coil» по углу между векторами на примере белка 1ВВ1.

PDB ID белка	Количество спиралей	Цепи	Номера структур	Средний косинус угла	Средний угол	Направле- ние закрутки	Происхождение
1 BB 1	3	A,B,C	1,2,3	-0,86544	151,61627	L	Искусственный
1COI	3	А	1,2,3	-0,95287	164,27641	L	Искусственный
1D7M	2	A,B	1,2	-0,89340	153,30395	L	Природный
1L8D	2	А	1,2	-0,83381	146,49241	L	Природный
1L8D	2	В	3,4	-0,79023	142,20691	L	Природный
1NYH	2	А	1,2	-0,70155	134,55180	L	Природный
1P9I	2	А	1,2	-0,79532	142,68591	L	Неизвестно
1RH4	4	А	1,2,3,4	0,97138	12,60585	D	Искусственный
1T6F	2	A,B	1,2	-0,94825	161,48665	L	Природный
1WT6	3	A,B,D	1,2,3	-0,82796	146,74953	L	Природный
2HY6	7	A,B,C,D,E,F,G	1,2,3,4,5,6,7	-0,93137	160,34975	L	Природный
2V71	2	A,B	1,2	-0,50522	120,34623	L	Природный
2XU6	2	A,B	1,2	-0,92664	157,91675	L	Природный
3QH9	2	Α	1,2	-0,99355	173,48756	L	Природный
4BRY	2	A,B	1,2	-0,89581	153,61220	L	Природный
4BWD	2	A,B	1,2	-0,97126	166,23026	L	Природный
4FXX	2	Α	1,2	-0,80737	143,83989	L	Природный
4JBZ	3	A,B,C	19,37,55	-0,93823	162,33884	L	Природный
4YTO	2	A,B	1,4	-0,91952	156,85593	L	Природный
5A16	4	А	1,2,3,4	-0,96225	166,96110	L	Природный
5D3A	2	A,B	1,2	-0,85570	148,83745	L	Природный
5JXC	3	A,B,C	1,2,3	-0,78597	142,28240	L	Природный
5JXC	3	D,E,F	4,5,6	-0,82593	147,97427	L	Природный
5LXN	2	A,B	1,2	-0,77531	140,83288	L	Природный
5LXO	2	A,B	1,2	-0,69884	134,33381	L	Природный
5M48	3	А	1,2,3	-0,87375	151,17191	L	Природный
5NFD	2	А	1,2	-0,95346	162,45090	L	Природный
5T1Y	2	А	1,2	-0,95321	162,40315	L	Природный
5UXT	3	A,B,C	1,2,3	-0,92353	160,90101	L	Неизвестно
1FB1	5	A,B,C,D,E	9,17,26,34,42	-0,32922	110,45772	L	Природный
1H12	6	А	4,7,10,12,14,17	-0,70685	141,34958	L	Природный

Расчетные параметры структур типа «coiled coil»

$$\chi_{\text{norm}} = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^{q} \cos(\beta_i), \qquad (5)$$

где β_i — угол между направлением оси *i*-й α -спирали и направлением оси суперспирали, т.е. между векторами \mathbf{v}_{ki} и \mathbf{v}_{pi} ; q — число спиралей в суперспирали.

Для расчетов использовали координаты атомов из файлов PDB. Метод опробован на 30 суперспиралях, из которых 29 были идентифицированы как левые, а суперспираль из искусственного белка 1RH4 определилась как правая. Данные расчетных параметров оценки хиральности структур типа «coiled coil» представлены в таблице. Анализ 30 различных суперспиралей показал,

что такие структуры является в абсолютном большинстве левыми, что полностью согласуется с известными из научной литературы данными, а также с концепцией хиральной иерархии белковых структур [17, 18].

Представленные нами методы оценки спиральных и суперспиральных структур отличаются небольшим количеством необходимой для его использования информации, а также простотой вычислений. На основе методов реализованы компьютерные программы на языке Python 3.7. Графический интерфейс реализован с помощью библиотеки tkinter. Среднее время расчета структуры – 50 мс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлены методы идентификации знака хиральности спиральных структур белков и суперспиралей «coiled coil». Достаточным условием методов является взаимное расположение α -углеродов в спирали, что позволяет на порядок снизить количество обрабатываемой информации и является явным преимуществом при обработке больших массивов данных. На основе методов реализованы компьютерные программы на языке Python 3.7.

Анализ представленных карт хиральности α - и 3_{10} -спиралей свидетельствует о том, что α -спирали и 3_{10} -спирали представлены в основном правыми структурами, а суперспирали «coiled coil» – левыми. Полученные результаты соответствуют теории знакопеременных хиральных структур и адекватно отражает данные, представленные в научной литературе. Нормированное значение хиральности линейно зависит от числа атомов в спирали.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фундаментальные и прикладные исследования космоса» и частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00082).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- А. В. Финкельштейн и О. Б. Птицын, Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами, Зе изд. (КДУ, М., 2012).
- L. Pauling and R. B. Corey, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 256 (1951).
- L. Pauling and R. B. Corey, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 729 (1951).
- 4. D. J. Barlow and J. M. Thornton, J. Mol. Biol. **201**, 601 (1988).
- 5. M. N. Fodje and S. Al-Karadaghi, Protein Eng. 15, 353 (2002).
- J. S. Richardson and D. C. Richardson, Science 240, 1648 (1988).
- L. Pauling, R. B. Corey, and H. R. Branson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 205 (1951).
- 8. F. H. C. Crick, Nature 170, 882 (1952).
- 9. F. H. C. Crick, Acta Crystallogr. 6, 685 (1953a).
- 10. F. H. C. Crick, Acta Crystallogr. 6, 689 (1953b).
- A. Rose, S. J. Schraegle, E. A. Stahlberg, and I. Meier, BMC Evol Biol. 5, 66 (2005).
- O. J. Rackham, M. Madera, C. T. Armstrong, et al., J. Mol. Biol. 403, 480 (2010).
- E. Moutevelis and D. N. Woolfson, J. Mol. Biol. 385, 726 (2009).
- 14. J. Seo and C. Cohen, Proteins 15, 223 (1993).
- 15. A. Lupas and M. Gruber, Adv. Prot. Chem. 70, 37 (2005)
- 16. Y. B. Yu. Adv. Drug Deliv. Rev. 54 (8), 1113 (2002)
- 17. В. А. Твердислов, Биофизика 58 (1), 159 (2013).
- В. А. Твердислов и Е. В. Малышко, Успехи физ. наук 189, 375 (2019).
- G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, J. Mol Biol. 7, 95 (1963).
- 20. A. E. Sidorova, E. V. Malyshko, A. R. Kotov, et al., Biophysics **64** (2), 155 (2019).
- A. E. Sidorova, N. T. Levashova, E. V. Malyshko, and V. A. Tverdislov, Moscow Univ. Phys. Bull. 74 (3), 213 (2019).
- 22. RCSB PDB. Available online: http://www.rcsb.org (accessed on 15 December 2020).
- 23. G. N. Phillips, Proteins 14, 425 (1992).
- R. D. B. Fraser and T. P. MacRae, Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides (Academic Press, Lond., 1973).

Methods for Determining the Chirality Sign of Helical and Superhelical Protein Structures

A.E. Sidorova, A.O. Lutsenko, D.K. Shpigun, E.V. Malyshko, and V.A. Tverdislov

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

A method for describing helical structures of different levels of organization in proteins has been developed. The proposed method can be used to characterize the sign of chirality/helicity and quantify α -helices, 3_{10} -helices and coiled coil structures; it is important for the development of the previously developed concept of sign-alternating chiral hierarchies of DNA and protein structures. A sufficient condition for this method is the relative location of α -carbons in the helix. Satisfying this condition ensures that the amount of processed information can be reduced by an order of magnitude thereby offering an evident benefit for processing large data sets.

Keywords: proteins, chirality, helices, superhelices, chirality map

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА —

УДК 577.325

ТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ: «КЛЮЧЕВЫЕ СТАДИИ»

© 2021 г. В.А. Королева, С.С. Ольшанникова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1 E-mail: holyavka@rambler.ru

> Поступила в редакцию 30.11.2019 г. После доработки 17.06.2020 г. Принята к публикации 04.02.2021 г.

Изучены процессы термоинактивации фицина, бромелина и папаина в растворенном состоянии и иммобилизованных на матрицах среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов. Показано, что нативный фицин инактивировался при 70° С после 10 мин нагревания, бромелин в растворе сохранял до 40% активности после 60 мин инкубации при 60 и 70° С, свободный папаин был устойчив при 70° С в течение всего времени экспозиции (60 мин). Для растворимых образцов фицина, бромелина и папаина характерна полная инактивация при 80 и 90° С после 10 мин инкубации. Иммобилизация фицина на матрицах обоих типов хитозанов увеличила его термостабильность (при 70° С каталитическая способность фермента составляла не менее 20%). Фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном и высомолекулярном хитозанах, полностью инактивировался при 80 и 90° С после 10 мин инкубации, тогда как сорбированные на матрице хитозана папаин и бромелин при названных условиях сохраняли более 10% каталитической способности от ее начального уровня.

Ключевые слова: фицин, бромелин, папаин, иммобилизация, термическая инактивация, хитозан. **DOI:** 10.31857/S0006302921030029

Протеазы растительного происхождения используются в различных сферах производства. В пищевой промышленности эти ферменты выполняют роль смягчения мяса, в пивоварении их применяют для осветления напитков, используют в гидролизе глютена, для выделки кожи и других целей. Протеазы входят в состав различных детергентов, в медицине и ветеринарии на их основе изготавливают ранозаживляющие препараты [1–13].

Особый интерес представляют цистеиновые протеолитические ферменты, а именно фицин, бромелин и папаин, из-за их широкой субстратной специфичности и высокой активности в области повышенных температур. Общеизвестно, что высокие температуры предотвращают риск заражения нежелательной микрофлорой целевых продуктов и самих биокатализаторов, улучшают растворимость некоторых субстратов. Вместе с тем повышение температуры не только интенсифицирует процесс образования фермент-субстратного комплекса, но также может приводить к денатурации фермента и снижению его каталитической функции. Следовательно, необходимо получать препараты на основе природных биокатализаторов, которые будут подвержены термической инактивации при более высоких температурах по сравнению с теми, которые используются в промышленных реакторах [14].

Фицин (КФ 3.4.22.3) получают из высушенного латекса растений рода *Ficus* [15]. Известно, что фицин встречается в природе во множественных формах [16], разделяемых ионообменной хроматографией [17]. Оптимальный диапазон рН для фермента составляет от 5.0 до 8.0, а оптимальная температура – от 45 до 55°C [18].

Папаин (КФ 3.4.22.2) выделяют из латекса *Carica papaya* [19, 20]. Помимо своей протеазной активности папаин также проявляет амидазную, эстеразную, трансамидазную, трансэстеразную и тиолэстеразную активность [21, 22]. Оптимальный диапазон рН для проявления каталитической способности папаина варьирует в зависимости от природы субстрата в пределах 5.0–7.0. Этот фермент более термоустойчив по сравнению с другими протеазами [23].

Бромелин экстрагируют из стеблей (КФ 3.4.22.32) и незрелых плодов (КФ 3.4.22.33) Ananas comosus из семейства Bromeliaceae. Оптимальный уровень рН для активности бромелина 6.0– 8.5 для большинства субстратов при температуре 50–60°С. Бромелин из плодов имеет более высокую протеолитическую активность по сравнению с ферментом из стеблей и более широкую специфичность для пептидных связей [18, 24].

Несмотря на широкий спектр применения цистеиновых протеаз, растворимые ферменты существенным образом подвергаются воздействию экстремальных факторов (в том числе высоких температур и автолизу), приводящих к их инактивации посредством нарушения нативной конформации и агрегации.

Иммобилизация на нерастворимом носителе позволяет повысить термостабильность фермента: его молекулы закрепляются на матрице полимера, что затрудняет разворачивание его глобулы и препятствует тепловой денатурации, при этом также ограничиваются межмолекулярные контакты и предотвращается процесс автолиза протеолитических биокатализаторов [25].

Хитозан получают путем деацетилирования хитина. Он представляет собой неразветвленный полимер, образованный β-(1,4)-связанными глюкозаминовыми мономерами; гидроксильные и аминогруппы являются мишенями для химических модификаций, направленных на получение подходящих материалов для различных целей. Хитозан характеризуется высокой гидрофильностью, нетоксичностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью, что позволяет применять его в фармацевтической технологии [26]. Молекулы хитозана содержат катионы, представленные аминогруппами. и анионы в виде гидроксильных групп: следовательно, хитозаны могут сорбировать ферменты, полисахариды и ионы металлов за счет электростатических взаимодействий [27-31].

Иммобилизация протеолитических ферментов на хитозане может быть выполнена методом простой адсорбции [32]. Есть несколько механизмов взаимодействия между белками и полисахаридами, основанные на электростатическом притяжении между противоположно заряженными группами в соответствующих условиях раствора [33] и/или за счет гидрофобных или ван-дер-ваальсовых взаимодействий как с последующим ковалентным присоединением к подложке, так и без него [34, 35].

Существует множество примеров использования иммобилизованных протеаз [36]. В частности, была проведена иммобилизация папаина на композитных гранулах, модифицированных волокнистым полимером хитозан/глина. Папаин обладает металлсвязывающими свойствами, благодаря присутствию сульфгидрильных групп в его активном центре, поэтому после иммобилизации фермент был использован для удаления ртути из ее водного раствора. [37]. Хитозан служил матрицей для иммобилизации бромелина и папаина. Полученные биокатализаторы были использованы в реакторе непрерывного действия для стабилизации белков белого вина [38]. Фицин был иммобилизован в полимерные нановолокна [39], на глиоксил-агарозе [40], что существенно повысило стабильность фермента.

Изучение процессов термической инактивации ферментов является одной из центральных проблем биофизики и позволяет выявить механизмы регулирования этими процессами. В связи с вышесказанным целью нашей работы было исследование «ключевых стадий» процессов термической инактивации свободных и иммобилизованных на матрице хитозана фицина, папаина и бромелина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, папаин и бромелин фирмы Sigma (США). В качестве носителя использовали кислоторастворимые хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс» (Щелково Московской области), – среднемолекулярный ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования – 82.0%) и высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94.85%).

Иммобилизацию фицина, папаина и бромелина на матрице хитозана осуществляли адсорбционным методом. К 50 мг хитозана добавляли 1 мл буферного раствора фермента (в концентрации 1 мг/мл для фицина и папаина, 5 мг/мл для бромелина), инкубировали в течение 4 ч (со среднемолекулярным хитозаном) и 5 ч (с высокомолекулярным хитозаном) с периодическим перемешиванием. Для иммобилизации фицина на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов использовали 0.05 М глициновый буфер с рН 10.0 и 8.6 соответственно. Для сорбции папаина на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов применяли 0.05 М глициновый буфер с рН 9.0; для иммобилизации бромелина на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов – 0.05 М трис-глициновый буфер с рН 9.0 и 8.5 соответственно [41].

Количество белка в иммобилизованном препарате измеряли модифицированным методом Лоури [42]. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей и взаимодействий между матрицей носителя и молекулой фермента. Для этого обрабатывали иммобилизованный препарат раствором K,Na-тартрата, приготовленном на 1 M NaOH при 50°C в течение 10 мин.

В качестве субстрата для определения активности ферментов применяли азоказеин [43] и Nбензол-DL-аргинин-пара-нитроанилид [44]. Для активации ферментов в данном исследовании применяли раствор 1 мМ L-цистеина [45].

Активность фермента выражали в абсолютных (ед/мг) и относительных (%) величинах.



Рис. 1. Зависимости каталитической активности фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от температуры инкубации: 1 – нативный фермент, 2 – фермент, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане, 3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане. Время инкубации 30 мин.

Определение каталитической активности протеаз при использовании азоказеина в качестве субстрата. К 200 мкл раствора свободного фермента в 50 мМ трис-HCl-буфере с pH 7.5, содержащему 1 мМ раствор цистеина (или к суспензии 50 мг иммобилизованного образца в 200 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера с pH 7.5, содержащей 1 мМ раствор L-цистеина), добавляли 400 мкл 1% раствора азоказеина (в 50 мМ трис-HCl-буфере, pH 7.5) и инкубировали 30 мин при оптимальной для про-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

явления каталитической активности фермента температуре – при 37°С для фицина, при 60°С для бромелина и папаина. После инкубации добавляли 800 мкл 5% раствора трихлоруксусной кислоты, инкубировали 5 мин при -4°С, а затем центрифугировали в течение 3 мин при 13000 об/мин для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3% раствора NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при длине волны 410 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Контрольная проба содержала 400 мкл азоказеина, 800 мкл трихлоруксусной кислоты; 50 мг образца и 200 мкл буфера вносили последними: после проведения всех перечисленных выше манипуляций, т.е. непосредственно перед измерением оптической плотности контрольных образцов.

Определение каталитической активности протеаз при использовании N-бензол-DL-аргинин-паранитроанилида в качестве субстрата. К 400 мкл раствора фермента в 50 мМ трис-HCl-буфере с рН 7.5 (или к суспензии 50 мГ иммобилизованного образца в 400 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера с рН 7.5) добавляли 400 мкл раствора N-бензол-DL-аргинин-пара-нитроанилида (1 мг/мл) и 400 мкл 1 мМ раствора L-цистеина в 50 мМ трис-HCl-буфере с рН 7.5. Инкубировали раствор 30 мин при 37°С для фицина, при 60°С — для бромелина и папаина. Далее останавливали реакцию 800 мкл 1 М HCl. Измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 410 нм.

Процесс термической инактивации нативных и иммобилизованных цистеиновых протеиназ изучали при температурах 60, 70, 80 и 90°С в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин с последующим измерением каталитической активности.

Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в восьмикратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Stadia 8.0 (Professional)». Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при p < 0.05), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение зависимости каталитической активности фицина, бромелина и папаина от температуры. Каталитическая активность свободного и иммобилизованного на матрицах хитозана фицина в зависимости от температуры представлена на рис. 1а. В ходе наших экспериментов было установлено, что для всех трех образцов диапазон рабочих температур находится между 37 и 60°С, однако при 70°С свободный фермент был полностью термически инактивирован, в то время как сорбированный фермент на двух видах хитозана сохранял порядка 50% активности от нативного. По сообщениям других авторов фицин проявляет свои каталитические свойства в диапазоне от 40 до 60°С [46, 47]. В этом случае при 70°С происходит термоинактивация фицина [48].

Оптимальная температура для бромелина варьирует в пределах $55-60^{\circ}$ С [3]. В нашей работе диапазон рабочих температур бромелина находится между 50 и 70° С, а для иммобилизованного на хитозане фермента — от 40 до 70° С (рис. 16). Однако при 80° С свободный фермент был термически инактивирован на 76%, в то время как сорбированный на среднемолекулярном хитозане фермент сохранял 69% активности от максимального значения, а иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане — 79%.

Для растворимого и сорбированного папаина характерна высокая активность при температурах соответственно 50 и 70°С (рис. 1в). Однако при 80°С свободный фермент был термически инактивирован на 32%, в то время как при иммобилизации на среднемолекулярном хитозане сохранял порядка 80% активности от максимального значения. Препарат фермента и высокомолекулярного хитозана проявлял стабильную активность независимо от температуры инкубации в диапазоне температур 50–80°С. По данным других исследователей папаин высоко активен при температурах 50–75°С [37, 49, 50].

Исследование закономерностей процессов термической инактивации фицина, бромелина и папаина. В следующей серии экспериментов мы исследовали процесс термической инактивации нативных фицина, бромелина, папаина при температурах 60, 70, 80 и 90°С. Для этого растворы белков инкубировали в интервале времени 10– 60 мин при различных температурах (60–90°С) с последующим определением каталитической активности. На рис. 2 показана динамика процессов инактивации ферментов.

Каталитическая способность фицина, прогреваемого при температуре 60°С, снижалась сразу после 10 мин инкубации, далее плавно уменьшалась и после 60 мин составляла 32%. При 70, 80 и 90°С фермент был полностью термически инактивирован после 10 мин нагревания (рис. 2а).

Для бромелина было характерно сохранение ферментативной активности на 56 и 34% при инкубации соответственно при 60 и 70°С в течение 60 мин. После 10 мин нагревания при 80 и 90°С фермент был полностью инактивирован (рис. 26).

Для папаина мы наблюдали потерю более 60% каталитической способности от первоначального уровня после 10 мин инкубации при 60 и 70°С, при этом остаточная активность при увеличении



Рис. 2. Зависимости каталитической активности фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от времени термической инактивации.

времени нагревания практически не изменялась. После 10 мин при 80 и 90°С фермент утрачивал практически 100% своей ферментативной способности (рис. 2в).

Далее мы определили процент сохранения активности фицина, бромелина и папаина по сравнению с ферментами, не подвергнутыми нагрева-



Рис. 3. Сохранение каталитической активности ферментов в различные промежутки времени в ходе инкубации при 60°С (а), 70°С (б), 80°С (в), 90°С (г): *1* – фицин, *2* – бромелин, *3* – папаин. За 100% принята максимальная ферментативная активность сорбированного образца, наблюдаемая без предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

нию, при инактивации в диапазоне температур 60–90°С (рис. 3).

Динамика потери каталитической способности в ходе инкубации при 60°С для всех исследуемых ферментов сходна: кривые инактивации совпадали по форме. Наибольший процент сохранения активности (порядка 60%) после 60 мин прогревания был характерен для бромелина.

Динамика потери ферментативной способности при 70°С для бромелина и папаина также сходна: кривые термической инактивации совпадали по форме и были близки по значениям. После часового прогревания бромелин сохранял более 30% первоначальной активности, папаин — 45%. Фицин инактивировался практически полностью уже после 10-минутной инкубации.

Для фицина, бромелина и папаина была характерна полная инактивация при 80 и 90°С после 10-минутной инкубации их растворов.

Из всего вышеизложенного можно сделать следующие выводы: 1) бромелин сохранял высокий процент активности в диапазоне температур

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

60 и 70°С (до 40%); 2) фицин быстро инактивировался в случае нагревания при 70°С; 3) папаин был достаточно устойчив при температуре 70°С; 4) фицин, бромелин и папаин полностью инактивировались при нагревании в условиях 80 и 90°С.

Следует отметить, что кривые термопревращения бромелина и папаина при 60-90°С, а также фицина при 70, 80 и 90°С имеют два отчетливо выраженных участка (две «ключевые стадии»): первый (время инкубирования менее 10 мин) отличается высокой скоростью снижения каталитической способности. Для второго (время инкубирования от 20 до 60 мин) характерна стабилизация остаточной активности фермента. Наличие излома и двухфазный характер кривой термоинактивации названных цистеиновых протеаз свидетельствуют, возможно, о последовательном развитии как минимум двух стадий сложного процесса термомодификации белка и о наличии в изучаемой системе двух форм фермента, характеризующихся различной устойчивостью к денатурирующему воздействию. Интересен тот факт, что излом на кривой инактивации фицина одина-



Рис. 4. Зависимости каталитической активности иммобилизованных на среднемолекулярном хитозане фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от времени термической инактивации.

ков при 70, 80 и 90°C, а у бромелина и папаина он более выражен при 80 и 90°C по сравнению с 60 и 70°C.

Исследование закономерностей процессов термической инактивации фицина, бромелина и папаина, иммобилизованных на матрицах хитозанов.



Рис. 5. Зависимости каталитической активности иммобилизованных на высокомолекулярном хитозане фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от времени термической инактивации.

Иммобилизация ферментов на нерастворимых носителях способствует повышению их термостабильности. Этот эффект обусловлен тем, что при присоединении молекул фермента к матрице подложки происходит стабилизация их каталитически активной конформации.

На рис. 4 и 5 изображены кривые термической инактивации протеаз, иммобилизованных на

матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов.

Иммобилизация фицина на среднемолекулярном хитозане увеличила его термостабильность по сравнению с нативным белком: после инкубации при 70°С каталитическая способность гетерогенного препарата сохранилась на 32% от первоначальной. Ферментативная активность при 60°С после 10 мин уменьшилась на 35% и далее практически не претерпевала изменений. Кривые инактивации фицина, сорбированного на матрице высокомолекулярного хитозана, по форме были одинаковы и близки по значениям после нагревания при 60 и 70°С, активность препарата составила более 20% от исходной как после 10 мин, так и после одночасовой инкубации. Фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах, полностью терял свою активность после нагревания при 80 и 90°С (рис. 4а и 5а). Авторы работы [51] произвели иммобилизацию фицина на глиоксилагарозе с сохранением 30% активности от нативного фермента, что значительно увеличило стабильность биокатализатора. Препарат продемонстрировал повышенную активность при рН 10 и при 80°С по сравнению со свободным ферментом. Другая группа исследователей получила ферментные препараты на основе иммобилизованных тиоловых протеаз, такие как папаин, фицин и бромелин, на пористых гранулах поливинилового спирта путем ковалентной фиксации. Стабильность в условиях щелочных значений рН среды и высоких температур, а также при хранении у иммобилизованных ферментов оказалась выше, чем у свободных. Например, остаточная активность иммобилизованного папаина после инкубации при 60°С в течение 60 мин практически не изменилась (осталась на уровне 95-99%), тогда как активность свободного папаина снизилась до 70% от исходного значения [52].

Кривые зависимости каталитической активности иммобилизованного на среднемолекулярном хитозане бромелина от времени термической инактивации при температурах 60 и 70°C до 40 мин инкубации практически совпадали по значениям: активность препарата снижалась до 50%. После 40 мин нагревания ферментных образцов при 60 и 70°С их активность падала до 26% в сравнении с интактным препаратом. После инкубации фермента в течение 1 ч при 80 и 90°С остаточная энзиматическая способность составляла 10 и 20% от исходной. Кривые зависимости активности бромелина, сорбированного на матрице высокомолекулярного хитозана, от времени термической инактивации совпадали по форме и значениям при 60, 70, 80 и 90°С. После 60-минутного прогревания образцы сохраняли не более 25% первоначальной каталитической способности (рис. 46 и 56). Авторы работы [53] показали, что адсорбция бромелина на спорах пробиотика *Bacillus sp.* повысила его термостабильность при 80°С по сравнению с растворимой формой: свободный бромелин потерял полностью свою активность, в то время как иммобилизованный фермент потерял только ~ 47% от своей первоначальной каталитической способности.

Кривые инактивации иммобилизованного на среднемолекулярном хитозане папаина при 60, 70, 80 и 90°С до 30 мин инкубации не различались по форме и значениям параметров: активность препарата снижалась до 70%. После 50 мин инкубации при 60°С фермент сохранял активность на уровне более 60%, а после 10 мин нагрева при 90°С плавно терял свою каталитическую способность, которая в конце эксперимента составляла 33% от исходной. Кривые инактивации папаина, сорбированного на матрице высокомолекулярного хитозана, по форме были одинаковы и близки по значениям параметров после нагревания при 60, 70, 80 и 90°C, активность препарата составляла не более 28% от исходной (рис. 4в и 5в). Напротив, при иммобилизации папаина на хлопчатобумажной ткани не было продемонстрировано значительного улучшения термостабильности фермента по сравнению с его растворимой формой [54]. Авторы работы [50] продемонстрировали заметное повышение термостабильности при 70°С папаина, иммобилизованного на магнитных композитных микросферах, что можно объяснить сниженным автолизом за счет фиксации фермента на подложке.

Анализируя не абсолютные значения активности иммобилизованных на хитозанах протеолитических ферментов, а степень ее сохранения по сравнению с нативными препаратами при инактивации в диапазоне температур 60-90°С (рис. 6 и 7), можно высказать следующие соображения. Динамика потери ферментативной способности при инкубации при 60°С фицина и папаина, иммобилизованных на среднемолекулярном хитозане, близка по форме: ферменты снижали свою активность уже после 10 мин нагревания. Бромелин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане, сохранял 19% каталитической способности после 60 мин инкубации при 60°С, что приблизительно в три раза меньше, чем у других протеаз. Иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане папаин оказался наиболее устойчивым при 70°С и сохранял 90% своей активности. Фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане, полностью инактивировался при 80 и 90°С, тогда как папаин и бромелин сохраняли более 10% каталитической способности от ее начального уровня.

Кривые инактивации, полученные при нагревании при 60°С, были одинаковы по форме и значениям параметров (не более 37% активности во



Рис. 6. Сохранение активности иммобилизованных на среднемолекулярном хитозане ферментов в различные промежутки времени в ходе инкубации при 60°С (а), 70°С (б), 80°С (в), 90°С (г): *1* – фицин, *2* – бромелин, *3* – папаин. За 100% принята максимальная ферментативная активность сорбированного образца, наблюдаемая без предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

всем диапазоне времени) для фицина, бромелина и папаина. При 70°С мы наблюдали практически полное совпадение кривых инактивации для ферментов, иммобилизованных на высокомолекулярном хитозане, они теряли каталитическую способность гораздо быстрее, чем при температурах 60°С и ниже. Иммобилизованные на высокомолекулярном хитозане бромелин и папаин оказались более термостойкими по сравнению с иммобилизованным на том же носителе фицином, который полностью инактивировался после 10 мин инкубации при 80 и 90°С.

Следует отметить, что после иммобилизации на обоих типах хитозанов изменилась форма кривых термопревращения цистеиновых протеаз, по сравнению с результатами, полученными для растворимых ферментов: при сохранении двухфазного характера кривых инактивации излом на них при 80 и 90°С стал менее глубоким.

Форма кривых термической инактивации фицина, бромелина и папаина в растворе при температурах 60, 70, 80 и 90°С указывает на возможность участия процессов ассоциации в регуляции их каталитической активности. В связи с тем, что после иммобилизации двухфазный характер кривых термопревращения цистеиновых протеаз стал менее выраженным, можно сделать предположение, что сорбция на обоих типах хитозанов препятствует протеканию названных выше процессов, стабилизируя тем самым каталитически активную конформацию молекул ферментов при повышении температуры.

В настоящем исследовании было показано, что сорбция ферментов на хитозане способствовала повышению их термостабильности. Можно сделать вывод о том, что адсорбция на среднемолекулярном (200 кДа) и высокомолекулярном (350 кДа) хитозане позволяет расширить спектр и возможности применения цистеиновых протеаз (фицин, папаин, бромелин) за счет протекторных свойств его матрицы.



Рис. 7. Сохранение активности иммобилизованных на высокомолекулярном хитозане ферментов в различные промежутки времени в ходе инкубации при 60°С (а), 70°С (б), 80°С (в), 90°С (г): *1* – фицин, *2* – бромелин, *3* – папаин. За 100% принята максимальная ферментативная активность сорбированного образца, наблюдаемая без предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нативный фицин инактивировался после 10 мин нагревания при 70°С, иммобилизация фермента на матрице хитозана способствовала увеличению его термостабильности при той же температуре. Свободный бромелин терял каталитическую способность после инкубации при 80° С, сорбированная форма фермента проявляла свою активность при 80 и 90°С. Растворимый папаин был термически инактивирован при 80° С, иммобилизация фермента на хитозане частично предотвратила потерю его каталитической способности при 80 и 90°С.

Полученные результаты следует учитывать при разработке ферментных препаратов промышленного назначения на основе фицина, бромелина и папаина, так как иммобилизация цистеиновых протеаз на матрице хитозана частично защищает их молекулы от денатурирующего действия высоких температур, что позволит использовать подобные гетерогенные биокатализаторы в реакторах периодического и непрерывного действия.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- M. Esmaeilpour, M. R. Ehsani, M. Aminlari, et al., Comp. Clin. Pathol. 25 (3), 599 (2016).
- M. A. Shah, S. A. Mir, and M. A. Paray, Dairy Sci. Technol. 94, 5 (2014).
- Z. I. M. Arshad, A. Amid, F. Yusof, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 7283 (2014).
- M. Faccia, G. Picariello, A. Trani, et al., Eur. Food Res. Technol. 234, 527 (2012).
- 5. Z. Pietrasik, J. L. Aalhus, L. L. Gibson, and P. J. Shand, Meat Sci. 84, 512 (2010).

- B. Gerelt, Y. Ikeuchi, and A. Suzuki, Meat Sci. 56, 311 (2000).
- 7. S. Ketnawa and S. Rawdkuen, Food Nutrition Sci. 2, 393 (2011).
- I. Benucci, K. Liburdi, A. M. V. Garzillo, and M. Esti, Food Chem. **124**, 1349 (2011).
- L. P. Hale, P. K. Greer, C. T. Trinh, and C. L. James, Int. Immunopharmacol. 5, 783 (2005).
- G. A. Sullivan and C. R. Calkins, Meat Sci. 85, 730 (2010).
- 11. O. Diaz, M. Fernandez, G. D. Garcia de Fernando, et al., Sci. Food Agric. **71**, 13 (1996).
- 12. L. Feijoo-Siota and T. G. Villa, Food Bioprocess. Technol. 4, 1066 (2011).
- D. R. Baidamshina, E. Y. Trizna, F. S. Akhatova, et al., Sci. Rep. 7, 46068 (2017).
- В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалёва, М. Г. Холявка и др., Прикл. биохимия и микробиология 46 (4), 422 (2010).
- V. C. Sgarbieri, S. M. Gupte, D. E. Kramer, and J. R. Whitaker, J. Biol. Chem. 239, 2170 (1964).
- I. K. Jones and A. N. Glazer, J. Biol. Chem. 245, 2765 (1970).
- 17. D. C. Williams and J. R. Whitaker, Plant Physiol. 44, 1574 (1969).
- J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial Enzymes:* Structure, Function and Applications (Springer, N. Y., 2007).
- J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, et al., Nature 218, 929 (1968).
- I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M. B. Swarte, and J. Drenth, J. Mol. Biol. **179** (2), 233 (1984).
- 21. C. F. Barbas and C. H. Wong, J. Chem. Soc. **1987**, 533 (1987).
- 22. R. B. Johnston, J. Biol. Chem. 221 (2), 1037 (1956).
- 23. *Enzymes in Food Technology*, Ed. by R. J. Whitehurst and M. Van Oort (Wiley-Blackwell, West Sussex, 2010).
- 24. A. D. Napper, S. P. Bennett, M. Borowski, et al., Biochem. J. **301** (Pt 3), 727 (1994).
- C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, and R. C. Rodrigues, Adv. Synth. Catal. 353, 2885 (2011).
- 26. A. Fini and I. Orienti, Am. J. Drug Deliv. 1 (1), 43 (2003).
- 27. M. Alatorre-Meda, P. Taboada, J. Sabin, et al., Colloid Surf. A **339**, 145 (2009).
- B. Krajewska, P. Wydro, and A. Jańczyk, Biomacromolecules 12, 4144 (2011).
- B. Krajewska, P. Wydro, and A. Kyzioł, Colloid Surf. A 434, 349 (2013).
- B. Krajewska, A. Kyzioł, and P. Wydro, Colloid Surf. A 434, 359 (2013).
- A. Kilinç, M. Teke, S. Önal and A. Telefoncu, Prep. Biochem. Biotechnol. 36 (2), 153 (2006).

- 32. T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, Adsorption **20**, 801 (2014).
- B. Hua and Q. Huangb, Chin. J. Polymer Sci. 31 (9), 1190 (2013).
- 34. G. R. Castro, R. R. Kamdar, B. Panilaitis, and D. L. Kaplan, J. Control Release **109**, 149 (2005).
- 35. V. E. Bosio, G. A. Islan, Y. N. Martínez, et al., Crit. Rev. Biotechnol. **36** (3), 447 (2016).
- O. L. Tavano, A. Berenguer-Murcia, F. Secundo, and R. Fernandez-Lafuente, Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety 17 (2), 412, (2018).
- 37. A. Ü. Metin and E. Alver, Bioprocess. Biosyst. Eng. **39**, 1137 (2016).
- I. Benucci, C. Lombardelli, K. Liburdi, et al., Food Sci. Technol. 53 (2), 1130 (2016).
- A. S. Rojas-Mercado, I. E. Moreno-Cortez, R. Lucio-Porto, and L. L. Pavon, Int. J. Biol. Macromolecules 118, 2287 (2018).
- E. Siar, R. Morellon-Sterling, M. N. Zidoune, and R. Fernandez-Lafuente, Int. J. Biol. Macromolecules 133, 412 (2019).
- М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов и В. А. Королева, Патент на способ получения гетерогенного препарата различной дисперсности на основе бромелайна и хитозана, дата подачи заявки: 03.07.2017, дата публикации заявки: 10.01.2019, Бюл. № 1, опубликовано: 16.01.2019, Бюл. № 2.
- 42. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R.J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- 43. A. R. Sabirova, N. L. Rudakova, N. P. Balaban, et al., FEBS Lett. **584** (21), 4419 (2010).
- 44. D. F. Erlanger, N. Kokowski, and W. Cohen, Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 (1961).
- 45. L. R. Singh, Th. P. Devi, and S. K. Devi, Prepar. Biochem. Biotechnol. **34** (1), 25 (2004).
- 46. D. Baeyens-Volant, A. Matagne, R. El Mahyaoui, et al., Phytochemistry **117**, 154 (2015).
- 47. S. Fadýloğlu, Nahrung/Food 45 (2),143 (2001).
- K. B. Devaraj, P. R. Kumar, and V. Prakash, J. Agric. Food Chem. 56, 11417 (2008).
- 49. P. Alpay and D. Aktas Uygun, Mol. Catalysis B 111, 56 (2015).
- 50. H. Lei, W. Wang, L.-L. Chen, et al., Enzyme Microbial Technol. **35** (1), 15 (2004).
- 51. E. Siar, H. Zaak, J. F. Kornecki, et al., Process. Biochem. 58, 98 (2017).
- 52. T. Hayashi, S.-H. Hyon, W.-I. Cha, and Y. Ikada, Polymer J. **25** (5), 489 (1993).
- 53. T. N. Nwagu and C. J. Ugwuodo, Int. J. Biol. Macromolecules **127**, 406 (2019).
- 54. F.-Y. Li, Y.-J. Xing, and X. Ding, Enzyme Microbial Technol. **40** (7), 1692 (2007).

Thermal Inactivation of Cysteine Proteases: "Key Stages" V.A. Koroleva, S.S. Olshannikova, M.G. Holyavka, and V.G. Artyukhov

Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

The processes of thermal inactivation of ficin, bromelain and papain in a dissolved state and immobilized on matrices of medium-molecular (200 kDa) and high-molecular (350 kDa) chitosans were studied. It was shown that native ficin was inactivated at 70° C after 10 min of heating, bromelain in solution retained up to 40% of its activity after 60 min of incubation at 60° C and 70° C, the enzymatic activity of free papain remained constant at 70° C over the whole period of exposure (60 min). Soluble samples ofs ficin, bromelain and papain are characterized by complete inactivation at 80° C and 90° C after 10 min of incubation. The ficin immobilization on matrices of both types of chitosans increased its thermal stability (at 70° C, the catalytic ability of the enzyme was at least 20%). Ficin, immobilized on medium and high molecular weight chitosans, was completely inactivated at 80° C and 90° C after 10 min of incubation and bromelain adsorbed on the chitosan matrix retained more than 10% of their catalytic ability from its initial level under these conditions.

Keywords: ficin, bromelain, papain, immobilization, thermal inactivation, chitosan

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА —

УДК 577.322.7, 577.323.7, 535.56, 543.422.8

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО БЕЛКА HMGB1 И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ФОРМИРОВАНИЕ УПОРЯДОЧЕННЫХ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 2021 г. Е.В. Чихиржина*, Т.Ю. Старкова*, А.М. Поляничко*, **

*Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4 E-mail: e.chikhirzhina@incras.ru

**Санкт—Петербургский государственный университет, 199034, Санкт—Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: a.polyanichko@spbu.ru Поступила в редакцию 02.12.2019 г. После доработки 02.12.2019 г. Принята к публикации 04.03.2021 г.

Белок HMGB1 является одним из ключевых клеточных белков. Основные функции HMGB1 выполняет в ядре, являясь компонентом сложных белок-белковых и ДНК-белковых комплексов. Прежде всего HMGB1 играет важную роль в основных клеточных процессах: транскрипции, репликации, репарации. Помимо ядра этот белок обнаружен в цитоплазматическом и внеклеточном пространстве. Несмотря на достаточно большое количество работ, посвященных исследованию структуры и функций белка HMGB1, на сегодня нет четкого представления о молекулярных механизмах, определяющих разнообразие выполняемых им функций. В работе рассматриваются особенности структурной организации белка HMGB1 и ее влияние на взаимодействие белка с ДНК и другими белками.

Ключевые слова: белок HMGB1, ДНК, гистон H1, структура хроматина. DOI: 10.31857/S0006302921030030

Хроматин эукариотических клеток представляет собой достаточно сложную и динамичную систему, в которой ДНК взаимодействует не только с хорошо изученными гистонами, но и с большим количеством негистоновых белков [1-6]. Среди них наиболее интересными, на наш взгляд, являются широко распространенные в хроматине и эволюционно консервативные представители обширной группы белков с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group). Наиболее многочисленными представителями этой группы являются белки семейства HMGB, содержащие один или несколько структурно-консервативных ДНК-связывающих домена (так называемые HMGB-домены) [2, 7, 8]. Двухдоменный белок HMGB1, как и гистон H1, взаимодействует с линкерной ДНК и формирует наднуклеосомные уровни структурной организации хроматина [2, 4]. Белок HMGB1 хорошо известен как «архитектурный» фактор транскрипции, осуществляющий свои функции путем сбортранскрипционно активного ки на ДНК многокомпонентного белкового комплекса [3, 8]. Кроме того, он играет важную роль в функционировании генома, в том числе на этапах транскрипции, репликации, рекомбинации и репарации ДНК [8, 9].

СТРУКТУРА БЕЛКА НМСВ1

Белок HMGB1 (как и гомологичный ему HMGB2) состоит из двух гомологичных ДНКсвязывающих HMGB-доменов, соединенных коротким линкером (пять-семь аминокислотных остатков), небольшого N-концевого фрагмента и длинного C-концевого участка. Последний состоит из непрерывной последовательности тридцати дикарбоновых аминокислот [1].

В составе ДНК-связывающего НМGВ-домена (~80 аминокислотных остатков) можно выделить три спиральных участка (I, II, и III), формирующих необычную Г-образную структуру, которая стабилизируется сильными гидрофобными взаимодействиями в вершине угла между спиралями I и II [10]. Стоит отметить, что помимо HMGB1/2 к белкам HMGB-семейства относится также и целый ряд транскрипционных факторов [2, 11–17].

Относительно недавно было показано [18–20], что HMGB-белки способны изменять свою пространственную структуру в зависимости от мишени связывания, что позволило их сравнить с природно неупорядоченными белками [8, 21]. Конформационная подвижность полипептидной цепи HMGB-белков, по всей видимости, важна для сборки сложных ДНК-белковых и белок-белковых комплексов, активно участвующих в регуляции структуры и динамики хроматина [22–25].

ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКА HMGB1

Разнообразие выполняемых белком HMGB1 функций отчасти связано с тем. что он может иметь ядерную, цитоплазматическую и внеклеточную локализацию. Локализация белка зависит от характера посттрансляционных модификаций (в первую очередь ацетилирования в областях ядерной локализации (nuclear localization sequences, NLS), фосфорилирования и метилирования), а также окислительно-восстановительного статуса остатков цистеина [2, 26-28]. Восстановленная форма белка (восстановлены все цистеины С23, С45 и С106) характерна для ядерной локализации HMGB1, где белок функционирует как «шаперон», принимая активное участие в процессах транскрипции, репарации, рекомбинации, репликации, осуществляя посадку на нуклеосому хроматин-ремоделирующего комплекса, и связывание с ДНК транскрипционных факторов [29, 30].

Ацетилирование HMGB1 в областях ядерной локализации приводит к транслокации белка в цитоплазму, где он принимает участие в регулировании процессов аутофагии и апоптоза [31].

В случае некроза или другого повреждения целостности клетки HMGB1 попадает во внеклеточное пространство, где постепенно происходит окисление остатков цистеина в положениях C23, C45 и C106. В зависимости от степени окисления белок выступает в роли сигнальной молекулы, инициирующей миграцию клеток, реакцию иммунного ответа клетки, синтез противовоспалительных цитокинов [26–28, 32–34]. Выполнение белком внеклеточных сигнальных функций дало предпосылки отнести HMGB1 к классу аларминов [28, 35–38]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе многообразия выполняемых HMGB1 функций, на сегодняшний день остаются до конца не выясненными.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ HMGB1 С ГИСТОНОМ Н1 И ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

Наряду с линкерным гистоном H1 белок HMGB1 играет ключевую роль в функционировании хроматина. Как уже отмечалось выше, HMGB1 принимает активное участие в формировании сложного транскрипционно активного комплекса, в связи с чем его относят к «архитектурным» факторам транскрипции. Белки H1 и HMGB1 взаимодействуют с межнуклеосомными участками ДНК [2, 5]. Исследования взаимодействия этих белков с ДНК различными физико-химическими методами показало, что связывание с ДНК одного из белков в значительной степени облегчает взаимодействие с ней второго белка [4, 6, 39–42]. HMGB1 и H1 взаимодействуют с ДНК по разным бороздкам двойной спирали, изменяя ее структуру сходным образом.

В нескольких работах было показано прямое взаимодействие между белками H1 и HMGB1 [40, 42–45]. Следует отметить, что на взаимодействие между этими белками также влияет степень окисления цистеина в HMGB1 [7, 46], что хорошо согласуется с описанными в литературных источниках функциями белка. Кроме того, окисление цистеина влияет и на взаимодействие HMGB1 с рядом других мишеней. Было показано и непосредственное взаимодействие HMGB1 с гистоном H3, которое происходит с участием С-концевого участка HMGB1 и гибкого N-концевого фрагмента гистона [19].

Как упоминалось выше, белок НМGВ1 является участником сложных функционально-значимых белковых комплексов. В литературе накопилось довольно много данных о прямом взаимодействии HMGB1 с большим количеством других белков. Так, и in vivo, и in vitro показано прямое связывание HMGB1 с белком p53, который активируется при различных повреждениях ДНК, а также регулирует множество клеточных процессов, таких как клеточный цикл, апоптоз, дифференцировка, старение, репарация ДНК [8]. HMGB1 стимулирует связывание p53 с конкретными сайтами ДНК, в том числе с участками, модифицированными цисплатином [47]. В экспериментах in vitro было показано, что HMGB1 может выступать в качестве «шаперона» при взаимодействии р53 с ДНК [48]. На первом этапе происходит сильный изгиб ДНК, индуцированный НМGВ1, а затем p53 прочно связывается с ДНК, а HMGB1 уходит из комплекса. При этом с p53 связан А-домен HMGB1, а само взаимодействие регулируется его С-концевым участком [49]. Такой комплекс p53/HMGB1 регулирует аутофагию и апоптоз внутри живых клеток [50, 51].

Белок HMGB1 участвует во всех путях процесса рекомбинации. Он принимает участие в формировании мультибелкового комплекса при репарации некомплементарных нуклеотидов при репликации ДНК (mismatch repair, MMR). HMGB1 работает на начальных этапах распознавания повреждения/разрыва ДНК и взаимодействует с белками MMR – белком теплового шока р70, MSH2 и MLH1 [52–54]. Эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов (base excision reраіг, BER и nucleotide excision repair, NER) также связаны с взаимодействием между HMGB1 и раз-

личными ферментами [55-60]. При восстановлении двунитевых разрывов ДНК (double-strand break repair, DSBR) происходит связывание гетеродимера Ku70/Ku80 с поврежденными концами ДНК, что активирует работу каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs) [61]. Фосфорилирование этой протеинкиназы приводит к конформационным изменениям поврежденных концов ДНК, что облегчает работу нуклеаз и лигаз при восстановлении разрывов. Белок HMGB1 стимулирует in vitro активность протеинкиназы DNA-PKcs [61, 62], белков RAG1 и RAG2 [63] и усиливает активность ДНК-лигазы Т4 [64]. При рекомбинации именно формирование комплекса из трех белков RAG1, RAG2 и HMGB1 приводит к образованию на ДНК шпильки [65, 66]. Причем этот белковый комплекс стабилен во время всего процесса рекомбинации. Присутствие HMGB1 активирует лиазу dRP, участвующую в восстановлении одноцепочечных разрывов ДНК. HMGB1 взаимодействует с ДНК в месте образования платиновых аддуктов, защищая от восстановления поврежденные цисплатином участки ДНК [57]. Важную роль в этом процессе играют и посттрансляционные модификации HMGB1, в первую очередь ацетилирование и фосфорилирование [58, 60].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НМСВ1 С ДНК

ДНК-связывающая функция белков HMGB1 и HMGB2 на сегодняшний день наиболее изучена и подробно описана в литературе [2, 8, 67]. Взаимодействие HMGB1/2 с ДНК характеризуется формированием изгибов двойной спирали ДНК при связывании с белком и/или способностью белка узнавать и избирательно связываться с участками ДНК, имеющими различные нарушения структуры.

Роль НМGВ-доменов. При взаимодействии с ДНК ароматические аминокислотные остатки в составе НМGВ-доменов частично интеркалируют со стороны малой бороздки, изгибая ДНК в сторону большой бороздки, при этом угол изгиба может достигать 140° [1]. Совокупные исследования процесса формирования ДНК-белковых комплексов методами кругового дихроизма, аналитического ультрацентрифугирования и ретардации в агарозном геле показали, что при образовании ДНК-белкового комплекса при большом содержании HMGB1 в комплексе основную роль играют белок-белковые взаимодействия между молекулами HMGB1. В любом случае при связывании с ДНК проявляется специфичность не к нуклеотидной последовательности, а к пространственной организации молекулы ДНК, и эта специфичность определяется ДНК-связывающими ломенами белка.

Характерной особенностью НМGB1 (так же, как и HMGB2) является его способность узнавать и взаимодействовать с участками ДНК, имеющими различные структурные нарушения: однонитевые разрывы, 4Н ДНК [68-70], платиновые аддукты, образованные на ДНК в результате действия противоопухолевых препаратов (карбоплатин, цисплатин) и т.д. [2]. Связывание этих белков с такими поврежденными областями ДНК является сигналом для начала работы репарационной системы клетки. В экспериментах in vitro показано, что в присутствии НМGВ-доменных белков замедляется восстановление повреждений ДНК в месте образования платиновых аддуктов. В результате увеличивается эффективность таких препаратов.

Сравнительно недавно было показано, что молекула белка HMGB1 находится в динамическом равновесии между закрытым (свернутым) и открытым (развернутым) состояниями [18–20]. В неактивном состоянии отрицательно заряженный С-концевой домен взаимодействует с линкером (остатки аргинина 72 и 162, лизина 81 и 164 и изолейцина 158 [71]), что обеспечивает его расположение в полости между положительно заряженными ДНК-связывающими доменами и стабилизацию белковой молекулы в целом [19]. Переход в функционально-активное развернутое состояние сопровождается нарушением данного взаимодействия и, следовательно, разворачиванием белка HMGB1 [20]. Регуляция данного конформационного перехода может включать как структурно-адаптивные механизмы, когда в зависимости от объекта связывания белок способен изменять свою структуру, так и наличие посттрансляционных модификаций [18].

НМGB1 не является сиквенс-специфичным белком. Однако некоторыми авторами показано, что с ГЦ-богатыми участками ДНК в основном взаимодействует В-домен НМGB1 [72]. В случае АТ-богатых последовательностей в связывании с ДНК принимают участие оба ДНК-связывающих домена.

Роль С-концевого домена. При сравнении аминокислотной последовательности белков группы HMGB1-3 (рис. 1) можно заметить, что все три белка по первичной структуре очень близки. Отличие между ними проявляется в длине неупорядоченного С-концевого домена: у HMGB2 и HMGB3 они короче, чем у HMGB1, на 5 и 15 а.к. соответственно. Как уже отмечалось выше, именно этот домен отвечает за взаимодействие белка с другими молекулами, в том числе с ДНК и гистонами.

Основные работы, посвященные исследованию влияния сильно заряженного С-концевого участка HMGB1 на связывание белка с ДНК, выполнялись с использованием спектроскопиче-



Рис. 1. Аминокислотная последовательность двудоменнх негистоновых белков HMGB1, HMGB2 и HMGB3. Рисунок сформирован на основе базы данных (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

ских подходов (ультрафиолетовая и инфракрасная спектроскопия, круговой дихроизм) и атомной силовой микроскопии. Сравнительный анализ взаимодействия ДНК с полноразмерным HMGB1 и с укороченным белком HMGB1-(A+B), состоящим только из двух ДНК-связывающих доменов, выявил значительное отличие в структуре формирующихся комплексов [73–75].

Было установлено, что рекомбинантный белок НМGB1-(А+В) образует с ДНК комплексы, обладающие высокой степенью упорядоченности и аномально высокой оптической активностью [73, 76, 77]. С помощью метода атомной силовой микроскопии было показано, что для данных систем характерно формирование своего рода «жгутов», сплетенных из нитей ДНК-белкового комплекса [75]. Это говорит о доминирующей роли межмолекулярных взаимодействий в такой системе. Образующиеся ассоциаты сформированы сразу несколькими молекулами ДНК в составе ДНК-белкового комплекса и состоят ИЗ одинаково ориентированных «цилиндров», имеющих очень близкие размеры. Расположенные вокруг нити ДНК содержат чрезвычайно большое количество изломов, что указывает на высокое число связанных с ней молекул белка. На основе полученных данных была предложена модель связывания белка HMGB1 с ДНК (рис. 2). Согласно этой модели, при взаимодействии ДНК с полноразмерным белком связывание происходит посредством только одного ДНК-связывающего домена (рис. 2а). В случае рекомбинантного белка НМGB1-(A+B) во взаимодействии с ДНК участвуют оба ДНК-связывающих домена (рис. 26).

Связанные с межнуклеосомным участком ДНК, белок HMGB1 и линкерный гистон H1 являются ключевыми белками в функционировании хроматина [2,3,6]. В то время как гистон H1 является репрессором транскрипции, белок

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

НМGВ1 (как и гомологичный ему белок НМGВ2) может служить стимулирующим транскрипцию фактором [4]. Существует гипотеза, согласно которой гистон Н1 и белок НМGВ1 образуют единый комплекс с ДНК. С одной стороны, оба белка взаимодействуют с линкерным участком ДНК, с другой – Н1 располагается по большой бороздке двойной спирали, а НМGВ1 – в малой [10], при одновременном связывании с ДНК они сходным образом изменяют структуру ДНК и тем самым облегчают друг другу связывание с ней. Исследования взаимодействия гистона Н1 и белка HMGB1 с ДНК различными физико-



Рис. 2. Модель связывания белка HMGB1 с ДНК: (а) – взаимодействие ДНК с полноразмерным белком HMGB1; (б) – взаимодействие ДНК с рекомбинантным белком HMGB1-(A+B), который состоит только из ДНК-связывающих доменов.

химическими методами (круговой дихроизм в ультрафиолетовом и инфракрасном диапазоне, абсорбционная спектроскопия, спектрофотометрическое плавление, гель-ретардация) показывают, что связывание этих белков с ДНК скорее всего не носит конкурентного характера, а обладает признаками кооперативного взаимодействия [4, 6, 39–42].

Анализ структуры комплексов ДНК/НМGВ1 в присутствии гистона Н1 с помощью метода кругового дихроизма в инфракрасном диапазоне позволяет увидеть связывание отдельных белков как с сахаро-фосфатным остовом, так и с основаниями ДНК [39-41, 78]. При одновременном присутствии в комплексе с ДНК обоих белков, гистон Н1 взаимодействует преимущественно с фосфатными группами ДНК, частично экранируя их заряд, чем облегчает связывание HMGB1 с основаниями ДНК в малой бороздке. Белок-белковые взаимодействия стимулируют конденсацию ДНК с образованием крупных ДНК-белковых комплексов [79]. Методом АСМ показано, что для комплексов ДНК/HMGB1 в присутствии гистона Н1 характерно формирование фибриллярных структур, сплетенных из нитей ДНК, которые удерживаются между собой молекулами белков [40, 75]. Эти данные указывают на первостепенную роль взаимодействий между HMGB1 и H1 при формировании тройного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы видим доминирующую роль неупорядоченного отрицательно заряженного С-концевого фрагмента белка HMGB1 как при связывании белка с ДНК, так и при его взаимодействии с другими белковыми молекулами [79, 80]. Этот участок снижает эффективность связывания белка с ДНК. В его отсутствие во взаимодействии с ДНК принимают участие оба ДНК-связывающих домена. Связывание двух доменов белка с ДНК приводит к образованию межмолекулярных «скрепок» на ДНК и стимулирует формирование надмолекулярного порядка в системе, что влияет на прочность связывания белка с ДНК, а также на структуру и стабильность образующихся комплексов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-04-01199 (исследование структуры HMGB1 в зависимости от мишени связывания и роли белка в процессах клеточной дифференцировки) и № 18-08-01500 (изучение структуры ДНК-белковых комплексов)).

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

- M. Bustin and R. Reeves, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 35 (1996).
- 2. M. Stros, Biochim. Biophys. Acta 1799, 101 (2010).
- 3. E. Chikhirzhina, G. Chikhirzhina, and A. Polyanichko, Biomed. Spectr. Imaging **3**, 345 (2014).
- Y. V. Postnikov and M. Bustin, Biochim. Biophys. Acta 1859, 462 (2016).
- 5. E. Chikhirzhina, T. Starkova, and A. Polyanichko, Biophysics **63**, 858 (2018).
- E. Chikhirzhina, T. Starkova, and A. Polyanichko, Biophysics 65, 202 (2020).
- M. Stros, E. Polanska, M. Kucirek, et al., PLoS One 10, e0138774 (2015).
- 8. R. Reeves, DNA Repair 36, 122 (2015).
- P. Mandke and K. M. Vasquez, DNA Repair (Amst.) 83, 102701 (2019).
- A. M. Read, P. D. Cary, C. Crane-Robinson, et al., Nucl. Acids Res. 21, 3427 (1993).
- 11. T. Chi, Nat. Rev. Immunol. 4, 965 (2004).
- 12. M. Stros, D. Launholt, and K. D. Grasser, Cell. Mol. Life Sci. 64, 2590 (2007).
- 13. L. H. Pevny and S. K. Nicolis, Int. J. Biochem. Cell Biol. 42, 421 (2010).
- P. Bernard and V. R. Harley, Int. J. Biochem. Cell Biol. 42, 400 (2010).
- F. Oppel, N. Müller, G. Schackert, et al., Mol Cancer. 10, 137 (2011).
- 16. O. Leis, A. Eguiara, E. Lopez-Arribillaga, et al., Oncogene **31**, 1354 (2012).
- A. Lai, M. Wan, J. Wu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 1169 (2009).
- J. O. Thomas and K. Stott, Biochem. Soc. Trans. 40, 341 (2012).
- M. Watson, K. Stott, and J. O. Thomas, J. Mol. Biol. 374, 1286 (2007).
- K. Stott, M. Watson, F. S. Howe, et al., J. Mol. Biol. 403, 706 (2010).
- 21. V. N. Uversky, Eur. J. Biochem. 269, 2 (2002).
- L. Breydo, J. M. Redington, and V. N. Uversky, Int. Rev. Cell. Mol. Biol. **329**, 145 (2017).
- 23. V. N. Uversky, Prot. Sci. 22, 693 (2013).

- 24. V. N. Uversky, Cell. Mol. Life Sci. 74, 3065 (2017).
- 25. A. L. Darling and V. N. Uversky, Molecules 22, pii: E2027 (2017).
- E. Venereau, M. Casalgrandi, M. Schiraldi, et al., J. Exp. Med. 209, 1519 (2012).
- H. Yang, P. Lundback, L. Ottosson, et al., Mol. Med. 18, 250 (2012).
- A. Raucci, S. Di Maggio, F. Scavello et al., Cell. Mol. Life Sci. 76, 211 (2019).
- M. Stros, M. Kucirek, S.A. Sani, et al., Biochim. Biophys. – Acta Gen. Regul. Mech. 1861, 200 (2018).
- 30. G. Verrijdt, A. Haelens, E. Schoenmakers, et al., Biochem. J. **361** (Pt 1), 97 (2002).
- X. Zhu, J. S. Messer, Y. Wang, et al., J. Clin. Invest. 125, 1098 (2015).
- 32. H. Yang, H. Wang, Z. Ju, et al., J. Exp. Med. 212, 5 (2015).
- 33. K. Stark, V. Philippi, S. Stockhausen, et al., Blood **128**, 2435 (2016).
- M. Tirone, N. L. Tran, C. Ceriotti, et al., J. Exp. Med. 215, 303 (2018).
- 35. E. Venereau, C. Ceriott, and M. E. Bianchi, Front. Immunol. 6, 442 (2015).
- N. Lohani and M. R. Rajeswari, Curr. Prot. Pept. Sci. 17, 762 (2016).
- M. E. Bianchi, M. P. Crippa, A. A. Manfredi, et al., Immunol. Rev. 280, 74 (2017).
- 38. Б. И. Кузник, В. Х. Хавинсон, Н. С. Линькова и др., Успехи физиол. наук **48**, 40 (2017).
- A. Polyanichko and E. Chikhirzhina, Spectroscopy 27, 393 (2012).
- 40. A. M. Polyanichko and E.V. Chikhirzhina, J. Mol. Struct. **1044**, 167 (2013).
- 41. A. Polyanichko, E. Chikhirzhina, V. Andruschchenko, et al., Biopolymers **83**, 182 (2006).
- 42. E. V. Chikhirzhina, V. I. Vorob'ev, and A. M. Polyanichko, Mol. Biol. **47**, 299 (2013).
- 43. L. Cato, K. Stott, M. Watson, et al., Mol. Biol. 384, 1262 (2008).
- L. A. Kohlstaedt, E. C. Sung, A. Fujishige, et al., J. Biol. Chem. 262, 524 (1987).
- 45. L. A. Kohlstaedt and R. D. Cole, Biochemistry **33**, 570 (1994).
- E. Polanska, S. Pospisilova, and M. Stros, PLoS One 9, e89070 (2014).
- 47. T. Imamura, H. Izumi, G. Nagatani, et al., J. Biol. Chem. 276, 7534 (2001).
- K. McKinney and C. Prives, Mol. Cell Biol. 22, 6797 (2002).
- 49. P. Rowell, K. L. Simpson, K. Stott, et al., Structure 20, 2014 (2012).
- K. M. Livesey, R. Kang, H. J. Zeh 3rd, et al., Autophagy 8, 846 (2012).

- 51. K. M. Livesey, R. Kang, P. Vernon, et al., Cancer Res. **72**, 1996 (2012).
- 52. E. Y. Krynetski, N. F. Krynetskaia, M. E. Bianchi, et al., Cancer Res. **63**, 100 (2003).
- F. Yuan, L. Gu, S. Guo, C. Wang, et al., J. Biol. Chem. 279, 20935 (2004).
- 54. Y. Zhang, F. Yuan, S. R. Presnell, et al., Cell **122**, 693 (2005).
- 55. R. Prasad, Y. Liu, L. J. Deterding, et al., Mol. Cell. 27, 829 (2007).
- 56. Y. Liu, R. Prasad, and S. H. Wilson, Biochim. Biophys. Acta 1799, **119** (2010).
- J. Malina, J. Kasparkova, G. Natile, et al., Chem. Biol. 9, 629 (2002).
- 58. I. Ugrinova, I. G. Pashev, and E. A. Pasheva, Biochemistry **48**, 6502 (2009).
- 59. I. Ugrinova, S. Zlateva, I. G. Pashev, et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. **41**, 1556 (2009).
- I. Ugrinova, I. G. Pashev, and E. A. Pasheva, Mol. Biol. Rep. 36, 1399 (2009).
- D. J. Sawchuk, J. Mansilla-Soto, C. Alarcon, et al., J. Biol. Chem. 279, 29821(2004).
- Y. Yumoto, H. Shirakawa, M. Yoshida, et al., J. Biochem. 124, 519 (1998).
- D. C. van Gent, K. Hiom, T. T. Paull, et al., EMBO J. 16, 2665 (1997).
- 64. M. Stros, D. Cherny, and T. M. Jovin, Eur. J. Biochem. **267**, 4088 (2000).
- A. J. Little, E. Corbett, F. Ortega, et al., Nucl. Acids Res. 41, 3289 (2013).
- 66. R. B. West and M. R. Lieber, Mol.Cell Biol. 18, 6408 (1998).
- 67. R. Reeves, Biochim. Biophys. Acta 1799, 3 (2010).
- T. C. Johnstone, J. J. Wilson, and S. J. Lippard, Inorg. Chem. 52, 12234 (2013).
- 69. Q. Wang, M. Zeng, W. Wang, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **360**, 14 (2007).
- 70. F. Totsingan and A. J. Bell Jr., Prot. Sci. 22, 1552 (2013).
- 71. S. Knapp, S. Muller, G. Digilio, et al., Biochem. **43**, 11992 (2004).
- 72. S. Muller, M. E. Bianchi, and S. Knapp, Biochem. **40**, 10254 (2001).
- E. Chikhirzhina, A. Polyanichko, Z. Leonenko, et al., Spectroscopy 24, 361 (2010).
- 74. А. М. Поляничко, С. Г. Давыденко, Е. В. Чихиржина и др., Цитология **42**, 787 (2000).
- A. M. Polyanichko, Z. V. Leonenko, D. Cramb, et al., Biophysics 53, 202 (2008).
- E. V. Chikhirzhina, A. M. Polyanichko, A. N. Skvortsov, et al., Mol. Biol. 36, (2002).
- 77. A. M. Polyanichko, E. V. Chikhirzhina, A. N. Skvortsov, et al., J. Biomol. Struct. Dyn. **19**, 1053 (2002).
- A. Polyanichko and H. Wieser, Biopolymers 78, 329 (2005).
- 79. E. V. Chikhirzhina, T. Yu. Starkova, A. Beljajev, et al., Inter. J. Mol. Sci. **21**, 7948 (2020).
- 80. Е. В. Чихиржина, А. М. Поляничко и Т. Ю. Старкова, Цитология **62**, 716 (2020).

Structural Organization of the Nuclear Protein HMGB1 and Its Effect on the Formation of the Ordered Supramolecular Complexes

E.V. Chikhirzhina*, T.Yu. Starkova*, and A.M. Polyanichko*, **

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

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

HMGB1 is one of the key proteins of the cell. HMGB1 performs its main functions predominantly in the cell nucleus, being an essential component of DNA-protein and multiprotein complexes. It plays an important role in such cellular processes as transcription, replication, and DNA repair. However, it was also found outside the nucleus: in cytoplasmic and extracellular space. Despite numerous papers on the structure and functioning of HMGB1, the molecular mechanisms, which determine a vast variety of functions this protein performs, still remain unclear. In this paper, we reported recent data on organization of the protein structure, its effect on interactions of HMGB1 with DNA and other proteins.

Keywords: HMGB1 protein, DNA, histone H1, chromatin structure

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577. 3: 577.15: 577.151.33

РОЛЬ АНИОНОВ ФОСФАТА В АВТО- И ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛЕНИИ NADH

© 2021 г. О.Н. Бржевская*, Е.Н. Дегтярев**, С.Н. Холуйская**

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

> *E-mail: s_n_khol@mail.ru* Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 22.07.2020 г. Принята к публикации 18.12.2020 г.

Методом ЭПР исследовано влияние моно- и двузамещенных фосфатов на реакцию фотолиза восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH) в замороженном (77 K) водном растворе. Установлена зависимость выхода парамагнитных интермедиатов реакции — катион-радикала NADH⁺ и атомарного водорода от концентрации фосфатов. Полученные результаты интерпретированы с точки зрения основности и электроноакцепторных свойств фосфатов. По данным электронной спектроскопии обнаружено значительное ускорение авто- и фотоиндуцированного окисления NADH в нормальных условиях (20°C, водная среда, фосфатный буфер, pH 6.3). Скорость темновой реакции прямо пропорциональна суммарной концентрации орто- и гидрофосфатов и нечувствительна к кислороду. На основании экспериментов с использованием нитроксильной ловушки сделан вывод о нерадикальной природе реакции.

Ключевые слова: автоокисление NADH, фосфат, ЭПР-спектроскопия. DOI: 10.31857/S0006302921030042

NADH и его окисленная форма NAD⁺ (рис. 1) – важные коферменты редокс-превращений в биохимическом синтезе. Изучению их действия посвящено огромное число исследований, например [1-5]. В контролируемых ферментами реакциях молекула NADH выступает либо как источник протона и двух электронов, либо как донор иона гидрида, который переносится на подходящий субстрат. Основную химическую роль в этих процессах играет фрагмент молекулы NADH – 1,4-дигидроникотинамид.

Окислительно-восстановительные превращения аналогов NADH, содержащих никотинамидный фрагмент, интенсивно изучаются в реакциях без участия ферментов, поскольку данные модельные реакции могут прояснить механизм действия NADH и, кроме того, представляют практический интерес. Так, на антипролиферативных и цитотоксических свойствах кофермента и его модельных соединений основаны разработки антиопухолевых фармацевтических препаратов [6, 7]; на изучении редокс-свойств — создание новых процессов органического синтеза, создание датчиков для определения загрязняющих примесей в воде [8] и т. д. Результатом многочисленных исследований стала гипотеза о двух механизмах трансформации кофермента NADH: первый механизм представляет собой одностадийный перенос гидридного иона. Второй — включает несколько стадий: две, когда последовательно происходит перенос электрона и атома водорода на



Рис. 1. NADH и его окисленная форма NAD⁺; R – фрагмент, включающий рибозу и аденин.

Сокращения: TEMPOL – 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил, P_i – моно- и двузамещенные фосфаты.

молекулу окислителя А⁺, либо три – с постадийным переносом второго электрона и протона по следующей схеме:

Одностадийный перенос: NADH + A⁺ → [NAD^{δ +...}H^{δ -...}A^{δ +}] → NAD⁺ + HA; *Многостадийный перенос:* (а) электрон – атом водорода (e[•] – H[•]) NADH + A⁺ → [NADH^{+...}A[•]] → NAD⁺ + HA;

(б) электрон – протон – электрон (
$$\mathbf{e}^{\cdot} - \mathbf{H}^{+} - \mathbf{e}^{\cdot}$$
)
NADH + A⁺ → [NADH⁺···A[']] → [NAD^{····}AH^{+·}] →
NAD⁺ + HA.

Доказательством второго механизма служит регистрация различными физико-химическими методами промежуточных частиц — радикалов и ион-радикалов, в частности катион-радикала NADH. Примеров реализации второго механизма для NADH и его моделей немного, так как начальный перенос электрона — сильно эндотермическая реакция и для ее осуществления требуется дополнительная энергия, что достигается в условиях фотоиндуцирования или при введении катализаторов.

С другой стороны, известно, что эффективность редокс-процессов повышается в присутствии посредников передачи электрона таких, как молекулярные анионы, а именно анионы фосфата. Фосфатные анионы участвуют во многих биохимических процессах, исследование их взаимодействия с гидратированным электроном стало предметом многочисленных публикаций [9–11].

Целью настоящей работы было исследование влияния анионов фосфата на процесс автоокисления NADH, в том числе фотоиндуцированного. В условиях фотоокисления методом ЭПР также изучены свободнорадикальные интермедиаты реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали (без дополнительной очистки) NADH фирмы Serva (Германия), соли NaH₂PO₄ 2H₂O, Na₂HPO₄, NaCl и KBr фирмы Panreac (Испания) и 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (TEMPOL) фирмы Merck (Германия).

Кинетику автоокисления NADH изучали по изменению полосы поглощения его электронного спектра с $\lambda_{max} = 339$ нм ($\dot{\epsilon} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{сm}^{-1}$). Спектры регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне 225–400 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Кинетику фотоокисления NADH в воде и фосфатном буфере ($C_0 = 0.5 \text{ M}$, pH 6.3) исследовали при облучении монохромным светодиодом ($\lambda = 365$ нм) при комнатной температуре в атмосфере аргона в кюветах специальной конструкции, позволяющих провести предварительный барботаж раствора инертным газом. Погрешность измерения оптической плотности составляет ± 0.001, общая погрешность определения константы скорости не превышает 5%.

Фотоиндуцированное окисление NADH в замороженных жидким азотом образцах осуществляли при облучении лампой ДРШ-1000 с фильтром БС6 с пропусканием $\lambda > 320$ нм. Растворенудаляли вакуумированием. ный кислород Времена экспозиции варьировали от 8 до 40 мин. Регистрацию сигналов ЭПР проводили на спектрометре EMX (Bruker, США) в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН. Спектры атома водорода и катион-радикала NADH регистрировали соответственно при мощности микроволнового поля 2 мкВт (в отсутствие насыщения) и 200 мкВт, при 77 К и амплитуде модуляции 3 Гс. Двойное интегрирование сигнала, пропорциональное концентрации парамагнитных центров, проводили с помощью программы WinEPR (Bruker, США). Измерение интенсивности сигналов проводили троекратно, различие в полученных значениях составляло <10%. Для построения графиков использовали усредненные значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2а представлены ЭПР-спектры продуктов фотоиндуцированного окисления NADH. При 77 К зарегистрирован характерный пятикомпонентный сигнал, впервые описанный в работах [12, 13] и относящийся к парамагнитному интермедиату реакции – катион-радикалу NADH⁺. Регистрация катион-радикала свидетельствует о многостадийном механизме окисления NADH, который, как правило, реализуется в условиях фотоиндуцированного процесса. Второй продукт, образующийся в одном элементарном акте с катион-радикалом – гидратированный электрон e_{aq} имеет время жизни около 120 нс и не обнаруживается методом ЭПР. Вместе с тем при фотоокислении NADH в фосфатном буфере в спектре ЭПР появляется сигнал атома водорода (дублет с расщеплением ~506 Гс).

Превращение мобильного электрона в атом водорода в присутствии фосфатов обнаружено достаточно давно [13]. Впервые эта реакция наблюдалась при γ -радиолизе замороженных растворов ортофосфатов. Оказалось, что взаимодействие e_{aq} с анионами ортофосфата приводит к образованию атомарного водорода, стабилизированного полем оксианиона (реакция 1).

$$e_{aq} + H_2 PO_4^{-} \rightarrow HPO_4^{2-} + H^{\cdot}.$$
 (1)



Рис. 2. (а) — Спектры ЭПР парамагнитных продуктов фотолиза NADH (77 K, $([NADH]_0 = 5.0 \text{ мM}, \text{время облучения} 8 \text{ мин}, \text{вакуум})$: *1* — спектр катион-радикала NADH⁺, *2* и *3* — спектры катион-радикала NADH⁺ и атомарного водорода, полученные в присутствии фосфатов (pH 6,3) в концентрации 0.125 M (2) и 0.5 M (3). (б) — Зависимости интенсивностей сигналов ЭПР катион-радикала NADH⁺ (*1*) и атомарного водорода (*2*) от концентрации фосфатов. Звездочками обозначен относительный выход гидратированных электронов по данным наносекундного лазерного фотолиза [15].

Впоследствии захват и стабилизация e_{aa} фосфатами обнаружены для электронов с низкой энергией <4.5 эВ в условиях, исключающих появление продуктов радиолиза воды. Свободные электроны генерировали путем фотоионизации различных соединений (триптофан, пирен, фенотиазин, хлорофилл и другие) при облучении с длинами волн 240 нм < λ < 700 нм, т. е., в том числе, видимым светом. Предполагается, что при взаимодействии e_{aq} с фосфатом в замороженном водном растворе образуется молекулярный анион – аддукт электрона, метастабильная частица, способная передавать электрон акцептору при его наличии (O₂, NO₃⁻), либо распадаться, причем характерным продуктом фрагментации является атом водорода. Прекурсором атома Н'выступает протон фосфата, что однозначно доказано по появлению спектра ЭПР атомарного дейтерия в экспериментах с $D_2 PO_4^{-}$ [11].

Полученные нами результаты также указывают на определяющую роль моно- и двузамещенных фосфатов (P_i) в образовании атома водорода.

Действительно, мы наблюдали сигнал Н исключительно в присутствии фосфатного буфера, причем интенсивность сигнала коррелировала с концентрацией фосфатов (рис. 26). Суммарную концентрацию Р_i изменяли от 1 мМ до 1.5 М значения, близкого к предельной растворимости ортофосфата натрия. Соотношение моно- и двузамещенного фосфатов подбиралось таким образом, чтобы pH растворов имел постоянное значение (рН 6.3). Зависимость интенсивности сигнала атомов водорода от концентрации буфера представляет собой кривую с насыщением (кривая *I* на рис. 26), наибольшая интенсивность сигнала Н[•] достигается при концентрации $[P_i] \ge 0.5$ М, и плато на экспериментальной кривой соответствует условиям, когда все свободные электроны взаимодействуют с фосфатом.

Напротив, максимальное образование первичного продукта фоторазделения зарядов - катион-радикала NADH⁺ – происходит в отсутствие фосфатов (кривая 2 на рис. 26). В фосфатном буфере с ростом концентрации [P_i] интенсивность сигнала NADH+ снижается и стремится к постоянному значению, которое устанавливается также при концентрации $[P_i] \ge 0.5 \text{ M}$ (рис. 26), т. е. зависимости интенсивностей сигналов NADH⁺ и H[•] от концентрации P_i антибатны. Существует несколько причин, способных вызвать снижение интенсивности сигнала катион-радикала. Во-первых, эффективность реакции фотолиза может понизиться в результате увеличения ионной силы раствора, приводящей к изменению поляризации связей в молекуле NADH. Однако мы не обнаружили влияния соли Na₂SO₄ на выход катион-радикала при ее введении в концентрации 1.0 М в раствор NADH.

Во-вторых, авторами работы [2] была выдвинута гипотеза об образовании комплекса с переносом заряда между NADH и анионом фосфата [NADH...P_i]. У молекулы NADH в таком комплексе могут изменяться поляризуемость, дипольный момент, магнитные свойства. В работе

[2] было высказано предположение об увеличении реакционной способности координированного фосфатом NADH в условиях термической реакции. Однако при фотолизе NADH мы наблюдали обратное: в присутствии фосфатов не только снижается концентрация катион-радикала, но, как было показано ранее [11] методом наносекундного лазерного фотолиза, снижается также выход гидратированных электронов, т. е. эффективность (квантовый выход) реакции падает.

Рис. 26 дополнен данными нашей работы [15]: двумя звездочками обозначены относительные величины выхода e_{aq} в отсутствие фосфатов и при $[P_i] = 0.5$ М. Видно, что выходы e_{aq} и катион-радикала для $[P_i] = 0.5$ М не совпадают, хотя обе частицы образуются эквимолекулярно в одном элементарном акте. Значительно меньшая концентрация катион-радикала говорит о существовании канала его расходования. Следовательно, действие фосфата на фотоокисление NADH носит двойственный характер: с одной стороны, снижает квантовый выход реакции, с другой – стимулирует вторичные превращения ее продуктов, e_{aq} и катион-радикала NADH⁺.

Известно, что катион-радикал NADH⁺ вследствие более кислого характера в сравнении с исходной молекулой обладает высокой реакционной способностью и легко депротонируется, переходя в нейтральный радикал NAD [16, 17], причем эта реакция практически необратима. Несмотря на высокие значения константы скорости реакции депротонирования NADH⁺ при нормальных (20°С) условиях $k \approx 10^6 \text{ c}^{-1}$ [18], при 77 К катион-радикал устойчив (спектр 1 на рис. 2а), что, очевидно, обусловлено довольно большой энергией активации, которая составляет около 60 кДж/моль [19]. Однако ситуация изменяется в присутствии акцептора протона (спектры 2 и 3 на рис. 2а). Так, по оценке, сделанной в работе [17], взаимодействие NADH⁺ с гидроксильным анионом увеличивает скорость депротонирования по сравнению с молекулой H₂O на два порядка; значения констант составляют 2.9 $\cdot ~ 10^8 \ {\rm M}^{-1} \ {\rm c}^{-1}$ и $3.5 \cdot 10^6$ с⁻¹ соответственно. В нашей системе наиболее вероятной частицей, связывающей протон, выступает гидрофосфат HPO_4^{2-} (р $K_a = 7.21$) и превращение катион-радикала происходит по реакции (2):

$$NADH^{+} + HPO_{4}^{2-} \rightarrow NAD' + H_{2}PO_{4}^{-}.$$
 (2)

Полученные данные также хорошо согласуются с результатами исследований [16, 20], где обнаружено, что акцепторы протона и атома водорода повышают выход конечного продукта реакции —



Рис. 3. Кинетика фотоокисления NADH при облучении с $\lambda = 365$ нм в водном растворе (20°С): *1* – в аргоне, *2* – в аргоне в присутствии фосфатов в концентрации 0.5 M (pH 6.3), 3 – на воздухе.

окисленной формы NAD⁺ – и в целом увеличивают общую скорость фотолиза.

Образующийся после депротонирования радикал NAD[•] также нестабилен. Его гибель происходит в основном по двум направлениям — в результате быстрой димеризации [21] и экзотермической реакции одноэлектронного окисления [22]. Нельзя исключить влияние ортофосфата на окисление NAD[•] как частицы, обладающей электронакцепторными свойствами:

$$NAD' - e^{-} (+ H_2PO_4^{-}) \rightarrow NAD^+.$$
(3)

Описанный механизм фотоокисления NADH включает обратимые стадии, в частности, авторы работы [23] методами флуоресценции исследовали рекомбинацию катион-радикала NADH⁺ с гидратированным электроном. Катион-радикал NADH⁺ и e_{aq} – первичные продукты разделения зарядов, и наблюдаемое нами акцептирование электрона ортофосфатом предотвращает их рекомбинацию и смещает равновесие реакции в сторону образования NAD⁺. Отсюда можно предположить увеличение общей скорости окисления NADH, даже несмотря на незначительное уменьшение квантового выхода фотолиза, отмеченное выше.

На рис. 3 представлены результаты экспериментов по фотоиндуцированному окислению NADH в нормальных условиях с добавками фосфатов и в их отсутствие. Кинетические кривые на рис. 3 показывают сильное ускоряющее действие P_i на реакцию. В этом отношении влияние фосфатов подобно действию кислорода, который, как показано в работе [24], выступает в качестве



Рис. 4. (а) — Изменение во времени электронного спектра поглощения NADH ($C_0 = 0.25$ мМ) в присутствии фосфатного буфера ($C_0 = 1,0$ М, pH 6,43), Ar, 23°С. (б) — Кинетические кривые автоокисления NADH ($C_0 = 0.25$ мМ, 23°С): I — в инертной атмосфере аргона (кружки) и на воздухе (треугольники); 2 – с добавкой NaCl ($C_0 = 2.0$ М, в аргоне); 3 – в присутствии фосфатного буфера ($C_0 = 0.5$ М, pH 6.43) в аргоне (квадраты) и на воздухе (ромбы). (в) – Зависимость начальной скорости W_0 автоокисления NADH ($C_0 = 0.25$ мМ) от концентрации P_i фосфатного буфера.

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

медиатора передачи электронов, образующихся при фотолизе NADH. Однако эндотермическая реакция присоединения к кислороду реализуется только при достаточной энергии электронов, например, в условиях фотогенерации. Поэтому мы исследовали влияние фосфатов и кислорода на автоокисление NADH без инициирования облучением.

Темновой процесс автоокисления NADH изучали по изменению электронного спектра кофермента в нормальных условиях (20°С). При отсутствии добавок спектр NADH практически стабилен в атмосфере аргона и воздуха, введение Р_і значительно ускоряет реакцию (рис. 4б). В спектре не проявляются признаки образования комплексов кофермента с фосфатами: трансформация NADH в окисленную форму происходит с четко выраженной изобестической точкой (рис. 4а), что говорит о существовании только двух форм кофермента. Ускорение реакции не связано с изменением ионной силы раствора. Так, введение добавок солей (NaCl, KBr) в концентрациях, соответствующих ионной силе фосфатного буфера не влияет на реакцию (рис. 4б). Автоокисление NADH – pH-зависимая реакция, при смещении в более щелочную область от значения рН 6.4 процесс сильно замедляется и при рН ≥ 8 практически останавливается. Начальные участки кинетических кривых расходования NADH линейны (зависимость 3 на рис. 46), скорость реакции постоянна, оценка значения эффективной константы скорости дает величину $k_{9\Phi} = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1} ([P_i] = 0.5 \text{ M}).$ Зависимость скорости окисления NADH от $[P_i]$ имеет сложный характер (рис. 3в): она прямо пропорциональна суммарной концентрации NaH₂PO₄ и Na₂HPO₄ в диапазоне концентраций [P_i] ≤ 0,5 М, с приближением к пределу растворимости NaH₂PO₄ скорость падает.

Следует отметить отсутствие влияния кислорода на реакцию, что косвенно может свидетельствовать о нерадикальном процессе. Для идентификации природы реакции использовали радикальную ловушку - водорастворимый нитроксильный радикал TEMPOL. Нитроксильный радикал в концентрации 0.2 мМ вводили в раствор с концентрацией реагентов [NADH]₀ = 1.0 мМ; $[P_i] = 0.5 \text{ M} (\text{pH 6.43})$. Выяснилось, что вне зависимости от наличия кислорода TEMPOL не оказывает действия на реакцию: скорость автоокисления не изменяется, значение эффективной константы скорости практически совпадает с величиной, определенной без ловушки, наконец, ЭПР-спектр радикала TEMPOL в реакционной смеси стабилен во времени. Таким образом, не было получено аргументов в пользу радикального процесса при автоокислении NADH в присутствии фосфатов. Данный факт легко объясняется в рамках одностадийного механизма переноса гидридных анионов, который более характерен для темновых процессов. Стимулирование фосфатами темновой реакции может быть вызвано активацией NADH при его координации фосфатом. В данном случае, вероятно, имеет место нековалентное взаимодействие, поскольку мы не обнаружили в электронном спектре NADH изменений, характерных для образования комплекса. В настоящий момент нами проводятся исследования комплексообразования методом ЯМР, поскольку он позволяет выявить слабые нековалентные ваимодействия по изменению времен спин-решеточной релаксации атомов молекулы NADH.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неорганические фосфаты оказывают двойное действие на фотоиндуцированное окисление NADH. С одной стороны, незначительно снижают выход первичных продуктов разделения зарядов – электрона и катион-радикала NADH⁺, с другой – вступают с ними во вторичные реакции, предотвращая рекомбинацию и повышая общую скорость фотолиза NADH. Ускоряющее действие фосфатов обусловлено их свойствами - основностью и сродством к электрону; первое приводит к увеличению скорости депротонирования NADH⁺ под действием гидрофосфата, второе имеет своим следствием акцептирование гидратированного электрона ортофосфатом с образованием атомарного водорода.

Темновая реакция автоокисления NADH ускоряется фосфатами и предположительно происходит по одностадийному механизму гидридного переноса, поскольку в экспериментах с использованием радикальных ловушек (молекулярный O_2 , TEMPOL) не обнаружено признаков радикальной природы реакции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при бюджетном финансировании (№ темы ФАНО: 0082-2014-0009, № гос. регистрации: АААА-А17-117040610309-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. U. Eisner and J. Kuthan, Chem. Rev. 72, 1 (1972).
- S. G. A. Alivisatos, F. Ungar, and G. Abraham, Nature 203, 973 (1964).
- 3. D. M. Stout and A. I. Meyers, Chem. Rev. 82, 223 (1982).
- 4. D. G. Nicholls and S. J. Ferguson, *Bioenergetics* (Academic Press, 2002).
- 5. T. Bugg, *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry* (Blackwell Publishing Ltd., 2004).
- S. Boulton, S. Kyle, and D. W. Durkacz, Br. J. Cancer 76, 845 (1997).
- E. Ciesielska, K. Studzian, E. Zyner, at al., Cell. Mol. Biol. Lett. 5, 441 (2000).
- M. Zhang, Y. Zhang, L. Zhengwen, et al., J. Environ. Manag. 232, 197 (2019).
- 9. П. П. Левин, О. Н. Бржевская и О. С. Неделина, Изв. РАН. Сер. хим. **56** (7), 1277 (2007).
- 10. О. Н. Бржевская, Е. Н. Дегтярев, Т. С. Журавлева и др., Докл. РАН **420** (3), 1 (2008).
- 11. О. С. Неделина, О. Н. Бржевская, Е. Н. Дегтярев и др., Докл. РАН **428** (4), 474 (2009).
- 12. А. А. Красновский и Г. П. Брин, Докл. АН СССР **158** (1),225 (1964).
- 13. А. В. Умрихина, А. Н. Луганская и А. А. Красновский, Докл. АН СССР **304** (6),1485 (1989).
- 14. J. Jortner, M. Ottolenghi, J. Rabani, et al., J. Chem. Phys. 37, 2488 (1962).
- 15. О. Н. Бржевская, Е. Н. Дегтярев, П. П. Левин и др., Докл. РАН **405** (2), 259 (2008).
- 16. A. Anne, P. Hapiot, J. Moiroux, et al., J. Am. Chem. Soc. **114**, 4694 (1992).
- 17. J. Zielonka, A. Marcinek, J. Adamus, et al., J. Phys. Chem. A **107** (46), 9860 (2003).
- B. Czochralska and L. Lindquist, Chem. Phys. Lett. 101, 297 (1983).
- J. Moiroux and P. Elving, J. Am. Chem. Soc. 108, 6533 (1980).
- J. Gebicki, A. Marcinek, and J. Zielonka, Acc. Chem. Res. 37(6), 379 (2004).
- C. O. Schmakel, K. S. V. Santhanam, and P. J. Elving, J. Am. Chem. Soc. 97, 5083 (1975).
- 22. P. J. Elving, W.T. Bresnahan, J. Moiroux, et al., Bioelectrochem. Bioenerg. 9, 365 (1982).
- 23. J. Tornmalm, E. Sandberg, M. Rabasovic, et al., Sci. Rep. 9, 15070 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-51526-w
- 24. B. Czochralska, W. Kawczynski, D. Bartosz, et al., Biochim. Biophys. Acta **801** (3), 40
The Role of Phosphate Anions in Photoinduced Auto-Oxidation of NADH O.N. Brzevskaya*, E.N. Degtyarev**, and S.N. Kholuiskaya**

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

**Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The EPR technique was used to study the effect of mono- and disubstituted phosphates on photolysis of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in frozen aqueous solution at 77°K. The dependence of the yield of paramagnetic reaction intermediates – cation radical of NADH + and hydrogen atom on phosphate concentration was determined. The results obtained have been interpreted in terms of basicity and electron-withdrawing properties of phosphates. According to electron spectroscopy, a significant acceleration of photoinduced auto-oxidation of NADH was detected under normal conditions (20°C, aqueous solution, phosphate buffer, pH 6.3). The speed of the dark reaction is directly proportional to the total concentration of ortho- and hydrophosphates, it is insensitive to oxygen. Experiments with nitroxyl trapping led to the conclusion that the reaction proceeds through the non-radical mechanism.

Keywords: NADH auto-oxidation, phosphate, EPR spectroscopy

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА В ДИАПАЗОНЕ –170°С – +20°С В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

© 2021 г. В.З. Пащенко, В.В. Горохов, Б.Н. Корватовский, П.П. Нокс, Н.П. Гришанова, С.Н. Горячев

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

E-mail: vz.paschenko@gmail.com Поступила в редакцию 26.11.2019 г. После доработки 25.02.2020 г. Принята к публикации 20.02.2021 г.

Исследованы температурные зависимости ($-170^{\circ}C - +20^{\circ}C$) длительности флуоресценции молекул триптофана в водном растворе, в растворах глицерина (50 и 75% по объему), диметилсульфоксида (50 и 75% по объему) и в 1 М водном растворе трегалозы. В этом температурном диапазоне во всех образцах кинетика флуоресценции наилучшим образом аппроксимируется тремя экспонентами с характерными временами при комнатных температурных зависимостей длительности флуоресценции наиболее быстрой и средней компонент в температурном диапазоне от $-60^{\circ}C$ до $10^{\circ}C$. Для объяснения такого характера данных температурных зависимостей нами предложена новая модель природы многокомпонентного свечения, учитывающая переход молекулы триптофана из возбужденное состояния в состояние с разделением заряда, обратный переход в возбужденное состояние, а также излучательный и безызлучательный переходы состояния с разделенными зарядами в основное состояние. Полученные результаты могут служить основой для интерпретации экспериментальных зависимостей для в белках.

Ключевые слова: триптофан, флуоресценция, кинетика затухания флуоресценции, температурная зависимость.

DOI: 10.31857/S0006302921030054

Флуоресцентная спектроскопия триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного внутреннего индикатора конформационного состояния этих белков, их динамики, а также процессов межмолекулярных взаимодействий. Известно, что динамические (спектрально-кинетические) характеристики молекул триптофана (Тгр) сильно зависят от свойств окружающей среды [1, 2]. Собственная флуоресценция индольного хромофора чувствительным образом реагирует на состояние окружающей среды, а длительность и квантовый выход флуоресценции являются индикатором даже небольших изменений в этом окружении [3, 4]. Так, положение максимума спектра флуоресценции белковых триптофанилов, определяемое релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного хромофора, уже давно используется в качестве показателя, отражающего состояние внутримолекулярной динамики белка, в том числе при изменении температуры [5, 6]. Сложнее ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Особенно это относится к малоисследованным температурным зависимостям длительности триптофановой белковой флуоресценции в диапазоне от криогенных температур до комнатной. Очевидно, что детальное выяснение природы локальных изменений окружения триптофановых остатков в структуре белка, влияющих на регистрируемые в эксперименте зависимости от температуры длительности флуоресценции (τ), требует комплексных исследований, включая различные модели, описывающие особенности изменения т молекул Trp от температуры в различных растворителях.

Наблюдаемый в экспериментах многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Trp в растворе, а также в составе пептидов

Сокращения: Trp – триптофан, CTS – состояние с переносом заряда (Charge Transfer State), ДМСО – диметилсульфоксид, HB – водородные связи (Hydrogen Bonds).

и белков можно связать, в том числе, с наличием трех возможных ротамеров индольных колец вокруг связи $C_{\alpha} - C_{\beta}$, возникающих в результате электростатических взаимодействий в молекуле Trp [7-10]. При этом обычно удельное содержание одного из ротамеров существенно выше, чем двух других. В свою очередь, среди этих двух наименее выраженных по содержанию ротамеров также преобладает один. В случае, когда триптофаны находятся в составе белковой матрицы, в дополнение к явным ротамерам боковой цепи Тгр специфическим источником гетерогенности кинетики регистрируемого сигнала флуоресценции являются микроконформационные состояния белков в локальном окружении индольного кольца. Поэтому для белков правильнее говорить о конформерах вместо ротамеров [10]. Наличие нескольких компонент в кинетике затухания флуоресценции молекул Trp в белках связывают, в частности, с разными скоростями переноса электрона в ротамерах к пептидным связям при возбуждении триптофановых остатков [8, 9]. Удельное содержание различных ротамеров, а также скорости дезактивации возбужденного состояния Тгр в разных растворителях отличаются, поэтому и наблюдается различие в длительностях и квантовых выходах флуоресценции Тгр в зависимости от растворителя [8, 9].

В нашей предыдущей работе [11] были исследованы температурные зависимости кинетик затухания флуоресценции молекул Trp в растворе глицерина (50% по объемуу) и в 1 М водном растворе трегалозы. Флуоресценцию измеряли в спектральной области 292-417 нм с субнаносекундным временным разрешением. Оказалось, что при комнатной температуре кинетика флуоресценции в обоих случаях хорошо аппроксимировалась тремя экспонентами с временами $\tau_1 \sim 4$ нс, $\tau_2 \sim 6$ нс и $\tau_3 \sim 12.5$ нс. Было определено спектральное распределение амплитуд (Decay Associated Spectra – DAS) этих компонент и установлен антибатный (противофазный) характер температурных зависимостей длительности флуоресценции быстрой и средней компонент в температурном диапазоне от -60°С до 10°С. Третья (медленная) компонента давала незначительный вклад в сигнал флуоресценции и показывала слабую зависимость от температуры во всем исследованном диапазоне от -170° С до 20° С. В работе [11] мы предположили, что наблюдаемое антибатное поведение времен затухания флуоресценции двух компонент в определенном температурном интервале обусловлено переходом части молекул Trp, находящихся в возбужденном состоянии, из коротковолновой формы, обладающей коротким временем жизни флуоресценции, в длинноволновую форму с промежуточным значением длительности флуоресценции.

В последнее время в литературе обсуждается другой механизм возникновения двухкомпонентного характера кинетики затухания флуоресценции, который основан на возможности переноса электрона с индольного кольца возбужденной молекулы триптофана на амидные остатки или пептидные группы ближайшего окружения триптофана. Более того, в работе [12] с помощью методов молекулярной динамики и теории функционала электронной плотности (density functional theory – DFT) показана возможность образования в водном окружении трипофана упорядоченной системы водородных связей, которая приводит к появлению квазизоны для переноса электрона от индольного кольца возбужденной молекулы триптофана на водородные связи. В результате возникает состояние с переносом заряда, которое переходит в основное состояние с более высокой (в два-три раза) скоростью, чем возбужденное состояние триптофана.

В настоящей работе были исследованы температурные зависимости кинетик затухания флуоресценции водных растворов молекул Trp в присутствии таких агентов, как глицерин, трегалоза и диметилсульфоксид. При этом, так же как и в работе [11], наблюдался антибатный характер температурных зависимостей длительности флуоресценции быстрой и средней компонент в температурном диапазоне от -60°C до 10°C. Для объяснения антибатного характера наблюдаемых температурных зависимостей мы использовали новую модель, описывающую переход молекулы Trp из возбужденного состояния в состояние с разделенными зарядами (Trp* → CTS, где CTS – состояние с переносом заряда (Charge Transfer State)), обратный переход CTS→ Trp*, а также излучательный и безызлучательный переход CTS в основное состояние. Физический смысл процессов перехода в новой модели совершенно иной, чем в ротамерной модели, использованной нами ранее в работе [11]. Суть отличий состоит в том, что в ротамерной модели трехкомпонентное свечение Тгр объясняется присутствием трех разных центров свечения, тогда как в новой модели три компоненты в кинетике затухания флуоресценции являются следствием иных физических процессов, описывающих дезактивацию Trp* с участием промежуточного состояния с переносом заряда. Анализируемые нами эффекты, очевидно, могут дать новый полезный материал для интерпретации экспериментальных зависимостей длительности триптофановой флуоресценции от температуры в белках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали триптофан, трегалозу и диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы Sigma (США), глицерин фирмы Merck (США). Измере-

ния кинетики флуоресценции проводили на установке с коррелированным по времени и длине волны счетом единичных фотонов PML-16 (Becker & Hickl GmbH, Berlin, Germany, http://www. becker-hickl.de/pdf/pml16c21.pdf2006). Данная установка оборудована 16-канальной мультианодной трубкой Hamamatsu R5900, содержащей 16 раздельных входных анодных элементов и общую катодную и динодную систему. Получаемый сигнал флуоресценции направляется в полихроматор с дифракционной решеткой 600 штрихов/мм, обеспечивающей ширину спектральной полосы измерительной системы 200 нм с разрешением 12.5 нм/канал. Это позволяет регистрировать трехмерную картину флуоресценции, отражающую изменения длительности (т), длины волны (λ) и интенсивности (I) свечения. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового диода EPLED 280 (Edinburg Photonics, Шотландия), длительность импульса света составляла 870 пс, спектральная ширина – 10 нм, частота следования импульсов 10 МГц. Для получения хорошего отношения сигнал/шум время накопления сигнала было выбрано равным 30 с. Таким образом, регистрируя трехмерное (τ , λ , I) изображение свечения триптофанилов, мы могли измерять кинетики затухания флуоресценции в любом спектральном канале. В эксперименте образец находился в охлаждаемой жидким азотом кювете, температуру которой контролировали с помощью термопары. Время охлаждения до -170°С составляло около 10 мин, скорость последующего нагревания была равной 5-7 град/мин.

Получаемый в результате измерений массив спектрально-кинетических данных представляет собой набор кинетик затухания флуоресценции, зарегистрированных при разных λ в области свечения Trp 292 — 425 нм с интервалом 12.5 нм. Число экспериментальных точек при регистрации каждой кинетики составляло 4096. Для каждого спектрального канала измеряли также число фотонов, зарегистрированных в данной области спектра.

Спектры поглощения в образцах измеряли с использованием спектрофотометра Hitachi-557 (Hitachi Ltd., Япония), спектры флуоресценции препаратов ($\lambda_{BO36} = 280$ нм) — на спектрофлуориметре Hitachi-850.

Аппроксимацию экспериментальных кинетик проводили для каждого спектрального канала при помощи программы SPCImage (Bekker & Hickl, Germany) по формуле (1), позволяющей разлагать кинетики по методу Марквардта—Левенберга на сумму от одной до пяти экспонент, свернутых с аппаратной функцией системы регистрации, измеряемой для каждого спектрального канала. При разложении экспериментальных кинетик мы ограничились тремя экспонентами, так как дальнейшее увеличение числа компонент не приводило к снижению χ_r^2 . На первом этапе проводили свободное варьирование параметров a_i и τ_i для каждого спектрального канала. Затем полученные значения τ_i (i = 1,...,3) усреднялись по всем спектральным каналам. Полученные усредненные значения τ_i подставляли в программу глобального анализа по всем спектральным каналам Globals Unlimited (Illinois University, США) как неварьируемые параметры для окончательного определения предэкспоненциальных коэффициентов $a_i(\lambda)$, которые затем использовали для получения спектрального распределения этих коэффициентов:

$$F(t, \lambda) = \sum_{i} a_i(\lambda) \exp(-t/\tau_i) \ (i = 1, \dots, 3). \tag{1}$$

Здесь $a_i(\lambda)$ представляет собой зависящий от длины волны сигнала флуоресценции предэкспоненциальный множитель компоненты с временем жизни τ_i . Среднеквадратичное отклонение экспериментальной кривой от теоретической χ_r^2 рассчитывалось по формуле: $\chi_r^2 = 1/(N - p - 1)\Sigma_j(d_j - f_j)^2/s_j^2$ (j = 1, ..., 4096), где d_j – экспериментальные значения кинетики затухания флуоресценции в *j*-й момент времени, f_j – значение рассчитанной для данного момента времени теоретической кривой, равной свертке функции (1) с аппаратной функцией ($f = F \otimes A \Phi$), s_j – дисперсия экспериментальных точек, p – число параметров теоретической кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы сопоставили температурные зависимости различных параметров, характеризующих спектры флуоресценции Тгр и кинетики затухания флуоресценции в чистом водном растворе, а также водных растворах глицерина (50 и 75% по объему), ДМСО (50 и 75% по объему) и 1 М водном растворе трегалозы. Методика обработки температурной зависимости этих параметров во всех экспериментах была одинаковой, поэтому детальный анализ данных мы приводим только для водного раствора Тгр.

На рис. 1 и 2 представлены спектры поглощения и флуоресценции раствора Тгр в воде при комнатной температуре. Из рис. 1 видно, что спектр поглощения Тгр в водном растворе обладает сложной структурой и имеет длинноволновое монотонно уменьшающееся по интенсивности крыло. Очевидно, что такой спектр поглощения является суперпозицией нескольких центров поглощения, отличающихся положением их максимумов. Для детального анализа этот спектр был



Рис. 1. Спектр поглощения триптофана в водном растворе при комнатной температуре. Цифрами *1–5* обозначены гауссовы компоненты разложения спектра поглощения на составляющие.

разложен на гауссовы компоненты. Видно, что в спектре поглощения присутствуют две основных (1 и 2) и две минорных компоненты (3 и 4), а также широкая полоса (5) в длинноволновой области. В литературе уже давно было отмечено, что Тгр в воде имеет две-три отчетливых компоненты флуоресценции в зависимости от рН и три времени жизни в присутствии органических растворителей типа метанола, этанола или диметилсульфоксида. Это объясняется наличием ротамеров вокруг связи С $_{\alpha}$ –С $_{\beta}$ [7, 13]. При этом наблюдение двух, а не трех компонентов может быть обусловлено близкими временами жизни двух компонентов и незначительным квантовым выходом одного из них. Также понижение температуры, согласно работе [14], может приводить к «вымораживанию» определенных ротамеров. Данная точка зрения впоследствии подтверждалась во многих исследованиях [10, 15–18].

Ротамерная модель прямо подтверждается данными ЯМР-спектроскопии, а также измерениями времени жизни триптофановой флуоресценции индивидуальных белковых кристаллов с единственным триптофановым остатком [19, 20].

До настоящего времени в литературе нет сведений о принадлежности центров поглощения (1-4) конкретным формам Trp в водном растворе. Отнесение полос к тем или иным формам Trp можно сделать исходя из известных представлений о связи вкладов и спектральной ширины компонент в спектре поглощения с интенсивностью и длительностью компонент в кинетике затухания флуоресценции [8]. Мы считаем, что две основных компоненты представляют собой полосы поглощения двух ротамеров, присутствующих в водном растворе триптофана, одна из минорных полос (3) соответствует спектру третьей дол-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021



Рис. 2. Спектр флуоресценции триптофана в воде при комнатной температуре. Символами S1 и S2 обозначены компоненты разложения спектра на гауссовы составляющие, а также их площади. На врезке показана зависимость отношения площадей гауссовых компонент разложения спектра S2/S1 от температуры.

гоживущей ротамерной формы. Спектральная компонента (4) по своим характеристикам (положение λ_{max}, полуширина) близка к спектру поглощения несольватированной или частично сольватированной формы Trp с длинным временем затухания флуоресценции [21]. Широкая длинноволновая компонента (5) спектра поглощения Trp связана, предположительно, с прямым переходом молекулы Trp, окруженной сеткой водородных связей (НВ), при возбуждении из основного состояния системы Trp + HB в состояние с переносом заряда Trp⁺HB⁻, образующееся в результате перехода электрона с индольного кольца на систему водородных связей, окружающих молекулу Trp. При понижении температуры амплитуда широкой компоненты уменьшается до нуля при -60°С.

Несмотря на достаточно сложный спектр поглощения Trp в водном растворе, его спектр флуоресценции (рис. 2) характеризуется только двумя компонентами, причем более слабая компонента S2 является существенно уширенной по сравнению с основной полосой S1. Очевидно, что компонента S2 соответствует более короткому времени жизни возбужденного состояния Trp, чем S1. Из данных спектров флуоресценции можно сделать вывод, что основные ротамерные формы триптофана (рис. 1, 1,2), в водном растворе характеризуются близкими временами жизни флуоресценции, а широкая полоса связана с процессами тушения флуоресценции и является причиной немоноэкспоненциального характера кинетики затухания флуоресценции. На рис. 3а,б приведено спектральное распределение амплитуд



Рис. 3. Спектральные распределения амплитуд для трех компонент флуоресценции триптофана в воде при температуре 10°C (а) и –170°C (б); *a*₁, *a*₂, *a*₃ – амплитуды этих компонент.

для трех компонент флуоресценции триптофана в воде с временами $\tau_1 \approx 3.1$ нс, $\tau_2 \approx 4.5$ нс , $\tau_3 \approx 15.4$ нс при температуре 10°С (рис. 3а) и $\tau_1 \approx 4.8$ нс, $\tau_2 \approx 7.0$ нс , $\tau_3 \approx 15.5$ нс при -170° С (рис. 36). Видно, что вклад третьей компоненты незначителен и практически не зависит от температуры. Такая же картина наблюдалась и для третьей компоненты кинетики флуоресценции в других растворителях. Поэтому во всех кинетических измерениях мы представляли кинетику затухания флуоресценции в трехэкспоненциальном приближении, а дальнейший анализ данных проводили, учитывая только две наиболее быстрые экспоненты с амплитудами a_1 и a_2 . Отчетливо видно, что при комнатной температуре вклад быстрой компоненты (амплитуда a_1) существенно меньше вклада компоненты с амплитудой a_2 , а при -170° C картина меняется на противоположную. Очевидно, необходимо было проанализировать поведение длительностей и вкладов этих компонент во всем температурном диапазоне от -170°С до 20°С. Ход зависимости от температуры длительности (т1.2) двух основных компонент флуоресценции, а также их вкладов (площади $A_1 = a_1 \tau_1$ и $A_2 = a_2 \tau_2$) в суммарную интенсивность флуоресценции показаны на рис. 4.

Видно, в частности, что изменение параметров A_1 и A_2 от температуры происходит антибатно (в противофазе). Обращают на себя внимание два температурных диапазона: от -150° C до -110° C и от -90° C до 10° C, где отчетливо проявляется «перекачка» интенсивности флуоресценции первой компоненты во вторую. Действительно, в диапазоне температур от -170° C до -110° C вклад $A_1 > A_2$, затем наблюдается инверсия кривых $A_1(T)$ и $A_2(T)$ в диапазоне от -90° C до 10° C. После

нагревания выше -20° С снова происходит изменение температурной зависимости вкладов A_1 и A_2 , т.е. вновь растет вклад от быстрой компоненты и падает вклад медленной компоненты. В данном температурном диапазоне противоположным образом меняются и характерные длительности компонент τ_1 и τ_2 . В работе [11] эти изменения мы связали с индуцируемыми температурой переходами между двумя ротамерами Trp с максимальным значением скорости этого перехода при температуре около -20° С. В окрестности этой температуры (-20° С) происходит также сдвиг длины волны (λ_{max}) максимума в спектре флуоресценции первой компоненты (рис. 5). В то же



Рис. 4. Зависимости от температуры длительности (τ_1, τ_2) двух основных компонент флуоресценции, а также вкладов данных компонент $A_1 = a_1 \tau_1$ и $A_2 = a_2 \tau_2$ в суммарную интенсивность флуоресценции.



Рис. 5. Температурные зависимости длины волны (λ_{max}) максимального значения в спектральном распределении первой и второй компонент флуоресценции от температуры; $1/2 \lambda_{max}$ указывает на температуру половинного сдвига λ_{max} первой компоненты флуоресценции.

время видно, что значение λ_{max} второй компоненты флуоресценции остается постоянным во всем диапазоне измеряемых температур: $\lambda_{max} \approx 336$ нм. Отметим также, что λ_{max} первой компоненты сохраняет постоянное значение, равное 311 нм в диапазоне температур от -170° C до $\approx -40^{\circ}$ C, а при дальнейшем повышении температуры сдвигается к значениям, близким для таковых у второй компоненты.

Известно, что сдвиг спектра люминесценции флуоресцирующего хромофора при повышении температуры связан с увеличением подвижности его окружения [5, 8], в данном случае – диполей воды. Полученная температура (около –20°С) скорее всего отвечает температуре затвердевания (кристаллизации) 1 М раствора Тгр в воде. Очевидно, что в разных растворителях температура затвердевания должна меняться. Соответственно, должны наблюдаться и разные значения температур перехода между ротамерами Тгр (температурных областей антибатного поведения короткого и длинного времен затухания флуоресценции Trp). Действительно, если смещение спектра люминесценции происходит в результате увеличения подвижности растворителя, то в разных растворителях это смещение должно наблюдаться в разных областях температур, а именно там, где происходит активизация молекулярной динамики в окружении флуоресцирующих хромофоров. Для проверки этого предположения мы провели исследование температурного сдвига λ_{max} для водных растворов Trp в 50%-м и 75%-м глицерине, в 50%-м и 75%-м ДМСО и 1 М растворе трегалозы. Результаты приведены в таблице.

Отметим прежде всего, что изменение состава растворителя само по себе меняло исходное соотношение «весов» A_1 и A_2 двух основных компонент флуоресценции в замороженных до -170° С образцах. Амплитуда третьей компоненты во всех случаях продолжала оставаться незначительной. По сравнению с чисто водным раствором Trp соотношение весов A_1 и A_2 в растворе глицерина увеличивалось, а в растворах ДМСО и трегалозы уменьшалось (см. таблицу).

Очевидно, что состав растворителя, определяющий детали его взаимодействия с индольным ядром и аланильной боковой цепью молекулы Trp, явным образом влияет на величину конкретных соотношений популяций разных ротамеров, фиксируемых низкой температурой. Из таблицы также видно, что по сравнению с чисто водным раствором температурная точка половинного сдвига первой компоненты λ_{max} , характеризующегося длительностью флуоресценции τ_1 , смещается к $\approx -30^{\circ}$ С и $\approx -40^{\circ}$ С в растворах с 50% глицерина и 50% ДМСО соответственно. Однако в растворах с 75% глицерина и 75% ДМСО эта точка снова смещается к более высоким температурам: к -12°С и -22°С соответственно. Этот факт является дополнительным подтверждением связи температурной области регистрируемых нами переходов между ротамерами Trp с молекулярной динамикой окружающего растворителя. Действительно, температуры затвердевания водных

Растворитель	$A_1/A_2 (-170^{\circ}\text{C})$	Температура половинного сдвига λ _{max} первой компоненты флуоресценции		
H2O	1.54	-20		
50% глицерина	1.86	-30		
75% глицерина	2.3	-12		
50% ДМСО	≈ 1	-40		
75% ДМСО	≈ 1	-22		
1 М трегалоза	1.27	-5		

Зависимость отношения спектральных вкладов и температуры половинного сдвига λ_{max} спектра первой компоненты кинетики флуоресценции Trp от растворителя

растворов как глицерина, так и ДМСО немонотонно зависят от соотношения глицерин/ H_2O и ДМСО/ H_2O . При смешивании двух чистых компонентов растворителя – глицерина и H_2O – температура затвердевания (замерзания) раствора понижается по мере увеличения массовой доли глицерина вплоть до –38°С при 70% содержании глицерина. При дальнейшем же увеличении концентрации глицерина эта температура замерзания резко повышается. Аналогичная картина наблюдается и с водными растворами ДМСО, с тем уточнением, что минимальные температуры затвердевания смеси ДМСО/ H_2O еще более низкие, чем у смесей глицерина с водой [22–24].

Что касается раствора трегалозы, то на основании второго закона Рауля [25] можно оценить, на какую величину должна понизиться температура замерзания чистой воды в присутствии 1 М трегалозы. Оказывается, что эта температура составляет ~ -3° С, что практически совпадает с величиной 1/2 сдвига λ_{max} первой компоненты флуоресценции Trp в растворе трегалозы: -5° С (см. таблицу).

Многокомпонентный характер кинетик затухания флуоресценции Trp обычно связывают с переходами между его различными ротамерами [8]. В нашей работе [11] антибатный характер температурной зависимости короткого (τ_1) и длинного (τ_2) времени жизни кинетики затухания флуоресценции Trp в растворе мы объяснили переходом между двумя ротамерными формами Trp в возбужденном состоянии. При этом каждой форме Trp приписывалась свое время жизни флуоресценции.

Однако возможен и альтернативный подход к объяснению особенностей зависимости длительностей и квантовых выходов флуоресценции Тгр от температуры, основанный на иных физических механизмах возникновения многокомпонентной кинетики затухания флуоресценции. В последнее время в ряде работ появились сведения, что кинетики флуоресценции собственно ротамерных форм Тгр моноэкспоненциальны, причем длительность флуоресценции разных ротамеров отличается незначительно [26]. При этом тушение флуоресценции какой-либо ротамерной формы Trp и связанный с этим многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Trp в белках объясняется дополнительным каналом дезактивации возбужденного состояния Trp – переносом электрона с возбужденного индольного кольца на амидные группы основного скелета Тгр либо на его электрон-акцепторные боковые связи. В белке также возможен перенос протона с ближайших аминокислот, например с тирозина на индольное кольцо [27]. Для объяснения природы многокомпонентного свечения Тгр в воде, а также механизмов тушения флуоресцен-

ции Тгр в работе [12] выдвинуто предположение, что при возбуждении молекул Тгр происходит делокализация электронной плотности между индольным кольцом и соседними молекулами воды. При этом происходит напряжение сети водородных связей, приводящее к сильному красному сдвигу спектра флуоресценции Тгр в водном растворе. Как следует из наших экспериментальных данных, это предположение справедливо только в определенном температурном диапазоне ($-50^{\circ}C$ ÷ 10° C), в котором регистрируются широкие полосы с длинным крылом как в спектре поглощения, так и в спектре флуоресценции, а также происходит сдвиг спектра флуоресценции быстрой компоненты на ~20 нм. В остальной области температур перенос электрона может происходить на амидные группы основного скелета молекулы Trp, либо на обладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Кроме того, мы предположили, что состояние с переносом заряда CTS может переходить обратно в возбужденное состояние триптофана, а также в основное состояние за счет излучательного и безызлучательного процессов. В этом случае моноэкспоненциальная кинетика затухания флуоресценции Trp приобретает двухкомпонентный характер. Процессы, происходящие при возбуждении Trp в водном окружении, можно представить в виде модельной схемы, показанной на рис. 6. Эта схема использовалась для проведения целевого анализа («Target analysis») кинетики затухания флуоресценции Trp и определения параметров, характеризующих динамику процессов при возбуждении Тгр в водной среде. При разложении кинетики согласно модели рис. 6 определенные параметры приходилось задавать априори из известных спектроскопических данных: например, константа скорости затухания флуоресценции Trp полагалась равной обратному времени затухания флуоресценции формы 4, составлявшей $(14.5 \text{ нс})^{-1}$, константа скорости излучательного перехода CTS в основное состояние молекулы триптофана оценивалась по ширине полосы минорной формы (S2) спектра флуоресценции Trp (рис. 2) и принималась равной $(8 \text{ нc})^{-1}$. Остальные параметры кинетической схемы определялись в процессе аппроксимации кинетики затухания флуоресценции. При этом существование состояния с делокализованным электроном в системе водородных связей предполагалось только в области температур $-50^{\circ}C \div 10^{\circ}C$. По нашему мнению, в области температур -170°C÷-50°C тушение флуоресцении Trp и немоноэкспоненциальный характер кинетики затухания флуоресценции обусловлены переносом электрона с возбужденного индольного кольца молекулы Trp на амидные группы основного скелета либо на обладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Этот процесс сопровождается образованием состояния с переносом за-

ряда и обратным переходом в возбужденное состояние индольного кольца, а также возможной релаксацией состояния с переносом заряда в основное состояние. Описываемая схема кинетических процессов (рис. 6) применима также и для описания переходов между ротамерными формами Trp, приводящих к антибатной температурной зависимости времени жизни компонент в кинетике флуоресценции [11]. В математическом плане использованная нами в работе [11] модель перехода одной ротамерной формы в другую сходна с моделью, описывающей переходы каждой ротамерной формы в состояние с переносом заряда с учетом обратного перехода. Для ответа на вопрос, какая модель физически более адекватно описывает переходы в возбужденном состоянии молекулы Trp, необходимо провести измерение кинетик изменения оптической плотности в области поглощения триптофана. Это требует, однако, наличия соответствующей экспериментальной техники.

Модель переходов молекулы Trp с образованием состояния с переносом заряда CTS (рис. 6) описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{dn_{\rm l}}{dt} = -(k_{\rm Fl} + k_{\rm R1} + k_{\rm l2})n_{\rm l} + k_{\rm 21}n_{\rm 2},
\frac{dn_{\rm 2}}{dt} = k_{\rm l2}n_{\rm l} - (k_{\rm F2} + k_{\rm R2} + k_{\rm 21})n_{\rm 2},$$
(2)

где n_1 обозначает населенность возбужденных молекул Trp*, n_2 – населенность состояния с переносом заряда CTS, k_{F1} – скорость затухания флуоресценции Trp* без учета скорости перехода в состояние n_2 , k_{R1} - скорость безызлучательного перехода Trp* в основное состояние, k_{12} – скорость перехода возбужденного состояния Trp* в состояние с переносом заряда n_2 , k_{21} – скорость обратного перехода CTS \rightarrow Trp*, k_{F2} , k_{R2} – скорости излучательного и безызлучательного переходов CTS на основной уровень, ΔG – разность уровней энтальпии возбужденного состояния триптофана Trp* и CTS.

Аппроксимацию кинетики затухания флуоресценции проводили минимизацией функционала среднеквадратичной ошибки экспериментальной кинетики и теоретической кривой при варьировании параметров кинетической схемы рис. 6. Теоретические кривые сворачивались с аппаратной функцией системы регистрации. Данная аппроксимация позволяет непосредственно определять скорости прямого перехода k_{12} и обратной рекомбинации k_{21} .

Решение системы дифференциальных уравнений, описывающих переходы молекулы Trp (рис. 6), дает выражения для населенностей n_1 и n_2 , а также

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021



Рис. 6. Модельная схема кинетических переходов в триптофане: n₁, n₂ – населенности возбужденного состояния молекул Тгр и состояния с переносом заряда, Trp^+R^- – состояние с переносом заряда (CTS), где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Trp, так и амидные группы и пептидные связи с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Trp, $k_{\rm Fl}$ – константа скорости затухания флуоресценции возбужденного состояния триптофана, k_{12} – скорость перехода Trp* в состояние CTS; $k_{\rm R1}$ – скорость безызлучательного перехода Trp* в основное состояние, $k_{21}-{\rm скорость}$ обратного перехода CTS
 \rightarrow Trp*, $k_{\rm F2}-$ скорость излучательного перехода CTS на основной уровень, $k_{\rm R2}$ – скорость безызлучательного перехода CTS на основной уровень Trp, ΔG – разность уровней энтальпии состояний Trp* и CTS, $E_{\rm r}$ – энергия реорганизации среды, связанная с образованием CTS. Горизонтальными штрихованными линиями показаны некоторые колебательные уровни основного и возбужденных состояний Trp.

длительности τ_1 и τ_2 двух компонент разложения кинетики флуоресценции в виде формул:

$$n_{1}(t) = a_{1}e^{-k_{1}t} + a_{2}e^{-k_{2}t},$$

$$n_{2}(t) = b_{1}e^{-k_{1}t} + b_{2}e^{-k_{2}t},$$

$$\frac{1}{\tau_{1,2}} = k_{1,2} = \frac{1}{2}\left(g_{1} + g_{2} \pm \sqrt{\left(g_{1} - g_{2}\right)^{2} + 4k_{12}k_{21}}\right),$$
(3)

где $g_1 = k_{\text{F1}} + k_{\text{R1}} + k_{12}, g_2 = k_{21} + k_{\text{F2}} + k_{\text{R2}}.$

Для a_1 , a_2 , b_1 , b_2 выражения имеют следующий вид:

$$a_{1} = \frac{g_{1} - k_{2}}{k_{1} - k_{2}}; a_{2} = \frac{k_{1} - g_{1}}{k_{1} - k_{2}};$$
$$b_{1} = \frac{-k_{12}}{k_{1} - k_{2}}; b_{2} = \frac{k_{12}}{k_{1} - k_{2}}.$$



Рис. 7. Спектральные зависимости величины константы скорости перехода возбужденного состояния триптофана в состояние с переносом заряда. На данном рисунке не приведен спектр при -50° С, так как он практически повторяет спектр при -110° С.

Из данных выражений следует, что $a_1 + a_2 = 1$; $b_2 = -b_1$;

Обозначения параметров в уравнении (1) указаны в подписи к рис. 6.

При фитировании кинетик флуоресценции согласно модели рис. 6 значение для $n_2(t)$ необходимо умножать на квантовый выход флуоресцен-

ции этого состояния $\varphi_{F2} = \frac{k_{F2}}{k_{F2} + k_{R2}}$.

Согласно полученным выражениям для k_1 и k_2 , если в некоторой области температур значение k_1 увеличивается за счет роста подкоренного члена (3), то значение k_2 в этой же области будет уменьшаться. В результате будет наблюдаться антибатный характер температурных зависимостей времени жизни короткой и длинной компонент кинетики флуоресценции Trp в водном растворе в соответствующей температурной области.

Таким образом, используя теоретическую модель (3), а также схему, представленную на рис. 6, мы смогли описать экспериментальные температурные зависимости длительностей компонент τ_1 и τ_2 . Кроме того, решение системы уравнений (2) позволило определить значения коэффициентов a_1, a_2, b_1, b_2 и построить зависимость величины константы скорости перехода триптофана k_{12} в состояние с переносом заряда от длины волны при разных температурах, показанную на рис. 7. Видно, что в области температур от -50° C до - 10° C константа скорости перехода Тгр из возбужденного состояния в состояние с переносом заряда k_{12} имеет большее значение в сравнении с другими температурами (10° C, -110° C), при этом ее



Рис. 8. Температурные зависимости скоростей перехода триптофана из возбужденного состояния в состояние с переносом заряда k_{12} и обратного перехода k_{21} .

зависимость от длины волны уширена, что приводит к дополнительному увеличению этой скорости и соответствующему уменьшению времени жизни компоненты кинетики флуоресценции с временем затухания τ_1 в данном температурном диапазоне. При этом, согласно уравнению (3), время жизни компоненты кинетики флуоресценции с временем жизни τ_2 увеличивается. Это приводит к антибатному характеру температурных зависимостей времени жизни короткой и длинной компонент кинетики флуоресценции Trp в водном растворе в области $-50^{\circ}C \div -10^{\circ}C$. Таким образом, выражение (3) позволяет естественным образом описать антибатный характер времен жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 при увеличении константы скорости перехода k_{12} из возбужденного состояния Тгр в состояние с переносом заряда, поскольку изменение величин констант скоростей k_1 и k_2 происходит при этом в противоположном направлении (при увеличении значения k_1 величина k_2 уменьшается). Обращает на себя внимание существование длинноволнового вклада в константу скорости перехода при температурах 10°С и −10°С, что коррелирует с существованием при данных температурах широкой полосы с длинноволным хвостом как в спектре поглощения, так и в спектре флуоресценции Тгр (рис. 1 и 2). В остальной температурной области приведенная модель позволяет объяснить тушение флуоресценции Trp и двухкомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции даже в предположении, что времена жизни флуоресценции ротамерных форм в отсутствие «сольватирующей» сетки водородных связей примерно одинаковы. Так, на рис. 8 показана зависимость констант скоростей прямого перехода из возбуж-

денного состояния Trp* в состояние с переносом заряда CTS k_{12} и обратного перехода k_{21} от температуры. Видно, что в температурной области -60°С÷10°С данные константы имеют большие значения по сравнению с таковыми при других температурах. Изменения констант скоростей k_{21} и k_{12} от температуры качественно похожи, за исключением того, что k₂₁ имеет меньшие значения во всем диапазоне температур. Это связано с аррениусовской зависимостью константы скорости обратного перехода от скорости прямого перехода, энергетического зазора ΔE и температуры T $(k_{21} = k_{12} \exp(-\Delta E/kT))$. В результате, согласно уравнениям (3), в данной области температур и наблюдается антибатное поведение времени затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 .

Отметим, что значения τ_1 и τ_2 , рассчитанные на основе модели, представленной на рис. 6, близки к данным, полученным в результате глобального анализа кинетик, а их спектры близки к спектральному распределению амплитуд глобального анализа (рис. 3а,б). Величина χ^2 при аппроксимации согласно схеме на рис. 6 не превышала 1.5.

Влияние водородных связей в окружении возбужденных хромофоров на их флуоресцентные свойства изучалось в ряде работ (см., например, монографию [28]). В частности, в работе [26] показано, что сильное влияние на вероятность перехода молекулы Trp в состояние с переносом заряда в белке оказывает расположение диполей окружающей воды относительно индольного кольца. В работе [29] выдвинуто предположение, что при возбуждении молекул Тгр формируются эксиплексы молекул растворителя с индольным кольцом. Последние образуются и стабилизируются в результате диполь-дипольных взаимодействий молекул растворителя с атомами индольного кольца в возбужденном состоянии. В работе [12] показано, что возбужденное состояние Тгр в воде переходит в состояние с переносом заряда в результате взаимодействия индольного кольца с молекулами воды. Этот переход сопровождается образованием цвиттерионного комплекса и напряжением определенных водородных связей. При этом происходит частичное упорядочивание водородных связей, в результате чего в системе водородных связей возникает квазизона проводимости для электрона индольного кольца, в которой электрон делокализуется. Наши данные указывают, что состояние с переносом заряда может переходить в возбужденное состояние молекулы Тгр, а также релаксировать в основное состояние. При этом образование квазизоны проводимости в системе водородных связей и делокализация электрона по молекулам воды происходят в определенной области температур,

в которой взаимодействие диполей водородных связей достаточно велико, чтобы вызвать упорядочивание сетки водородных связей. При этом температура должна быть ниже некоторой критической, превышение которой может привести к разупорядочиванию этой сетки и исчезновению проводимости. В нашем случае — это температурная область, индикатором которой является появление широких полос в спектре поглощения и спектре флуоресценции триптофана. Другим признаком возникновения упорядоченной системы водородных связей и образования в ней квазизоны проводимости служит антибатность температурной зависимости короткого и длинного времени жизни флуоресценции триптофана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В использованном нами подходе к изучению флуоресцентных свойств триптофана в водном растворе возникновение тушения флуоресценции и переход от моноэкспоненциальной кинетики флуоресценции триптофана к многокомпонентному свечению объясняется переносом электрона от индольного кольца на амидные группы или на водородные связи окружающей молекулу Тгр воды. Данный процесс сопровождается образованием состояния с переносом заряда. При этом возможен обратный переход из данного состояния в возбужденное состояние Trp, либо излучательный или безызлучательный переходы на основной уровень. В температурной области -50°С÷-10°С главную роль в образовании состояния с переносом заряда может играть сетка окружающих молекулы Trp водородных связей в результате их частичного упорядочивания и образования квазизоны проводимости. Как следствие, происходит перенос электрона от возбужденного индольного кольца в систему водородных связей и его делокализация. В результате изменяются как спектр, так кинетика флуоресценции Trp в водном растворе. Отметим, что возможен и прямой переход молекулы триптофана в состояние с делокализованным электроном, что приводит к возникновению широкого длинноволнового крыла в спектре поглощения (рис. 1).

Таким образом, температурные зависимости длительности флуоресценции Trp в растворе могут быть объяснены как переходами между различными формами ротамеров Trp [11], так и переходами между возбужденным состоянием триптофана и состоянием с переносом заряда, образующимся при переносе электрона с индольного кольца на обладающие электрон-акцепторными свойствами амидные группы, пептидные связи или водородные связи ближайшего окружения молекул Trp. Отличие этих моделей состоит в следующем: в случае ротамерной модели три компоненты кинетики затухания флуоресценции

объясняются присутствием трех различных центров свечения, при этом при изменении температуры часть молекул Trp, находящихся в возбужденном состоянии, может переходить из коротковолновой короткоживущей формы в длинноволновую форму с большим временем жизни. Новая модель объясняет физический механизм возникновения многокомпонентного сигнала флуоресценции при возбуждении молекул Trp, находящихся в идентичных условиях. При этом дезактивация молекул Trp* происходит либо непосредственно в основное состояние, либо через промежуточное состояние СТЅ. Выводы о предпочтительном характере той или другой модели можно будет сделать в результате дальнейших исследований. Может оказаться, что для некоторых случаев, например для триптофанов в составе белков (может быть гидрофобных) в реакционных центрах или в других системах, может быть справедливым существование ротамеров, приводящее к двухкомпонентному характеру кинетики флуоресценции триптофана. В других случаях, в частности для растворов триптофана в водной среде или в гидрофильных белках, более подходящей окажется модель, связанная с переносом заряда и образованием состояния с переносом электрона, в том числе с образованием системы упорядоченных водородных связей (цвиттерионного комплекса [12]) в окружении возбужденной молекулы триптофана.

Совершенно ясно, однако, что результаты данного исследования необходимо учитывать при анализе температурных зависимостей времени жизни флуоресценции Trp в составе белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Е.П. Лукашева за помощь в измерении спектров поглощения и флуоресценции триптофана в водном растворе.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- J. L. Dashnau, B. Zelent, and J. M. Vanderkooi, Biophys. Chem. **114**, 71 (2005).
- 2. D. E. Schlamadinger, J. E. Gable, and J. E. Kim, J. Phys. Chem. B **113**, 14769 (2009).

- 3. Y. Chen and M. D. Barkley, Biochemistry 3, 9976 (1998).
- 4. G. Mei, A. Di Venere, A. F. Agrò, et al., J. Fluoresc. 13, 467 (2003).
- 5. Э. А. Бурштейн, Молекуляр. биология 17, 455 (1983).
- 6. Y. K. Reshetnyak and E. A. Burstein, Biophys. J. 81, 1710 (2001).
- 7. A. G. Szabo and D. M. Rayner, J. Am. Chem. Soc. **102**, 554 (1980).
- 8. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3nd ed. (Springer, N. Y., 2006).
- P. D. Adams, Y. Chen, K. Ma, et al., J. Am. Chem. Soc. 124, 9278 (2002).
- J. A. Ross and D. M. Jameson, Photochem. Photobiol. Sci. 7, 1301(2008).
- 11. В. В. Горохов, П. П. Нокс, Б. Н. Корватовский и др., Биохимия **82**, 1615 (2017).
- 12. H. Liu, H. Zhang, and B. Jin, Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy **106**, 54 (2013).
- E. Gudgin, R. Lopez-Deigado, and W. R. Ware, Phys. Chem. 87, 1559 (1983).
- J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. McDonald, and G. R. Fleming, J. Am. Chem. Soc. 105, 3824 (1983).]
- 15. M. Hellings, M. De Maeyer, and S. Verheyden, Biophys. J. **85**, 1894 (2003).
- T. Liu, P. R. Callis, B. H. Hesp, and M. de Groot, J. Am. Chem. Soc. 127, 4104 (2005).
- C.-P. Pan, P. L. Muino, M. D. Barkley, and P. R. Callis, J. Phys. Chem. B 115, 3245 (2011).
- A. Kadyan, S. Juneja, and S. J. Pandey, Phys. Chem. B 123, 7578 (2019).
- 19. J. B. A. Ross, H. R. Wyssbrod, R. A. Porter, and G. P. Schwartz, Biochemistry **31**, 1585 (1992).
- 20. T. E. S. Dahms, K. J. Willis, and A. G. Szabo, J. Am. Chem. Soc. **117**, 2321(1995).
- I. Compagnon, F. C. Hagemeister, R. Antoine, et al., J. Am. Chem. Soc. 123, 8440 (2001).
- 22. *Physical properties of glycerine and its solutions* (Glycerine Producers' Association, N. Y., 1963).
- 23. R. N. Havemeyer, J. Pharmaceutic. Sci. 55, 851(1966).
- 24. J. J. Towey, A. K. Soper, and L. Dougan, J. Phys. Chem. B **120**, 4439 (2016).
- 25. *Физическая химия*, под ред. К. С. Краснова, 3-е изд. (Высш. школа, М., 2001), т. 1.
- M. R. Hilairea, I. A. Ahmed, C.-W. Lina, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114, 6005 (2017).
- 27. P. R. Callis, J. Mol. Struct. 1077, 22 (2014).
- 28. K. L. Han and G. J. Zhao, *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State* (John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2011).
- 29. M. V. Hershberger and R. Lumry, Photochem. Photobiol. 23, 391(1976).

The Study of the Temperature Dependence of Tryptophane Fluorescence Lifetime in the Range of -170°C to +20°C in Various Solvents

V.Z. Paschenko, V.V. Gorokhov, B.N. Korvatovsky, P.P. Knox, N.P. Grishanova, and S.N. Goryachev

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

The temperature dependences of the fluorescence lifetime of tryptophan molecules in an aqueous solution, aqueous solutions of glycerol (50 and 75%, v/v) and dimethyl sulfoxide (50 and 75%, v/v) and 1 M aqueous trehalose solution were studied in the range of $-170^{\circ}C - +20^{\circ}C$. In this temperature range, the fluorescence kinetics in all samples is best approximated by three exponential terms with characteristic times $\tau_1 \sim 3$ ns, $\tau_2 \sim 4$ ns and $\tau_3 \sim 15$ ns at room temperature. Temperature dependences of fluorescence lifetimes for the fastest and medium components exhibited antisymbatic (antiphase) behavior in the temperature range of $-60^{\circ}C$ to $10^{\circ}C$ is observed. To explain the behavior of these temperature dependences, a new model of the nature of multicomponent fluorescence kinetics was suggested. This model takes into account the transition of a tryptophan molecule from the excited state to the state with separated charges—charge transfer state, the transition back to the excited state, radiative and non-radiative transitions of the charge transfer state to the ground state. The obtained results can be used for explanation the experimental temperature dependences of tryptophan fluorescence lifetime in proteins.

Keywords: tryptophan, fluorescence, fluorescence decay kinetics, temperature dependence

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УЛК 519.876.5

ПОИСК АГРООСТРОВКОВ В ГЕНОМЕ НУТА

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

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого.

195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

**Кубанская опытная станция Федерального исследовательского центра «Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова», 352183, Краснодарский край, п. Ботаника, Центральная ул., 2

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

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

****Федеральный исследовательский центр «Всероссийский научно-исследовательский институт

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

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

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru Поступила в редакцию 07.12.2020 г. После доработки 07.12.2020 г. Принята к публикации 25.12.2020 г.

Концентрация генов, контролирующих признаки доместикации в так называемых «островках одомашнивания, или агроостровках» затрудняет селекцию, поэтому информация о том, в каком месте генома локализованы такие островки и с какими признаками доместикации они ассоциированы, очень важна для дальнейших исследований, направленных на улучшение современных сортов. Для получения информации о таких районах в геномах староместных сортов нута использована программа BayPass, которая оценивает ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов со специфичными для популяций ковариатами, в качестве которых выбраны комплексы признаков синдрома доместикации одинакового целевого назначения. Районы генома, с которыми эти ковариаты ассоциированы, локализуются на первой, пятой, шестой, седьмой и восьмой хромосомах. Эти области являются потенциальными агроостровками, что косвенно подтверждается ранее полученными данными.

Ключевые слова: нут (Cicer arietinum L.), генотипирование путем секвенирования, однонуклеотидные полиморфизмы, геномный анализ ассоциаций, адаптация.

DOI: 10.31857/S0006302921030066

Окультуривание растений началось примерно 10000 лет назад и впоследствии независимо повторялось во многих местах по всему миру. Этот процесс включал выращивание и отбор растений с более крупными съедобными частями и более легким сбором урожая - признаками, которые позволяли производить излишки пищи. Такой комплекс признаков, который принято называть синдромом одомашнивания, часто перекрывается у культур одинакового целевого назначения. Так, например, у зернобобовых синдром одомашнивания включает в себя более крупные семена, уменьшение их растрескиваемости и периода покоя, а также изменение фенологии, т.е. количе-

Сокращения: ОНП – однонуклеотидные полиморфизмы, SMS - оценка синтетической морфологии (Synthetic Morphology Score), BF – фактор Байеса (Bayes Factor).

ственные признаки, контролируемые большим числом генов.

Таким образом, уже на начальных этапах селекции, которые, по-видимому, были непредумышленными, сильный отбор строго определенных фенотипов должен был приводить к эффекту бутылочного горлышка, т.е. к уменьшению генетического разнообразия в окультуриваемой популяции за счет выбора только части аллелей генов из генофонда диких видов [1]. Согласно современным представлениям, окультуривание растений происходило постепенно и обмен генами между доместицируемыми и дикими формами все же был возможен в течение довольно длительного времени [2], что приводило к гомогенизации и препятствовало дивергенции окультуриваемых и диких форм, в то время как селекция усиливала такую дивергенцию [3, 4].

Наиболее вероятным результатом этих двух разнонаправленных процессов может быть концентрация генов, контролирующих признаки доместикации на так называемых «островках одомашнивания, или агроостровках», подобных «островкам видообразования» комаров [5]. Эта гипотеза неявно исходит из соображения, что гены синдрома одомашнивания с большей вероятностью сохранятся в популяции, несмотря на обмен генами и рекомбинацию, если они находятся в неравновесном сцеплении и в одном или нескольких местах в геноме. Сильная совместная локализация QTL, влияющих на несколько признаков в нескольких регионах генома, обнаруженная у многих культурных растений, убедительно подтверждает эту точку зрения [6].

Нут – зернобобовое растение, используемое в качестве источника белка особенно широко в странах Азии – не является исключением из этого правила. Как показали наши исследования, некоторые гаплоблоки генома этого растения обогащены однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП), ассоциированными с признаками синдрома одомашнивания [7]. Хотя концентрация генов окультуривания в агроостровках является результатом селекции, она часто препятствует дальнейшему улучшению растений, особенно в случае, когда признаки отрицательно скоррелированы. Поэтому информация о том, в каком месте генома локализованы такие островки и с каким комплексом признаков доместикации они ассоциированы, очень важна для дальнейших исследований, направленных на улучшение современных сортов.

Получить информацию о таких районах можно с помощью программы BayPass [8], которая оценивает ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов со специфичными для популяций ковариатами, в качестве которых выбраны комплексы признаков синдрома доместикации одинакового целевого назначения. В этой работе мы применили BayPass к анализу шести популяций нута.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетический материал и геномные данные. Генетический материал был получен из староместных образцов нута коллекции ВИР, собранных из основных исторических центров выращивания нута и его вторичной диверсификации: Эфиопии, Ливана, Марокко, Турции, Индии и в более широких регионах Центральной Азии и Средиземноморья. 407 образцов, использованных при анализе, были разделены на шесть отдельных групп, отражающих географическое положение мест сбора образцов: Эфиопия («ETHI»), Индия («IND»), Ливан («LEB»), Марокко («MOR»), Турция («TUR») и Центральная Азия («C ASIA»).

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

Описание генотипирования путем секвенирования и отбора набора ОНП, использованных в данном исследовании, приведено в работе [7]. Данные секвенирования доступны в базе данных Национального центра биотехнологий, код Віо-Project PRJNA388691. Поиск ОНП был произведен с помощью программы Genome Analysis Tool Kit (GATK) [9], дальнейшая фильтрация ОНП была выполнена программой VCFtools [10]. Для анализа ассоциаций между фенотипическими признаками и ОНП были отобраны 2579 ОНП, идентифицированных в 407 староместных образцах нута.

Анализ ассоциаций между фенотипическими признаками и однонуклеотидными полиморфизмами. Для анализа ассоциаций между фенотипическими признаками и ОНП был применен пакет BayPass [8]. Данный пакет может идентифицировать ОНП, связанные с фенотипическими признаками на уровне популяций. Для анализа были использованы 16 количественных фенотипических признаков, оценка которых была произведена на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. (табл. 1). Описание фенотипирования, проведенного в 2016 г., приведено в работе [7]. Для каждого фенотипического признака вычисляли средние значения отдельно для каждой из шести географически различных групп. По рекомендации авторов пакета BayPass [8] предварительно был проведен анализ корреляций между фенотипическими признаками. Коэффициенты корреляции Спирмена были рассчитаны с использованием функции «rcorr» из библиотеки «Hmisc» в R [11]. Согласно результатам анализа корреляций, одиннадцать признаков были отнесены к одной из четырех групп сильно коррелированных переменных. Средние значения каждой из этих четырех групп заменялись оценкой синтетической морфологии (Synthetic Morphology Score, SMS), которая является первой главной компонентой данных (табл. 2). Остальные пять фенотипических переменных не были сильно коррелированы с любыми другими переменными, поэтому их средние значения использовали в анализе без преобразований. Таким образом, пакетом BayPass [8] был проведен анализ ассоциаций между ОНП и девятью ковариатами фенотипических признаков. Анализ проводили в предположении о независимости переменных. Каждый ОНП оценивали с помощью алгоритма выборки по значимости [8], который вычисляет значение фактора Байеса (Bayes Factor, BF), эмпирическое значение P-value и соответствующие регрессионные коэффициенты. Значимость ассоциации определяли по эмпирическому значению P-value (> 4), а силу ассоциации ОНП с переменными определяли по шкале оценки фактора в соответствии с правилом Джеффриса [12]: «очень убедительное доказательство» при 15 < BF < 20 и «решающее доказа-

Елиница измерения
Единици измерении
сутки
СМ
сутки
сутки
сутки
сутки
Г
ММ
ММ
ШТ
ШТ
Г
Г
СМ
Γ
Г

Таблица 1. Фенотипические признаки, измеренные в 2016 г. на Кубанской опытной станции, отобранные для анализа ассоциаций

тельство» при BF > 20. Далее с помощью базы данных Legume information system [13] была проведена аннотация значимо асоциированных полиморфизмов. Манхэттенские графики были выполнены в R с использованием библиотеки CMplot [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа ассоциаций между ОНП и фенотипическими ковариатами с учетом популяционной структуры были использованы 16 количественных фенотипических признаков, оценка которых была произведена на Кубанской опытной станции ВИР в 2016 г. (табл. 1). Для оценки ассоциаций на уровне популяций 407 образцов, использованных в анализе, были разделены на шесть отдельных групп, отражающих географическое положение мест сбора образцов: Эфиопия («ETHI»), Индия («IND»), Ливан («LEB»), Марокко («MOR»), Турция («TUR») и Центральная Азия («C_ASIA») (рис. 1а).

Для определения групп сильно коррелированных фенотипических признаков для 16 фенотипических признаков был проведен анализ корреляций. Результаты анализа приведены на рис. 16.

Таблина 2.	Опенки	синтетической	морс	b ологии	фенотипических	признаков
	0 4011111	•••••••••••••••••	mope	2011011111	φ•ποππ	mpmomanob

Оценка синтетической морфологии (SMS)	Фенотипические признаки и коэффициенты корреляции между ними
SMS1	Количество дней цветения — количество дней от конца цветения до начала созревания (<i>r</i> = -0.76*)
SMS2	Масса 1000 семян – ширина боба (<i>r</i> = 0.74*); Масса 1000 семян – длина боба (<i>r</i> = 0.76*); Ширина боба – длина боба (<i>r</i> = 0.86*)
SMS3	 Число семян с одного растения – число бобов с одного растения (r = 0.85*); Число семян с одного растения – вес семян с одного растения (r = 0.74*); Число семян с одного растения – вес бобов (r = 0.60*); Число бобов с одного растения – вес семян с одного растения (r = 0.82*); Число бобов с одного растения – вес бобов (r = 0.77*); Вес семян с одного растения – вес бобов (r = 0.88*)
SMS4	Вес растения без бобов — вес всего растения (с бобами) ($r = 0.92^*$)

Примечание. * - p < 0.0001.



Рис. 1. (а) — Географическое происхождение образцов и их отнесение к одной из шести географических групп; (б) — результат анализа корреляций фенотипических признаков.

Одиннадцать признаков были отнесены к одной из четырех групп сильно коррелированных переменных. В соответствии с рекомендациями авторов пакета BayPass для каждой из шести географически различных групп были построены девять ковариат: четыре оценок синтетической морфологии (SMS) (табл. 1 и 2) и пять усредненных некоррелированных ковариат. Оценка синтетической морфологии SMS1 получена на основе двух последовательных вегетационных периодов, связанных сильной отрицательной корреляционной связью: количества дней цветения и количества дней от конца цветения до начала созревания (табл. 2). Оценки синтетической морфологии SMS2, SMS3 и SMS4 соответствуют фенотипическим признакам, описы-

Хромосома

Рис. 2. Анализ ассоциаций с помощью BayPass. ОНП со значением фактора Байеса (BF) > 15 обозначены треугольниками. Когда одна позиция ассоциируется с рядом фенотипических ковариат с разным BF, представлены все ассоциации.

вающим весовые характеристики растений, бобов и семян, размеры бобов и количество бобов и семян с одного растения (табл. 2).

Таким образом, с помощью программного пакета BayPass [8] был проведен анализ ассоциаций между ОНП и девятью ковариатами фенотипических признаков. Для оценки значимости ассоциации были использованы следующие критерии: эмпирическое байесовское *P*-value > 4 и (согласно правилу Джеффриса [12]) фактор Байеса > 15.

Анализ ассоциаций с помощью BayPass [8] выявил 14 ОНП, достоверно связанных с фенотипическими ковариатами (рис. 2, табл. 3): семь ОНП на первой хромосоме, два – на второй и по одному ОНП на четвертой, пятой, шестой, седьмой и восьмой хромосомах. Ранее нами в работе [7] был проведен поиск блоков неравновесного сцепления (гаплоблоков), включающих в себя 2579 ОНП, расположенных на хромосомах, с помощью программы Haploview [15]. Каждый гаплоблок рассматривался как набор ОНП, расположенных в данном гаплоблоке, и использовался для аннотации значимо асоциированных маркеров. Также была проведена аннотация ОНП с помощью базы данных Legume information system [13]. В результате два идентифицированных в анализе ОНП попадают в последовательность известных генов и три ОНП входят в регионы неравновесного сцепления (табл. 3). Два ОНП (на первой и пятой хромосомах) значимо ассоциированы с двумя ковариатами – SMS3 и SMS4. ОНП на восьмой хромосоме (8: 10314452) значимо ассоциирован сразу с четырьмя фенотипическими ковариатами - SMS1, SMS3, SMS4 и ковариатом высоты растений (табл. 3). Данный ОНП был идентифицирован нами и в предыдущих GWAS-

исследованиях (исследованиях геномного анализа ассоциаций): ОНП значимо ассоциирован с весовыми характеристиками растений при фенотипировании на Кубани в 2016 г. [7], с периодом цветения на Кубани в 2017 г. [16]. Кроме того, в работе [17] при поиске программой BayPass [8] ОНП, значимо ассоциированных с биоклиматическими ковариатами в местах сбора образцов, две биоклиматические переменные, включающие температурные характеристики, были совместно ассоциированы с ОНП 8: 10314452. Также данный ОНП находится на расстоянии ~25 кб от ОНП, ассоциированным с весом растения в работе [18].

ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация генов, контролирующих признаки доместикации в так называемых «островках одомашнивания, или агроостровках» затрудняет селекцию, поэтому информация о том, в каком месте генома локализованы такие островки и с какими признаками доместикации они ассоциированы, очень важна для дальнейших исследований, направленных на улучшение современных сортов. Получить информацию о таких районах можно с помощью программы BavPass [2], которая оценивает ассоциацию ОНП со специфичными для популяций ковариатами, в качестве которых могут быть выбраны комплексы признаков синдрома доместикации одинакового целевого назначения. В этой работе мы применили BayPass к анализу шести популяций староместных сотров нута из коллекции ВИР. Фенотипические признаки синдрома одомашнивания были сгруппированы в пять групп разного целевого назначения описывающие фенологию, вес семян, число семян

> БИОФИЗИКА том 66 Nº 3 2021



1	1			
Позиция	Хромосома	Признак Ген		Блок неравновесного сцепления (гаплоблок)
25727022		SMS3	Co. 19591	_
23737022		SMS4	Ca_18381	_
29930356		Средняя высота прикрепления нижнего боба	_	_
33512355	1	Среднее время от начала всходов до начала цветения	_	_
34754596		SMS4	_	Ca1_Block_36
35261112		SMS4	_	Ca1_Block_37
40608784		SMS4	_	_
44150305		Средняя высота прикрепления нижнего боба	_	_
17432752	2	Средняя высота прикрепления нижнего боба	Ca_16006	-
19604640	2	Средняя высота прикрепления нижнего боба	_	_
38580554	4	Среднее время от начала всходов до начала цветения	_	Ca4_Block_61
12253018	5	SMS3	_	-
12233010	5	SMS4	_	_
47657340	6	SMS4	—	_
19377547	7	SMS4	_	-
		SMS1	_	-
10314452	8	SMS3		
10517752	0	SMS4	_	-
		Средняя высота растений	_	-

Таблица 3. ОНП, выявленные по результатам анализа ассоциаций между ОНП и девятью ковариатами фенотипических признаков пакетом BayPass [4]

и характеристики растения. Районы генома, с которыми эти ковариаты ассоциированы, локализуются на первой, пятой, шестой, седьмой и восьмой хромосомах. Эти области являются потенциальными агроостровками, что косвенно подтверждается перекрыванием некоторых из идентифицированных районов с гаплоблоками, обогащенными ОНП. Интересно, что некоторые из этих районов совпадают также с районами, ассоциированными с одиночными признаками при проведении полногеномного поиска ассоциаций в 2016 и 2017 гг. [7, 16], что является дополнительным указанием на правильность их классификации как агроостровков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-00007).

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- B. L. Gross and K. M. Olsen, Trends Plant Sci. 15, 529 (2010).
- 2. T. Pyhäjärvi, M. B. Hufford, S. Mezmouk, and J. Ross-Ibarra, Genome Biol. Evol. 5, 1594 (2013).
- 3. L. A. F. Frantz, et al., Nat. Genet. 47, 1141 (2015).
- S. Abbo and A. Gopher, Trends Plant Sci. 22 (6), 491 (2017). DOI: 10.1016/j.tplants.2017.03.010
- T. L. Turner, M. W. Hahn, and S. V. Nuzhdin, PLoS Biol. 3, 1572 (2005).

- R. Bohar, A. Chitkineni, and R. K. Varshney, Biotechniques 69 (3), 158 (2020). DOI: 10.2144/btn-2020-0066
- 7. A. Sokolkova, et al., Int. J. Mol. Sci. 21, 3952 (2020).
- 8. M. Gautier, Genetics 201, 1555 (2015).
- A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, et al., Genome Res. 20, 1297 (2010).
- P. Danecek, A. Auton, G. Abecasis, et al., Bioinformatics 27, 2156 (2011).
- F. E. Harrell Jr, *Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 4.1-1* (2018). https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc (Accessed 20th October, 2020).
- 12. H. Jeffreys, *Theory of Probability*, 3rd ed. (Oxford Univ. Press, Oxford, 1961).
- S. Dash, J. D. Campbell, E. K. Cannon, et al., Nucl. Acids Res. 44, D1181 (2016).
- 14. *CMplot: Circle Manhattan Plot.* URL https://github.com/YinLiLin/RCMplot (Accessed 25th November, 2020).
- 15. J. C. Barrett, B. Fry, J. Maller, and M. J. Daly, Bioinformatics **21**, 263 (2005).
- 16. Соколкова А.Б. и др., Биофизика 66 (1), 40 (2021).
- 17. Соколкова А.Б. и др., Биофизика 65 (2), 276 (2020).
- 18. R. K. Varshney, M. Thudi, M. Roorkiwal, et al., Nat.
- Genet. 51, 857 (2019). DOI: 10.1038/s41588-019-0401-3

Search for Agroislands in Chickpea Genome

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

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

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

*** Faculty of Plant Pathology, University of California, Davis, CA 95616, USA

****University of Vermont, Burlington, Vermont, VT 05405, USA

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

******University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, USA

The concentration of genes that control domestication traits in the so-called "agroislands" complicates selection and, therefore, information about where such islands are located in the genome and with what traits of domestication they are associated is very important for further research aimed at improving modern varieties. To obtain information about such regions in the genomes of chickpea landraces, the BayPass program was used to assess the association of single nucleotide polymorphisms with population-specific covariates, for which complexes of the domestication syndrome traits of the same target purpose were selected. The regions of the genome with which these covariates are associated are located on chromosomes 1, 5, 6, 7, and 8. These regions are potential agroislands, which is indirectly confirmed by previously obtained data.

Keywords: chickpea (Cicer arietinum L.), genotyping by sequencing, single nucleotide polymorphisms, genomic analysis of associations, adaptation

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.3

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИИ Ocimum gratissimum МЕТОДАМИ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОСКОПИИ И ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2021 г. Р. Селвараджу*, П. Сакунтала**, К.А. Джалили***

*Отдел физики ФИиТ Университета Аннамалай, Чидамбарам, Тамил Наду, Индия E-mail: drselvarajufeatau@gmail.com **Кафедра физики Женского колледжа Раджа Бахадур Венкат Рама Редди, Нараянагуда, Хайдарабад, Штат Теннеси, Индия E-mail: sakuntalap71@yahoo.com ***Кафедра физики Низам-колледжа Османского Университета, Хайдарабад, Штат Теннеси, Индия E-mail: kaleemjaleeli@gmail.com Поступила в редакцию 27.04.2020 г. После доработки 23.06.2020 г. Принята к публикации 27.01.2021 г.

Проведено определение химических соединений, присутствующих в листьях, стеблях и семенах растения *Ocimum gratissimum*. С помощью газовой хроматографии-масс-спектроскопии показано присутствие эвгенола, флавона, кариофиллена, олеиновой кислоты, фитола, октадекановой кислоты, клогексен-1-метанол-4-[1-метилэтенил]ацетата, артемизинина, 3,5-бис[1,1-диметилэтил]-фенол и метил-альфа-ионона в качестве основных соединений. Уже было доказано, что эти соединения обладают антиоксидантным, антимикотическим, противовирусным, противопаразитарным, отпугивающим насекомых, противовоспалительным, анестезирующим, антиканцерогенным, антимикробным, противоопухолевым, обезболивающим, антибактериальным, фунгицидным, цитотоксическим и противогрибковым действием. С использованием метода ИК-Фурье-спектроскопии идентифицированы такие функциональные группы, как C=O, O–H, C–N и C=C.

Ключевые слова: биологическая активность, Ocimum gratissium, газовая хроматография-масс-спектроскопия, ИК-Фурье-спектроскопия, функциональные группы. DOI: 10.31857/S0006302921030078

Индийская традиция оказывает большое влияние на выбор лекарственных растений в качестве лекарственных средств. Биохимические соединения, присутствующие в растениях, эффективны, не дают побочных эффектов и имеют низкую стоимость [1]. Лекарственные растения используются в повседневной жизни для приготовления ценных лекарств в развивающихся странах, таких как Индия, Бразилия, Китай и т. д. Эти растения являются источниками фитохимических веществ, ценных элементов, витаминов и минералов, которые могут быть использованы для приготовления лекарств в фармацевтической промышленности [2–4].

Растение туласи (базилик эвгенольный (лат. *Ocimum gratissimum*)) считается объектом поклонения божеству и известно как «царица растений» и «материнское лекарство природы» из-за

его потенциальных лечебных свойств [5]. Туласи означает несравненный или бесподобный [6]. Это растение известно как тулси (Tulsi) на хинди, гуджарати и бенгали и Туласа (Tulasa) на маратхи. На тамильском – это туласи (Thulasi, Tulasi) на телугу и Триттаву (Trittavu) на малаялам. По-английски он называется базилик свяшенный. Растения вида *Осітит* принадлежат к семейству *Lamiaceae*. Этот вид имеет множество разновидностей и выращивается во многих частях света. В аюрведической медицине используются его различные фрагменты – листья, стебли и семена [7]. Каждая разновидность имеет свои лечебные особенности [8]. Базилик также относится к категориям домашних и диких растений [9]. Растение используется при лечении многих заболеваний, таких как опухоли, рак, диабет, инсульт и т. д. [10–12].

Газовая хроматография, объединенная с массспектрометрией (ГХ-МС), представляет собой чрезвычайно удачный синергетический союз, поскольку соединения, которые можно анализиро-

Сокращение: ГХ-МС – газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией.

вать с помощью газовой хроматографии (низкомолекулярные, средней или низкой полярности, в концентрации частица на миллион/миллиард частей), также совместимы с требованиями массспектрометрии. Газовая хроматография может разделять летучие и полулетучие соединения с большим разрешением, но не может их идентифицировать. Масс-спектрометрия может идентифицировать и определять точное количество соединений, присутствующих в образцах, по их структурной информации.

Инфракрасный спектрофотометр с преобразованием Фурье (ИК-Фурье-спектрометр) – наиболее мощный инструмент для определения типов химических связей (функциональных групп), присутствующих в соединениях. Длина волны поглощенного света является характеристикой химической связи, как видно из аннотированного спектра. Интерпретируя инфракрасный спектр поглощения, можно определить химические связи в молекуле [13]. В последние годы ИК-Фурьеспектроскопия становится общепринятым методом из-за простоты подготовки проб, быстроты определения, требует небольшого размера образцов и не требует использования растворителей, что является более экономичным. Многочисленные исследования показали, что ИК-Фурьеспектроскопия может использоваться для анализа биологически активных соединений. К ним относятся исследования в области пищевых технологий, фармацевтики и медицины [14]. Наша работа была направлена на идентификацию возможных фитохимических соединений вместе с их функциональными группами, присутствующими в спиртовом экстракте листьев, стеблей и семян растения Ocimum gratissimum, с использованием методов ГХ-МС и ИК-Фурье-спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор и подготовка растительного материала Листья, стебли и семена Ocimum gratissimum (всего три образца) были собраны в Центральном институте лекарственных и ароматических растений (Хайдарабад, штат Телангана, Индия). Все собранные образцы растений были без какой-либо инфекции (листья, стебли и семена) и проверялись в соответствии со стандартной процедурой. Собранный растительный материал сначала промывали простой водой, затем дистиллированной водой, после чего сушили на воздухе при комнатной температуре в течение одной недели. Растительный материал разрезали на небольшие кусочки, измельчали до мелкого порошка с использованием ступки с пестиком и хранили в контейнере. На рис. 1 представлено растение Ocimum gratissimum полностью, а также соответственно его листья, стебли и семена.

Подготовка проб для анализа методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии. 10 г порошка растительного материала замачивали в 100 мл этанола и оставляли на 72 ч. Экстракт фильтровали с использованием фильтровальной бумаги Whatman № 1, остаток удаляли. Фильтрат упаривали досуха при 80°С и хранили при 4°С до дальнейшего анализа [15].

Проведение анализа. Все образцы экстрактов растения *Ocimum gratissimum* были подвергнуты детальному ГХ-МС-анализу для определения химических компонентов с использованием ГХмасс-спектрометра GCMATE II (JEOL Ltd., Япония) Состав соединений оценивали по их соответствующим относительным площадям пиков.

Идентификация соединений. Интерпретацию масс-спектра ГХ-МС проводили с использованием базы данных Национального института стандартов и технологий (National Institute of Standards and Technology, США). Спектр неизвестного компонента сравнивали со спектром известных компонентов, хранящимся в библиотеке Национального института стандартов и технологий.

ИК-Фурье-спектроскопический анализ. Инфракрасный спектрофотометр с преобразованием Фурье является наиболее важным и мощным инструментом для определения функциональных групп, присутствующих в образце. Длина волны поглощенного света является характеристикой химической связи. Химические связи в молекуле можно определить, интерпретируя инфракрасный спектр поглощения.

Процедура. Инфракрасные спектры всех высушенных порошкообразных образцов растений регистрировали с помощью альфа-Фурье-спектрометра Bruker с приставкой для снятия спектров методом нарушенного полного внутреннего отражения есо ZnSe, атмосферной компенсацией, размером интерферограммы 15192 точки и размером Фурье-трансформа 16 К, работающего в среднем инфракрасном диапазоне (4000– 400 см⁻¹). Разрешение рабочего окна было задано в 512 × 256 пикселей [16, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ методом газовой хроматографии-массспектрометрии. Хроматограммы ГХ-МС этанольных экстрактов листьев, стеблей и семян растения Ocimum gratissimum показаны на рис. 2, а их интерпретация приведена в табл. 1–3.

ИК-Фурье-спектроскопический анализ. Спектры, полученные с помощью ИК-Фурье-спектроскопического анализа для сухих порошков из



Рис. 1. Внешний вид целого растения Ocimum gratissimum (a), его листьев (б), стеблей (в) и семян (г).

листьев, стеблей и семян растения Ocimum gratissimum, представлены на рис. 3, а их групповая идентификация дана в табл. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных, полученных методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии. Результаты исследования листьев, стеблей и семян Ocimum gratissimum методом ГХ-МС приведены соответственно в табл. 1-3. Процентное содержание каждого химического соединения оценивали по относительной площади его пика на хроматограмме. Химические соединения, идентифицированные в листьях растения в большом количестве: эвгенол (30.57%), клогексен-1-метанол-4-[1-метилэтенил] ацетат (14.67%), кариофиллен (14.93%), артемизин (11.84%). Флавон (9.46%) и 3-гидрокси-2-[3,4-метилендиоксифенил]-4Н-хромен-4-он (9.60%)при-сутствовали в умеренном количестве, а соединения 3-метил-6-[1-метилэтилиден]-циклогексен (4.29%) и 1-гидрокси-3-метоксибензиловый спирт (4.64%) были идентифицированы в следовых количествах. Стебли содержали большое количество эвгенола (11.58%), кариофиллена (23.05%) и 3,5-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

бис[1,1-диметилэтил]-фенол (23.62%). 1-Метилэтиловый эфир нонановой кислоты (7.47%), флавон (8.74%), этил[2E,4E]-3,7,11-триметил-2,4-додекадиеноат (6.14%), олеиновая кислота (5.05%), октадекановая кислота (5.66%) и 3-метил-6-[1-метилэтилиден]-циклогексен (3.89%), 1-метил-4-[1метилэтилиден]-циклогексанол (4.8%) присутствовали в умеренных количествах в стеблях растения. В семенах обнаружено больше эвгенола (11.9%), метил-альфа-ионона (24.86%) и флавона (10.38%). Соединения 1-метилэтиловый эфир нонановой кислоты, (7.45%), 6-метоксифлавон (6.97%) и нонадекан (5.37%) присутствовали в умеренных количествах, а трицикло[4,4,0,0(3,9)]декан (4.36%), бицикло[2.2.1]гептан-2-он, 1,7,7-триметил-[n] (5.11%) – в следовых количествах [18-20]. Соединения эвгенол, кариофиллен и флавон присутствовали во всех исследованных частях растения Ocimum gratissimum, однако артемизин присутствовал только в его листьях.

Анализ данных, полученных с помощью ИК-Фурье-спектроскопии. Зарегистрированные высокоинтенсивные пики при частотах 3866, 3861, 3860, 3735, 3736, 3618 и 3615 см⁻¹ относятся к валентно-



Рис. 2. ГХ-МС-хроматограммы экстрактов листьев растения Ocimum gratissimum (a), его стеблей (б) и семян (в).

му колебанию О–Н гидроксильной группы. Пики при 3388, 3394 и 3393 см⁻¹ обусловлены валентным колебанием О–Н спиртовой группы. Валентное колебание группы карбоновой кислоты О–Н связано с пиками при 3232, 3223 и

3106 см⁻¹, а валентное колебание С–Н алкенов связано с пиками, присутствующими при 3013 и 3005 см⁻¹. Пики при 2922 и 2919 см⁻¹ относятся к валентному колебанию С–Н алканов. Пики средней остроты при 2416, 2399 и 2406 см⁻¹ относятся

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Химические соединения	<i>RT</i> , мин	Площадь пиков, %	Формула	Молекулярная масса	Полученная масса
3-Метил-6-[1- метилэтилиден]-циклогексен	14.28	4.29	$C_{10}H_{16}$	136	136.05
1-Гидрокси-3- метоксибензиловый спирт	16	4.64	$C_8H_{10}O_3$	154	154
Эвгенол	17.27	30.57	$C_{10}H_{12}O_2$	164	164.06
Клогексен-1-метанол-4-[1- метилэтенил]ацетат	17.98	14.67	$C_{12}H_{18}O_2$	194	193.69
Кариофиллен	18.23	14.93	$C_{15}H_{24}$	204	204
Флавон	18.9	9.46	$C_{15}H_{10}O_2$	222	222
Артемизинин	19.98	11.84	$C_{15}H_{22}O_5$	262	262.52
3-Гидрокси-2-[3,4- метилендиоксифенил]4Н- хромен-4-он	20.78	9.60	$C_{16}H1_0O_5$	282	282.53

Таблица 1. Химические соединения, присутствующие в экстракте листьев

Примечание. *RT* – время удерживания.

Таблица 2. Химические соединения, присутствующие в экстракте листьев

Химические соединения	<i>RT</i> , мин	Площадь пиков, %	Формула	Молекулярная масса	Полученная масса
3-Метил-6-[1- метилэтилиден]-циклогексен	14.87	3.89	$C_{10}H_{16}$	136	136
1-Метил-4-[1- метилэтилиден]- циклогексанол	16.03	4.80	C ₁₀ H ₁₈ O	154	154
Эвгенол	16.63	11.58	$C_{10}H_{12}O_2$	164	164.02
 Метилэтиловый эфир нонановой кислоты 	17.57	7.47	$C_{12}H_{24}O_2$	200	200
Кариофиллен	18.22	23.05	C ₁₅ H ₂₄	204	204
3,5-бис[1,1-диметилэтил]- фенол	18.38	23.62	C ₁₄ H ₂₂ O	206	206
Флавон	19	8.74	$C_{15}H_{10}O_2$	222	222
Этил[2E, 4E]-3,7,11- триметил-2,4-додекадиеноат	20.2	6.14	$C_{17}H_{30}O_2$	266	266.24
Олеиновая кислота	21.58	5.05	$C_{18}H_{34}O_2$	282	282
Октадекановая кислота	22.55	5.66	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284

Примечание. *RT* – время удерживания.

СЕЛВАРАДЖУ и др.

Химические соединения	<i>RT</i> , мин	Площадь пиков, %	Формула	Молекулярный вес	Полученная масса
Трицикло[4,4.0.0(3,9)]декан	14.08	4.36	C ₁₀ H ₁₆	136	136
Бицикло[2.2.1]гептан-2-он, 1,7,7-триметил-[n]-	16.02	5.11	C ₁₀ H ₁₈ O	152	152
Эвгенол	17.55	11.90	$C_{10}H_{12}O_2$	164	164.20
 Метилэтиловый эфир нонановой кислоты 	18.53	7.45	$C_{12}H_{24}O_2$	200	200
Кариофиллен	19.18	23.60	C ₁₅ H ₂₄	204	204
Метил-альфа-ионон	19.35	24.86	C ₁₄ H ₂₂ O	206	206
Флавон	19.98	10.38	$C_{15}H_{10}O_2$	222	222
6-метоксифлавон	21.18	6.97	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	252	252.22
Нонадекан	22.57	5.37	C ₁₉ H ₄₀	268	268

Таблица 3. Химические соединения, присутствующие в экстракте семян

Примечание. *RT* – время удерживания.

Таблица 4.	Частоты поглощения	FTIR (см ⁻¹) и	соответствующие	ориентировочные	интерпретации	образца Осі-
mum gratiss	simum					

Листья	Стебель	Семена	Предварительное присваивание
3866	3861	3860	О–Н-растяжение, гидроксильная группа
3735	3736	3736	О–Н-растяжение, гидроксильная группа
3618	3615	3618	О-Н-растяжение, гидроксильная группа
3388	3394	3393	О–Н-растяжение, спиртовая группа
3232	3223	-	О–Н-растяжение, карбоксильная группа
_	3106	_	О–Н-растяжение, карбоксильная группа
3013	3012	-	С–Н-растяжение, алкены
_	2922	2919	С-Н-растяжение алканов
2416	2399	2406	О–Н-растяжение, кислые карбоновые кислоты
1668	1692	1668	С=О-растяжение, алкены (амиды)
1524	1524	1524	C=C-растяжение, ароматические кольца
_	1171	_	С-Н-веерное колебание, (CH2X)-алкилгалогениды
1033	-	1017	С≡N-растяжение, алифатические амины
_	966	—	С–Н-изгиб, каротиноиды

Примечание. *RT* – время удерживания.



Рис. 3. ИК-Фурье-спектры листьев растения Ocimum gratissimum (а), его стеблей (б) и семян (в).

к О–Н-валентным колебаниям карбоновых кислот. Валентные колебания С=О алкенов (амидов) связаны с наличием пиков при 1692 и 1668 см⁻¹. Сильный пик при 1524 см⁻¹ возникает из-за С=С-связей ароматического кольца. Слабый пик при 1171 см⁻¹ приписывается С–О-валентному колебанию (CH₂X) алкилгалогенидов. Пики при 1033 и 1017 см⁻¹ обусловлены валентным колебанием С–N алифатических аминов. Пик при 966 см⁻¹ указывает на наличие изгибного колебания С–H каротиноидов [21–25].

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

выводы

Химические компоненты, обнаруженные в растении Ocimum gratissimum, отвечают за различные лечебные действия. Эвгенол обладает антиоксидантным, антимикотическим, противовирусным, дезинсекционным, противопаразитарным, противораковым действием и антимикробными свойствами, помогает в лечении сердечных и ряда биохимических заболеваний. Кариофиллин обладает биологической активностью, имеет противовирусное, противовоспалительное, анестезирующее, антиканцерогенное, антимикробное, противоопухолевое, обезболивающее, антибактериальное, цитотоксическое и противогрибковое действие. Сообщается, что камфора обладает противокандидозным, противовоспалительным и антидиабетическим действием. Недавние исследования показали, что артемизин может быть эффективен при лечении рака и проявляет противомалярийную активность. Флавоны снижают риск рака, болезней сердца, астмы и инсульта. Октадекановая кислота (стеариновая кислота) и октадеценовая кислота или олеиновая кислота обладают гипохолестеринемической активностью из-за присутствия ингибитора 5-а-редуктазы [26-28]. ГХ-МС-анализ показывает, что лекарственные растительные материалы (листья, стебли и семена) Ocimum gratissimum содержат полезные химические соединения, такие как эвгенол, фитол, камфора, хлорофилл, октадекановая кислота, олеиновая кислота, изопропилпальмитат, артемизин, кариофиллин и т.д. По ИК-Фурье-спектроскопическим данным было обнаружено, что части растений содержат в качестве функциональных групп алканы, карбоновые кислоты, алкены и алифатические амины. Доказано, что части растений являются резервуаром биоактивных компонентов, имеющих фитофармацевтическое значение. Исследование создает платформу для скрининга многих биологически активных соединений для лечения различных заболеваний у людей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я,П. Сакунтала, хотел бы поблагодарить профессора Р. Сельвараджу и доктора Калима Ахмеда Джалили за их постоянное руководство и поддержку в завершении исследовательской работы. Также выражаю сердечную благодарность Центральной исследовательской лаборатории, Женскому колледжу Р. Б. В. Р. Р., Хайдарабад, и Центру САП, ИИТ, Ченнаи, за предоставление необходимых условий для успешного завершения этой работы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. M. S. Villiathan, Curr. Sci. 75 (11), 1122 (1998).
- 2. H. I. Davidson, Model Assist. Statistics Applic. J. 16 (1), 13 (2000).
- 3. J. B. Harborne, *Text Book of Phytochemical Methods* (Chapman and Hall, Lond., 1973).
- K. S. Santhosh and C. Uma, Int. J. Ayurvedic Med. 4 (4), 328 (2013).
- 5. V. Singh, S. Amdekar, and O. Verma, Webmed Central Pharmacol. 1 (10), MC001046 (2010).
- 6. S. Jain, Int. J. Maxi Res. 1 (1), 3 (2015).
- 7. G. Pandey, Int J. Pharm. Sci. Rev. Res. 5 (1), 61 (2010).
- 8. S. G. Buddhadev, Int. Peer Rev. Ayur. J. 2 (2), 1 (2014).
- P. K. Kumar, Int. J. Adv. Pharm. Bio. Chem. 1 (3), 406 (2012).
- 10. B. Joseph, Brit. J. Pharm. Res. 3 (2), 273 (2013).
- S. K. Gupta, J. Prakash, and S. Srivastava, Ind. J. Exp. Biol. 40 (7), 765 (2002).
- D. N. Lethika, K. S. Santosh, and A. Arun, Int. J. Appl. Sci. Res. Rev. 3 (4), 130 (2016).
- 13. T. Kottke, et al., Biochemistry 45 (8), 2472 (2006).
- 14. A. Khoddami, et al., Molecules 18 (2), 2328 (2013).
- 15. L. K. Kanthal, A. Dey, K. Satyavathi, and P. Bhojaraju, Pharm. Res. 6 (1), 58 (2014).
- G. M. Barrow, *Introduction to Molecular Spectroscopy* (McGraw-Hill, Kogakusha Ltd, 1962), Chapt. I, pp. 1–44.
- 17. L. J. Bellamy, *The infrared Spectra of Complex Molecules* (Chapman and Hall, Lond., 1975), Vol. 1 (3rd ed.).
- 18. R. K. Joshi, Acta Chromatographica 29 (1), 111 (2017).
- L. G. Matasyoh, C. M. Josphat, N. W. Francis, et al., Afr. J. Biotechnol. 6 (6), 760 (2007).
- 20. P. R. Rastogi and B. N. Mehrotra, Compendium of Indian Medicinal Plants (New Delhi) **3**, 434, 455 (2001).
- J. Gowri, S. P Arockia, V. Dharmalingama, et al., Int. J. Nano Corrosion Sci. Engineer. 2 (5), 322 (2015).
- 22. E. Malliga, M. S. Dhanarajan, and I. Elangovan, World J. Pharmaceut. Res. 4 (3), 1284 (2015).
- 23. H. Subrahmanian, P. Suriyamoorthy, and D. Kanakasabapathi, J. Pharmaceut. Sci. Res. 9 (11), 2062 (2017).
- 24. M. Kh. Baseri and S. Baker, Roman. J. Biophys. **21** (4), 277 (2011).
- 25. R. Selvaraju, P. Sakuntala, and A. J. Kaleem, Int. J. Emerging Technol. Engineer. Res. 5 (4), 131 (2017).
- S. Balasubramanian, D. Ganesh, R. P. Shridhar, and V. V. S. Surya Narayana, Asian J. Pharmaceut. Analysis Med. Chem. 2 (2), 71 (2014).
- 27. K. K. Igwe, P. O. Nwankwo, I. E. Otuokere, et al., J. Res. Pharmaceut. Sci. 2 (11), 01–06 (2015).
- J. M. Hannan, L. Marenah, L. Ali, et al., J. Endocrinol. 189 (1), 127 (2006).

GC-MS and FTIR Analysis of Chemical Compounds in Ocimum Gratissimum Plant R. Selvaraju*, P. Sakuntala**, and K. A. Jaleeli***

*Physics Section, Annamalai University, Chidambaram, Tamil Nadu, India

** Department of Physics, RBVRR Women's college, Narayanaguda, Hyderabad, TS, India

***Department of Physics, Nizam College, O.U., Hyderabad, TS, India

The determination of chemical compounds present in the leaves, stems and seeds of the Ocimum gratissimum plant has been carried out. Gas chromatography-mass spectroscopy showed the presence of eugenol, flavone, caryophyllene, oleic acid, phytol, octadecanoic acid, clohexene-1-methanol-4-[1-methylethenyl]acetate, artemisinin, 3,5-bis[1,1-dimethylethyl]-phenol and methyl-alpha-ionone as major compounds. These compounds were already proved to possess antioxidant, antimycotic, antiviral, antiparasitic, anti-insect, anti-inflammatory, anaesthetic, anticarcinogenic, antimicrobial, antitumour, analgesic, antibacterial, fungicidal, cytotoxic and antifungal activities. The functional groups such as C=O, O–H, C–N and C=C were identified using FTIR spectroscopy.

Keywords: biological activities; ocimum gratissium; gas chromatography-mass spectroscopy, FTIR, functional groups

——— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ=

УДК 577.3

ИНГИБИРУЮЩАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛИПИДНОГО КОМПОНЕНТА РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛЯРНОСТИ ЭЛЮЕНТА

© 2021 г. Л.Н. Шишкина, Л.И. Мазалецкая, А.Н. Смирнова, В.О. Швыдкий

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

E-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru Поступила в редакцию 26.01.2021 г. После доработки 26.01.2021 г. Принята к публикации 05.02.2021 г.

Изучены антиоксидантные свойства, спектральные характеристики и состав липидов, выделенных из цветков календулы и плодов облепихи и из их 50%-х водно-пропиленгликолевых экстрактов. Выявлены существенные количественные различия ингибирующей эффективности, количественного соотношения фракций липидов и присутствия в их хлороформном растворе биологически активных веществ в зависимости от полярности элюентов, что обусловливает способность липидного компонента растительных объектов принимать участие в регуляции окисления на разных стадиях процесса. Это подтверждено анализом кинетических кривых накопления пероксидов с помощью компьютерного пакета программ KINS и математической обработкой УФ-спектров растворов липидов по методу Гаусса.

Ключевые слова: ингибирующая эффективность, липиды, экстракты, низкотемпературное окисление, УФ-спектрофотометрия, компьютерное моделирование DOI: 10.31857/S000630292103008X

Наличие в растениях таких биологически активных веществ (БАВ), как флавоноиды и каротиноиды, рассматривается в качестве основной причины их фармакологического действия, которое обычно связывают с антиоксидантными свойствами БАВ [1-5]. Существенно более низкая токсичность природных соединений для организма по сравнению с синтетическими препаратами обусловливает необходимость детального изучения механизма антиоксидантных свойств компонентов растений с целью поиска среди них новых источников для создания фармакологических средств. Антиоксиданты (АО) принимают активное участие в регуляции окислительных процессов в любых системах, однако их эффективность существенно зависит как от концентрации кислорода, так и от состава субстрата окисления.

Основными субстратами окисления в биологических системах являются фосфолипиды (ФЛ), являющиеся одними из главных структурных компонентов мембран и играющих важную роль в регуляции метаболизма в организме [6]. Для анализа антиоксидантных свойств различных компонентов клеток, АО и их смесей одним из наиболее используемых в качестве модельного субстрата окисления является метилолеат. В биологических мембранах процессы перекисного окисления липидов преимущественно протекают в диффузионном режиме, что позволяет рассматривать модель автоокисления метилолеата в тонком слое как адекватную модельную систему для изучения участия компонентов различных объектов в регуляции перекисного окисления липидов [7, 8].

Для приготовления экстрактов из различных растительных объектов, в составе которых присутствуют БАВ и общие липиды [9], преимущественно используются водные смеси различных спиртов с разным соотношением элюентов. Детальному анализу состава ФЛ растений и ряда растительных экстрактов посвящены лишь единичные исследования последних лет [10–14]. Несмотря на то что цветки календулы и плоды облепихи широко применяются в фармакологии, сведения о детальном составе их ФЛ и влиянии полярности элюентов на физико-химические свойства липидов экстрактов единичны [14].

Целью работы явилось оценить участие липидного компонента растений на разных стадиях

Сокращения: БАВ — биологически активные вещества, АО — антиоксиданты, $\Phi \Pi$ — фосфолипиды, ВПГ — воднопропиленгликолевый, ΦX — фосфатидилхолин, $\Phi \Theta$ — фосфатидилэтаноламин.

процесса окисления модельного субстрата на основании сравнительного анализа антиоксидантных свойств, наличия БАВ и состава липидов цветков календулы и плодов облепихи в зависимости от полярности элюента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись липиды, выделенные из свежесобранных в Московской области цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) и замороженных плодов облепихи крушиновидной (*Hippophoe rhamnoides* L.) и их 50%-х водно-пропиленгликолевых (ВПГ) экстрактов. Методика приготовления ВПГ экстрактов подробно изложена в работе [14].

Взвешенные цветки календулы и плоды облепихи растирали в дистиллированной воде в соотношении 1 г сырой массы: 1.95 мл дистиллированной воды. Липиды из растительных объектов и их экстрактов извлекали по методу Фолча в модификации Кейтса [15]. Качественный и количественный состав ФЛ определяли методом тонкослойной хроматографии [16], используя силикагель типа Н (Sigma, США), стеклянные пластинки размером 90 × 120 мм и смесь хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : дистиллированная вода в объемном соотношении 12.5:7.5:2:1 в качестве мобильной фазы. Проявление хроматограмм проводили в парах йода. Количественный анализ состава ФЛ после удаления пятен с пластинки и сжигания до неорганического фосфата хлорной кислотой проводили на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ («ЭКРОС», Россия) при длине волны 815 нм по образованию фосфомолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Для калибровки использовали однозамещенный фосфорнокислый калий марки «ос. ч.». Для каждой пробы анализировали не менее четырех-пяти хроматографических дорожек. Содержание стеринов определяли по методу, описанному в работе [17], на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ при длине волны 625 нм. Помимо количественного содержания отдельных фракций ФЛ оценивали также обобщенные показатели состава липидов: доля ФЛ (%) и стеринов (%) в составе общих липидов; отношение фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин $(\Phi X/\Phi \Theta)$. которое позволяет судить о структурном состоянии липидного компонента [18], и отношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ (ГЛОФЛ/ГТОФЛ), характеризующее способность липидов к окислению [18]. Последнее вычисляли по формуле: $\Sigma \Pi O \Phi \Pi / \Sigma T O \Phi \Pi = (\Phi \Pi + \Phi C + \Phi \Im + K \Pi +$ $+ \Phi K$)/(Л ΦX + СЛ + ΦX), где ΦH – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, КЛ – кардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы фосфолипидов, СЛ – сфинголипиды.

Антиоксидантные свойства липидов определяли по их способности тормозить автоокисление метилолеата (RH) в тонком слое при 323 К в диффузионной области, когда концентрация кислорода обусловлена скоростью его диффузии в слой метилолеата. Для этого липиды после отгонки хлороформа растворяли в метилолеате в диапазоне концентраций от $7.1 \cdot 10^{-4}$ до $3.57 \cdot 10^{-3}$ моль/л (0.5-2.5 мг/мл). Процесс окисления контролировали по накоплению гидропероксидов (ROOH), концентрацию которых определяли методом йодометрического титрования (ошибка измерения не превышала 5%). За период индукции (т) принимали время, рассчитанное из кинетических кривых накопления ROOH от начала опыта до точки пересечения линейных участков кинетической кривой, соответствующих начальной скорости окисления в периоде индукции и максимальной скорости накопления пероксидов [19]. Кинетические кривые анализировали с помощью пакета компьютерных программ KINS [20].

Ингибирующую эффективность оценивали по разности величин периода индукции окисления RH в присутствии и отсутствие исследуемых добавок ($\Delta \tau$), отнесенной к периоду индукции окисления самого RH (т_{RH}), Антирадикальную активность липидного экстракта цветков календулы, т.е. константу скорости его взаимодействия с пероксирадикалами (k_7), определяли на модели инициированного динитрилом азоизомасляной кислоты окисления метилолеата при 333 К при скорости инициирования $W_i = 1 \cdot 10^{-7}$ моль $\cdot n^{-1} \cdot c^{-1}$. Метилолеат в смеси с инертным растворителем хлорбензолом (1:1) и растворенным инициатором термостатировали, после чего добавляли раствор липидного экстракта цветков календулы в метилолеате. Процесс окисления контролировали волюмометрическим методом по поглощению кислорода. Детали анализа кинетических характеристик липидного экстракта даны в работе [19]

Дифференциальные УФ-спектры растворов липидов в хлороформе регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 250 до 500 нм при разбавлении исходных растворов хлороформом. Полученные спектры подвергали математической обработке по методу Гаусса в программе Excel solver путем минимизации суммы квадратов разности между экспериментальным и расчетным спектрами, соблюдая следующие условия: совпадение контура исходного спектра с расчетным после аппроксимации на уровне $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными методами вариационной статистики, используя программный продукт MS Excel и пакет компьютерных программ KINS [20]. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию



Рис. 1. Относительное содержание ряда фракций фосфолипидов при выделении липидов из цветков календулы (1) и их 50%-х водно-пропиленгликолевых экстрактов (2).

Стьюдента [21]. В таблице и на рисунках данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием их средних квадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ состава липидов, выделенных из исследованных объектов, выявил существенные различия как доли ФЛ и стеринов в составе общих липидов, так и количественного соотношения фракций ФЛ в самих цветках календулы и плодах облепихи и их 50%-х ВПГ-экстрактах. Так, относительное содержание ФЛ в составе общих липидов из цветков календулы снижается с 24.6 \pm 2.4% (n = 8) до 2.6 \pm 0.6% (n = 13) в липидах их ВПГ-экстрактов, а аналогичный показатель состава общих липидов плодов облепихи падает с 13.5 \pm 2.9% (n = 7) до 2.6 \pm 0.15% (n = 13). При этом относительно невысокая доля стеринов в составе общих липидов цветков календулы $(3.1 \pm 1.7\%)$ и плодов облепихи $(0.83 \pm 0.34\%)$ в липидах обоих ВПГ-экстрактов уменьшается до следовых количеств [14]. Следовательно, предварительная экстракция растительного сырья полярным элюентом (для пропиленгликоля $\mu = 2.2 \text{ D}$) приводит к уменьшению доли полярных фракций липидов в 5.2-9.5 раза.

Столь же существенные изменения наблюдаются и в количественном соотношении фракций ФЛ исследуемых объектов, что иллюстрируют



Рис. 2. Относительное содержание ряда фракций фосфолипидов при выделении липидов из плодов облепихи (1) и их 50%-х водно-пропиленгликолевых экстрактов (2).

данные, представленные на рис. 1 и 2. Сравнительный анализ полученных результатов показывает, что в липидах, выделенных из 50%-х ВПГэкстрактов, достоверно повышена доля лизоформ ФЛ в 2.6 (*p* < 0.001) и 2.0 (*p* < 0.001) раза и сфинголипидов в 1.9 (*p* < 0.01) и 3.0 (*p* < 0.001) раза в ФЛ цветков календулы и плодов облепихи соответственно. В то же время относительное содержание ФЭ и ФХ в ФЛ цветков календулы в 1.8–1.9 (*p* < 0.001) раза превышает аналогичный показатель в составе ФЛ его ВПГ-экстракта, а предварительная обработка плодов облепихи полярным элюентом уменьшает долю этих фракций ФЛ лишь на 20-50%. Разнонаправленные изменения относительного содержания таких более легкоокисляемых фракций ФЛ, как кардиолипин и фосфатидная кислота, наблюдаются в липидах, выделенных из исходных растительных объектов, по сравнению с липидами из их ВПГ-экстрактов (рис. 1 и 2). Интересно отметить, что суммарные доли «фосфатидилинозит + фосфатидилсерин» в ФЛ всех изученных объектов достаточно близки и варьируют в пределах 12.0-16.1%.

Столь существенные изменения количественного соотношения фракций ФЛ обусловливают и изменения обобщенных показателей состава ФЛ, величины которых представлены в таблице. Видно, что липиды из ВПГ-экстрактов характеризуются более высоким значением отношения

Обобщенные показатели состава фосфолипидов

Показатель	1	Экстракт 1	2	Экстракт 2
ФХ/ФЭ	0.938 ± 0.058	1.328 ± 0.059	1.831 ± 0.054	2.245 ± 0.130
(∑ЛОФЛ/∑ТОФЛ)	1.431 ± 0.088	1.173 ± 0.063	1.463 ± 0.084	0.998 ± 0.059

Примечание. Представлены соотношения сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ ((ΣЛОФЛ/ΣТОФЛ) и отношение фракций фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин (ФХ/ФЭ) в составе фосфолипидов цветков календулы (1) и плодов облепихи (2) и их 50%-х ВПГ-экстрактов (экстракты 1 и 2 соответственно).



Рис. 3. УФ-спектры хлороформных растворов липидов из цветков календулы и их гауссианы (концентрация липидов 5.1·10⁻⁵ моль/л): *1, 14* – исходный и расчетный спектры, *2* – 238.1 нм, *3* – 280.2 нм, *4* – 325.5 нм, *5* – 376.2 нм, *6* – 385.3 нм, *7* – 400.5 нм, *8* – 406.7 нм, *9* – 431.9 нм, *10* – 457.3 нм, *11* – 478.3 нм, *12* – 489.3 нм, *13* – 529.1 нм.

 $\Phi X/\Phi \Theta$ и более низкой величиной соотношения $\Sigma \Pi O \Phi \Pi / \Sigma T O \Phi \Pi$. Следовательно, предварительная обработка растительного сырья 50%-м ВПГ обусловливает увеличение жесткости липидного компонента и уменьшение его способности к окислению.

Как известно, использование хлороформа в качестве растворителя в УФ-спектрофотометрии позволяет выявить наличие в пробе компонентов, характеризующихся максимумами полос поглощения в области λ > 250 нм. Сравнительный анализ УФ-спектров и их гауссиан хлороформных растворов липидов из цветков календулы и плодов облепихи и липидов из их ВПГ-экстрактов показал определенные различия величин максимумов полос поглощения в области флавоноидов в диапазоне λ от 250 нм до 380 нм. Следовательно, предварительная экстракция сырья полярным элюентом влияет на распределение флавоноидов. Отсутствие полос поглощения в области $\lambda > 400$ нм, характерных для растворов каротионидов в хлороформе [22], свидетельствует об отсутствии каротиноидов в липидах, выделенных из ВПГ-экстрактов исследованных объектов. Эти выводы четко следуют из данных, представленных на рис. 3 и 4 на примере липидов, выделенных из цветков календулы и их ВПГ-экстрактов.

Изучение антиоксидантных свойств липидов, выделенных из цветков календулы и плодов облепихи, показало, что они способны тормозить автоокисление метилолеата, а период индукции окисления линейно зависит от количества введенной добавки (рис. 5). Это свидетельствует о

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

том, что содержащиеся в липидных экстрактах данных объектов компоненты, принимающие участие в процессе окисления, в течение периода индукции преимущественно взаимодействуют с пероксирадикалами. Необходимо обметить, что ингибирующая эффективность ($\Delta \tau / \tau_{RH}$) экстрактов липидов из цветков календулы в 1.9 ± 0.2 (n = 6) раза превышает аналогичную величину для липидных экстрактов из плодов облепихи. Полученные данные позволяют предположить, что торможение процесса окисления обусловлено содержащимися в липидах АО, наличие которых подтверждает анализ УФ-спектров (рис. 3). Количественная оценка содержания АО и их антирадикальной активности (k₇) была проведена для более эффективного липидного экстракта из цветков календулы. Установлено, что присутствие добавки тормозит процесс инициированного окисления метилолеата, из величины периода индукции и начальной скорости окисления которого рассчитана концентрация АО, равная 4.35 10⁻⁵ моль/л, и проведена оценка параметра ингибирования $k_7/\sqrt{k_6} = 65 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, где *k*₆ – это константа скорости квадратичной гибели пероксирадикалов метилолеата. Полученное значение параметра $k_7/\sqrt{k_6}$ соответствует данным литературы о высокой антирадикальной активности флавоноидов [7].

Несмотря на более низкую способность к окислению относительно липидов из исходных растительных объектов (таблица) и наличию в липидах из экстрактов БАВ (рис. 4), липиды из их ВПГ-экстрактов практически не влияют на про-



Рис. 4. УФ-спектры хлороформных растворов липидов, выделенных из 50%-х водно-пропиленгликолевых экстрактов цветков календулы и их гауссианы (концентрация липидов 1.1×10^{-3} моль/л): *1*, *5* – исходный и расчетный спектры, 2 - 205.1 нм, 3 - 318.4 нм, 4 - 326.8 нм.

цесс окисления. Так, липиды из экстрактов плодов облепихи обладают слабой прооксидантной активностью ($\Delta \tau / \tau_{\rm RH} = -0.035 \pm 0.09$, n = 6), а липиды из ВПГ экстрактов цветков календулы низкой ингибирующей эффективностью ($\Delta \tau / \tau_{\rm RH} =$ $= 0.050 \pm 0.029$, n = 3) независимо от их концентрации в среде окисления.

Ранее было установлено, что автоокисление RH при 323 К в диффузионной области описывается экспоненциальной зависимостью [ROOH] = $a\exp(kt)$ с коэффициентом корреляции 0.94–1.00 [8]. При этом на начальных стадиях процесса окисления, когда расходованием субстрата можно пренебречь, изменение величин *a* и показателя экспоненты *k* в присутствии различных добавок относительно соответствующих значений для



Рис. 5. Зависимость периода индукции автоокисления метилолеата в тонком слое при 323 К от концентрации липидов, выделенных из цветков календулы (*1*) и плодов облепихи (*2*); RH – метилолеат.

субстрата окисления позволяет оценить их участие на разных стадиях процесса окисления [7, 8].

Анализ полученных в работе кинетических кривых окисления липидов с помощью компьютерного пакета программ KINS показал, что во всех вариантах экспериментов коэффициенты корреляции данной экспоненциальной зависимости варьируют в пределах 0.993–0.999. Величина предэкспоненциального множителя *а* достоверно уменьшается с ростом концентрации липидов, выделенных как из цветков календулы, так и из плодов облепихи, однако зависимости имеют сложный характер (рис. 6). Величина фактора *а* кинетических кривых накопления пероксидов обусловлена скоростью зарождения радикалов и продолжения цепи автоокисления метилолеата и



Рис. 6. Зависимость величины фактора *а* автоокисления метилолеата в тонком слое при 323 К от концентрации липидов, выделенных из цветков календулы (*1*) и плодов облепихи (*2*).

уменьшается с ростом антиоксидантных свойств липидов [23], поэтому его уменьшение в присутствии липидов из цветков календулы и плодов облепихи свидетельствует об их участии на стадиях зарождения радикалов и продолжения цепи. Поскольку в липидах, выделенных из ВПГ экстрактов, отсутствуют каротиноиды (рис. 4) и липиды практически не обладают антиоксидантными свойствами, это позволяет сделать вывод, что ингибирующая эффективность липидов из исходных растительных объектов обусловлена присутствием в них флавоноидов, что подтверждает и высокая антирадикальная активность липидов из цветков календулы. Как установлено в работе [7], кверцетин и дигидрокверцетин вызывают снижение величины фактора а в реакции автоокисления метилолеата в тонком слое на несколько порядков, в то время как эффект присутствующих в липидах цветков календулы и плодов облепихи флавоноидов существенно ниже (рис. 6). Это обусловлено способностью флавоноидов образовывать комплексы с ФЛ, что существенно уменьшает эффективность их ингибирующего действия [24, 25].

Независимо от концентрации, липиды из ВПГ экстрактов календулы практически не влияют на величину фактора *a* (1.090 \pm 0.047), в то время как присутствие липидов из плодов облепихи приводит к его незначительному увеличению (1.29 \pm 0.10), что соответствует различию в их антиоксидантных свойствах.

Так как величина показателя экспоненты k обусловлена общей скоростью процесса окисления [23], то необходимо отметить, что эффект липидов всех исследованных объектов на величину *k* не зависит от их концентрации. Липиды плодов облепихи практически не оказывают влияния на величину показателя ($k_{\text{отн}} = 0.94 \pm 0.03$, n = 6), липиды из цветков календулы вызывают его снижение ($k_{\text{отн}} = 0.63 \pm 0.04$, n = 3). При этом липиды из ВПГ-экстрактов проявляют обратный эффект: липиды экстрактов из цветков календулы не влияют на общую скорость окисления ($k_{\text{отн}} = 0.95 \pm$ \pm 0.04), а липиды экстрактов из плодов облепихи ее незначительно уменьшают ($k_{\text{отн}} = 0.84 \pm 0.02$). Влияние липидов на общую скорость окисления после выхода из периода индукции может быть обусловлено участием липидов и содержащихся в них БАВ в побочных реакциях, как, например, их способностью разлагать пероксиды, что характерно для компонентов многих растительных объектов [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предварительная экстракция растительного сырья полярным элюентом обу-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

словливает существенные различия как состава и антиоксидантных свойств выделенных из них липидов, так и разнообразия БАВ в их хлороформных растворах по сравнению с аналогичными показателями липидов из исходных растений. Липиды и присутствующие в них БАВ из цветков календулы и плодов облепихи принимают участие в регуляции процесса автоокисления на стадиях зарождения радикалов и продолжения цепи окисления, обеспечивая их антиоксидантные свойства. Более высокая ингибирующая эффективность липидов из цветков календулы относительно липидов из плодов облепихи сопровождается и снижением общей скорости окисления после окончания периода индукции окисления в их присутствии. Существенное уменьшение доли ФЛ, основных субстратов окисления, в составе общих липидов из экстрактов и изменение набора БАВ по сравнению с липидами исходных объектов обусловливают их низкую ингибирующую эффективность. Это подтверждается как слабыми антиоксидантными свойствами липидов из ВПГ-экстрактов цветков календулы, так и незначительным ростом скорости зарождения радикалов и продолжения цепи окисления в присутствии липидов из экстрактов плодов облепихи.

Столь сложный и неоднозначный характер влияния липидного компонента растительного сырья на регуляцию окислительных процессов в зависимости от полярности элюентов, используемых в процессе его обработки, требует более детального анализа его состава и физико-химических свойств при оценке биологической активности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность н.с ИБХФ РАН к.х.н. В.А. Волкову, любезно предоставившему ВПГ-экстракты для исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (тема № 44.4, гос. № те-мы: 0084-2019-0014).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- V. Gody, E. Middleton, and J. B. Harborne, *Plant fla-vonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-active relationships* (Liss, N. Y., 1986).
- 2. V. K. Gupta and S. K. Sharma, Natural Product Radiance **5** (4), 326 (2006).
- N. Sirisha, M. Sreenivasulu, K. Sangeeta, and C. Madhusudhana Chetty, Int. J. Pharm. Tech. Res. 2 (4), 2174 (2010).
- 4. А. А. Семенов и В. Г. Карцев, *Биологическая активность природных соединений* (МБФНП «Научное Партнерство», М., 2012).
- Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов и Е. Н. Музафаров, Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина (Synchrobook, Пущино, 2013).
- 6. Р. Геннис, Биомембраны: Молекулярная структура и функции (Мир, М., 1997).
- L. I. Mazaletskaya, N. I. Sheludchenko, and L. N. Shishkina, In *Chemical Reactions in Gas, Liquid and Solid Phases Synthesis, Properties and Application*, Ed. by G. E. Zaikov and R. M. Kozilowsky (Nova Science Publisher, N. Y., 2012), pp. 11–20.
- L. N. Shishkina, M. V. Kozlov, L. I. Mazaletskaya, et al., In *Antioxidants in Systems of Varying Complexity: Chemical, Biochemical, and Biological Aspects*, Ed. by L. N. Shishkina, A. N. Goloshchapov, and L. I. Weisfeld (Apple Acad. Press, Toronto, 2020), pp. 41–59.
- Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сборник инновационных статей по материалам Х Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», под ред. Н. В. Загоскиной (М., 2018).
- 10. Yu. Nakamura, Trends Plant Sci. 22 (12), 1027 (2017).

- 11. A. M. Cassim, P. Gougue, J. Gronnie, et al., Progr. Lipid Res. **73**, 1 (2019).
- X. Liu, D. Ma, Zh. Zhang, et al., Environ. Exp. Botany 165, 174 (2019).
- 13. L. A, Colin and U. Jaillais, Curr. Opin. Plant Biol. 53, 1 (2020).
- В. О. Швыдкий, А. Н. Смирнова, В. А. Волков и Л. Н. Шишкина, Химия раст. сырья, № 1, 67 (2020).
- 15. М. Кейтс, Техника липидологии (Мир, М., 1975).
- Биологические мембраны. Методы, под ред. Дж. Б. С. Финдлея и У. Г. Эванза (Мир, М., 1990).
- 17. W. M. Sperry and M. Webb, J. Biol. Chem. 187, 97 (1950).
- Л. Н. Шишкина, Е. В. Кушнирева и М. А. Смотряева, Радиац. биология. Радиоэкология 44 (3), 289 (2004).
- В. Ф. Цепалов, А. А. Харитонова, Г. П. Гладышев и Н М. Эммануэль, Кинетика и катализ 18, 1261 (1977).
- 20. Э. Ф. Брин и С. О. Травин, Хим. физика **10** (6), 830 (1991).
- 21. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, 3-е изд. (Высш. шк., М., 1990).
- А. Г. Курегян, Фундамен. исследования, № 2 (23), 5166 (2015).
- 23. Л. Н. Шишкина и Н. В. Хрустова, Биофизика **51** (2), 340 (2006).
- 24. Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко и Л. Н. Шишкина, Прикл. биохимия и микробиология 46 (2), 148 (2010).
- 25. L. Mazaletskaya, N. Sheludchenko, and L. Shishkina, Chemistry & Chemical Technology, **6** (1), 35 (2012).

Inhibitory Efficiency of the Lipid Component of Plant Objects in Dependence on the Eluent Polarity

L.N. Shishkina, L.I. Mazaletskaya, A.N. Smirnova, and V.O. Shvydkiy

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

Antioxidant properties, spectral characteristics and the composition of lipids isolated from pot marigold flowers and sea buckthorn berries and their 50%-water-propyleneglycol extracts were studied. Significant quantitative differences in the inhibitory efficiency, the quantitative relations of fractions of lipids and the presence of bioactive substances in the chloroform solution were identified according to eluent polarities, thereby enabling the involvement of the lipid component of plant objects in the regulation of oxidation at different stages of this process. These data were confirmed by analysis of the kinetic curves of the peroxide accumulation performed by means of the KINS computer programs and mathematical treatment of UV-spectra of the lipid solutions using the Gaussian Elimination method.

Keywords: inhibitory efficiency, lipids, extracts, low temperature oxidation, UV-specrtophotometry, computer modeling
УДК 577.352.336

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА В РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА, В НОРМЕ *in vitro*

© 2021 г. Н.Ю. Герасимов*, О.В. Неврова*, И.В. Жигачева*, И.П. Генерозова**, А.Н. Голощапов*

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4 **Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35 E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

> Поступила в редакцию 22.10.2020 г. После доработки 08.12.2020 г. Принята к публикации 09.12.2020 г.

Изучено действие антиоксиданта ресвератрола в различных концентрациях на микровязкость мембран митохондрий, выделенных из клеток листьев гороха. Показано, что ресвератрол в физиологических ($5 \cdot 10^{-6}$ М) и сверхмалых ($5 \cdot 10^{-14}$ М) дозах изменял микровязкость и структуру липидного бислоя мембран. По-видимому, данный антиоксидант путем изменения структуры липидного окружения мембранных белков изменяет их активность и таким образом влияет на активность и функции митохондрий. В областях доз между физиологическими и сверхмалыми не было обнаружено никаких изменений, т.е. наблюдалась «мертвая зона». Кроме того, было выявлено, что ресвератрол в физиологических концентрациях сдвигает термоиндуцированный структурный переход в область более низких температур, что может мешать нормальной регуляции естественных процессов.

Ключевые слова: структура мембран, микровязкость мембран, антиоксидант. **DOI:** 10.31857/S0006302921030091

Митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене и регулируют поток кальция в клетках [1, 2]. В настоящее время в литературе с большим интересом изучаются процессы кодирования митохондриальных белков с помощью регуляции ядерного генома и активность митохондриальной транскрипции через регуляторы суточного цикла в растениях [3-5]. Все больше информации о связи между дыхательной цепью и вводимыми белковыми комплексами [6] и о митохондриальной реакции на стресс [7]. Объем получаемых данных представляет собой превосходный инструмент для получения более полного представления о молекулярных компонентах сложной митохондриальной системы с целью целесообразного моделирования и регулирования функции митохондрий.

Интересно, что полифенольные соединения оказывают непосредственное влияние на структуру и функцию митохондрий. Растительные полифенолы взаимодействуют с белками, такими как сигнальные киназы, факторы транскрипции и ионные каналы [8] и регулируют окислительновосстановительные процессы, аналогичные митохондриальным. Одним из наиболее распространенных полифенольных соединений является ресвератрол. Он известен как биологически активный компонентов красного вина с антиоксидантной активностью, который улучшает функции митохондрий [9, 10]. Показана противораковая активность ресвератрола, которая может быть обусловлена его способностью вызывать апоптоз в клетках лейкемии и рака молочной железы человека [11]. Однако до настоящего времени не было информации о прямом изменении митохондриальной активности ресвератролом растений и о его механизме действия.

Действие антиоксидантов на биологические мембраны объясняется системой регуляции пероксидного окисления липидов [12–14], которая напрямую связана с микровязкостью мембран. В то же время активные формы кислорода генерируются, главным образом, митохондриями.

Таким образом, целью нашей работы было провести исследование и оценить влияние ресвератрола, как сильного природного антиоксиданта и активатора, на митохондрии гороха в норме, пытаясь спрогнозировать возможную роль ресвератрола в качестве модулятора активности мито-

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, E_a – энергия активации.



Рис. 1. Структурные формулы использованных спиновых зондов.

хондрий, что открывает новые возможности в защите растений от стресс-факторов, связанных с митохондриальной дисфункцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии получали из клеток листьев гороха методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере. Для приготовления образца митохондрии разбавляли в среде выделения таким образом, чтобы содержание белка в конечном растворе составляло 2 мг/мл.

Ресвератрол готовили последовательным стократным разбавлением в среде выделения так, чтобы концентрация в образцах с митохондриями при конечном разбавлении составляла $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-10}$, $5 \cdot 10^{-12}$, $5 \cdot 10^{-14}$ и $5 \cdot 10^{-16}$ М. Методика приготовления сверхмалых доз биологически активного вещества показана, например, в работах [15, 16].

Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6- бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин-3-оксил (зонд II) (рис. 1), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.

В работе [17] показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II — в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I «липидным», а зонд II — «белковым».

Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_+ \cdot \cdot ((I_+/I_-)^{0.5} - 1)$, приведенной в работе [18]. Реги-

страцию спектров ЭПР проводили в диапазоне температур 283–317 К (10–44°С) на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы Brucker (США).

Известное соотношение Стокса–Энштейна (см., например, работу [19]) связывает параметр τ_c и вязкость среды, окружающей зонд $\tau_c = \eta V/kT$, где V – объем радикала (его можно считать прямо пропорциональным молекулярной массе); η – динамическая вязкость среды; k – постоянная Больцмана и T – абсолютная температура. Динамическая вязкость η связана с температурой следующим эмпирическим соотношением $\eta = A'e^{b/T}$ [20], откуда следует lntc = $A'' + b/T + \ln(1/T)$, где A', A'' и b – константы. Исследуемый нами температурный интервал (от 283 до 305 K) достаточно узок, на его протяжении ln(1/T) меняется очень незначительно по сравнению со слагаемым b/T, поэтому можно считать ln $\tau_c = a + b/T$.

Исходя из этой точки зрения, график зависимости $\ln \tau_c$ от 1/T для таких структур должен представлять собой ломаную линию, точки излома которой являются точками структурных переходов [21]. Наклон этих прямых позволяет определить энергию активации перехода $\Delta E_a = bR$ [22], где b - коэффициент наклона соответствующего прямого участка, а R – универсальная газовая постоянная. Энергия активации соответствует энергии перестройки одного моля липидов мембран [22].

Статистическую обработку данных осуществляли методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft® Office Excel и Origin® 6.1 при статистической надежности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы были получены температурные зависимости времен вращательной корреляции зондов I и II для контрольной группы (рис. 2 и 3) и при действии ресвератрола в физиологической (5·10⁻⁶ M, рис. 2) и сверхмалой (5·10⁻¹⁴ M, рис. 3) концентрациях. Для контрольной группы наблюдали термоиндуцированный



Рис. 2. Температурные зависимости микровязкости мембран митохондрий в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от 1/T, для удобства указаны величины *T* для контрольной группы и концентрации ресвератрола 5·10⁻⁶ M): (а) – белковый зонд, (б) – липидный зонд.

структурный переход в обеих областях мембран (липидных и прибелковых) при температурах от 18 до 20°С (291–293 К). Введение антиоксиданта в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М приводило к исчезновению структурных перестроек в мембранах. Вероятно, ресвератрол в физиологических дозах сдвигает структурный переход в область температур вне изученной области. Напротив, введение антиоксиданта в сверхмалой концентрации не изменяло положение термоиндуцированных перестроек в липидном бислое (рис. 3). Следует отметить, что обе концентрации препарата уменьшали микровязкость как липидной, так и прибелковой фазы мембран митохондрий (рис. 4). Этот факт, по-видимому, связан с уменьшением окисления липидов вследствие введения антиоксиданта и накоплением ненасыщенных жирных кислот в мембране.

На рис. 4 представлена дозовая зависимость эффекта ресвератрола на микровязкость мембран при температуре 12°С (285 К), наиболее благоприятной для цветения гороха [23], при которой структурные переходы не наблюдались (рис. 2 и 3). Максимальное действие антиоксиданта наблюдалось, по сравнению с другими дозами, для



Рис. 3. Температурные зависимости микровязкости мембран митохондрий в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от 1/T, для удобства указаны величины *T* для контрольной группы и концентрации ресвератрола 5·10⁻¹⁴ M): (a) – белковый зонд, (б) – липидный зонд.



Рис. 4. Зависимость изменения микровязкости (отн. изм. = $(\tau_c - \tau_c_{\text{контр}})/\tau_c_{\text{контр}})$ митохондрий гороха от концентрации ресвератрола (T = 285 K): (а) – липидный зонд, (б) – белковый зонд.

большой (5·10⁻⁶ М) и для сверхмалой (5·10⁻¹⁴ М) концентраций (рис. 4). В областях доз между физиологическими и сверхмалыми, $5 \cdot 10^{-10}$ и $5 \cdot 10^{-12}$ М, ресвератрол практически не изменял микровязкость мембран митохондрий по сравнению с контролем, т.е. в данной области наблюдалась (рис. 4) так называемая «мертвая» зона [24]. Данный антиоксидант при 12°С (285 К) в концентрации 5.10⁻⁶ М приводит к уменьшению микровязкости липидных областей мембраны на 20% по отношению к контролю (рис. 4а), а микровязкость прибелковых областей (рис. 4б) уменьшалась на 30%. При этом изменение микровязкости в прибелковых областях даже на 10% может быть очень существенно, так как может привести к значительным изменениям энергетики клеток.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* ресвератрол приводит к уменьшению микровязкости мембран в сверхмалой и физиологической концентрации. В то же время сдвиг термоиндуцированного структурного перехода является нежелательным, так как это указывает на значительное изменение структуры липидного бислоя. Это, в свою очередь, может мешать нормальной регуляции естественных процессов при защите от стресс-факторов. Поэтому ресвератрол в сверхмалой дозе ($5 \cdot 10^{-14}$ M) при воздействии на структуру мембран митохондрий обладает явным преимуществом перед физиологической концентрацией ($5 \cdot 10^{-6}$ M).

В таблице схематически изображены термоиндуцированные структурные переходы и структурные состояния мембран в разных областях температур с соответствующими энергиями активации (*E*_a). При введении ресвератрола в сверхмалых дозах энергия активации структурного состоянии липидных областей мембраны при низких температурах (285-291 К) практически не менялась, тогда как при высоких температурах (297-305 К) уменьшалась приблизительно в два раза. В отличие от липидных, в прибелковых областях введение антиоксиданта в сверхмалой концентрации приводило к значительным (~ в три раза ниже контроля) изменениям энергии активации при низких температурах (285-291 К). При высоких температурах E_{a} не изменялась, оставаясь на уровне контроля. Следовательно, можно предположить, что сразу после введения ресвератрол в сверхмалых дозах приводил к изменению структуры прибелковых областей мембраны. При повышении температуры липиды в мембране перестраивались таким образом, что структура прибелковых областей бислоя возвращалась к норме за счет миграции липидов из липидной фазы в прибелковую область мембран, что приводило к изменению структуры липидных областей бислоя. Введение ресвератрола в больших дозах приводило к исчезновению термоиндуцированных структурных перестроек как в липидной, так и прибелковой фазах мембран. Вероятнее всего, структурное состояние мембран митохондрий при введении большой дозы ресвератрола соответствует структурному состоянию мембран контрольной группы при высоких температурах, судя по близким значениям их энергии активации. Из этого следует, что соответствующие переходы сместились в область более низких температур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ресвератрол в физиологических и сверхмалых дозах изменял структуру мембран митохондрий, выделенных из листьев гороха. Поскольку активность мембранных белков су-

	Липидные области			Прибелковые области			
<i>Т</i> , К	Контроль	Ресвератрол, 5·10 ⁻⁶ М	Ресвератрол, 5·10 ⁻¹⁴ М	Контроль	Ресвератрол, 5·10 ⁻⁶ М	Ресвератрол, 5·10 ⁻¹⁴ М	
	<i>Е</i> _а , кДж						
285	170 ± 50		150 ± 40	90 + 20		30 ± 5	
289	170 ± 50		150 ± 40	J0 ± 20		50 ± 5	
291							
293		40 ± 7			25 ± 5		
297				40 ± 7			
301	60 ± 10		35 ± 5			40 ± 10	
305							

Структурные состояния липидного бислоя митохондрий листьев гороха при разных температурах с соответствующими энергиями активации

Примечание. Закрашенные области соответствуют термоиндуцированным структурным переходам.

щественно зависит от липидного окружения [25], данный антиоксидант путем изменения структуры липидного бислоя может изменять активность белков и ферментов, таким образом влияя на активность и функции митохондрий. В областях доз между физиологическими и сверхмалыми не было обнаружено никаких изменений, т.е. наблюдалась «мертвая» зона. Кроме того, было выявлено, что ресвератрол в физиологических концентрациях сдвигает термоиндуцированный структурный переход в область более низких температур, что может мешать нормальной регуляции естественных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. А. Ленинджер, *Основы биохимии* (Мир, М., 1985), т. 1.
- S. Stael, A. G. Rocha, A. J. Robinson, et al., FEBS Lett. 585 (24), 3935 (2011).
- 3. Г. М. Дымшиц, Природа 6 (1042), 54 (2002).
- 4. M. W. Hameed, I. Juszczak, R. Bock, and J. T. van Dongen. Plant Methods 13, 112 (2017).
- 5. S. Okada and A. Brennicke, Mol. Genet. Genomics **276** (1),71 (2006).
- 6. D. C. Wallace, Cell 163 (1), 33 (2015).
- 7. M. Picard, B. S. McEwen, E. S. Epel, and C. Sandif, Front Neuroendocrinol. **49**, 72 (2018).
- B. Dasgupta and J. Milbrandt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 7217 (2007).
- M. Lagouge, C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, et al., Cell 127, 1109 (2006).
- Z. Ungvari, N. Labinskyy, P. Mukhopadhyay, et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 297, H1876 (2009).

- 11. S. Pervaiz, Leuk. Lymphoma 40 (5–6), 491 (2001).
- С. А. Аристархова, Г. В. Архипова, Е. Б. Бурлакова и др., ДАН СССР 228, 215 (1976).
- Е. Б. Бурлакова и Н. Г. Храпова, Успехи химии 54 (9),540 (1985).
- Е. Б. Бурлакова, в Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты (Химия, М., 2005), т. 2, сс.10–45.
- 15. Ф. Ф. Ниязи, Н. В. Кувардин и Е. А. Фатьянова, Наука и образование: новое время **1** (1), 65 (2014).
- Н. В. Кувардин в сб. Мат-лы Междунар. науч.практич. конф. «Актуальные проблемы химической науки, практики и образования» (КурскГТУ, Курск, 2009), сс. 122–125.
- В. И. Бинюков, С. Ф. Борунова, М. Г. Гольдфельд и др., Биохимия **36** (6), 1149 (1971).
- А. М. Вассерман, А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский и И. Б. Нейман, Высокомолекуляр. соединения 10А, 1930 (1968).
- 19. А. Н. Кузнецов, *Метод спинового зонда* (Наука, М., 1976).
- 20. Х. Кухлинг, Справочник по физике (Мир, М., 1983).
- 21. D. Chapman, Quart. Rev. Biophys. 8, 185 (1975).
- 22. M. Shinitzky and M. Inbar, Biochim. Biophys. Acta **433** (1), 133 (1976).
- 23. Р. Х. Макашева, Горох (Колос, Л., 1973).
- 24. Е. Б. Бурлакова, Вестник РАН 64 (М5), 425 (1994).
- 25. Р. Геннис, Биомембраны: Молекулярная структура и функции (Мир, М., 1997).

Effects of Various Concentrations of Resveratrol on the Structural State of Mitochondrial Membranes Isolated from Pea Leaves *in vitro*

N.Yu. Gerasimov*, O.V. Nevrova*, I.V. Zhigacheva*, I.P. Generozova**, 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

In this study, the effects of various concentrations of an antioxidant such as resveratrol on microviscosity of mitochondrial membranes isolated from pea-leaf cells were investigated. It was shown that resveratrol in physiological $(5 \cdot 10^{-6} \text{ M})$ and ultralow $(5 \cdot 10^{-14} \text{ M})$ doses changed microviscosity and altered the structure of the membrane lipid bilayer. Apparently, this antioxidant affects the activities of membrane proteins due to altered structures of lipid molecules that surround these proteins thereby influencing mitochondria activity and function. In the range between physiological dose and ultra-low dose, there were no differences, it was a "dead-zone" range. In addition, it was found that resveratrol in physiological concentrations shifted thermal induced structural transition to the lower temperature region, which might interfere with the normal regulation of natural processes.

Keywords: membrane structure, membrane microviscosity, antioxidant

——— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ =

УДК 582.998.2:547.587

КИНЕТИКА ИНИЦИИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПОСОМ ИЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА С ВВЕДЕННЫМИ В НИХ ЭКСТРАКТАМИ АЛОЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2021 г. Н.Н. Сажина*, П.В. Лапшин**, Н.В. Загоскина**

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4 **Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35 E-mail: Natnik48s@yandex.ru

С-тап. тчатк403@уапаех.та Поступила в редакцию 15.12.2020 г. После доработки 10.01.2021 г. Принята к публикации 20.01.2021 г.

Многочисленные виды растений рода Алое привлекают внимание исследователей различными проявлениями их биологической активности, в том числе антиоксидантной. В настоящей работе проведено сравнительное исследование кинетики ингибирующего действия этанольных экстрактов пяти видов Алое в модельной системе инициированного окисления фосфатидилхолиновых липосом. Установлено, что экстракты A. marlothii и A. congolensis обладают, соответственно, в 13 и 10 раз большей антиоксидантной активностью, чем традиционные виды Anoe: A. arborescens u A. vera. Значения суммарного содержания фенольных соединений экстрактов A. marlothii и A. congolensis превышают значения содержания фенольных соединений A. arborescens и A. vera в меньшей степени, чем антиоксидантная активность (в пять-шесть раз). Это может свидетельствовать о наличии в экстрактах A. marlothii и A. congolensis очень активных фенольных антиоксидантов. Анализ влияния введенных в липосомы экстрактов на их размер показал, что наиболее активные экстракты A. marlothii, A. congolensis и A. pillansii уменьшают средний размер липосом в сравнении с «чистыми» липосомами, а экстракты с меньшей антиоксидантной активностью увеличивают, что связано, вероятно, с различным изменением липидной структуры липосом компонентами экстрактов. Полученные результаты позволяют рекомендовать A. marlothii, A. congolensis и A. pillansii для изучения других видов их биологической активности и создания на их основе новых лекарственных средств.

Ключевые слова: Алое, фенольные метаболиты, кинетика, окисление, липосомы, фосфатидилхолин. **DOI:** 10.31857/S0006302921030108

В мире насчитывается более 500 различных видов рода Алое. Они являются важными источниками биологически активных веществ [1]. К фитохимическим классам, присущим Алое, относятся: антроны, хромоны, кумарины, пироны, алкалоиды, флаваноиды, стиролы, энзимы, протеины, жирные кислоты и другие липидные компоненты, практически все витамины (В₁, В₂, В₆, В12, С, Е, бета-каротин и др.) [1]. Благодаря разному биологическому действию соединений этих классов, Алое широко применяют в традиционной и современной медицине [2]. При лечении гепатита и алкогольной интоксикации печени используются гепатопротекторные свойства Алое [3, 4]. Благодаря пребиотической и антибактериальной активности в гастроэнтерологии сок и экстракты Алое помогают лечить гастриты и язвы желудка [5]. Антидиабетическая и антигиперлипидемическая активности компонент Алое позволяют бороться с сахарным диабетом и жировой болезнью печени [6]. Отдельные компоненты Алое (алое-эмодин, алоин и др) обладают антивирусной, иммуномодулирующей активностями и используются для лечения заболеваний верхних дыхательных путей [1, 7]. Некоторые соединения Алое обладают противоопухолевой активностью [8, 9]. Было найдено, что алое-эмодин, один из основных компонентов Алое, ингибирует активность ацетилхолинэстеразы, а экстракт A. arborescens защищает IMR32, нейробластому клеточной линии человека, от токсичности, вызванной бета-амилоидным пептидом, ответственным за болезнь Альцгеймера [2, 10].

Одна из причин и стадий перечисленных болезней — окислительный стресс, обусловленный перекисным окислением липидов в мембранах

Сокращения: АОА – антиоксидантная активность, ФХ – фосфатидилхолин, ААРН – 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, СФС – суммарное содержание фенольных соединений, ДК – диеновые конъюгаты.

клеток крови, печени, мозга, эпителия и других, поэтому для ингибирования окислительного процесса важно найти Алое с высоким содержанием активных антиоксидантов. Наиболее исследованными и используемыми видами Алое являются Aloe arborescens Mill., Aloe ferox Mill. и Aloe vera (L.) Burm. [1]. Однако встречаются мало изученные виды с более активными антиоксидантными компонентами. В работе [11] амперометрическим и хемилюминесцентным методами был проведен скрининг 15 видов Алое по оценке антиоксидантной активности (АОА) их экстрактов и найден вид Алое А. pillansii со значительно более высоким значением АОА, чем у традиционных видов Алое. Поиск продуцентов биологически активных веществ с высокими антиокислительными свойствами в других видах Алое востребован и является актуальной задачей современной биологии и фармацевтики.

В настоящее время для исследования биохимических процессов в мембранах клеток живых организмов, в частности процесса перекисного окисления липидов, широко используют различные липосомные структуры как модели биомембран [12-15]. Инициируя окисление липосом разными способами, можно регулировать окислительный процесс различными субстанциями, встроенными в липосомы. Ингибирование окисления липосом антиоксидантами дает более реальную «физиологичную» модель для определения их АОА. Поэтому в нашей работе мы использовали модельную систему инициированного окисления липосом из соевого фосфатидилхолина (ΦX) при $T = 37^{\circ}C$ [14–16]. Кроме использования в качестве модели биологических мембран, липосомы из ФХ можно использовать также как потенциальные наноконтейнеры для доставки в ткани и клетки живых организмов различных лекарственных препаратов, в том числе и экстрактов Алое, поэтому целесообразно определить физико-химические характеристики таких липосом [12, 17–19].

Цель настоящей работы — изучение кинетики ингибирующего действия экстрактов пяти видов рода *Алое* на модели инициированного окисления липосом из ФХ и определение их АОА, а также сравнение размеров и ζ-потенциала липосом с введенными в них экстрактами Алое.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение экстрактов Алое. В работе использовали пять представителей рода *Aлое: A. arborescens*, *A. vera, A. pillansii, A. congolensis A. marlothii*, выращенных в коллекции суккулентных растений в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва) при естественном освещении и 16-часовом фотопериоде. Листья взрослых (годовалых) растений измельчали до фрагментов размером ≈ 5 мм и лиофильно высушивали до получения сухой массы. Экстракты готовили из 50 мг сухих листьев в 1.5 мл 70%-го этанола, перемешивали в термостате в течение 45 мин при температуре 45°С [20]. Далее центрифугировали с относительным ускорением 12000 *g* (13000 об/мин) на центрифуге Hettich (Германия) и отбирали надосадочную жидкость (супернатант). Готовые экстракты хранили при 4°С. Весовая концентрация всех полученных экстрактов составила 33.3 мг сухих листьев на 1 мл этанола. В качестве вещества сравнения использовали галловую кислоту (Sigma-Aldrich, США). Суммарное содержание фенольных соединений (СФС), выраженное в мг-экв галловой кислоты на 1 г сухих листьев, определяли спектрофотометрическим методом (725 нм) с помощью реактива Фолина–Чокальтеу [20]. Погрешность определения СФС составила менее 3%.

Приготовление суспензии липосом. Для приготовления липосом использовали суспензию соевого ФХ марки L-α-phosphatidylcholine P3644 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄) с pH 7.4 и ионной силой 1 мМ. В состав ФХ данной марки входили два основных фосфолипида – фосфатидилхолин (55%) и фосфатидилэтаноламин (25%). Содержание ЖК в % к общему их количеству составило: пальмитиновая – 17%, стеариновая – 4%, олеиновая – 9%, линолевая – 60%, линоленовая – 7%. Суспензию готовили из навески ФХ с объемом буфера, необходимым для получения концентрации 1 мг/мл. Смесь перемешивали в шейкере, добавляя разные объемы (от 10 до 100 мкл) спиртовых экстрактов Алое. Липосомы формировали с помошью ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonics & Materials, США) при мошности 70 Вт в течение 15 мин в режиме 15 с × 15 с, для предохранения липосом от окисления сосуд с суспензией помещали в смесь воды со льдом. Для отделения липосом от примесей, образующихся, в том числе, и после «озвучивания», дисперсию липосом центрифугировали на центрифуге Hettich (Германия), при 12000 g (13000 об/мин) и 4°С в течение 20 мин, а супернатант отбирали для дальнейшей работы [16, 21]. Для определения концентрационных зависимостей ингибирующего действия экстрактов Алое мы ввели величину содержания сухих листьев в известном объеме экстракта, введенного в суспензию липосом, к массе ФХ в липосомах $C = m_{C,\Pi}/m_{\Phi X}$, где $m_{C,\Pi}$ – масса сухих листьев в введенном объеме экстракта в мг, $m_{\Phi X}$ – масса навески ΦX в мг.

Инициирование окисления липосом. Для инициирования окисления липосом использовали водорастворимый азо-инициатор 2,2'-азобис(амидинопропан)дигидрохлорид (ААРН; Fluka, Германия) с конечной концентрацией в дис-

персии липосом 0.33 мМ. Исходный раствор ААРН (200 мМ) готовили на дистиллированной воде при $T \approx 0^{\circ}$ С и хранили в морозильнике. Перед измерением разбавляли в десять раз буферным раствором в сосуде, помещенном в лед, из которого отбирали 50 мкл для анализа. Окисление липосом с концентрацией ФХ 0.1 мг/мл проводили в спектрофотометрической кварцевой кювете с конечным объемом рабочей жидкости 3 мл, термостатированной при физиологической температуре (37°С). Кинетику увеличения оптической плотности $\Delta A (A - A_0)$, т.е. приращения образования диеновых конъюгатов (ДК) в процессе перекисного окисления липидов, регистрировали во времени при $\lambda = 234$ нм на двухлучевом спектрофотометре (Perkin Elmer, США). Для исключения влияния спектра поглощения ААРН в кювету сравнения добавляли такое же количество ААРН, как и в рабочую кювету, а вместо дисперсии липосом – такой же объем буфера. Добавление 100 мкл 70%-го этанола вместо экстрактов при формировании «чистых» липосом не изменяло параметры окисления по сравнению с «бесспиртовыми» липосомами в пределах ошибки измерений.

Основными показателями, которые использовали при изучении кинетики образования ДК, были: τ – период индукции, $V_{\rm m}$ – максимальная скорость окисления, $t_{\rm m}$ – время достижения $V_{\rm m}$ [16, 27]. Спектры поглощения этанольных экстрактов *Алое* регистрировали в диапазоне 200–700 нм на вышеупомянутом спектрофотометре.

Метод динамического светорассеяния. Для определения среднего размера липосом в суспензии использовали метод динамического светорассеяния. Измерения проводили на высокочувствительном приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм, рассеянного на липосомах под углом 173° [21]. Концентрация ФХ-липосом с введенным экстрактами Алое составляла ≈0.5 мг/мл, температура 25°С, индекс полидисперсности варьировал в пределах 0.23-0.25. Для каждой пробы осуществляли регистрацию пяти-семи распределений интенсивности по размерам частиц, усреднение проводили по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния с погрешностью не более ±5%. При измерении ζ-потенциала липосом прибор использовали в режиме регистрации электрофоретической подвижности частиц, по которой рассчитывали распределение для ζ-потенциала. Усреднение максимальных значений ζ-потенциала проводили по трем повторным измерениям. Калибровку проводили по стандартной дисперсии полистирольного латекса с погрешностью

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

 $\pm 5\%$. Суммарная ошибка составляла не более $\pm 10\%$.

Методы статистической обработки. Результаты экспериментов представлены как средняя величина \pm стандартная ошибка средней при помощи программного пакета Microsoft® Office Excel. Статистическую обработку результатов измерений осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента [22]. Различия считали статистически достоверными при уровне различия $p \leq 0.05$. Измерения повторяли не менее трех раз. Погрешность определения ингибирующей активности экстрактов Алое не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сначала были изучены спектры поглощения этанольных экстрактов всех исследованных видов Алое (рис. 1). Они существенно различались между собой. Наибольшее поглощение компонентами всех экстрактов наблюдается в диапазоне 200-400 нм, что характерно для фенольных соединений [20]. Это относится к таким веществам, содержащимся в листьях Алое, как алоин, алоэнин, алоэ-эмодин, алоэзин, алоэрезин, алоэнозид и др. [23-26]. Для A. arborescens содержание алоэнина составляет 20.7% от суммы фенольных соединений, на долю алоинов приходится 26.2% [24]. Для A. arborescens и A. vera, эти фенольные метаболиты определяют, главным образом, антирадикальную активность [25, 26]. Спектры поглощения трех чистых метаболитов Алое приведены в работе [23]. Для алоэнина максимумы полос поглощения 218 и 308 нм, для алоэрезина - 216 и 302 нм, у барбалоина – четыре пика поглощения: при 226, 270, 298 и 360 нм [23]. Сопоставление этих и наших данных (рис. 1) позволяет качественно оценить вклад указанных фенольных метаболитов в спектральные характеристики экстрактов исследуемых видов Алое. Так, основной максимум поглощения этанольного экстракта листьев A. arborescens (спектр 1) отмечен около 300 нм. что может свидетельствовать о наличии в нем алоина, алоэнина, алоэрезина, как и отмечалось в [23, 24]. Для этанольного экстракта листьев A. pillansii (спектр 3) характерны три ярко выраженные полосы поглощения в области 270, 300 и 360 нм, что предполагает наличие в нем не только алоина, алоэнина, алоерезина, но и других фенольных метаболитов. Похожий спектр поглощения имеет экстракт A. vera (спектр 2), однако концентрации его составляющих в полтора-два раза меньше. Для экстракта A. marlothii (спектр 5) можно отметить две полосы поглощения вблизи 300 и 250 нм. Экстракт A. congolensis (спектр 4) имеет очень высокий пик вблизи 230 нм. Возможно, в этом случае доминирует максимум поглощения барбалоина, присутствующего в высокой концентрации, на фоне поглощения алоэнина,



Рис. 1. Спектры поглощения 70%-х этанольных экстрактов пяти видов *Anoe:* 1 - A. *arborescens,* 2 - A. *vera,* 3 - A. *pillansii,* 4 - A. *congolensis,* 5 - A. *marlothii.* Разведение в 200 раз.

алоерезина и других близких метаболитов. Не исключено также наличие во всех изученных экстрактах антронов, антрохинонов, алоэсапонаринов, производных эмодина, также имеющих несколько полос поглощения в этой области спектра [1].

Определение суммарного содержания фенольных соединений в изученных экстрактах (СФС в мг-экв галловой кислоты на 1 г сухого листа) показало небольшие и близкие их значения для *A. arborescens* и *A. vera* (рис. 2). В экстрактах остальных видов их уровень был в пять-шесть раз выше. Исходя из этих данных, можно отметить высокую способность к биосинтезу вторичных фенольных метаболитов у *A. pillansii*, A. *marlothii* и A. *congolensis* в сравнении с «традиционными» видами *Алое*.

Следующим этапом нашего исследования явилось изучение процессов инициированного окисления липосом из ФХ и ингибирования окисления экстрактами Алое, введенными в липосомы. Механизм и соответствующие уравнения инициированного ААРН радикально-цепного окисления жирных кислот (ЖК) в липосомах подробно рассмотрены в работах [14, 16, 27, 28]. На рис. 3 представлены сравнительные кинетические кривые образования ДК (в процессе инициированного окисления липосом без экстракта Алое и с включенными в них экстрактами пяти видов Алое с равными значениями $C = m_{C.Л.}/m_{\Phi X}$, где $m_{C.Л.} - m_{C.Л.}$ масса сухих листьев в введенном в липосомы объеме экстракта в мг, $m_{\Phi X}$ – масса ΦX в липосомах в мг.

При одинаковых значениях *С* значительно более продолжительные периоды индукции демонстрируют экстракты 5 (*A. marlothii*) и 4 (*A. con*- golensis) (см. рис. 3). Накопление ДК в максимуме кривой 5 несколько выше, чем у других (~10%), что, возможно, связано с присутствием в экстракте *A. marlothii* фитостеролов или других липидных субстратов [1]. Максимальная скорость окисления липосом, от которой зависит τ , заметно снижается у кривых 4 и 5 по сравнению с остальными кривыми, что в значительной степени связано с расходованием к этому времени ненасыщенных липидов ФХ, от концентрации которых главным образом и зависит скорость окисления [16, 27, 28]. При больших временах окисления на скорость может влиять также снижение концентрации AAPH [27]. Учитывая величину молярного коэф-



Рис. 2. Содержание фенольных соединений (СФС, в мг-экв галловой кислоты на г сухого листа) в этанольных экстрактах листьев изученных видов *Алое:* 1 - A. *arborescens,* 2 - A. *vera,* 3 - A. *pillansii,* 4 - A. *congolensis,* 5 - A. *marlothii;* * - p < 0.05 по отношению к образцу 1.



 $0 \quad \tau \quad t_m \quad 100 \quad 200 \quad 300$

 $A - A_0$

1.2

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

Рис. 3. Кинетика образования ДК в процессе инициированного окисления ФХ-липосом: 0 – без введения в них экстрактов, с введенными экстрактами: 1 – *A. arborescens,* 2 – *A. vera,* 3 – *A. pillansii,* 4 – *A. congolensis,* 5 – *A. marlothi,* [ФХ] = 0.1 мг/мл, [ААРН] = 0.33 мМ, C = 0.14 мг_{С.Л.}/мг_{ФХ}, T = 37°С, A – оптическая плотность ДК при 234 нм, A_0 – оптическая плотность при t = 0 мин, $V_{\rm m}$ – максимальная скорость окисления, $t_{\rm m}$ – время достижения $V_{\rm m}$, τ – период индукции.

фициента поглощения ДК при $\lambda = 234$ нм, равную 274000 М⁻¹ см⁻¹ [15, 16], по наклону касательной можно определить максимальную скорость $V_{\rm m}$ формирования ДК для всех кинетических кривых на рис. 3 (см. таблицу). Максимальная скорость окисления липосом с включенным экстрактом 4 (*A. congolensis*) снижается по сравнению с $V_{\rm m}$ для

липосом с экстрактом 1 (A. arborescens) примерно в два раза. Если учесть, что $\tau = t_m - (A - A_0)_m / V_m$ (рис. 3), то оценки влияния снижения V_m на τ показывают, что для больших значений t_m (рис. 3, кривые 4 и 5) эти изменения для τ не очень значительны (~5–7%) и меньше общей погрешности определения АОА.

Для сравнения степени ингибирования окисления липосом экстрактами Алое мы приняли безразмерный параметр ($\tau - \tau_0$)/ τ_0 , где τ_0 – период индукции в отсутствие экстрактов для кривой 0 $(\tau_0 = (5.0 \pm 0.5)$ мин), обусловленный кинетикой процесса накопления ДК и зависящий от концентраций ФХ и ААРН [16, 27-29]. Для ААРН скорость инициирования радикалов $R_i = k_i [AAPH],$ где $k_{\rm i} = 1.3 \cdot 10^{13} \cdot {\rm e}^{-112600/RT}$ – константа скорости этой реакции [29]. При $T = 37^{\circ}$ С, $k_{i} = 1.36 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$. Согласно законам жидкофазного окисления углеводородов и липидов с квадратичным обрывом цепей, при неингибированном окислении скорость образования ДК (гидропероксидов HP) d[HP]/dt = $=k_{\rm p}/(2k_{\rm t})^{0.5}$ -[LH]· $R_{\rm i}^{0.5}$, где $k_{\rm p}$ и $k_{\rm t}$ – эффективные константы скорости продолжения и обрыва цепей окисления, [LH] - концентрация окисляемых липидов. Для ингибированного окисления $d[HP]/dt = k_p/2k_i[AO] \cdot [LH_o] \cdot R_i$, где [AO] – концентрация ингибитора (антиоксиданта). Если [AO] снижается линейно со временем ($[AO] = [AO]_0$ – $-R_{i}t/f$, то по окончании ингибирования [AO] = 0, а $t = \tau$, и для разных кинетических кривых на рис. 3 можно сделать сравнительные оценки величин $f [AO]_0 = R_i \tau$, где f – стехиометрический коэффи-

Результаты экспериментов после их статистической обработки

№ образца и вид Алое	$V_{\rm m} \pm { m SD},$	$[AO]_0 f, \pm SD,$	$y = a_n x + b$	$AOA \pm SD$, нмоль
	нМ/мин	мкМ		Tr _{экв} /мг _{С.Л.}
0	117.2 ± 1.2	-	_	_
1. A. arborescens	91.2 ± 1.5	0.43 ± 0.03	y = 73.88x + 0.91	22.8 ± 2.0
			$r^2 = 0.9899$	
2. A. vera	$80.3 \pm 2.7*$	$0.54 \pm 0.03^{*}$	y = 96.04x + 0.20	$30.2 \pm 2.1*$
			$r^2 = 0.9977$	
3. A. pillansii	54.7 ± 1.7*	$1.38 \pm 0.04*$	y = 357.02x + 1.12	$112.3 \pm 8.6*$
			$r^2 = 0.9941$	
3. A. congolensis	43.8 ± 2.9*	$2.94 \pm 0.04*$	y = 732.87x - 1.63	$230.2 \pm 9.1*$
			$r^2 = 0.9984$	
3. A. marlothii	47.4 ± 3.2*	$4.08 \pm 0.05^{*}$	y = 996.65x + 2.11	$310.4 \pm 11.2^*$
			$r^2 = 0.9983$	

Примечание. В таблице представлены: максимальная скорость окисления ($V_{\rm m}$) на кривых, показанных на рис. 3; величины [AO]₀ f и уравнения регрессии $y = a_n x + b$ (n = 1-5) для зависимостей ($\tau - \tau_0$)/ τ_0 от С (рис. 4); значения антиоксидантной активности. Показатели $V_{\rm m}$, AOA и [AO]₀ f выражены как среднее ± стандартное отклонение; * – p < 0.05 по отношению к показателям образца 1.

циент ингибирования, $[AO]_o - «эффективная» на$ чальная концентрация антиоксиданта в образце. $При [AAPH] = 0.33 мМ, <math>R_i = 0.45$ нМ/с. Расчет $f \cdot [AO]_o$ для исследуемых экстрактов приведен в таблице. Все величины выражены как средняя величина ± стандартная ошибка средней.

Зависимости параметра ($\tau - \tau_0$)/ τ_0 от (*C*) представлены на рис. 4.

В указанных пределах *С* эти зависимости линейны (p < 0.01), а наклон их определяет ингибирующую (антиокислительную) активность экстрактов *Алое*. Из этих зависимостей были получены соответствующие уравнения регрессии (y = ax + b) для пяти образцов липосом (см. таблицу).

Для выражения ингибирующей (антиоксидантной) активности экстрактов *Алое* в эквивалентах тролокса ($\text{Tr}_{\text{экв}}$) была проведена калибровка с этанольным раствором тролокса ($\underline{C} = 1 \text{ мM}$), вводимом в известных объемах (V) в липосомы. АОА исследуемых образцов определялась по калибровочной прямой зависимости (τ - τ_0)/ τ_0 для тролокса от его удельного содержания в ФХ-липосомах ($\underline{C} \cdot V$, нмоль $\text{Tr}/m_{\Phi X}$, мг). В таблице представлены результаты определения АОА изученных экстрактов в $\text{Tr}_{3 \text{кв}}$, т.е. в нмоль $\text{Tr}_{3 \text{кв}}/\text{мг}_{\text{С.Л}}$.

Как видно из таблицы, по значениям АОА лидируют образцы 5 (A. marlothii) и 4 (A. congolensis), они имеют антиокислительную активность в 13 и 10 раз выше по сравнению с A. arborescens, однако значение СФС у них только в 5–6 раз выше, чем у А. arborescens (рис. 2), а «эффективная» концентрация *f*·[AO]₀ – в 9 и 6 раз. Для образца З (A. pillansii) эта разница сглаживается: СФС и АОА больше этих величин для A. arborescens в 4.4 и в 4.8 раза, причем спектр экстракта A. pillansii заметно выше остальных, что свидетельствует о главном вкладе в АОА этого экстракта активных фенольных соединений. Все это свидетельствует о сложном антиоксидантном профиле в экстрактах этих растений и значительной разнице в АОА составляющих их фенольных компонентов.

В разных модельных системах фенольные метаболиты *Алое* проявляют, как правило, неодинаковую AOA. На модели со стабильным ДФПГ-радикалом и методом ORAC (oxygen-radical absorbing capacity) для экстрактов разных частей листьев A. *arborescens* были определены значения антирадикальной активности [25, 30–32]. Для экстрактов из целых листьев A. *arborescens* значения антирадикальной активности составили 71 мкМ Tr_{экв} с ДФПГ-радикалом и 2671 мкМ Tr_{экв} в ORAC-си-



Рис. 4. Зависимости $(\tau - \tau_0)/\tau_0$ от удельного содержания сухих листьев в экстракте, введенном в липосомы, к массе ФХ в липосомах (C, мг_{С.Л.}/мг_{ФХ}) для: 1 - A. arborescens, 3 - A. pillansii, 4 - A. congolensis, 5 - A. marlothi. Для A. vera эта зависимость практически совпадает с зависимостью 1, поэтому не приведена.

стеме. Такая разница объясняется значительным отличием в этих системах активности к захвату радикалов ДФПГ и ААРН разными фенольными метаболитами. На этих моделях определены также антирадикальные активности чистых вторичных фенольных метаболитов - алоина, алоэ-эмодина, алоэрезина, алоэзина А, алоэзона, алоэнина А. Для первого метода самыми активными оказались алоэзон, алоэзин, алоэ-эмодин (351, 343 и 222 мк
М $\mathrm{Tr}_{_{\mathrm{ЭКВ}}}),$ для второго — алоэрезин A и алоэ-эмодин (144 и 116 мкМ Тг_{экв}), остальные метаболиты проявили в 2-30 раз меньшую антирадикальную активность [25]. Алоин, считающийся главным антиоксидантом в *Алое*, показал в $Д\Phi$ -ПГ-системе меньшую антирадикальную активность (90 мкМ Tr_{экв}), как и в системе ORAC (84 мкМ Тг_{экв}) [25]. Масс-спектроскопический скрининг A. arborescens [25] и A. vera [25,33] выявил такие классы антиоксидантов, как антроны (алоин, алоэсапонарин), пироны (алоэнин), хромоны (алоэзин, алоэрезин), флавоны, гидроксикислоты (хлорогеновая, феруловая, кофейная) и др. [33].

Для нашей модельной системы в свободно-радикальных цепных реакциях инициированного окисления ненасыщенных липидных компонентов в бислое липосом кроме пероксидного радикала (инициатора ААРН) образуются промежуточные радикальные интермедиаты жирных кислот фосфолипидов (алкильные, пероксильные и



Рис. 5. Средний размер (D, показан столбиками на диаграмме) и ζ-потенциал липосом: θ – без экстрактов, 1 - A. arborescens, 2 - A. vera, 3 - A. pillansii, 4 - A. congolensis, 5 - A. marlothii, $C = 0.14 \text{ мг}_{\text{С.Л}}/\text{мг}_{\text{ФХ}}$, [Φ X] = 0.5 мг/мл; * - p < 0.05 по отношению к образцу θ .

др. радикалы), с которыми взаимодействуют антиоксиданты экстрактов и обрывают цепь окисления [15, 16, 27, 28]. Подобные реакции происходят и в мембранах клеток живых организмов [34], поэтому ингибирование окисления липосом антиоксидантами при $T = 37^{\circ}$ С дает более реальную «физиологичную» модель для определения АОА различных соединений. Наблюдаемое в нашей работе значительное превышение АОА *A. marlothii и A. congolensis* над АОА *A. arborescens* и *A. vera* может свидетельствовать о наличии в листьях этих видов *Алое* фенольных метаболитов с высокой ингибирующей активностью в сложных свободно-радикальных процессах, протекающих в процессе перекисного окисления липидов.

Введение экстрактов *Алое* в липосомы приводит к перераспределению компонентов *Алое* в разных частях липосомы: в липидном бислое локализуются липофильные соединения, а в центральной части гидрофильные. Это приводит к изменению структуры бислоя липосом и их физико-химических характеристик [35, 36], в частности размера и поверхностного заряда (ζ-потенциала) [21, 37]. Эти характеристики для липосом с экстрактами Алое, введенными в липосомы, представлены на рис. 5.

Можно отметить, что наиболее активные экстракты (экстракты 3, 4 и 5) достоверно уменьшают средний размер липосом в сравнении с «чистыми» липосомами, в то время как экстракты с меньшей АОА (экстракты 1 и 2) увеличивают размер липосом. Эта тенденция сохраняется и для других значений удельной концентрации. Размер

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

«чистых» липосом зависит, главным образом, от условий их приготовления и жирнокислотного состава используемого ФХ и уменьшается с увеличением в нем процентного содержания полиненасыщенных ЖК [38]. С введением в липосомы экстрактов Алое их жирорастворимые компоненты встраиваются в различные области липидного слоя липосом [35, 36, 39]. Они могут взаимодействовать с группами липидных полярных головок на границе раздела «липид-вода» мембран и защищать липидный бислой от агрессивных молекул. Если повреждающая молекула является окислителем, этот защитный эффект может способствовать общему антиоксидантному действию экстракта. «Ригидификация» липидной мембраны компонентами экстракта может препятствовать диффузии в нее кислорода и радикалов ААРН, снижая скорость окислительных реакций и повышая ингибирование окисления липидов. Возможно, с таким изменением структуры липидного бислоя и связано уменьшение среднего размера липосом, наблюдаемое нами для экстрактов 3, 4 и 5 (рис. 5). Компоненты экстракта 2, по-видимому, проявляют противоположный эффект при встраивании в липидный слой, как бы «разрыхляя» его и увеличивая размер липосом.

Уплотнение липидного бислоя активными компонентами экстрактов 3 и 4 приводит к перестройке его структуры и, возможно, переориентации и перегруппировке фосфолипидов в нем, что приводит к уменьшению абсолютной величины отрицательного ζ -потенциала соответствующих липосом по сравнению с этим значением для «чистых» липосом [21]. Для экстрактов 1 и 2 наблюдается небольшое (\approx 5%) увеличение отрицательного ζ -потенциала липосом, однако это только тенденция, достоверного различия нет.

выводы

Проведено сравнительное исследование кинетики ингибирующего действия этанольных экстрактов пяти видов *Алое* в модельной системе ААРН-индуцированного окисления липосом из ФХ и выявлены новые виды *Алое: А. marlothii* и *A. congolensis,* обладающие, соответственно, в 13 и 10 раз большей антиоксидантной активностью, чем традиционные виды *Алое: А. arborescens и A. vera.* Значения суммарного содержания фенольных соединений в исследуемых экстрактах *Алое* различаются только в 5–6 раз для *А. arborescens* и *А. marlothii* и *А. congolensis,* что может свидетельствовать о наличии в последних активных фенольных антиоксидантов в высоких концентрациях. Проведен анализ спектров поглощения изученных экстрактов на основе спектров поглощения основных индивидуальных фенольных метаболитов *Алое*, который показал значительную разницу в составе изученных видов *Алое*. Установлено влияние введенных в липосомы экстрактов на их размер: наиболее «активные» экстракты *А. marlothii, А. congolensis* и *А. pillansii* уменьшают средний размер липосом в сравнении с «чистыми» липосомами, а экстракты с меньшей АОА увеличивают, что, вероятно, связано с изменением липидной структуры липосом компонентами экстрактов.

Результаты работы позволяют рекомендовать *A. marlothii, A. congolensis* и *A. pillansii* для более глубокого изучения их биологической активности и создания на их основе различных медицинских препаратов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- B. Salehi, S. Albayrak, H. Antolak, et al., Int. J. Mol. Sci. 19, 2843. (2018).
- M. Akaberi, Z. Sobhani, B. Javadi, et al., Biomedicine & Pharmacotherapy 84, 759 (2016).
- D. I. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, R. Sendón, A. Sanches-Silva, Trends Food Sci. Technol. 61, 94 (2017).
- 4. E. Misawa, M. Tanaka, K. Nomaguchi, et al., Agric. Food. Chem. 60, 2799 (2012).
- I. Cock, In Novel Natural Products: Therapeutic Effects in Pain, Arthritis and Gastro-intestinal Diseases, Ed. by K. Rainsford, M. Powanda, and M. Whitehouse (Springer, Basel, 2015), pp. 179–235.
- N. Ghannam, M. Kingston, I. A. Al-Meshaal, et al., Horm. Res. Pediatr. 24, 288 (1986).
- 7. R. Lawrence, P. Tripathi, and E. Jeyakumar, Braz. J. Microbiol. 40, 906 (2009).
- Q. Pan, H. Pan, H. Lou, et al., Cancer Cell Int. 13, 69 (2013).
- S.-Y. Lin, W.-W. La, C.-C. Ho, et al., Anticancer Res. 29, 327 (2009).
- M.E. Clement, G.Tringali, D. Triggiani, B. Giardina, Nat. Prod. Commun. 10 (11), 1993 (2015).
- Н. Н. Сажина, П. В. Лапшин и Н. В. Загоскина, Химия растит. сырья, № 2, 169 (2015).
- N. P. Palmina, E. L. Maltseva, V. I. Binjukov, et al., Biophysics 63 (1), 53 (2018).

- A. H. Thomas, A. Catala, and M. Vignoni, Biochim. Biophys. Acta 1858, 139 (2016).
- 14. M. Mosca, A. Cerlie, and L. Ambrosone, Chemistry and Physics of Lipids **164**, 158 (2011).
- 15. A. V. Lokhmatikov, N. Voskoboynikova, D. A. Cherepanov, et al., Oxidative Medicine and Cellular Longevity **1**, 1 (2016).
- N. N Sazhina, A. S. Antipova, M. G. Semenova, and N. P. Palmina, Rus. J. Bioorg. Chem. 45 (1), 34 (2019).
- 17. N. Kuznetsova, A. Kandyba, V. Vostrov, et al., J. Drug Delivery Sci. Technol. **19** (1), 51 (2009).
- 18. M. G. Semenova, Food Hydrocolloids 68, 114 (2017).
- 19. M. G. Semenova, A. S. Antipova, L. E. Belyakova, et al., Food Hydrocolloids **42**, 149 (2014).
- М. Н. Запрометов, Фенольные соединения и методы их исследования. Биохимические методы в физиологии растений, (М.: Наука. 1971). 185.
- 21. Н. Н. Сажина, И. Г. Плащина, М. Г. Семенова и Н. П. Пальмина, Коллоид. журн. **82** (1), 89 (2020).
- 22. К. Дерффель, Статистика в аналитической химии (Мир, М., 1994).
- 23. Y. Gutterman and E. Chauser-Volfson, Biochemical Systematics and Ecology **28** (9), 825 (2000).
- 24. Д. Н. Оленников, И. Н. Зилфикаров и Т. А. Ибрагимов, Химия растит. сырья, № 3, 77 (2010).
- 25. L. Lucinia, M. Pellizzonia, R. Pellegrinob, et al., Food Chemistry **170**, 501 (2015).
- 26. Д. Н. Оленников, И. Н. Зилфикаров, Т. А. Ибрагимов и др., Химия растительного сырья, № 3, 83 (2010).
- 27. P. A. C. McPherson, A. Bole, K. A. Cruz, et al., Chem. Phys. Lipids **165**, 682 (2012).
- 28. I. Pinchuk and D. Lichtenberg, Chem. Phys. Lipids **178**, 632014 (2014).
- E. T. Denisov and I. B. Afanas'ev, Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology (Boca Raton: CRC Press. 2005).
- 30. A. Seyoum, K. Asres, and F. K. El-Fiky, Phytochemistry **67**, 2058 (2006).
- H. Hu, X. Hu, and H. Qiuhui, J. Agricul. Food Chem. 51, 7788 (2003).
- D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodil, et al., J. Agricul. Food Chem. 50, 4437 (2002).
- 33. S. Lee, S. G. Do, S. Y. Kim, et al., J. Agricul. Food Chem. **60**, 11222 (2012).
- Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов и З. К Майзус, Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе, (Наука, М., 1965).
- N. P. Palmina, E. L. Maltseva, V. I. Binjukov, et al., Biophysics 63 (1), 53 (2018).
- 36. A. R. Neves, C. Nunes, H. Amenitsch, and S. Reis, Soft Matter **12**, 2118 (2016).
- S. Gal1, L. Pinchuk, and D. Lichtenberg, Chem. Phys. Lipids 126, 95 (2003).
- E. A. Tehrany, C. J. F. Kahn, C. Baravian, et al., Colloids Surfaces B: Biointerfaces 95, 75 (2012).

39. P. Strugała, S. Cyboran-Mikołajczyk, A. Dudra, et al., J. Membrane Biol. **249**, 393 (2016).

Kinetics of Initiated Oxidation of Phosphatidylcholine Liposomes with Introduced Aloe Extracts and Determination of Their Antioxidant Activity

N.N. Sazhina*, P.V. Lapshin**, and N.V. Zagoskina**

*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

Numerous species of the genus *Aloe* have attracted the attention of researchers because of different biological benefits and their capacity to act as antioxidants. This paper presents a comparative study of the kinetics of the inhibitory effect of ethanol extracts of five species of *Aloe* which was made using a model system of the oxidation of phosphatidylcholine liposomes. It was found that plant extracts of *A. marlothii* and *A. congolensis*, have higher antioxidant activity (by a factor of 13 and 10, respectively) than the best known *Aloe* species: *A. arborescens* and *A. vera*. The total phenolic content values of *A. marlothii* and *A. congolensis* are higher than those of *A. arborescens* and *A. vera* but in a lesser degree (by a factor of 5–6) than antioxidant activity was. This may indicate the presence of very active phenolic antioxidants in *A. Marlothii* and *A. congolensis*. Analysis of the influence of extracts introduced into liposomes on the liposome size showed that the most active extracts of *A. marlothii*, *A. congolensis* and *A. pillansii* reduce the average liposome size compared to pure liposomes, and extracts with weaker antioxidant activity increase it, what is probably due to changes in the lipid structure of liposomes by the components of extracts. Based on the results obtained, *A. marlothii*, *A. congolensis* are suitable for studying other types of their biological activity that might contribute to new drug development.

Keywords: Aloe, phenolic metabolytes, kinetics, oxidation, liposomes, phosphatidylcholine

УДК 577.352.2

СВОЙСТВА ИОННЫХ КАНАЛОВ, ОБРАЗОВАННЫХ ПРИ ОДНОСТОРОННЕМ ДЕЙСТВИИ АМФОТЕРИЦИНА И N-МЕТИЛПРОИЗВОДНОГО АМФОТЕРИЦИНА В БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2021 г. Т.Д. Пашазаде, Х.М. Касумов

Институт ботаники НАН Азербайджана, AZ1004, Баку, Патамдартское шоссе, 40 E-mail: turkan303@mail.ru Поступила в редакцию 25.12.2019 г. После доработки 09.03.2021 г. Принята к публикации 10.03.2021 г.

Установлено, что при односторонней модификации липидных мембран амфотерицином В и N-метилпроизводным амфотерицина В (метамфоцином) наблюдается дискретное увеличение проводимости мембран по канальному механизму. Найдены условия, при которых амфотерицин В увеличивает проводимость мембран при одностороннем введении его к мембранам. Эффект одностороннего действия амфотерицина В наблюдается в кислой среде (pH 3.0) и при меньшей (в два раза) концентрации фосфолипидов в мембраноформируюшем растворе. Выявлена большая дисперсия проводимости одиночных каналов – от 2 до 20 пСм. С наибольшей вероятностью появляются каналы величиной 10 пСм. Гистограмма распределения величины проводимости метамфоциновых каналов показывает, что с наибольшей вероятностью появляются каналы величиной 5 пСм. Избирательная проницаемость мембран при одностороннем введении метамфоцина преимущественно анионная и не зависит от концентрации холестерина в мембране. В основе механизма одностороннего действия амфотерицина В и метамфоцина лежит формирование ими в мембранах полупор, асимметричных по своему строению. Предполагается, что избирательная проницаемость амфотерициновых и метамфоциновых каналов определяется молекулярной структурой гидрофильной цепи, выстилающей внутреннюю полость полупоры.

Ключевые слова: полиеновые антибиотики, амфотерицина В, N-метилпроизводное амфотерицина В, липидные мембраны, проводимость, проницаемость мембран, ионные каналы.

DOI: 10.31857/S000630292103011X

Несмотря на большое количество публикаций. касаюшихся механизма взаимолействия полиеновых антибиотиков (ПА) с клеточными и бислойными липидными мембранами (БЛМ), содержащих стерины, до сих пор остается неясной взаимосвязь между структурой молекул антибиотиков и их свойствами в мембранах [1-3]. Основным представителем класса ПА является амфотерицин В, химическая структура которого показана на рис. 1. В химической структуре ПА имеется лактонное кольцо, содержащее гидрофобную цепочку с определенным числом двойных связей и гидрофильную цепь, в состав которой входят несколько гидроксильных и карбонильных групп. В основе биологического действия ПА лежит формирование ими в липидных и клеточных мембранах в комплексе со стеринами структурных ионных каналов молекулярных размеров с определенной проводимостью, проницаемых для ионов и органических соединений [4–10]. Из всех изученных ПА наибольшей биологической активностью обладает амфотерицин В.

Нарушение функций стеринсодержащих клеток эукариотов в присутствии полиенов связано с изменением проницаемости цитоплазматических мембран [11]. Увеличение проводимости липидных мембран неароматическими антибиотиками (амфотерицин В, нистатин, микогептин) только при наличии их с обеих сторон мембраны, казалось, несколько не согласуется с односторонним биологическим действием антибиотиков. Расхождение данных в первую очередь связано с неадекватными условиями действия полиенов с одной стороны клеточных и липидных мембран. При введении полиенов в культуральную среду концентрация последних с внутренней стороны

Сокращения: ПА – полиеновые антибиотики, БЛМ – бислойные липидные мембраны.



Рис. 1. Структурная формула амфотерицина В.

клеточных мембран сравнительно быстро приближается к его концентрации в среде. Однако в экспериментах на бислойных мембранах трудно добиться таких условий из-за большого объема окружающей среды. Тем не менее исследования показали, что при достаточно малом объеме водного раствора с противоположной от антибиотика стороны мембраны наблюдается интегральное нарастание проводимости мембраны [12]. Эффект ПА с одной стороны мембраны подтверждается исследованиями на липосомах и на клетках [11, 13]. Анионная избирательная проницаемость амфотерицина В на бислойных липидных мембранах [10], а также односторонний эффект на плазматических мембранах [11] и только двухсторонний эффект на БЛМ [4] побудили нас детально исследовать на бислоях эффект одностороннего действия амфотерицина В и его N-метилпроизводного. На рис. 2 показана структура Nметилпроизводного амфотерицина В.

Обнаружено, что, в отличие от амфотерицина В, нистатина и микогептина, N-метилпроизвод-

ное амфотерицина В увеличивает проводимость липидных мембран по канальному механизму, когда находится с одной стороны мембраны при нейтральных растворах pH. В данной работе выявлены условия одностороннего действия амфотерицина В, изучены свойства N-метилпроизводного амфотерицина В и амфотерицина В при введении их с одной стороны мембраны, представлены данные экспериментальных исследований об избирательности и величине проводимости при формировании односторонних проводящих каналов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бислойные мембраны получали из общих фосфолипидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга. Общие фосфолипиды очищали от нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили при 0°С в хлороформ-метанольном растворе (в соотношении 2:1) в концентрации 20 мг/мл и 10 мг/мл. Затем к этим липидам добавля-



Рис. 2. Структурная формула N-метилпроизводного амфотерицина В (метамфоцина). Буквой R обозначено место, где производилось метилирование полярной аминной и карбоксильной группы молекулы амфотерицина В [14].



Рис. 3. Одиночные ионные каналы, формируемые с одной стороны мембраны амфотерицином В в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ М при мембранном потенциале +200 мВ (знак «+» со стороны антибиотика). Состав водного раствора: 2 М КСl, рН 3.0, $t = 22^{\circ}$ С. Состав мембранного раствора: 10 мг фосфолипидов и 4 мг холестерина в 1 мл гептана.

ли необходимое количество перекристаллизованного холестерина в соответствующих концентрациях. Мембраны формировали на отверстии в тефлоновой ячейке диаметром 0.3 мм. В работе были использованы исходный амфотерицин В, N-метилпроизводное амфотерицина В, а также другие производные амфотерицина В, любезно предоставленные нам проф. В.А. Вайнштейном из Санкт-Петербургского Государственного химико-фармацевтического Университета. Антибиотики растворяли в диметилсульфоксиде в концентрации 1 мг/мл и затем использовали в качестве маточного раствора. Из маточного раствора микрошприцом антибиотики вводили в водные растворы, окружающие мембрану. Маточный раствор антибиотиков хранили в течение недели. Электрические характеристики БЛМ измеряли с помощью метода фиксации мембранного потенциала и тока, используя электрометрический усилитель постоянного тока Keithley-301 (США) и двухкоординатный самописец Endim (RFT, Германия). При образовании БЛМ мембраноформирующие растворы готовили из фосфолипидов, выделенных из бычьего мозга, которые смешивали с холестерином в различных соотношениях. Был использован перекристаллизованный холестерин фирмы Sigma (США). Для стабилизации рН водных растворов использовали буферные системы в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. Проводимость немодифицированной мембраны составляла 2-3 пСм в растворах 0.1 М КСІ и 2 М КСІ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При введении амфотерицина В с обеих сторон мембраны при концентрации 10^{-6} М наблюдалось резкое увеличение проводимости мембран вплоть до проводимости электродов. Введение амфотерицина В к мембранам с холестерином в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М не изменяло проводимо-

сти мембран в течение длительного времени (≥ 1 ч). Однако при детальном исследовании были обнаружены ионные каналы и высокая проводимость мембран, содержащих холестерин, при действии амфотерицина В с одной стороны мембраны с низким содержанием фосфолипидов в мембране (10 мг/мл) и с низким значением рН водного раствора (рН 3.0). Введение амфотерицина В в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ М с одной стороны мембраны приводит к появлению на мембране ионных каналов. На рис. 3 показана запись одиночных ионных каналов, формируемых амфотерицином В с одной стороны мембраны.

На рис. 4 приведена гистограмма распределения проводимости одиночных каналов. На ней видна большая дисперсия проводимости одиночных каналов - от 2 до 20 пСм. С наибольшей вероятностью появляются каналы от 7 до 10 пСм. Время сборки каналов не зависит от величины и направления электрического поля.Избирательная проницаемость мембран при одностороннем введении амфотерицина В преимущественно анионная и не зависит от концентрации холестерина в мембране. При создании десятикратного градиента проникающего иона (2 M → 0.2 M) разность потенциалов, возникающая на мембране, составляет величину -42 ± 2 мВ, если антибиотик находится в растворе 2M KCl и ток течет со стороны антибиотика. При создании десятикратного градиента проникающего иона с противоположной (не содержащей антибиотика) стороны мембраны величина разности потенциалов примерно вдвое меньше и составляет величину -22 ± 3 мВ. Таким образом, результаты показывают, что наибольшая величина потенциала достигается в том случае, когда градиент проникающего иона создается со стороны антибиотика. При обратном направлении градиента величина мембранного потенциала вдвое меньше. Указанная величина разности потенциалов в обоих направлениях не зависит от концентрации амфотерицина В в пределах $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6}$ М с одной стороны мембраны.

Эффект одностороннего действия амфотерицина В зависит от концентрации фосфолипидов в липидном бислое. Если мембраны формируются из липидного раствора, содержащего 10 мг/мл фосфолипидов с холестерином в гептане, то всегда наблюдается односторонний эффект амфотерицина В, который полностью воспроизводим. При более высоких концентрациях фосфолипидов в мембраноформирующем растворе эффект одностороннего действия не воспроизводится.

Сборка одиночных ионных каналов происходит при концентрациях амфотерицина B, сравнимых с концентрациями для получения симметричных каналов ($2 \cdot 10^{-8}$ M). В отличие от симметричных каналов число асимметричных



Рис. 4. Гистограммы распределения проводимости одиночных каналов при одностороннем действии амфотерицина В $(2 \cdot 10^{-8} \text{ M})$ при разных направлениях электрического тока. Одиночные каналы получены при мембранном потенциале 200 мВ. Мембраны формировали из общего липидного раствора, содержащего 10 мг фосфолипидов: 10 мг холестерина в 1 мл гептана, в растворах 2 M KCl, pH 3.0, $t = 22^{\circ}$ С. Гистограмма (а) соотвествует знаку (–) в растворе с антибиотиком, гистограмма (б) – знаку (+) в растворе с антибиотиком. N – число каналов.

каналов не зависит от концентрации холестерина в мембраноформирующем растворе в пределах 2-10 мг/мл холестерина при фиксированной концентрации амфотерицина В. Независимость числа каналов от концентрации холестерина в мембране при фиксированной концентрации амфотерицина В показывает, что молекулы холестерина, по-видимому, не формируют проводящие каналы в комплексе с антибиотиком, а создают необходимые условия для сборки каналов из нескольких молекул амфотерицина В. Роль фосфолипидов и рН при одностороннем эффекте амфотерицина В в настоящее время не совсем ясна. Изменение концентрации фосфолипидов и величины рН может влиять на физическое состояние липидного бислоя и, тем самым, на пространственную ориентацию и упаковку молекул антибиотика относительно плоскости мембраны.

На рис. 5 приведена зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В с одной стороны мембраны. Эта зависимость степенная и при разных концентрациях холестерина в мембране имеет одинаковый показатель степени n = 4 (при симметричной модификации мембран антибиотиком этот показатель равен n = 8).

Асимметричные амфотерициновые каналы блокируются тетраэтиламмонием только со стороны антибиотика. Уменьшение интегральной проводимости мембран наблюдается при концентрации тетраэтиламмония 3 · 10⁻³ М. Эта концентрация в 10 раз больше, чем та, которая необходима для блокирования симметричных каналов [15]. Исследование проводимости при действии

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

алкильных производных амфотерицина В с одной стороны мембраны показало, что на всех алкильных производных, кроме метамфоцина, в нейтральных pH не удается зарегистрировать одиночные каналы. После добавки антибиотиков в концентрации до $1 \cdot 10^{-5}$ M с одной стороны мембраны при повышенной концентрации холестерина в мембране (соотношение фосфо-



Рис. 5. Зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В с одной стороны мембраны в растворе 2 М КСl, pH 3.0, $t = 22^{\circ}$ С. Состав водного раствора: 2 М КСl, pH 3.0, $t = 22^{\circ}$ С. Состав мембранного раствора: 10 мг фосфолипидов и 4 мг холестерина в 1 мл гептана.



Рис. 6. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии метамфоцина: (а) – метамфоцин с обеих сторон мембраны при концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ M, (б) – метамфоцин с одной стороны мембраны при концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ M. Мембраны формировали из фосфолипидов мозга с холестерином в водном растворе 2 M KCl, pH 6.5, $t = 23^{\circ}$ C. Весовое соотношение фосфолипид : холестерин составляет 20 : 1. Потенциал на мембране 200 мВ.

липид: холестерин равно 2:1) проводимость мембран не изменялась в течении 40 мин, в то время как при двустороннем введении антибиотиков в существенно меньших концентрациях (в 100-1000 раз) одиночные каналы наблюдались спустя 5-10 мин. Метиловый эфир амфотерицина В и N-ацетил-амфотерицин В при соответствующих рН, когда нейтрализованы оба заряда, также не образуют одиночных каналов с одной стороны мембраны даже при концентрации 1 · 10⁻⁴ М. Исключение составляет метамфоцин. Это единственное производное, которое вызывает дискретные изменения проводимости при введении его с одной стороны мембраны. На рис. 6 приведены сравнительные записи одиночных метамфоциновых каналов при двухсторонней и односторонней модификации мембран. Проводимость, селективность и характер поведения одиночных каналов при одностороннем действии метамфоцина на мембрану оставались такими же, как и при двухстороннем введении этого антибиотика.

Зависимость проводимости мембран от концентрации метамфоцина, как и от концентрации амфотерицина В, при односторенней модификации мембран с холестерином степенная с показателем степени n = 4. Этот показатель остается таким же, как и при симметричной модификации

мембран метамфоцином. Эти данные показывают, что в сборке полупоры участвуют четыре молекулы метамфоцина. Такая же степенная зависимость наблюдается и при симметричной модификации мембран метамфоцином. Гистограмма распределения величины проводимости метамфоциновых полупор показывает, что с наибольшей вероятностью появляются каналы с проводимостью 5 пСм. Избирательная проницаемость мембран при одностороннем введении метамфоцина преимущественно анионная и не зависит от концентрации холестерина в мембране. При создании десятикратного градиента проникающего иона (2 М \rightarrow 0.2 М) разность потенциалов, возникающая на мембране, составляет -46 ± 2 мВ, если антибиотик находится в растворе 2M KCl и ток течет со стороны антибиотика. При создании десятикратного градиента проникающего иона с противоположной (не содержащей антибиотика) стороны мембраны величина разности потенциалов примерно вдвое меньше и составляет -24 ± 3 мВ. Проводящий канал, по-видимому, представляет собой полупору. В пользу этого предположения говорят данные по изменению величины разности потенциалов при градиенте проникающего иона, блокированию тетраэтиламмонием асимметричных каналов только со стороны антибиотика, а также несимметричные вольтамперные характеристики мембран при односторонней модификации амфотерицином В [16]. Данные по одностороннему действию показывают, что антибиотики, у которых полностью отсутствуют заряды (при соответствующих рН) на аминных и карбоксильных группах молекул, не образуют каналы. Односторонний эффект метамфоцина, повидимому, связан с повышенной проницаемостью через мембрану молекул этого соединения в силу того, что полное метилирование полярных групп делает молекулу более липофильным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Амфотерицин В и нистатин известны как основные противогрибковые лекарственные средства [17, 18]. Несмотря на наличие большого количества ПА и их производных, ни один из них по эффективности своего действия не может сравнится с амфотерицином В при лечении системной грибковой инфекции. В последние годы усилия ученых направлены на получение новых модифицированных форм ПА и разработку способов их доставки в пораженные органы и ткани [19]. Интерес к противогрибковым препаратам увеличился еще больше из-за высокой распространенности ВИЧ-инфекции [20]. Имеются данные о том, что около 90% ВИЧ-инфицированных поражены грибковой инфекцией из-за резкого ослабления иммунной системы [21]. Кроме того, при трансплантации различных органов

и костного мозга пациентам назначают иммуносупрессивные препараты. Однако они создают условия для появления у ВИЧ-больных грибковых инфекций [22]. Растущий интерес ученых к ПА стимулировал необходимость еще более углубленного изучения механизма их действия. Использование антибиотиков с известной молекулярной структурой позволяет изучать механизм одностороннего действия ПА на молекулярном уровне. Небольшие различия в гидрофильной цепи с измененным числом гидроксильных и карбонильных групп существенно влияют на проводимость и селективность канала [10]. Уведичение числа двойных связей в гидрофобной части молекул полиена приводит к более высокой биологической активности антибиотиков [4]. Измерение анион-катионной селективности каналов, образованных полиенами, показала, что анионная селективность, а также проводимость каналов снижаются среди антибиотиков: амфотерицин В – нистатин. Избирательная проницаемость липидных мембран зависит от структуры гидрофильной цепи полиеновой молекулы. Так, амфотерицин В, нистатин и микогептин эффективно увеличивают проводимость БЛМ для одновалентных анионов только при наличии их с обеих сторон мембраны [10]. В молекуле микогептина на одну карбонильную группу больше, чем в молекулах амфотерицина В и нистатина. Через микогептиновые каналы анионы и катионы проникают примерно одинаково. Проведенные исследования показали, что модификация мембран амфотерицином В с одной стороны приводит к такой же селективности, как и при двухстороннем введении антибиотика. Проводимость одиночных полупор примерно такая же, как и проводимость канала, образующаяся при двухстороннем введении антибиотика. Для выяснения молекулярной природы селективности каналов требуется синтез новых молекул с измененной химической структурой. Биологический синтез и химическая трансформация молекул ПА – вот реальный путь получения новых производных ПА с новыми физико-химическими свойствами [23, 24]. Наибольший интерес представляет модификация полиеновой молекулы по гидрофильной цепи, составляющая внутреннюю полость канала, и, как показывают исследования, только эта система в молекулах полиенов отвечает за величину проводимости и избирательную проницаемость мембран для ионов.

выводы

Полученные данные показывают, что путем встраивания в мембраны амфотерицина В и N-метилпроизводного амфотерицина В можно формировать односторонние каналы проницаемости

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

и экспериментально осуществить трансмембранный перенос ионов внутрь клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (грант № EIF-BGM-3-BRFTF-2+/ 2017-15/12).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Y. Nakagawa, Y. Umegawa, N. Matsushita, et al., Biochemistry **55** (24), 3392 (2016).
- A. Neumann, M. Wieczor, J. Zielinska, et al., Langmuir 32 (14), 3452 (2016)
- J. M. Falcón-González, G. Jiménez-Domínguez, I. Ortega-Blake, et al., J. Chem. Theory and Computation 13 (7), 3388 (2017).
- X. М. Касумов, Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков (Наука, М., 2009).
- 5. S. S. Efimova, L. V. Schagina, and O. S. Ostroumova, Acta Naturae **6** (4), 67 (2014).
- H. Kagohashi, O. Shirai, Sh. Kubota, et al., Electroanalysis 26 (3), 625 (2014).
- 7. D. M. Kamiński, Eur. Biophys. J. **43** (10–11), 453 (2014).
- 8. K. Boukari, S. Balme, J. M. Janot, et al., J. Membrane Biol. **249** (3), 261 (2016).
- 9. T. Shahmoradi, M. Ashrafpour, and H. Sepehri, J. Babol University of Medical Sciences 18 (2), 26 (2016).
- 10. A. A. Samedova, T. P. Tagi-zade, and Kh. M. Kasumov, Rus. J. Bioorg. Chem. **44** (3), 337 (2018).
- T. S. Yang, K. L. Ou, P. W. Peng, et al., Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes 1828 (8), 1794 (2013).
- 12. R. Brutyan and P. McPhee, J. Gen. Physiol. 107, 69 (1996).
- S. Kintali, G. K. Varshney, and K. Das, Chem. Select. 3 (38), 10559 (2018).
- 14. В. А. Вайнштейн, Г. Е. Гринберг, М. А. Михайлова и др., в Сб. матер. симпоз. «Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов» (Рига, 1982), с. 235.
- M. P. Borisova, L. N. Ermishkin, and A. Y. Silberstein, Biochim. Biophys. Acta 553, 450 (1979).
- М. П. Борисова, Л. Н. Ермишкин и А. Я. Зильберштейн, Биофизика 26 (6), 1093 (1978).

- 17. M. Liu, M. Chen, and Z. Yang, Drug Delivery **24** (1), 1 (2017).
- E. Grela, M. Wieczór, R. Luchowski, et al., Mol. Pharmaceut. 15 (9), 4202 (2018).
- J. He, Ch. Chipot, X. Shao, and W. Cai, J. Phys. Chem. 117 (22), 11750 (2013).
- 20. S. De Marie, R. Janknegt, and I. A. J. Bakker-Woudenberg, J. Antimicrob. Chemother. **33**, 907 (1994).
- 21. A. Mamidi, J. A. DeSimone, and R. J. Pomerantz, J. Neurovirol. 8, 158 (2002).
- 22. K. A. Sepkowitz, Clin. Infect. Dis. 34, 1098 (2002).
- D. S. Palacios, L. Dailey, D. M. Siebert, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108 (17), 6733 (2011).
- 24. M. N. Preobrazhenskaya, E. N. Olsufyeva, S. E. Solovieva, et al., J. Med. Chem. 52, 189 (2009).

Ion Channel Properties in Response to One-Sided Action of Amphotericin B and Its N-Methyl Derivative in Bilayer Lipid Membranes

T.D. Pashazade and Kh.M. Kasumov

Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences, Patamdartskoye shosse 40, Baku, AZ1004 Azerbaijan

It was found that the one-sided modification of lipid membranes with amphotericin B and its N-methyl derivative (metamphocin) causes an increase in membrane conductance contributed by ion channels in discrete steps. The conditions under which amphotericin B increased membrane conductance when it was added to one side of the membrane were determined. The effect of one-sided action of amphotericin B was observed with a pH value of 3.0 and when the phospholipid concentration was decreased by 2 fold in the membrane forming solution. Channels displayed a wide range of single-channel conductance from 2 pS to 20 pS. The formation of channels with single channel conductance of 10 pS is most probable. A histogram of the conductance distribution of metamphocin channels shows that channels with conductance of 5 pS are most likely to appear. Selective membrane permeability when metamphocin is added to one side of the membrane is predominantly anionic and independent of the concentration of cholesterol in the membrane. The mechanism of one-side action of amphotericin B and metamphocin is based on the formation of half-pores, asymmetric in their structure, by these antibiotics. It is suggested that selective permeability of amphotericin and metamphocin channels is determined by the molecular structure of the hydrophilic chain that lines a half-pore on the inside.

Keywords: polyene antibiotics, amphotericin B, N-methyl derivative of amphotericin B, lipid membranes, conductance, membrane permeability, ion channel УДК 577.3

КИНЕТИКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ В ГИПОМАГНИТНОМ ПОЛЕ

© 2021 г. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Е.Е. Фесенко

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

E-mail: docmag@mail.ru Поступила в редакцию 15.02.2021 г. После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 27.02.2021 г.

Показано, что 30-минутная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле, создаваемом системой магнитных экранов из пермаллоя (остаточное постоянное магнитное поле не превышает 20 нТл), приводит к существенному снижению (на 48%) интенсивности ее люцигенин-зависимой хемилюминесценции, определенной сразу после окончания воздействия гипомагнитных условий. Через 20 мин после пребывания в гипомагнитных условиях (при последующей 20-минутной инкубации нейтрофилов в геомагнитном поле) степень проявления различий между контрольными и опытными образцами полностью сохраняется. При увеличении длительности последующей после пребывания в «нулевом» магнитном поле инкубации экспериментальных образцов в геомагнитном поле (постоянное поле 44 мкТл) до 40 и 60 мин различия между ними и соответствующими контрольными группами образцов уменьшаются до 32 и 22%.

Ключевые слова: гипомагнитное поле, геомагнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, люцигенин, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302921030121

Свободные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК) могут представлять собой потенциальные молекулы для модуляции биологических функций в ответ на действие «нулевого» магнитного поля [1]. В литературе сообщается о снижении продукции АФК в гипомагнитных условиях в различных типах клеток [2-5]. Ранее нами было показано, что экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомагнитных условиях вызывает снижение внутриклеточной продукции АФК, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [6-8]. Этот эффект гипомагнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции химическими активаторами респираторного взрыва и, следовательно, не обусловлен нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы [6, 7]. Для оценки радикалпродуцирующей способности нейтрофилов после действия «нулевого» поля мы применили и другой метод - метод активированной хемилюминесценции с использованием люцигенина, селективного зонда на супероксид-анион [9, 10], с помощью которого было показано существенное снижение интенсивности их люцигенин-зависимой хемилюминесценции в этих условиях [11].

При анализе эффектов гипомагнитных условий на продукцию АФК биологическими объектами одним из важных и практически неизученных вопросов остается экспериментальная оценпродолжительности последействия этих ка условий, т. е. определение временного периода, в котором проявляются остаточные эффекты «нулевого» магнитного поля (МП) после прекращения его прямого действия. Для изучения временной динамики продукции АФК в данной работе мы применили уже хорошо зарекомендовавший себя в предыдущих исследованиях по этой теме метод люцигенин-зависимой хемилюминесценции [11], позволяющий в течение относительно короткого времени (несколько минут) оценить изменение скорости продукции АФК [9–11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мы-

Сокращения: А Φ К — активные формы кислорода, МП — магнитное поле, ГМП — геомагнитное поле.

шей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей-самцов линии CD-1 массой 24-26 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино, Московская область). В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 МКЛ суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/ мл (Zymozan A из Saccharomyces carevisiae, Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, их брюшную полость промывали четырьмя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 4 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли не менее чем на 1 ч при 4°С (но не более чем на 3 ч, так как более длительное хранение в этом случае снижало хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на последующую добавку люцигенина). Эта процедура позволяла снизить спонтанную хемилюминесценцию нейтрофилов и перевести эти клетки в «одинаковое» состояние, характеризующееся их равномерным хемилюминесцентным ответом, что обеспечивало возможность работы с ними в течение экспериментального дня. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%. Для опытов образцы получали, разводя суспензию нейтрофилов средой Хенкса (окончательный состав среды: 138 мМ NaCl, 6 MM KCl, 1 MM MgSO₄, 1 MM Na₂HPO₄, 5 мМ NaHCO₃, 5.5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в «нулевом» и геомагнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при 37.0 ± 0.1°С в концентрации 1 млн кл/мл по 0.25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметр – 1.2 см, длина – 5.5 см), в которых затем измеряли хемилюминесценцию. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного водного термостата.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле (ГМП) с постоянной составляющей ~ 44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц в 15—50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними (также одновременно проводили последующую регистрацию хемилюминесценции контрольных и экспериментальных образцов в опытах с одинаковой продолжительностью их инкубации). Опытные образцы помещали в установку для формирования гипомагнитных условий на 30 мин, затем в образцах регистрировали люцигенин-зависимую хемилюминесценцию (сразу после окончания инкубации в «нулевом» МП — опыты с временем последействия «0» мин). Другие опытные группы образцов сразу после окончания действия «нулевого» поля переносили в условия инкубации в геомагнитном поле на 20, 40 и 60 мин с последующей регистрацией хемилюминесценции после окончания инкубации. Каждой экспериментальной группе образцов соответствовала своя контрольная группа, инкубируемая одновременно с опытной, но только в условиях ГМП.

В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура — установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП – до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 20 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [8, 12]. Установка состояла из трех вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм). Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр – 20 см, длина – 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее шести). Опыты повторяли не менее трех раз.

Регистрация хемилюминесценции. После инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0.35 мМ. В работе был использован 12-канальный хемилюминометр Lum-1200 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применяли программу «PowerGraph». Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

30-минутная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле приводит к существенному снижению интенсивности ее люцигенин-зависимой хемилюминесценции, определенной сразу после окончания воздействия гипомагнитных условий (приблизительно на 48%) (рис. 1–3). Через 20 мин после пребывания в гипомагнитных условиях (при последующей



Рис. 1. Влияние «нулевого» магнитного поля на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов в зависимости от продолжительности последующей инкубации в геомагнитном поле. По оси ординат — максимальная интенсивность хемилюминесценции в условных единицах (средние значения и стандартные отклонения, n = 6), по оси абсцисс — время инкубации в геомагнитном поле после пребывания в «нулевом» МП. Светлые столбики контроль, темные столбики — опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля (P < 0.05).

20-минутной инкубации в ГМП) степень проявления различий между контрольными и опытными образцами полностью сохраняется (различия составляют 49%) (рис. 1–3). При увеличении длительности последующей после пребывания в «нулевом» МП инкубации экспериментальных образцов в ГМП до 40 и 60 мин различия между



Рис. 2. Временная динамика последействия «нулевого» магнитного поля в отн. ед., нормализованных относительно контрольных значений (средние значения и стандартные отклонения, n = 6). По оси абсцисс – время инкубации в геомагнитном поле после пребывания в «нулевом» МП. Светлые столбики – контроль, темные столбики – опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля (P < 0.05).

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

ними и соответствующими контрольными группами образцов уменьшаются соответственно до 32 и 22% (рис. 1–3). Следует отметить, что увеличение времени инкубации и в контроле, и в опыте само по себе сопровождается снижением интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов, что может быть связано с активацией антиоксидантных систем в этих клетках [13, 14] или расходом эндогенных восстановительных эквивалентов (НАДН, НАДФН) [10]. Последующие эксперименты помогут установить, имеют ли отношение эти естественные процессы к механизмам действия «нулевого» поля. Против этого, однако, свидетельствует динамика эффекта «нулевого» поля с максимумами ответа именно на ранние сроки наблюдений.

Полученные нами данные о наличии по крайней мере 20-минутного временного периода последействия гипомагнитных условий на скорость продукции АФК нейтрофилами, в котором степень выраженности эффект действия «нулевого» поля (снижение продукции АФК) полностью сохраняется, имеет помимо фундаментального значения выраженный прикладной (методический) аспект. Действительно, в ряде случаев крайне затруднительно проводить прямое изучение действия «нулевого» поля с помощью стандартной исследовательской аппаратуры, так как сама эта аппаратура является источником магнитных помех. Да и извлечение образцов при исследовании из гипомагнитных условий в условия окружающего ГМП приводит к существенному изменению их магнитного окружения. Наличие обнаруженного нами относительно продолжительного периода последействия у этого физического фактора в принципе позволяет планировать и проводить эксперименты с разобщением (в течение определенного времени) пребывания объектов исследования в гипомагнитных условий и регистрации эффекта их действия с помощью измерительной аппаратурой, что может способствовать прогрессу в этой области исследований.

В заключение следует отметить особую важность и перспективность изучения эффектов «нулевого» магнитного поля в целом для биоэлектромагнитных исследований. Наряду с прикладными аспектами уже обнаруженного неблагоприятного действия гипомагнитных условий на процессы эмбрионального развития [15–17], морфогенез [18–20] и поведенческие реакции [21, 22] изучение этих эффектов может способствовать определению первичных «работающих» мишеней действия слабого магнитного поля в биологических объектах [1, 5, 23, 24].



Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП при различных временах последующей инкубации в геомагнитном поле: (a) -0 мин (без инкубации в ГМП), (6) -20 мин, (в) -40 мин, (г) -60 мин; 1 – контроль, 2 – опыт.

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. B. Zhang and L. Tian, Bioelectromagnetics **41** (8), 573 (2020).
- H. Zhang, Z. Zhang, W. Mo, et al., Prot. Cell 8 (7), 527 (2017).
- 3. C. F. Martino and P. R. Castello, PLoS One 6 (8), e22753 (2011).

- 4. P. Politanski, E. Rajkowska, M. Brodecki, et al., Bioelectromagnetics **34**, 333 (2013).
- V. N. Binhi and F. S. Prato, PLoS One 12 (6), e0179340 (2017).
- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика 63 (3), 484 (2018).
- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, Биофизика 64 (4), 720 (2019).
- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика 65 (2), 524 (2020).
- T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 47, 673 (1987).
- А. А. Джатдоева, Е. В. Проскурнина, А. М. Нестерова и др., Биологич. мембраны 34 (6), 116 (2017).
- В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика 65 (4), 735 (2020).
- 12. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (1), 97 (2020).

- 13. F. Barnes and S. Kandala, Bioelectromagnetics **39**, 249 (2018).
- F. Barnes and B. Greenebaum, Bioelectromagnetics 41, 392 (2020).
- 15. M. Osipenko, L. Mezhevikina, I. Krasts, et al., Biophysics **53**, 317 (2008).
- 16. K. Trukhanov, T. Gur'eva, O. Dadasheva, et al., Radiats. Biol. Radioecol. **54**, 179 (2014).
- 17. В. В. Крылов, Е. А. Осипова, Н. А. Панкова и др., Биофизика **62** (4), 825 (2017).
- В. В. Новиков, И. М. Шейман и Е. Е. Фесенко, Биофизика 52 (5), 912 (2007).

- 19. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, Bioelectromagnetics **29**, 387 (2008).
- A. V. Van Huizen, J. M. Morton, L. J. Kinsey, et al., Sci. Adv. 5, eaau7201 (2019).
- 21. B. Zhang, H. Lu, W. Xi, et al., Neurosci. Lett. **371**, 190 (2004).
- 22. V. N. Binhi and R. M. Sarimov, Electromagn. Biol. Med. 28, 310 (2009).
- F. Barnes and B. Greenebaum, Bioelectromagnetics 36, 45 (2015).
- 24. V. O. Ponomarev and V. V. Novikov, Biophysics **54**, 163 (2009).

Kinetics of the Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils after Incubation in a Hypomagnetic Field

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, and E.E. Fesenko

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

It was shown that 30-min incubation of neutrophils in the presence of a near null magnetic field produced with the use of permalloy for magnetic shielding (the residual static magnetic field not greater than 20 nT) leads to a significant decrease (by 48%) in the intensity of lucigenin-dependent chemiluminescence measured directly after removal of the hypomagnetic field. In 20 min after being in hypomagnetic conditions (followed by 20 min of incubation of neutrophils in the geomagnetic field), the degree of severity of differences between the control and experimental samples is completely preserved. When time periods of incubation of experimental samples in the geomagnetic field 44μ T) were extended (40 min and 60 min) after exposure to a near null magnetic field, the differences between experimental and appropriate control groups of samples were smaller, up to 32 and 22%.

Keywords: hypomagnetic field, geomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, lucigenin, chemiluminescence ==== БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ ==

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ СТРАХА НА СИСТЕМУ С ЗАДЕРЖКОЙ «ХИЩНИК–ЖЕРТВА» С УБЕЖИЩЕМ ДЛЯ ЖЕРТВЫ ПРИ НАЛИЧИИ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ПИЩИ

© 2021 г. С. Мондал, Г.П. Саманта

Индийский Институт инженерных наук и технологии, Шибпур, Ховрах-711103, Индия E-mail: sudeshnamondal43@gmail.com, gpsamanta@math.iiests.ac.in Поступила в редакцию 26.06.2020 г. После доработки 08.07.2020 г.

Принята к публикации 25.07.2020 г.

В ходе полевых экспериментов на наземных позвоночных было замечено, что прямое нападение при взаимодействии хищника и жертвы может не только повлиять на динамику популяции, но и косвенно повлиять на страх хищника (ощущаемый жертвой) через химические и/или голосовые сигналы, может также снизить воспроизводство жертвы и изменить ее историю жизни. В настоящей работе исследовано влияние страха на жертву с помощью системы «хищник-жертва» Беддингтона-ДеАнгелиса, включающей убежище жертвы и наличие дополнительной пищи. Во-первых, обсуждена положительность и равномерная ограниченность решений, которые делают предлагаемую систему хорошо работающей. Вводятся критерии существования, анализ локальной и глобальной устойчивости всех состояний равновесия. Далее представлены условия возникновения транскритических бифуркаций. Кроме того, изучен устойчивый характер точки равновесия сосуществования для различных комбинаций факторов задержки; обнаружено, что непрерывное увеличение параметров задержки может переключить стабильность равновесия со стабильной спирали на стабильные колебания предельного цикла через сверхкритическую бифуркацию Хопфа. Для проверки аналитических результатов с помощью MATLAB было выполнено обширное численное моделирование. Численно влияние убежища добычи на выживание хищника было представлено с помощью введения дополнительной пищи.

Ключевые слова: убежище жертвы, эффект страха, дополнительная пища; локальные бифуркации, глобальная стабильность, временные задержки.

DOI: 10.31857/S0006302921030133

1. ВВЕДЕНИЕ

В экологии и эволюционной биологии одной из важных тем является взаимодействие хищника и жертвы, которое преобразует энергию с одного трофического уровня на более высокие трофические уровни. В целом размер популяции жертвы и структура сообщества могут регулироваться хищниками. Иногда влияние хищников на виды добычи может варьироваться в зависимости от различных ситуаций. Оно может быть прямым и смертельным, а может быть косвенным и не истребляющим. В случае прямого воздействия хищник съедает добычу [1], и это давняя точка зрения в модели «хищник-жертва». В случае косвенного воздействия страх перед хищником наводится на популяцию жертвы и, как следствие, влияет на уровень рождаемости и вызывает изменения в поведении жертвы [2].

В литературе есть много исследовательских работ по моделям «хищник-жертва» с функцио-

нальными реакциями Холлинга II типа (зависимыми только от жертвы) [3-5], функциональными реакциями Беддинга-ДеАнгелиса (зависимыми как от жертвы, так и от хищника, без сингулярности на низком уровне размера популяции) [6, 7] и функциональными реакциями, зависящими от соотношения хищников и жертв (зависимости как жертв, так и хищников с сингулярностью при малом размере популяции) [8]. Однако в этих исследованиях хищник убивает добычу напрямую. Но недавние полевые экспериментальные исследования показали, что косвенное воздействие (эффект страха) на виды-жертвы более эффективно, чем прямое воздействие на динамику популяций экологических систем [9, 10]. Страх перед хищником (ощущаемый добычей) создает психологический стресс для жертв, поскольку они всегда опасаются возможного нападения. В результате снижается скорость воспроизводства добычи и изменяется ее жизненный цикл. В подтверждение этого упоминается, что в

экосистеме Большого Йеллоустоуна волки (Canis *lupus*) влияют на репродуктивную физиологию лося (Cervus elaphus) [11]. Когда виды-жертвы распознают сигнал хищника (химический/голосовой), они тратят больше времени на то, чтобы внимательно следить за обнаружением опасности, а не на поиски пищи. Таким образом, рождаемость испуганной жертвы снижается, и она применяет некоторые механизмы выживания, такие как голодание [9, 12]. Например, некоторые птицы реагируют на звук хищника путем защиты от хищников [9, 12] и убегают из своих гнезд при первых признаках опасности [12]. Такое поведение против хищников может повлиять на выживание и воспроизводство птиц [12]. Экспериментально исследовано, что при отсутствии прямого умерщвления воспроизводство потомства певчих воробьев (Melospiza melodia) может быть уменьшено на 40% в результате воздействия чувства страха, создаваемого хищником [10]. Таким образом, это сокращение, вызванное антихищническим поведением, влияет на рождаемость и выживаемость потомства. Следовательно, цена страха (помимо прямого хищничества) должна быть внесена во взаимодействие хищник-жертва. В 2016 г. авторы работы [13] впервые предложили математическую модель взаимодействия хищника и жертвы, рассматривая страх хищника у видов-жертв, когда рождение жертв снижается изза уровня страха (ощущаемого жертвой). В работе [14] авторы исследовали динамику модели с задержкой «хищник-жертва» с влиянием эффекта страха при наличии дополнительной пищи. В 2019 г. авторы работы [15] изучали влияние эффекта страха в системе хищник-жертва, включающей убежище для добычи. Недавно в работе [16] была проанализирована динамика модели с задержкой «хищник-жертва» с учетом нелинейной функции убежища жертвы под влиянием эффекта страха и дополнительной пищи.

В данной статье мы исследовали эффект страха в системе «хищник-жертва», включающей убежище жертвы с функциональной реакцией Беддингтона-ДеАнджелиса в присутствии дополнительной пищи. На самом деле добыче требуется некоторое время для оценки риска нападения хищников после улавливания химических и/или голосовых сигналов. Также хищник не может мгновенно переваривать пищу. Требуется некоторое время задержки, известное как задержка беременности. Итак, в предлагаемой модели мы включили временную задержку т₁ в уменьшенную рождаемость жертвы из-за страха хищника и временную задержку τ_2 в член взаимодействия [17]. Обычно экологическая система дестабилизируется из-за запаздывания.

Система теряет свою устойчивость и претерпевает колебания предельного цикла через бифур-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

кацию Хопфа выше критического значения задержки [18]. Следовательно, включение временных задержек делает нашу предлагаемую систему более реалистичной, чем система без задержки.

Данная работа организована следующим образом: Раздел «Конфигурация модели» посвящен формулировке предлагаемой системы на основе некоторых биологических допущений. В разделе «Положительность и равномерная ограниченность» мы доказали положительность и равномерную ограниченность решений системы. Условия равномерной непрерывности изучаются в разделе «Равномерная устойчивость». В следующем разделе («Критерии вымирания») мы обсудили критерии вымирания обеих популяций. Раздел «Точки равновесия и анализ их устойчивости» описывает критерии выполнимости и анализ локальной устойчивости всех положений равновесия вместе с анализом глобальной устойчивости каждого из положений равновесия и условиями возникновения локальных бифуркаций для каждого граничного равновесия. В разделе «Влияние дискретных временных задержек» мы проанализировали природу устойчивости и существование сверхкритической бифуркации Хопфа в точке равновесия сосуществования при различных комбинациях параметров запаздывания (τ_1 и τ_2). В следующем разделе («Численное моделирование»)мы подтвердили аналитические выводы с помощью численных расчетов с использованием МАТLАВ. Наконец, в последнем разделе дается краткое заключение.

2. КОНФИГУРАЦИЯ МОДЕЛИ

При построении предлагаемой системы мы делаем следующие допущения.

1. Популяция добычи растет по логистической кривой в отсутствие хищника, что регулируется следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{dx}{dt} = rx - d_1 x - a_1 x^2, \qquad (2.1)$$

где x представляет популяцию жертвы в момент времени t, r – коэффициент рождаемости добычи, d_1 – коэффициент естественной смертности жертвы, a_1 – коэффициент смертности из-за внутривидовой конкуренции между особями жертвы.

Пусть у – биомасса хищника.

Чтобы учесть эффект страха, мы умножаем монотонно убывающую функцию $\phi(k,y) = 1/(1 + ky)$ [29] на коэффициент рождаемости (*r*) популяции жертв, где *k* представляет собой уровень страха, снижающий рождаемость добычи. Функция $\phi(k,y)$ удовлетворяет следующим условиям :

$$(i)\phi(0,y) = 1,$$

(ii)
$$\phi(k,0) = 1$$
,
iii) $\lim_{k \to \infty} \phi(k, y) = 0$,
iv) $\lim_{y \to \infty} \phi(k, y) = 0$,
(v) $\frac{\partial \phi(k, y)}{\partial k} < 0$,
(vi) $\frac{\partial \phi(k, y)}{\partial y} < 0$.

(

Модифицируем дифференциальное уравнение (2.1):

$$\frac{dx}{dt} = \frac{rx}{1+ky} - d_1x - a_1x^2$$

2. Хищнику предоставляется дополнительный корм постоянной биомассы *A*, которая равномерно распределена в естественной среде. Количество встреч одного хищника с дополнительной пищей пропорционально биомассе дополнительной пищи. Константа пропорциональности характеризует способность хищника идентифицировать дополнительную пищу [19–21].

3. Убежище жертвы — это концепция, которая может защитить популяцию жертвы от хищников, путем укрытия в местах, где их нелегко найти или недоступных для хищников. Если количество mx жертв не подвержено риску хищничества, где параметр убежища жертвы $m \in (0,1)$, тогда хищнику доступно x(1 - m) жертв для истребления [22].

4. Хищник потребляет и добычу, и дополнительную пищу в соответствии с функциональной реакцией Беддингтона—ДеАнгелиса [6, 7, 23, 24, 25].

На основе этих допущений можно сформулировать предлагаемую модель следующим образом:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{rx}{1+ky} - d_1 x - a_1 x^2 - \frac{a_2 (1-m) xy}{1+\alpha \eta A + b (1-m) x + ey},$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{ca_2 \{(1-m) x + \eta A\} y}{1+\alpha \eta A + b (1-m) x + ey} - d_2.$$
(2.2)

Начальные условия:

d

$$x(0) > 0, y(0) > 0.$$
(2.3)

Здесь d_2 — естественная смертность хищника, a_2 — максимальная скорость потребления хищником, *b* отражает время взаимодействия хищника с жертвой, *c* — коэффициент преобразования, член ηA обозначает эффективный уровень пищи, *a* представляет качество дополнительной пищи, а *е* интерпретирует взаимное вмешательство между хищниками.

Лемма 2.1 [26]. Предположим, что $a_1 > 0$ и $b_1 > 0$ при x(0) > 0, тогда (i) для дифференциального неравенства $\frac{dx}{dt} \le x(t)(a_1 - b_1x(t)), \lim_{t \to \infty} x(t) \le \frac{a_1}{b_1}$ и (ii) для дифференциального неравенства $\frac{dx}{dt} \ge (t)(a_1 - b_1x(t)), \lim_{t \to \infty} x(t) \ge \frac{a_1}{b_1}$.

3. ПОЛОЖИТЕЛЬНОСТЬ И РАВНОМЕРНАЯ ОГРАНИЧЕННОСТЬ

Теорема 3.1. Каждое решение системы (2.2) с (2.3) однозначно существует и положительно в $(0, \infty)$ для всех $t \ge 0$.

Доказательство. Решение (x(t), y(t)) уравнения (2.2) с начальными условиями (2.3) существует и единственно в (0, ξ), где 0 < $\xi \le +\infty$ [27].

Из (2.2) и (2.3) следует:

$$x(t) = x(0) \exp\left[\int_{0}^{t} \left\{\frac{r}{1+ky(s)} - d_{1} - a_{1}x(s) - \frac{a_{2}(1-m)y(s)}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x(x) + ey(s)}\right\} ds\right] > 0,$$

$$y(t) = y(0) \exp\left[\int_{0}^{t} \left\{\frac{ca_{2}\{(1-m)x(s) + \eta A\}}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x(s) + ey(s)} - d_{2}\right\} ds\right] > 0.$$

Следовательно, система (2.2) положительно инвариантна для всех $t \ge 0$.

Теорема 3.2. Все решения системы (2.2), которые начинаются внутри положительного квадранта (в двумерном пространстве), равномерно ограничены, если $d_2(1 + \alpha \eta A) > ca_2 \eta A$.

Доказательство. Из (2.2) имеем:

$$\frac{dx}{dt} \le \frac{rx}{1+ky} - d_1x - a_1x^2,$$

$$\frac{dx}{dt} \le rx - d_1x - a_1x^2,$$

$$\frac{dx}{dt} \le x[(r-d_1) - a_1x].$$

Используя лемму 2.1, получим:

$$\lim_{t \to \infty} x(t) \le \frac{r - d_1}{a_1}$$

Теперь имеем:

$$\frac{dW}{dt} = \frac{dx}{dt} + \frac{1}{c}\frac{dy}{dt}, \text{ rge } W = x + \frac{y}{c}.$$

$$\therefore \frac{dW}{dt} = \frac{rx}{1+ky} - d_1x - a_1x^2 - \frac{a_2(1-m)xy}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} + \frac{a_2\{(1-m)x + \eta A\}y}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} - \frac{d_2y}{c},$$

$$\Rightarrow \frac{dW}{dt} = \frac{rx}{1+ky} - d_1x - a_1x^2 + \frac{a_2\eta Ay}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} - \frac{d_2y}{c},$$

$$\frac{dW}{dt} \le rx - d_1x + \frac{a_2\eta Ay}{1+\alpha\eta A} - \frac{d_2y}{c},$$

$$\frac{dW}{dt} \le rx - d_1x - \frac{y}{c} \bigg[d_2 - \frac{ca_2\eta A}{1+\alpha\eta A} \bigg].$$

Пусть
$$\xi = \min \left\{ d_1, \left(d_2 - \frac{c a_2 \eta A}{1 + \alpha \eta A} \right) \right\}$$
 при условии

 $d_2(1 + \alpha \eta A) > ca_2 \eta A$. Тогда (для большого времени *t*) имеем:

$$a_l$$
 (поскольку $\frac{rx}{1+ky} \le rx$ и $\lim_{t\to\infty} x(t) \le \frac{r-d_1}{a_1}$

 $\frac{dW}{t} + \xi W \le r \left(\frac{r - d_1}{t} \right)$

Используя неравенство Гронвалла, получим:

$$0 < W(x(t), y(t)) \le r \left(\frac{r-d_1}{a_1 \xi}\right) (1-e^{-\xi t}) + e^{-\xi t} W(x(0), y(0))$$

$$\therefore 0 < W(x(t), y(t)) \le r \left(\frac{r-d_1}{a_1 \xi}\right), \text{ при } t \to \infty.$$

Таким образом, все решения системы (2.2) входят в область:

$$B = \left\{ (x, y) : 0 < x(t) \le \frac{r - d_1}{a_1}; 0 < W(x(t), y(t)) \le r\left(\frac{r - d_1}{a_1\xi}\right) \right\}.$$
(3.1)

Следовательно, система (2.2) равномерно ограничена при всех $t \ge 0$.

4. РАВНОМЕРНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

В математической экологии постоянство означает долгосрочное выживание в будущем всех популяций, которые существуют изначально.

Определение: Система (2.2) называется равномерно устойчивой (постоянной или сильно устойчивой), если существует $\varepsilon > 0$ такое что (x(t), y(t)) из (2.2) удовлетворяет условиям:

$$\underset{t \to \infty}{\liminf} x(t) \ge \epsilon \text{ и } \liminf_{t \to \infty} y(t) \ge \epsilon$$
при любом $x(0) > 0, y(0) > 0.$

Сформулируем и докажем теорему о постоянстве системы (2.2).

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

Теорема 4.1. Система (2.2) с (2.3) равномерно устойчива при условии

$$\frac{r}{1+kM_2} - d_1 - \frac{a_2(1-m)}{c} > 0$$

и $(ca_2 - bd_2)(1 - m)\kappa - d_2(1 + \alpha \eta A) + ca_2 \eta A > 0$, где выражения для M_2 и к указаны в доказательстве.

Доказательство.

$$\frac{dx}{dt} = \frac{rx}{1+ky} - d_1 x - a_1 x^2 - \frac{a_2 (1-m) xy}{1+b (1-m) x + ey + \alpha \eta A},$$
$$\frac{dx}{dt} > \frac{rx}{1+ky} - d_1 x - a_1 x^2 - \frac{a_2 (1-m) x}{e},$$
$$\frac{dx}{dt} \ge \frac{rx}{1+kM_2} - d_1 x - a_1 x^2 - \frac{a_2 (1-m) x}{e}$$

(поскольку $y \le M_2 = cr\left(\frac{r-d_1}{a_1\xi}\right)$ при большом времени),

$$\frac{dx}{dt} = x \left[\left(\frac{r}{1+kM_2} - d_1 - \frac{a_2(1-m)}{e} \right) - a_1 x \right].$$

Предположим, что
$$\frac{r}{1+kM_2} - d_1 - \frac{a_2(1-m)}{e} > 0.$$

Таким образом, согласно лемме 2.1, имеем:

$$\begin{split} \lim_{t \to \infty} \inf x(t) &> \frac{1}{a_1} \left[\frac{r}{1 + kM_2} - d_1 - \frac{a_2(1 - m)}{e} \right] = \kappa \text{ (предположим)} \\ &\therefore x(t) > \kappa (при \text{ большом времени } t). \\ &\frac{dy}{dt} = -d_2 y + \frac{ca_2[(1 - m)x + \eta A]y}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)x + ey}, \\ \\ \frac{dy}{dt} &= \frac{y}{1 + b(1 - m)x + ey + \alpha \eta A} [ca_2(1 - m)x + ca_2\eta A - d_2 - bd_2(1 - m)x - d_2ey - \alpha \eta Ad_2], \\ &\frac{dy}{dt} = \frac{y}{1 + b(1 - m)x + ey + \alpha \eta A} [(ca_2 - bd_2)(1 - m)x - d_2ey + ca_2\eta A - d_2 - \alpha \eta Ad_2], \\ &\frac{dy}{dt} \geq \frac{y}{1 + \sigma M + \alpha \eta A} [(ca_2 - bd_2)(1 - m)\kappa + ca_2\eta A - (1 + \alpha \eta A)d_2 - d_2ey], \\ &\text{ (где } \sigma = max \{b(1 - m), ce\}) \lor M = r \left(\frac{r - d_1}{a_1\xi}\right) \\ &\therefore \frac{dy}{dt} \geq y(L_1 - L_2y), \\ &\text{ где } L_1 = \frac{(ca_2 - bd_2)(1 - m)\kappa - d_2(1 + \alpha \eta A) + ca_2\eta A}{1 + \sigma M + \alpha \eta A}, \\ &L_2 = \frac{d_2e}{1 + \sigma M + \alpha \eta A}. \end{split}$$

Используя лемму 2.1, получим: $\liminf_{t\to\infty} y(t) \ge \frac{L_1}{L_2}$ при условии $(ca_2 - bd_2)(1 - m)\kappa - d_2(1 + \alpha \eta A) + ca_2 \eta A > 0.$ Это завершает доказательство.

5. КРИТЕРИИ ВЫМИРАНИЯ

Выберем $\epsilon = \min \left\{ \kappa, \frac{L_1}{L_2} \right\} > 0.$ Тогда $\liminf_{t \to \infty} \inf x(t) \ge \epsilon \ \text{и} \liminf_{t \to \infty} \inf y(t) \ge \epsilon.$

Теорема 5.1. Если $r < d_1$, то $\lim_{t \to \infty} x(t) = 0$. Доказательство. Имеем

$$\frac{dx}{dt} \le \frac{rx}{1+ky} - d_1 x \le rx - d_1 x \Rightarrow x(t) \le x(0) \exp\left[\int_0^t (r-d_1) ds\right]$$

$$\therefore \lim_{t \to \infty} x(t) = 0 \text{ при } r < d_1.$$

Теорема 5.2. Если
$$\frac{ca_2}{1+\alpha\eta A}\left\{(1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)+\eta A\right\} < d_2$$
, то $\lim_{t\to\infty} y(t) = 0$.

Доказательство. Имеем

$$\begin{aligned} \frac{dy}{dt} &\leq \frac{ca_2}{1 + \alpha \eta A} \left[(1 - m) x + \eta A \right] y - d_2 y \\ \frac{dy}{dt} &\leq \frac{ca_2}{1 + \alpha \eta A} \left((1 - m) \left(\frac{r - d_1}{a_1} \right) + \eta A \right) y - d_2 y \\ \Rightarrow y(t) &\leq y(0) \exp \left[\int_0^t \left\{ \frac{ca_2}{1 + \alpha \eta A} \left((1 - m) \left(\frac{r - d_1}{a_1} \right) + \eta A \right) - d_2 \right\} ds \right] \\ \therefore \lim_{t \to \infty} y(t) &= 0, \text{ если } \frac{ca_2}{1 + \alpha \eta A} \left\{ (1 - m) \left(\frac{r - d_1}{a_1} \right) + \eta A \right\} < d_2. \end{aligned}$$

6. ТОЧКИ РАВНОВЕСИЯ И АНАЛИЗ ИХ УСТОЙЧИВОСТИ

Равновесие. *Тривиальное равновесие*: $E_0(0,0)$ существует всегда.

Осевое равновесие (без хищников): $E_1\left(\frac{r-d_1}{a_1},0\right)$ существует при условии $r > d_1$.

Осевое равновесие (без жертв): $E_2(0, \overline{y})$ существует, если $ca_2\eta A > d_2(1 + \alpha \eta A)$, где $\overline{y} = \frac{\eta A (ca_2 - \alpha d_2) - d_2}{ed_2}$.

Внутреннее равновесие: $E^*(x^*, y^*)$ может быть получено решением уравнений:

$$\frac{r}{1+ky} - d_1 - a_1 x - \frac{a_2(1-m)y}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} = 0,(6.1)$$
$$\frac{ca_2((1-m)x + \eta A)}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} - d_2 = 0.$$
(6.2)

11

Из уравнения (6.2) получаем первую компоненту $E^*(x^*, y^*)$ в виде

$$x^{*} = \frac{d_{2}(1 + \alpha \eta A + ey^{*}) - ca_{2}\eta A}{(ca_{2} - bd_{2})(1 - m)},$$

где x^* существует, если $ca_2 > bd_2$ и $d_2(1 + cqA + ey^*) > ca_2 qA$ и y^* – единственный положительный корень уравнения $B_1y^3 + B_2y^2 + B_3y + B_4 = 0$. Здесь

$$\begin{split} B_1 &= -a_1 d_2 e k p_6, \\ B_2 &= (-d_1 p_1 k - a_1 p_2 k) p_6 - p_5 k - a_1 d_2 e k (p_3 + p_4) - a_1 d_2 e p_6, \\ B_3 &= [-d_1 p_1 k - a_1 p_2 k - a_1 d_2 e] (p_3 + p_4) + r p_1 p_6 - p_5 - (d_1 p_1 + a_1 p_2) p_6, \\ B_4 &= (r p_1 - d_1 p_1 - a_1 p_2) (p_3 + p_4), \end{split}$$

где

$$p_{1} = (ca_{2} - bd_{2})(1 - m),$$

$$p_{2} = d_{2}(1 + \alpha \eta A) - ca_{2}\eta A,$$

$$p_{3} = (1 + \alpha \eta A)p_{1},$$

$$p_{4} = b(1 - m)p_{2},$$

$$p_{5} = a_{2}(1 - m)p_{1}^{2},$$

$$p_{6} = ep_{1} + b(1 - m)d_{2}e.$$

Анализ локальной устойчивости. Теперь обсудим анализ локальной устойчивости всех состоя-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

имеет следующий вид:
$$\begin{bmatrix} r - d & 0 \end{bmatrix}$$

ний равновесия. Матрица Якоби J_0 при $E_0(0, 0)$

$$J_0 = \begin{bmatrix} r - a_1 & 0 \\ 0 & \frac{ca_2\eta A}{1 + \alpha\eta A} - d_2 \end{bmatrix}.$$

Собственные значения J_0 : $r - d_1$ и $\frac{ca_2\eta A}{1 + \alpha\eta A} - d_2$.

Теорема 6.1. E_0 локально асимптотически устойчиво, если $r < d_1$ и $ca_2\eta A < d_2\{1 + \alpha \eta A\}$ и неустойчиво, если либо $r > d_1$ или $ca_2\eta A > d_2\{1 + \alpha \eta A\}$. Матрица Якоби J_1 при $E_1\left(\frac{r-d_1}{a_1},0\right)$ имеет вид:

$$J_{1} = \begin{bmatrix} -r + d_{1} \frac{r - d_{1}}{a_{1}} \begin{cases} -rk - \frac{a_{2}(1 - m)}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)\left(\frac{r - d_{1}}{a_{1}}\right)} \\ 0 & \frac{ca_{2}\left((1 - m)\left(\frac{r - d_{1}}{a_{1}}\right) + \eta A\right)}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)\left(\frac{r - d_{1}}{a_{1}}\right)} - d_{2} \end{bmatrix}$$

Мы видим, что одно собственное значение – это $r + d_1$ (и оно меньше нуля), а другое собствен-

ное значение
$$-\frac{ca_2\left((1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)+\eta A\right)}{1+\alpha\eta A+b\left(1-m\right)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)}-d_2.$$

Теорема 6.2. Свободное равновесие хищников E_1 локально асимптотически устойчиво, если

Матрица Якоби J_2 при $E_2(0, \overline{y})$ имеет вид:

$$\frac{ca_2\left((1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)+\eta A\right)}{1+\alpha\eta A+b\left(1-m\right)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)} < d_2$$
и неустойчиво при
$$\frac{ca_2\left((1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)+\eta A\right)}{1+\alpha\eta A+b\left(1-m\right)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)} > d_2.$$

(Замечание: существование E_1 дестабилизирует E_0 .)

$$J_{2} = \begin{bmatrix} \frac{r}{1+k\overline{y}} - d_{1} - \frac{a_{2}(1-m)\overline{y}}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}} & 0\\ \frac{\overline{y}ca_{2}(1-m)}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}} - \frac{ca_{2}\eta Ab(1-m)\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} & \frac{-ca_{2}\eta Ae\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} \end{bmatrix}$$

Можно видеть, что одно собственное значение -

это
$$\frac{r}{1+k\overline{y}} - d_1 - \frac{a_2(1-m)\overline{y}}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}}$$
, а другое

 $\frac{-ca_2\eta Ae\overline{y}}{\left(1+\alpha\eta A+e\overline{y}\right)^2}$ (и оно меньше нуля).

Теорема 6.3. Точка свободного равновесия жертв E_2 локально асимптотически устойчива,

если
$$\frac{r}{1+k\overline{y}} < d_1 + \frac{a_2(1-m)y}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}}$$
, и неустойчива при
 $\frac{r}{1+k\overline{y}} > d_1 + \frac{a_2(1-m)\overline{y}}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}}$.
Оценим матрицу Якоби *J** при *E**(*x**,*y**):

$$J^* = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{bmatrix},$$

$$a_{11} = x^* \left\{ -a_1 + \frac{a_2 b (1-m)^2 y^*}{(1+\alpha \eta A + b (1-m) x^* + ey^*)^2} \right\},$$

$$a_{12} = x^* \left\{ \frac{-rk}{(1+ky^*)^2} - \frac{a_2 (1-m)}{1+\alpha \eta A + b (1-m) x^* + ey^*} + \frac{a_2 (1-m) ey^*}{(1+\alpha \eta A + b (1-m) x^* + ey^*)^2} \right\},$$

$$a_{21} = y^* \left\{ \frac{ca_2 (1-m)}{(1+\alpha \eta A + b (1-m) x^* + ey^*)} - \frac{ca_2 \left[\eta A + (1-m) x^* \right] b (1-m)}{(1+\alpha \eta A + b (1-m) x^* + ey^*)^2} \right\},$$

$$a_{22} = \frac{-ca_2 y^* \left[\eta A + (1-m) x^* \right] e}{(1+\alpha \eta A + b (1-m) x^* + ey^*)^2}.$$

Характеристическое уравнение, соответствующее J^* , имеет вид:

$$\lambda^2 + A_1 \lambda + A_2 = 0, \qquad (6.3)$$

где $A_1 = -(a_{11} + a_{22})$ и $A_2 = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}$.

Теорема 6.4. Точка E^* локально асимптотически устойчива, если $A_1 > 0$ и $A_2 > 0$. Далее, точка E^* неустойчива при $A_1 < 0$ (независимо от знака A_2) или при $A_2 < 0$ (независимо от знака A_1).

Анализ глобальной устойчивости. Теорема 6.5. Свободное равновесие хищника $E_1\left(\frac{r-d_1}{a_1},0\right)$ глобально асимптотически устойчиво при следующем условии:

$$d_2 - \frac{ca_2\eta A}{1 + \alpha\eta A} - \frac{ca_2(1-m)}{1 + \alpha\eta A} \left(\frac{r-d_1}{a_1}\right) > 0$$

Доказательство:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{rx}{1+ky} - d_1 x - a_1 x^2 - \frac{a_2 (1-m) xy}{1+\alpha \eta A + b (1-m) x + ey},$$
$$\frac{dx}{dt} \le \frac{rx}{1+ky} - d_1 x - a_1 x^2,$$
$$\frac{dx}{dt} \le rx - d_1 x - a_1 x^2,$$
$$\frac{dx}{dt} = (r - d_1) x \left(1 - \frac{x}{\frac{r-d_1}{a_1}}\right).$$

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

Следовательно, $\lim_{t \to \infty} x(t) \le \frac{r - d_1}{a_1}$ (используя лемму 2.1). Теперь для больших *t* имеем

$$\begin{aligned} \frac{dy}{dt} &= \frac{ca_2\{(1-m)x + \eta A\}y}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} - d_2y, \\ \frac{dy}{dt} &\leq -\left\{d_2 - \frac{ca_2\eta A}{1+\alpha\eta A} - \frac{ca_2(1-m)x}{1+\alpha\eta A}\right\}y, \\ \frac{dy}{dt} &\leq -\left\{d_2 - \frac{ca_2\eta A}{1+\alpha\eta A} - \frac{ca_2(1-m)}{1+\alpha\eta A}\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)\right\}y \\ &\quad (\text{поскольку } \lim_{t \to \infty} x(t) \leq \frac{r-d_1}{a_1}, \\ &\quad \frac{dy}{dt} < 0, \\ &\quad \text{при условии} \\ d_2 - \frac{ca_2\eta A}{1+\alpha\eta A} - \frac{ca_2(1-m)}{1+\alpha\eta A}\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right) > 0, \\ &\quad \therefore \lim_{t \to \infty} y(t) = 0 \Rightarrow \lim_{t \to \infty} x(t) = \frac{r-d_1}{a_1}. \end{aligned}$$

Примечание: Точка $E_0(0, 0)$ глобально асимптотически устойчива на основании теорем 5.1, 5.2 и 6.1.

Теорема 6.6. Свободное равновесие жертв $E_2(0, y)$ глобально асимптотически устойчиво в следующей области:

$$\Phi = \{ (x, y) : x > 0, \\ 0 < y < \overline{y}, \\ r < d_1, ca_2 \eta A > d_2 (1 + \alpha \eta A) \}$$

Доказательство. Рассмотрим функцию Ляпунова в следующем виде:

$$V(x, y) = x + \frac{1}{c} \left\{ y - \overline{y} - \overline{y} \log\left(\frac{y}{\overline{y}}\right) \right\},$$

где V(x, y) является положительно определенной функцией для всех $(x, y) \in \Phi$.

Теперь производная V по времени, вычисленная вдоль решений системы (2.2), определяется выражением:

$$\dot{V} = \dot{x} + \frac{1}{c} (y - \overline{y}) \frac{y}{y}$$

$$\Rightarrow \dot{V} = \frac{rx}{1 + ky} - d_1 x - a_1 x^2 - \frac{a_2 (1 - m) xy}{1 + \alpha \eta A + b (1 - m) x + ey} + \frac{1}{c} (y - \overline{y}) \left\{ \frac{c a_2 \{ (1 - m) x + \eta A \}}{1 + \alpha \eta A + b (1 - m) x + ey} - d_2 \right\}$$

$$\Rightarrow \dot{V} \le (r - d_1) x + \left\{ \frac{a_2 \eta A}{1 + \alpha \eta A} - \frac{d_2}{c} \right\} (y - \overline{y}).$$

Таким образом, $\dot{V} < 0$ в области Φ и $\dot{V} = 0$ в E_2 . Поэтому согласно теореме Ляпунова [22] $E_2(0, \overline{y})$ глобально асимптотически устойчива в области Φ .

Теорема 6.7. Равновесие сосуществования $E^*(x^*, y^*)$ глобально асимптотически устойчиво в следующей области:

$$D = \{(x,y): x \ge 0, y \ge 0, b(1-m) - ce < 0\}.$$

Доказательство. Пусть $U(x, y) = \frac{1}{xy}$ – непрерывно дифференцируемая функция

$$u_{1} = \frac{rx}{1+ky} - d_{1} - a_{1}x^{2} - \frac{a_{2}(1-m)xy}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey},$$
$$u_{2} = \frac{ca_{2}\{(1-m)x + \eta A\}y}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} - d_{2}y.$$

Ясно, что U(x,y) > 0 внутри положительного квадранта *ху*-плоскости.

Теперь

.

$$\Delta(x,y) = \frac{\partial}{\partial x} (u_1 U) + \frac{\partial}{\partial y} (u_2 U),$$

$$\Delta(x,y) = \frac{\partial}{\partial x} \left\{ \left(\frac{r}{1+ky} - d_1 - a_1 x \right) \frac{1}{y} - \frac{a_2 (1-m)}{1 + \alpha \eta A + b (1-m) x + ey} \right\} + \frac{\partial}{\partial y} \left\{ \frac{ca_2 (1-m)}{1 + \alpha \eta A + b (1-m) x + ey} + \frac{ca_2 \eta A}{x (1 + \alpha \eta A + b (1-m) x + ey)} - \frac{d_2}{x} \right\},$$

$$\Delta(x,y) = \frac{-a_1}{y} + \frac{a_2 (1-m) \{b (1-m) - ce\}}{(1 + \alpha \eta A + b (1-m) x + ey)^2} - \frac{ca_2 \eta Ae}{x (1 + \alpha \eta A + b (1-m) x + ey)^2}$$

Следовательно, $\Delta(x,y) \le 0$ всегда, если $b(1-m) - ce \le 0$. По критерию Дюлака [28], предельного цикла в области *D* не существует. Таким образом, $E^*(x^*,y^*)$ в этой области глобально асимптотически устойчиво.

Локальные бифуркации. В этом подразделе мы вывели локальную бифуркацию размерности 1 вокруг точек равновесия, и для этого мы использовали теорему Сотомайора [28]. Чтобы применить теорему Сотомайора, одно из собственных значений матрицы Якоби в точке бифуркации должно быть равно нулю. Пусть $V = (v_1, v_2)^T$ и $W = (w_1, w_2)^T$ – собственные векторы матрицы J_i и $(J_i)^T$, соответственно отвечающие нулевому собственному значению точки равновесия E_i , где i = 0, 1, 2.

Пусть
$$F = (F_1, F_2)^T$$
, где

$$F_{1} = \frac{rx}{1+ky} - d_{1}x - a_{1}x^{2} - \frac{a_{2}(1-m)xy}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey},$$

$$F_{2} = \frac{ca_{2}\{(1-m)x + \eta A\}y}{1+\alpha\eta A + b(1-m)x + ey} - d_{2}y.$$

Теорема 6.8. Система (2.2) претерпевает транскритическую бифуркацию вокруг точки $E_0(0,0)$,

если
$$d_1^{[TC]} = r$$
 и $\frac{ca_2\eta A}{b_1 + \alpha\eta A} - d_2 < 0.$
Доказательство. Имеем

$$J_0 = \begin{bmatrix} r - d_1 & 0 \\ 0 & \frac{ca_2\eta A}{1 + \alpha\eta A} - d_2 \end{bmatrix}.$$

Пусть $d_1^{[TC]}$ – критическое значение d_1 , такое, что J_0 имеет одно нулевое собственное значение. (Здесь $d_1^{[TC]} = r.$)

Значит, при *d*₁^[*TC*]: $J_0 = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & \frac{ca_2 \eta A}{1 + \alpha \eta A} - d_2 \end{bmatrix}.$ После некоторых вычислений: $V = (v_1, 0)^T$ и $W = (1,0)^T$, где $v_1 \neq 0$.

Следовательно

$$\Delta_{1} = W^{T} \cdot F_{d_{1}} \left(0, 0; d_{1}^{[TC]} \right) = (1, 0) \cdot \begin{pmatrix} -x \\ 0 \end{pmatrix}_{E_{0}} = 0,$$

$$\Delta_{2} = W^{T} \left[DF_{d_{1}} \left(0, 0; d_{1}^{[TC]} \right) V \right] = (1, 0) \cdot \begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}_{E_{0}} \begin{pmatrix} v_{1} \\ 0 \end{pmatrix} = -v_{1} \neq 0,$$

$$\Delta_{3} = W^{T} \cdot \left[D^{2}F \left(0, 0; d_{1}^{[TC]} \right) (V, V) \right] = (1, 0) \cdot D \begin{pmatrix} \frac{\partial F_{1}}{\partial x} v_{1} + \frac{\partial F_{1}}{\partial y} v_{2} \\ \frac{\partial F_{2}}{\partial x} v_{1} + \frac{\partial F_{2}}{\partial y} v_{2} \end{pmatrix}_{E_{0}} \begin{pmatrix} v_{1} \\ 0 \end{pmatrix} =$$

$$= (1, 0) \cdot \left(\frac{\partial^{2} F_{1}}{\partial x^{2}} v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2} F_{1}}{\partial y^{2}} v_{2}^{2} + 2 \frac{\partial^{2} F_{1}}{\partial x \partial y} v_{1} v_{2} \\ \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial x^{2}} v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial y^{2}} v_{2}^{2} + 2 \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial x \partial y} v_{1} v_{2} \\ \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial x^{2}} v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial y^{2}} v_{2}^{2} + 2 \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial x \partial y} v_{1} v_{2} \\ \end{bmatrix}_{E_{0}} = -2a_{1}v_{1}^{2} \neq 0.$$

По теореме Сотомайора система (2.2) претерпевает транскритическую бифуркацию при $d_1 = d_1^{[TC]} = r$ вокруг E_0 при условии $\frac{ca_2\eta A}{b_1 + \alpha \eta A} - d_2 < 0.$ *Теорема 6.9.* Транскритическая бифуркация возникает в системе (2.2) вокруг точки E_0 , если

 $d_2^{[TC]} = \frac{ca_2\eta A}{1 + \alpha \eta A}$ и $r < d_1$. Доказательство. Имеем

$$I_0 = \begin{bmatrix} r - d_1 & 0 \\ 0 & \frac{ca_2\eta A}{b_1 + \alpha\eta A} - d_2 \end{bmatrix}.$$

Пусть $d_2^{[TC]}$ будет критическим значением d_2 таким, что J_1 имеет одно нулевое собственное значение. $\left(3 \text{десь } d_2^{[TC]} = \frac{c a_2 \eta A}{1 + \alpha \eta A} \right)$ Таким образом, при $d_2^{[TC]}$:

$$J_0 = \begin{bmatrix} r - d_1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}.$$

После некоторых вычислений имеем: $V = (0, v_2)^T$ и $W = (0, 1)^T$, где $v_2 \neq 0$.

Следовательно,

$$\begin{split} \Delta_{1} &= W^{T} \cdot F_{d_{2}} \left(0, 0; d_{2}^{[TC]} \right) = (0, 1) \cdot \begin{pmatrix} 0 \\ -y \end{pmatrix}_{E_{0}} = 0, \\ \Delta_{2} &= W^{T} \left[DF_{d_{2}} \left(0, 0; d_{2}^{[TC]} \right) V \right] = (0, 1) \cdot \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}_{E_{0}} \begin{pmatrix} 0 \\ v_{2} \end{pmatrix} = -v_{2} \neq 0, \\ \Delta_{3} &= W^{T} \cdot \left[D^{2} F \left(0, 0; d_{2}^{[TC]} \right) (V, V) \right] = (0, 1) \cdot D \begin{pmatrix} \frac{\partial F_{1}}{\partial x} v_{1} + \frac{\partial F_{1}}{\partial y} v_{2} \\ \frac{\partial F_{2}}{\partial x} v_{1} + \frac{\partial F_{2}}{\partial y} v_{2} \end{pmatrix}_{E_{0}} \begin{pmatrix} 0 \\ v_{2} \end{pmatrix} = \\ &= (0, 1) \cdot \begin{pmatrix} \frac{\partial^{2} F_{1}}{\partial x^{2}} v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2} F_{1}}{\partial y^{2}} v_{2}^{2} + 2 \frac{\partial^{2} F_{1}}{\partial x \partial y} v_{1} v_{2} \\ \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial x^{2}} v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial y^{2}} v_{2}^{2} + 2 \frac{\partial^{2} F_{2}}{\partial x \partial y} v_{1} v_{2} \end{pmatrix}_{E_{0}} = \frac{-2ca_{2}e\eta A}{(1 + c\eta A)^{2}} v_{2}^{2} \neq 0. \end{split}$$

По теореме Сотомайора транскритическая бифуркация возникает в системе (2.2) при $d_2 = d_2^{[TC]} = \frac{ca_2\eta A}{1 + \alpha\eta A}$ вокруг E_0 при условии $r < d_1$. *Теорема* 6.10. Транскритическая бифуркация

возникает в системе (2.2) вокруг точки $E_1\left(\frac{r-d_1}{a_1},0\right)$,

если
$$d_2^{[TC]} = \frac{ca_2\left((1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right) + \eta A\right)}{1+\alpha\eta A + b(1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)}$$
 и $r > d_1$.

Доказательство. Имеем

$$J_{1} = \begin{bmatrix} -r + d_{1} \frac{r - d_{1}}{a_{1}} \begin{cases} -rk - \frac{a_{2}(1 - m)}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)\left(\frac{r - d_{1}}{a_{1}}\right)} \\ 0 & \frac{ca_{2}\left((1 - m)\left(\frac{r - d_{1}}{a_{1}}\right) + \eta A\right)}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)\left(\frac{r - d_{1}}{a_{1}}\right)} - d_{2} \end{cases}$$

Пусть $d_2^{[TC]}$ будет критическим значением d_2 таким, что J_1 имеет одно нулевое собственное нначе-

ние. Здесь
$$d_2^{[TC]} = \frac{ca_2\left((1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right) + \eta A\right)}{1+\alpha\eta A + b(1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)}.$$

Таким образом, при $d_2^{[TC]}$:

$$J_{1} = \begin{bmatrix} -r + d_{1} & \frac{r - d_{1}}{a_{1}} \begin{cases} -rk - \frac{a_{2}(1 - m)}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)\left(\frac{r - d_{1}}{a_{1}}\right)} \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

После некоторых вычислений имеем: $V = (v_1, v_2)^T$

и
$$W = (0,1)^T$$
, где $v_1 = \frac{-x_{12}}{x_{11}} v_2, v_2 = 1, x_{11} = -r + d_1$ и
 $x_{12} = \frac{r - d_1}{r} \Biggl\{ -rk - \frac{a_2(1 - m)}{r} \Biggr\}.$

$$\frac{1}{a_1} = \frac{r - a_1}{a_1} \left\{ \frac{-rk - \frac{a_2(1 - m)}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)\left(\frac{r - d_1}{a_1}\right)} \right\}.$$
Следовательно,

$$\begin{split} \Delta_{1} &= W^{T}.F_{d_{2}}\left(0,0;d_{2}^{[TC]}\right) = (0,1).\begin{pmatrix}0\\-y\end{pmatrix}_{E_{1}} = 0,\\ \Delta_{2} &= W^{T}\left[DF_{d_{2}}\left(E_{1};d_{2}^{[TC]}\right)V\right] = (0,1).\begin{bmatrix}0&0\\0&-1\end{bmatrix}_{E_{1}}\begin{pmatrix}v_{1}\\1\right) = -1 \neq 0,\\ \Delta_{3} &= W^{T}.\left[D^{2}F\left(E_{1};d_{2}^{[TC]}\right)(V,V)\right] = (0,1).D\begin{pmatrix}\frac{\partial F_{1}}{\partial x}v_{1} + \frac{\partial F_{1}}{\partial y}v_{2}\\\frac{\partial F_{2}}{\partial x}v_{1} + \frac{\partial F_{2}}{\partial y}v_{2}\end{pmatrix}_{E_{1}}\begin{pmatrix}v_{1}\\v_{2}\end{pmatrix} = \\ &= (0,1).\begin{pmatrix}\frac{\partial^{2}F_{1}}{\partial x^{2}}v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2}F_{1}}{\partial y^{2}}v_{2}^{2} + 2\frac{\partial^{2}F_{1}}{\partial x\partial y}v_{1}v_{2}\\\frac{\partial^{2}F_{2}}{\partial x^{2}}v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2}F_{2}}{\partial y^{2}}v_{2}^{2} + 2\frac{\partial^{2}F_{2}}{\partial x\partial y}v_{1}v_{2}\end{pmatrix}_{E_{1}} = \\ &= 2\left\{\frac{-ca_{2}e\left[(1-m)\left(\frac{r-d_{1}}{a_{1}}\right) + \eta A\right]}{\left\{1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)\left(\frac{r-d_{1}}{a_{1}}\right)\right\}^{2}} + \frac{ca_{2}(1-m)(1+\alpha\eta A - b\eta A)v_{1}}{\left\{1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)\left(\frac{r-d_{1}}{a_{1}}\right)\right\}^{2}} \neq 0. \end{split}$$

По теореме Сотомайора транскритическая бифуркация возникает в системе (2.2) при

$$d_2 = d_2^{[TC]} = \frac{ca_2\left((1-m)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right) + \eta A\right)}{1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)\left(\frac{r-d_1}{a_1}\right)}$$
 вокруг точ-

ки E_1 при условии $r > d_1$.

Теорема 6.11. Транскритическая бифуркация возникает в системе (2.2) вокруг точки $E_2(0, \overline{y})$,

если
$$k^{[TC]} = \frac{1}{\overline{y}} \left\{ \frac{r}{d_1 + \frac{a_2(1-m)\overline{y}}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}}} - 1 \right\}.$$

Доказательство. Имеем

$$J_{2} = \begin{bmatrix} \frac{r}{1+k\overline{y}} - d_{1} - \frac{a_{2}(1-m)\overline{y}}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}} & 0\\ \frac{\overline{y}ca_{2}(1-m)}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}} - \frac{ca_{2}\eta Ab(1-m)\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} & \frac{-ca_{2}\eta Ae\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} \end{bmatrix}.$$

Пусть $k^{[TC]}$ будет критическим значением k та-ким, что J_2 имеет одно нулевое собственное зна-

чение. Здесь
$$k^{[TC]} = \frac{1}{\overline{y}} \left\{ \frac{r}{d_1 + \frac{a_2(1-m)\overline{y}}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}}} - 1 \right\}.$$

ſ

Таким образом, при
$$k^{[TC]}$$
:

$$J_{2} = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ \frac{\overline{y}ca_{2}(1-m)}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}} - \frac{ca_{2}\eta Ab(1-m)\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} \frac{-ca_{2}\eta Ae\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} \end{bmatrix}.$$
После некоторых вычислений имеем:

$$W = (1-x)^{T} - W = (1-x)^{T} - x = \frac{-y_{2}}{2}$$

и (1,0), где
$$v_2 = \frac{\overline{y_{22}}}{y_{22}}v_1, v_1 = 1$$
 (до-
пустим), $y_{21} = \frac{\overline{y_{22}}(1-m)}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}} - \frac{ca_2\eta Ab(1-m)\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^2}$ и

$$y_{22} = \frac{-ca_2 \eta A e \overline{y}}{\left(1 + \alpha \eta A + e \overline{y}\right)^2}.$$
Следовательно,

$$\begin{split} \Delta_{1} &= W^{T} \cdot F_{k} \left(E_{2}; k^{[TC]} \right) = (1,0) \cdot \left(\frac{-rkx}{(1+ky)^{2}}_{0} \right)_{E_{2}} = 0, \\ \Delta_{2} &= W^{T} \left[DF_{k} \left(E_{2}; k^{[TC]} \right) V \right] = (1,0) \cdot \left[\frac{-rk}{(1+ky)^{2}} \frac{2rk^{2}x}{(1+ky)^{3}} \right]_{E_{2}} \left(\frac{v_{1}}{v_{2}} \right) = \frac{-rk^{[TC]}}{(1+k^{[TC]}\overline{y})^{2}} \neq 0, \\ \Delta_{3} &= W^{T} \cdot \left[D^{2}F \left(E_{2}; k^{[TC]} \right) (V, V) \right] = (1,0) \cdot D \left(\frac{\partial F_{1}}{\partial x} v_{1} + \frac{\partial F_{1}}{\partial y} v_{2} \right)_{E_{2}} \left(\frac{v_{1}}{v_{2}} \right) = \\ &= (1,0) \cdot \left(\frac{\partial^{2}F_{1}}{\partial x^{2}} v_{1}^{2} + \frac{\partial^{2}F_{1}}{\partial y^{2}} v_{2}^{2} + 2 \frac{\partial^{2}F_{1}}{\partial x \partial y} v_{1} v_{2} \right)_{E_{2}} = \\ &= 2 \left\{ -a_{1} + \frac{a_{2}b(1-m)^{2}\overline{y}}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} \right\} - 2 \left\{ \frac{rk^{[TC]}}{(1+k^{[TC]}\overline{y})^{2}} + \frac{a_{2}(1-m)(1+\alpha\eta A)}{(1+\alpha\eta A + e\overline{y})^{2}} \right\} v_{2} = \\ &= -2a_{1} - 2 \frac{rk^{[TC]}v_{2}}{(1+k^{[TC]}\overline{y})^{2}} - 2 \frac{(1+\alpha\eta A - b\eta A)a_{2}(1-m)^{2}}{e\eta A(1+\alpha\eta A + e\overline{y})} \neq 0. \end{split}$$

По теореме Сотомайора транскритическая бифуркация возникает в системе (2.2) при ſ

)

$$k = k^{[TC]} = \frac{1}{\overline{y}} \left\{ \frac{r}{d_1 + \frac{a_2(1-m)\overline{y}}{1+\alpha\eta A + e\overline{y}}} - 1 \right\}$$
вокруг точки E_2 .

7. ВЛИЯНИЕ ДИСКРЕТНЫХ ВРЕМЕННЫХ ЗАЛЕРЖЕК

1. Более реалистично предположить, что добыче требуется некоторое время для распознавания

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021 риска нападения хищников после улавливания химических сигналов или голосовых сигналов. Таким образом, страх перед риском нападения хищников не влияет спонтанно на рождаемость популяции жертв, скорее, должна быть некоторая временная задержка, называемая дискретной временной задержкой (τ_1).

2. Мы учли, что после нападения хищнику требуется некоторое время, чтобы ассимилировать некоторое количество энергии из его пищи до уровня энергии хищника. Это не методы спонтанного преобразования, потому что для завершения этого механизма необходимо выполнить множество биологических процессов. Весь процесс трансформации занимает некоторое время, известное как задержка беременности (τ₂) [18, 29, 30, 31].

Итак, систему «хищник-жертва» (2.2) можно доработать следующим образом:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{rx}{1 + ky(t - \tau_1)} - d_1 x - a_1 x^2 - \frac{a_2(1 - m)xy}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)x + ey},$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{ca_2\{(1 - m)x(t - \tau_2) + \eta A\}y(t - \tau_2)}{1 + \alpha \eta A + b(1 - m)x(t - \tau_2) + ey(t - \tau_2)} - d_2 y.$$
(7.1)

Начальные условия: $\psi(\phi) > 0$ (*i* = 1,2), $\forall \phi \in [-\tau, 0]$, $\tau = \max\{\tau_1, \tau_2\}, x(\phi) = \psi_1(\phi), y(\phi) = \psi_2(\phi).$

Линеаризуем (7.1) вокруг точки $E^*(x^*, y^*)$ с помощью преобразований $X = x - x^*$ и $Y = y - y^*$:

Для биологической обоснованности $\psi_1(0) > 0$ и $\psi_2(0) > 0.$

$$\frac{dU}{dt} = P_1 U(t) + P_2 U(t - \tau_1) + P_3 U(t - \tau_2), \quad (7.2)$$
где

$$\begin{split} U &= \begin{bmatrix} X, Y \end{bmatrix}^{T}, P_{1} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12}' \\ 0 & -d_{2} \end{bmatrix}, P_{2} = \begin{bmatrix} 0 & a_{12}'' \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \bowtie P_{3} = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ a_{21} & a_{22} + a_{22}' \end{bmatrix}, \\ a_{11} &= x^{*} \left\{ -a_{1} + \frac{a_{2}b\left(1-m\right)^{2}y^{*}}{\left(1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)x^{*} + ey^{*}\right)^{2}} \right\}, a_{12}'' = \frac{-rkx^{*}}{\left(1+ky^{*}\right)^{2}}, \\ a_{12}' &= x^{*} \left\{ \frac{-a_{2}\left(1-m\right)}{1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)x^{*} + ey^{*}} + \frac{a_{2}\left(1-m\right)ey^{*}}{\left(1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)x^{*} + ey^{*}\right)^{2}} \right\}, \\ a_{21} &= y^{*} \left\{ \frac{ca_{2}\left(1-m\right)}{1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)x^{*} + ey^{*}} - \frac{ca_{2}\left[\eta A + \left(1-m\right)x^{*}\right]b\left(1-m\right)}{\left(1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)x^{*} + ey^{*}\right)^{2}} \right\}, \\ a_{22} &= \frac{-ca_{2}y^{*}\left[\eta A + \left(1-m\right)x^{*}\right]e}{\left(1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)x^{*} + ey^{*}\right)^{2}}, a_{22}' &= \frac{ca_{2}\left[\eta A + \left(1-m\right)x^{*}\right]}{1+\alpha\eta A + b\left(1-m\right)x^{*} + ey^{*}}. \end{split}$$

Характеристическое уравнение, соответствующее системе (7.1), можно представить в виде:

$$\lambda^{2} + X_{1}\lambda + X_{2} + e^{-\lambda\tau_{2}} (X_{3}\lambda + X_{4}) + e^{-\lambda(\tau_{1}+\tau_{2})}X_{5} = 0,$$

= $-a_{11}d_{2}, X_{3} = -a_{22} - a_{22}, X_{4} = a_{11}a_{22} + a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}, X_{5} = -a_{12}a_{21}.$

где $X_1 = -a_{11} + d_2, X_2 = -a_{11}d_2, X_3$

Случай 1: $\tau_1 = \tau_2 = 0$.

В этой ситуации система (7.1) сводится к системе (2.2), а условия локальной устойчивости точки Е* уже обсуждались в разделе «Точки равновесия и анализ их устойчивости».

Случай 2: $\tau_1 = 0, \tau_2 > 0.$

Если принять $\tau_1 = 0$, уравнение (7.3) приобретает вид

$$\lambda^{2} + X_{1}\lambda + X_{2} + e^{-\lambda\tau_{2}} (X_{3}\lambda + X_{6}) = 0, \qquad (7.4)$$

где $X_6 = X_4 + X_5$.

Пусть $\lambda = p + iq$ будет решением уравнения (7.4), поэтому, вставив его в уравнение (7.4), получим:

$$(p+iq)^{2} + X_{1}(P+iq) + x_{2} + e^{-(p+iq)\tau_{2}}(X_{3}(p+iq) + X_{6}) = 0.$$
(7.5)

Сравнивая действительную и мнимую части с обеих сторон уравнения (7.5), имеем:

ВЛИЯНИЕ СТРАХА НА СИСТЕМУ С ЗАДЕРЖКОЙ «ХИЩНИК-ЖЕРТВА»

$$p^{2} - q^{2} + X_{1}p + X_{2} + e^{-p\tau_{2}}(X_{3}p + X_{6})\cos(q\tau_{2}) + e^{-p\tau_{2}}X_{3}q\sin(q\tau_{2}) = 0$$
(7.6)

$$2pq + X_1q + e^{-p\tau_2}X_3q\cos(q\tau_2) - e^{-p\tau_2}(X_3p + X_6)\sin(q\tau_2) = 0.$$
(7.7)

Необходимым условием изменения устойчивости точки E^* является то, что уравнение (7.4) должно иметь чисто мнимые корни. По этой причине, заменив p = 0 в уравнениях (7.6) и (7.7), имеем:

$$-q^{2} + X_{2} + X_{6}\cos(q\tau_{2}) + X_{3}q\sin(q\tau_{2}) = 0.$$
 (7.8)

$$X_1 q + X_3 q \cos(q\tau_2) - X_6 \sin(q\tau_2) = 0.$$
 (7.9)

Исключая τ_2 возведением в квадрат и добавлением уравнений (7.8) и (7.9), получим:

$$q^{4} + q^{2} \left(-2X_{2} + X_{1}^{2} - X_{3}^{2}\right) + \left(X_{2}^{2} - X_{6}^{2}\right) = 0. \quad (7.10)$$

Подставляя $q^2 = \beta$ в уравнение (7.10), получим квадратное уравнение относительно β :

$$R(\beta) = \beta^2 + R_1 \beta + R_2 = 0, \qquad (7.11)$$

где $R_1 = -2X_2 + X_1^2 - X_3^2$ и $R_2 = X_2^2 - X_6^2$.

Было замечено, что $R(\infty) = \infty$. Поэтому уравнение (7.11) имеет положительный корень при R(0) < 0, т.е. при $X_2^2 < X_6^2$. Пусть β_1 будет положительным корнем уравнения (7.11), тогда $q = \sqrt{\beta_1}$. Лемма 7.1 [31]. Рассмотрим:

$$\begin{split} P &\equiv P\left(\lambda, e^{-\lambda\tau_1}, e^{-\lambda\tau_2}, \dots, e^{-\lambda\tau_m}\right) = \lambda^n + p_1^{(0)}\lambda^{n-1} + \dots + p_{n-1}^{(0)}\lambda + p_n^{(0)} = \\ &= \left[p_1^{(1)}\lambda^{n-1} + \dots + p_{n-1}^{(1)}\lambda + p_n^{(1)}\right]e^{-\lambda\tau_1} + \left[p_1^{(m)}\lambda^{n-1} + \dots + p_{n-1}^{(m)}\lambda + p_n^{(m)}\right]e^{-\lambda\tau_m}, \end{split}$$

где $\tau_i \ge 0$ (i = 1, 2,..., m) и $p_j^{(i)}(i = 0, 1, ..., m;$ j = 1, 2,..., n) – константы. Поскольку ($\tau_1, \tau_2, ..., \tau_m$) изменяются, сумма нулевых порядков P в открытой полуплоскости может измениться только в том, случае, если нуль появляется на мнимой оси или пересекает ее.

Исследуем возникновение бифуркации Хопфа вокруг точки E^* , взяв ₂ в качестве параметра бифуркации.

Теорема 7.2. Предположим, что равновесие сосуществования E^* существует и локально асимптотически устойчиво при $A_1 > 0$ и $A_2 > 0$ для системы (2.2) ($\tau_1 = \tau_2 = 0$). Также для $\tau_1 = 0$ и $\tau_2 > 0$, если $X_2^2 < X_6^2$, то существует пороговое значение τ_2^* для которого точка E^* системы (7.1) устойчива при $0 < \tau_2 < \tau_2^*$ и неустойчиво при $\tau_2 > \tau_2^*$. С другой стороны, система (7.1) претерпевает сверхкритическую бифуркацию Хопфа вокруг точки E^* при $\tau_2 = \tau_2^*$ определяемую следующим образом:

$$\tau_{2}^{*} = \frac{\cos^{-1}\left(\frac{(X_{6} - X_{1}X_{3})\beta_{1} - X_{2}X_{6}}{X_{6}^{2} + X_{3}^{2}\beta_{1}}\right)}{\sqrt{\beta_{1}}}$$

при условии SV > UW, где S, U, V и W определены в доказательстве.

Доказательство. Если $X_2^2 < X_6^2$, уравнение (7.11) имеет положительный корень, например, β_1 . Из уравнений (7.6) и (7.7) получим $\tau_2^{(j)}$ как функцию β_1 :

$$\tau_{2}^{j} = \frac{\cos^{-1}\left(\frac{(X_{6} - X_{1}X_{3})\beta_{1} - X_{2}X_{6}}{X_{6}^{2} + X_{3}^{2}\beta_{1}}\right)}{\sqrt{\beta_{1}}} + \frac{2\pi j}{\sqrt{\beta_{1}}}, j = 0, 1, 2, 3, \dots$$

Следовательно, точка E^* локально асимптотически устойчива, если $A_1 > 0$ и $A_2 > 0$ для $\tau_1 = \tau_2 = 0$. В случае $\tau_1 = 0$ и $\tau_2 > 0$ используем лемму Батлера [32]: точка E^* остается устойчивой при $0 < \tau_2 < \tau_2^*$, где $\tau_2^* = \min_{i>0} \tau_2^i$.

Проверим условие трансверсальности: $\left[\frac{d}{d\tau_2} \operatorname{Re}\{\lambda(\tau_2)\}\right]_{\tau_2=\tau_2^*} > 0. (\operatorname{Re}\lambda \, \text{эквивалентно реаль-}$ ной части λ и Im λ эквивалентно его мнимой части.)

Дифференцируя уравнения (7.6) и (7.7) по от-

ношению к τ_2 и задавая p = 0 и $\tau_2 < \tau_2^*$, получим:

$$S\left[\frac{d}{d\tau_2}\operatorname{Re}\left\{\lambda(\tau_2)\right\}\right]_{\tau_2=\tau_2^*} + U\left[\frac{d}{d\tau_2}\operatorname{Im}\left\{\lambda(\tau_2)\right\}\right]_{\tau_2=\tau_2^*} = V,$$
(7.12)

$$-U\left[\frac{d}{d\tau_2}\operatorname{Re}\left\{\lambda(\tau_2)\right\}\right]_{\tau_2=\tau_2^*} + S\left[\frac{d}{d\tau_2}\operatorname{Im}\left\{\lambda(\tau_2)\right\}\right]_{\tau_2=\tau_2^*} = W,$$
(7.13)

где

$$S = \left\{ X_{1} + X_{3}\cos\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) - X_{6}\tau_{2}^{*}\cos\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) - X_{3}\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\sin\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) \right\},\$$
$$U = \left\{ -2\sqrt{\beta_{1}} + X_{3}\sin\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) - X_{6}\tau_{2}^{*}\sin\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) + X_{3}\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\cos\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) \right\},\$$
$$V = \left\{ X_{6}\sqrt{\beta_{1}}\sin\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) - X_{3}\beta_{1}\cos\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) \right\},\$$
$$W = \left\{ X_{6}\sqrt{\beta_{1}}\cos\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) + X_{3}\beta_{1}\sin\left(\sqrt{\beta_{1}}\tau_{2}^{*}\right) \right\}.$$

Решаем уравнения (7.12) и (7.13):

$$\begin{bmatrix} \frac{d\left[\operatorname{Re}\left\{\lambda(\tau_{2})\right\}\right]}{d\tau_{2}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{SV - UW}{S^{2} + U^{2}} \end{bmatrix}.$$

TEREPLE MAREM
$$\begin{bmatrix} \frac{d\left[\operatorname{Re}\left\{\lambda(\tau_{2})\right\}\right]}{d\tau_{2}} \end{bmatrix}_{\tau_{2}=\tau_{2}^{*}} > 0, \quad \text{если}$$

SV > UW. Таким образом, условие трансверсальности соблюдено. Значит, система (7.1) проявляет сверхкритическую бифуркацию Хопфа, когда τ_2 пересекает критическое значение τ_2^* .

Случай З: $\tau_1 > 0, \tau_2 = 0.$

Подставив
$$\tau_2 = 0$$
 в уравнение (7.3), получим:

$$\lambda^2 + X_7 \lambda + X_8 + e^{-\lambda \tau_1} X_5 = 0,$$

где $X_7 = X_1 + X_3$ и $X_8 = X_2 + X_4.$

Теорема 7.3. Предположим, что точка E^* существует и локально асимптотически устойчива при $A_1 > 0$ и $A_2 > 0$ для системы (2.2) ($\tau_1 = \tau_2 = 0$). Также для $\tau_1 > 0$ и $\tau_2 = 0$, если $X_8^2 < X_5^2$, существует пороговое значение τ_1^* , для которого точка E^* системы (7.1) устойчива при $0 < \tau_1 < \tau_1^*$ и неустойчива при $\tau_1 > \tau_1^*$. С другой стороны, система (7.1) проявляет сверхкриическую бифуркацию Хопфа вокруг точки E^* при $\tau_1 = \tau_1^* = \min_{j \ge 0} \tau_1^j$, определяемым следующим образом:

$$\tau_1^j = \frac{\cos^{-1}\left(\frac{\beta_2 - X_8}{X_5}\right)}{\sqrt{\beta_2}} + \frac{2\pi j}{\sqrt{\beta_2}}, j = 0, 1, 2, 3...$$

при условии SV > UW, где β_2 – положительный корень уравнения

$$\begin{aligned} R'(\beta') &\equiv \beta^2 + \left(X_7^2 - 2X_8\right)\beta' + \left(X_8^2 - X_5^2\right) = 0\\ \text{и } S' &= X_7 - X_5\tau_1^*\cos\left(\sqrt{\beta_2}\tau_1^*\right),\\ U' &= -2\sqrt{\beta_2} - X_5\tau_1^*\sin\left(\sqrt{\beta_2}\tau_1^*\right),\\ V' &= X_5\sqrt{\beta_2}\sin\left(\sqrt{\beta_2}\tau_1^*\right), W' = X_5\sqrt{\beta_2}\cos\left(\sqrt{\beta_2}\tau_1^*\right).\\ \mathcal{I} oказательство. Доказательство теоремы та \end{aligned}$$

Доказательство. Доказательство теоремы такое же, как и в случае 2.

Случай 4: $\tau_1 \in (0, \tau_1^*)$ и $\tau_2 > 0$.

Теорема 7.4. Предположим, что точка E^* существует и локально асимптотически устойчива при $A_1 > 0$ и $A_2 > 0$ для системы (2.2) ($\tau_1 = \tau_2 = 0$). Также для $\tau_1 \in (0, \tau_1^*)$ (фиксировано) и $\tau_2 > 0$, если $X_2^2 < (X_4 + X_5)^2$, то существует пороговое значение τ_2^0 , для которого точка E^* системы (7.1) устойчива, когда $0 < \tau_2 < \tau_2^0$ и неустойчива при $\tau_2 > \tau_2^0$ при условии KM > LN. Более того, система (7.1) проявляет сверхкритическую бифуркацию Хопфа вокруг точки E^* при $\tau_2 = \tau_2^0$, выраженном, как:

$$\pi_{2}^{0} = \frac{\cos^{-1}\left(\frac{Q_{1}^{2} + Q_{2}^{2} + Q_{3}^{2} + Q_{4}^{2}}{2\sqrt{(Q_{1}^{2} + Q_{2}^{2})(Q_{3}^{2} + Q_{4}^{2})}}\right)}{\gamma_{1}} + \frac{1}{\gamma_{1}}\left[\tan^{-1}\left(\frac{Q_{1}}{Q_{2}}\right) - \tan^{-1}\left(\frac{Q_{3}}{Q_{4}}\right)\right].$$

Доказательство. Считаем, что t₁ фиксировано в (0, τ_1^*) и $\tau_2 > 0$. Пусть $\lambda = p' + iq'$ – собственное значение характеристического уравнения (7.3). Теперь, подставив λ в уравнение (7.3) и сравнивая реальную и мнимую части с обеих сторон, мы имеем:

$$p'^{2} - q'^{2} + X_{1}p' + X_{2} + (X_{3}p' + X_{4})e^{-p'\tau_{2}}\cos(q'\tau_{2}) + X_{3}q'e^{-p'\tau_{2}}\sin(q'\tau_{2}) + X_{5}e^{-p'(\tau_{1}+\tau_{2})}\cos(q'(\tau_{1}+\tau_{2})) = 0 \quad (7.14)$$

$$2p'q' + X_1q' - (X_3p' + X_4)e^{-p'\tau_2}\sin(q'\tau_2) + X_3q'e^{-p'\tau_2}\cos(q'\tau_2) - X_5e^{-p'(\tau_1 + \tau_2)}\sin(q'(\tau_1 + \tau_2)) = 0.$$
(7.15)

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

530

Необходимым условием для изменения устойчивости в точке E^* является то, что корень характеристического уравнения (7.3) должен быть чисто мнимым. Итак, подставив p' = 0 в уравнения (7.14) и (7.15), получим:

$$-q^{'2} + X_2 + X_4 \cos(q'\tau_2) + X_3 q' \sin(q'\tau_2) + X_5 \cos(q'(\tau_1 + \tau_2)) = 0,$$
(7.16)

$$X_{1}q' - X_{4}\sin(q'\tau_{2}) + X_{3}q'\cos(q'\tau_{2}) - X_{5}\sin(q'(\tau_{1} + \tau_{2})) = 0.$$
(7.17)

Возводя в квадрат и складывая уравнения (7.16) и (7.17), чтобы убрать τ_2 , мы получим трансцендентное уравнение:

$$R_{1}(\gamma) \equiv q^{4} + S_{1}q^{2} + S_{2}q' + S_{3} = 0, \qquad (7.18)$$

где $S_1 = -2X_2 + X_1^2 - X_2^3$, $S_2 = 2X_3X_5\sin(q'\tau_1)$, и $S_3 = X_2^2 - X_4^2 - X_5^2 - 2X_4X_5\cos(q'\tau_1)$.

Легко увидеть, что $S(\infty) = \infty$. Таким образом, уравнение (7.18) имеет один положительный корень при S(0) < 0, т.е. при $X_2^2 < (X_4 + X_5)^2$. Пусть

 γ_1 — положительный корень уравнения (7.18). Таким образом, чисто мнимые корни характеристического уравнения (7.3) — это $\pm i\gamma_1$ для $\tau_1 \in (0, \tau_1^*)$. Следовательно, уравнения (7.16) и (7.17) можно представить в следующем виде:

$$Q_{1} - Q_{3}\cos(\gamma_{1}\tau_{2}) - \sin(\gamma_{1}\tau_{2}) = 0,$$

$$Q_{2} - Q_{3}\sin(\gamma_{1}\tau_{2}) - \cos(\gamma_{1}\tau_{2}) = 0.$$

rge $Q_{1} = \gamma_{1}^{2} - X_{2}Q_{2} = -X_{1}\gamma_{1}, Q_{3} = X_{4} + X_{5}\cos(\gamma_{1}\tau_{1}),$

$$Q_{4} = X_{3}\gamma_{1} - X_{5}\sin(\gamma_{1}\tau_{1}).$$

Имеем:

$$\tau_{2}^{0} = \frac{\cos^{-1}\left(\frac{Q_{1}^{2} + Q_{2}^{2} + Q_{3}^{2} + Q_{4}^{2}}{2\sqrt{(Q_{1}^{2} + Q_{2}^{2})(Q_{3}^{2} + Q_{4}^{2})}}\right)}{\gamma_{1}} + \frac{1}{\gamma_{1}}\left[\tan^{-1}\left(\frac{Q_{1}}{Q_{2}}\right) - \tan^{-1}\left(\frac{Q_{3}}{Q_{4}}\right)\right].$$

Вокруг точки E^* система (7.1) локально асимптотически устойчива при $\tau_1 = \tau_2 = 0$ и при соблюдении условий $A_1 > 0$ и $A_2 > 0$. Согласно лемме Батлера точка E^* останется устойчивой при 0 < τ_2 < τ_2^0 для фиксированного $\tau_1 \in (0, \tau_1^*)$.

Дифференцируя уравнения (7.14) и (7.15) относительно τ_2 и задавая p' = 0, $q = \gamma_1$ и $\tau_2 = \tau_2^{-0}$, получим:

$$K\left[\frac{d}{d\tau_2}[\operatorname{Re}\{\lambda(\tau_2)\}]\right]_{\tau_2=\tau_2^0} + L\left[\frac{d}{d\tau_2}[\operatorname{Im}\{\lambda(\tau_2)\}]\right]_{\tau_2=\tau_2^0} = M,$$
(7.19)

$$-L\left[\frac{d}{d\tau_2}\left[\operatorname{Re}\{\lambda(\tau_2)\}\right]\right]_{\tau_2=\tau_2^0} + K\left[\frac{d}{d\tau_2}\left[\operatorname{Im}\{\lambda(\tau_2)\}\right]\right]_{\tau_2=\tau_2^0} = N,$$
(7.20)

где

$$\begin{split} K &= \left\{ X_{1} + X_{3} \cos\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) - X_{4} \tau_{2}^{0} \cos\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) - X_{3} \gamma_{1} \tau_{2}^{0} \sin\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) - X_{5} \left(\tau_{1} + \tau_{2}^{0}\right) \cos\left(\gamma_{1} \left(\tau_{1} + \tau_{2}^{0}\right)\right) \right\}_{\tau_{1} \in \left(0, \tau_{1}^{*}\right)}, \\ L &= \left\{ -2\gamma_{1} + X_{3} \sin\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) - X_{4} \tau_{2}^{0} \sin\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) + X_{3} \gamma_{1} \tau_{2}^{0} \cos\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) - X_{5} \left(\tau_{1} + \tau_{2}^{0}\right) \sin\left(\gamma_{1} \left(\tau_{1} + \tau_{2}^{0}\right)\right) \right\}_{\tau_{1} \in \left(0, \tau_{1}^{*}\right)}, \\ M &= \left\{ X_{5} \gamma_{1} \sin\left(\gamma_{1} \left(\tau_{1} + \tau_{2}^{0}\right)\right) - X_{3} \gamma_{1}^{2} \cos\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) + X_{4} \gamma_{1} \sin\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) \right\}_{\tau_{1} \in \left(0, \tau_{1}^{*}\right)}, \\ N &= \left\{ X_{5} \gamma_{1} \sin\left(\gamma_{1} \left(\tau_{1} + \tau_{2}^{0}\right)\right) - X_{3} \gamma_{1}^{2} \sin\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) + X_{4} \gamma_{1} \cos\left(\gamma_{1} \tau_{2}^{0}\right) \right\}_{\tau_{1} \in \left(0, \tau_{1}^{*}\right)}. \end{split}$$

Решая уравнения (7.19) и (7.20), имеем:

$$\begin{bmatrix} \frac{d\left[\operatorname{Re}\left\{\lambda(\tau_{2})\right\}\right]}{d\tau_{2}} \end{bmatrix}_{\tau_{2}=\tau_{2}^{0}} = \begin{bmatrix} \frac{KM-LN}{K^{2}+L^{2}} \end{bmatrix}.$$

TEREPE ИМЕЕМ
$$\begin{bmatrix} \frac{d\left[\operatorname{Re}\left\{\lambda(\tau_{2})\right\}\right]}{d\tau_{2}} \end{bmatrix}_{\tau_{2}=\tau_{2}^{0}} > 0 \quad \text{при}$$

KM > LN. Тем самым условие трансверсальности доказано. Итак, система (7.1) демонстрирует сверхкритическую бифуркацию Хопфа, когда τ_2 достигает своего критического значения τ_2^0 и τ_1 фиксировано в области (0, τ_1^*).

Случай 5: $\tau_1 \in (0, \tau_2^*)$ и $\tau_1 > 0$.

Теорема 7.5. Пусть точка E^* существует и локально асимптотически устойчива при $A_1 > 0$ и $A_2 > 0$ для системы (2.2) ($\tau_1 = \tau_2 = 0$). Также для $\tau_2 \in (0, \tau_2^*)$ (фиксировано) и $\tau_1 > 0$, если ($X_2 + X_4$)² < X_5^2 , то существует пороговое значение $\tau_1^{\ 0}$ такое, что точка E^* системы (7.1) устойчива при $0 < \tau_1 < \tau_1^{\ 0}$ и неустойчива при $\tau_1 > \tau_1^{\ 0}$ при условии *К'М'* > *L'N'*. Более того, система (7.1) проявляет сверхкритическую бифуркацию Хопфа вокруг точки E^* при $\tau_1 = \tau_1^{\ 0}$, выраженном, как:

$$\tau_{1}^{0} = \frac{\cos^{-1}\left(\frac{Q_{1}^{'2} + Q_{2}^{'2} + Q_{3}^{'2} + Q_{4}^{'2} - Q_{5}^{'2} - Q_{6}^{'2}}{2\sqrt{(Q_{1}^{'2} + Q_{2}^{'2})(Q_{3}^{'2} + Q_{4}^{'2})}}\right)} + \frac{1}{\gamma_{2}}\left[\tan^{-1}\left(\frac{Q_{1}^{'}}{Q_{2}^{'}}\right) - \tan^{-1}\left(\frac{Q_{3}^{'}}{Q_{4}^{'}}\right)\right],$$

где τ_2 – положительный корень уравнения $R_1(\gamma) \equiv \gamma^4 + S_1\gamma^3 + S_2\gamma^2 + S_3\gamma + S_4 = 0$. Здесь

$$\begin{split} S_{1}^{'} &= \{-2X_{3}\mathrm{sin}\left(\gamma\tau_{2}\right)\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)},\\ S_{2}^{'} &= \left\{X_{3}^{2} - 2X_{2} + X_{1}^{2} + 2X_{1}X_{3}\mathrm{cos}\left(\gamma\tau_{2}\right) - 2X_{4}\mathrm{cos}\left(\gamma\tau_{2}\right)\right\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)},\\ S_{3}^{'} &= \left\{2X_{2}X_{3}\mathrm{sin}\left(\gamma\tau_{2}\right) - 2X_{1}X_{4}\mathrm{sin}\left(\gamma\tau_{2}\right)\right\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)},\\ S_{4}^{'} &= \left\{X_{2}^{2} + X_{4}^{2} + 2X_{2}X_{4}\mathrm{cos}\left(\gamma\tau_{2}\right) - X_{5}^{2}\right\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)},\\ Q_{1}^{'} &= \gamma_{2}^{2} - X_{2}, Q_{2}^{'} = -X_{1}\gamma_{2},\\ Q_{3}^{'} &= \left\{X_{5}\mathrm{cos}\left(\gamma_{2}\tau_{2}\right)\right\},\\ Q_{4}^{'} &= \left\{-X_{5}\mathrm{sin}\left(\gamma_{2}\tau_{2}\right)\right\},\\ Q_{5}^{'} &= X_{4}, Q_{6}^{'} &= X_{3}\gamma_{2},\\ K^{'} &= \left\{X_{1} + X_{3}\mathrm{cos}\left(\gamma_{2}\tau_{2}\right) - X_{4}\tau_{2}\mathrm{cos}\left(\gamma_{2}\tau_{2}\right) - X_{5}\left(\tau_{1}^{0} + \tau_{2}\right)\mathrm{cos}\left(\gamma_{2}\left(\tau_{1}^{0} + \tau_{2}\right)\right)\right\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)},\\ L^{'} &= \left\{-2\gamma_{2} + X_{3}\mathrm{sin}\left(\gamma_{2}\tau_{2}\right) - X_{4}\tau_{2}\mathrm{sin}\left(\gamma_{2}\tau_{2}\right) + X_{3}\gamma_{2}\tau_{2}\mathrm{cos}\left(\gamma_{2}\tau_{2}\right) - X_{5}\left(\tau_{1}^{0} + \tau_{2}\right)\mathrm{sin}\left(\gamma_{2}\left(\tau_{1}^{0} + \tau_{2}\right)\right)\right\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)},\\ M^{'} &= \left\{X_{5}\gamma_{2}\mathrm{cos}\left(\gamma_{2}\left(\tau_{1}^{0} + \tau_{2}\right)\right)\right\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)},\\ N^{'} &= \left\{X_{5}\gamma_{2}\mathrm{cos}\left(\gamma_{2}\left(\tau_{1}^{0} + \tau_{2}\right)\right)\right\}_{\tau_{2}\in\left(0,\tau_{2}^{*}\right)}. \end{split}$$

Доказательство. Доказательство теоремы такое же, как и в случае 4.

8. ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

В этом разделе мы выполнили численное моделирование системы (2.2), чтобы проверить аналитические результаты. Во-первых, мы выбрали следующий набор значений параметров: r = 5.5, $d_1 = 6.5, k = 0.2, d_2 = 15, a_1 = 2, a_2 = 0.3, b = 5, c = 0.7, A = 2, \alpha = 0.3, \eta = 0.2, e = 2, m = 0.1.$

Для этого параметрического набора тривиальное равновесие точки $E_0(0,0)$ является локально асимптотически устойчивым. На рис. 1 показано устойчивое поведение точки $E_0(0,0)$ во времени *t*. Эти параметрические значения показывают, что транскритическая бифуркация происходит во-



Рис. 1. Устойчивое поведение точки $E_0(0,0)$ для набора параметров: r = 5.5, $d_1 = 6.5$, k = 0.2, $d_2 = 15$, $a_1 = 2$, $a_2 = 0.3$, b = 5, c = 0.7, A = 2, $\alpha = 0.3$, $\eta = 0.2$, e = 2, m = 0.1.

круг $E_0(0,0)$ при $d_1 = d_1^{[\text{TC}]} = 5.5$ и тривиальное равновесие точки $E_0(0,0)$ теряет свою устойчивость, когда d_1 становится меньше $d_1^{[\text{TC}]}$ (см. рис. 2). К тому же для тех же параметрических значений, представленных на рис. 1, транскритическая бифуркация появляется при $d_2 = d_2^{[\text{TC}]} = 0.0750$ около точки $E_0(0,0)$, что показано на рис. 3 (ВР означает точку бифуркации).



Рис. 2. Транскритическая бифуркация вокруг точки $E_0(0,0)$ с d_1 в качестве параметра бифуркации; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 1. Точка бифуркации (ВР – bifurcation point) по-является при $d_1^{[TC]} = 5.5$.

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021



Рис. 3. Транскритическая бифуркация вокруг точки $E_0(0,0)$ с d_2 в качестве параметра бифуркации; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 1. Точка бифуркации (ВР) появляется при $d_1^{[TC]} = 0.0750$.

Если мы возьмем $d_1 = 1.5 < r = 5.5$, а другие параметры не изменятся, как показано на рис. 1, то свободное от хищников равновесие $E_1\left(\frac{r-d_1}{a_1},0\right) \equiv E_1(2,0)$ существует и является локально асимптотически устойчивым. Рис. 4 показывает устойчивый характер точки $E_1(2,0)$ во времени *t*. Из рис. 5 видно, что транскритическая бифуркация проявляется вокруг точки $E_1(2,0)$ при $d_2 = d_2^{[\text{TC}]} = 0.0457$ с параметром бифуркации d_2 .



Рис. 4. Устойчивое поведение равновесия в точке $E_1(2, 0)$, свободной от хищников, при $d_1 = 1.5$; остальные параметры таких же, как в наборе данных для рис. 1.



Рис. 5. Транскритическая бифуркация вокруг точки $E_1(2,0)$ с d_2 в качестве параметра бифуркации; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 4. Точка бифуркации (ВР) появляется при $d_2^{[TC]} = 0.0457$.

Опять же, следует отметить, что если мы возьмем $d_2 = 0.04$ (уровень смертности хищников), а остальные параметры будут такими же, как на рис. 4, то осевое равновесие точки E_1 будет неустойчивым, но внутреннее равновесие точки $E^*(x^*,y^*) = E^*(1.6628, 0.6771)$ существует и являет-

ся локально асимптотически устойчивым. На рис. 6 показан устойчивый характер точки $E^*(1.6628, 0.6771)$.

Теперь мы зафиксируем другой набор параметров:

$$r = 5.5, d_1 = 0.6, k = 0.2, d_2 = 0.1, a_1 = 0.6, a_2 = 0.98, b = 5, c = 0.9, A = 8.5, \alpha = 0.3, \eta = 0.2, e = 2, m = 0.1.$$
 (8.1)

Для этих значений параметров все возможные точки равновесия E_0 , E_1 , E_2 и E^* существуют, но только внутреннее равновесие $E^*(x^*,y^*) \equiv E^*(1.6445, 9.5689)$ является локально асимптотически устойчивым. Рис. 9 показывает устойчивый характер E^* во времени *t*. Более того, если взять k = 0.7 (уровень страха) и оставить остальные параметры, как в вышеперечисленном наборе данных, то свободное равновесие для жертвы



Рис. 6. Устойчивое поведение точки $E^*(1.6628, 0.6771)$ по времени *t* при $d_2 = 0.04$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 4.



Рис. 7. Устойчивое поведение точки $E_2(0, 6.7420)$ для набора параметров: r = 5.5, $d_1 = 0.6$, k = 0.7, $d_2 = 0.1$, $a_1 = 0.6$, $a_2 = 0.98$, b = 5, c = 0.9, A = 8.5, $\alpha = 0.3$, $\eta = 0.2$, e = 2, m = 0.1.

 $E_2(0, \overline{y}) \equiv E_2(0, 6.7420)$ существует и является локально асимптотически устойчивым, что отражено на рис. 7. Если взять *k* (уровень страха) в качестве свободного параметра, то для тех же параметрических значений на рис. 7 транскритическая бифуркация проявляется вокруг точки $E_2(0, 6.7420)$ при $k = k^{[TC]} = 0.6703$ и $E_2(0, 6.7420)$ теряет критерий устойчивости, когда *k* становится меньше, чем $k^{[TC]}$ (рис. 8).

В отсутствие действия страха, т.е. при k = 0.0 и остальных параметрах таких же, как в вышеперечисленном наборе данных, точка $E^*(x^*,y^*) = E^*(7.7814, 20.1182)$ локально асимптотически



Рис. 8. Транскритическая бифуркация вокруг точки $E_2(0, 6.7420)$ с k в качестве параметра бифуркации; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 7. Точка бифуркации (ВР) появляется при $k^{[TC]} = 0.6703$.

устойчива, ее критерий устойчивости отражен на рис. 11. Стоит заметить, что эффект страха может снизить значение точки внутреннего равновесия. Из рис. 10а можно сделать вывод, что повышение уровня страха (k) может не только снизить скорость роста популяции жертвы, но и уменьшить популяцию хищника при наличии дополнительной пищи. Кроме того, при отсутствии дополнительного питания (A = 0), как видно из рис. 10б, рост обоих видов монотонно убывает при непрерывном увеличении параметра k. Итак, изучение эффекта страха при взаимодействии хищника и жертвы очень важно независимо от



Рис. 9. Устойчивое поведение точки $E^*(1.6445, 9.5689)$ по времени *t* для k = 0.2 (уровень страха); остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 7.



Рис. 10. Влияние параметра k (уровень страха) на характер устойчивого состояния точки E^* при A = 8.5 (а) и A = 0.0 (б). Здесь $k \in [0.0, 0.3]$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 9.



Рис. 11. Устойчивое поведение точки *E**(7.7814, 20.1182) при *k* = 0 (без эффекта страха); остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 9.



Рис. 12. Влияние параметра *m* на характер устойчивого состояния точки E^* при k = 0.2 (а) и k = 0.0 (б); остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 9.



Рис. 13. Влияние параметра *m* на рост популяции хищников *у* для разных уровней страха при A = 0; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 9.

дополнительной пищи и является биологически последовательным.

Влияние временных задержек. Для изучения численного моделирования системы (7.1) (с ис-

пользованием программного пакета MATLAB) на влияние задержек по времени возьмем следующий набор значений параметров:

$$r = 1.5, d_1 = 0.05, k = 0.2, d_2 = 0.1, a_1 = 0.1, a_2 = 2, b = 2, c = 0.35, A = 3, \alpha = 0.3, \eta = 0.4, e = 3, m = 0.1.$$
 (8.2)

При $\tau_1 = \tau_2 = 0$ равновесие сосуществования точки $E^*(x^*, y^*) = E^*(2.0850, 5.4742)$ существует и устойчиво для перечисленного набора данных. Рис. 14 показывает устойчивый характер точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ для $\tau_1 = \tau_2 = 0$. Зафиксируем $\tau_1 = 0$ и будем постепенно увеличивать значение τ_2 . Путем некоторых расчетов получаем пороговое значение $\tau_2^* = 17.6726$, для которого точка



Рис. 14. Устойчивое поведение точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ при $\tau_1 = \tau_2 = 0$ для набора параметров: r = 1.5, $d_1 = 0.05$, k = 0.2, $d_2 = 0.1$, $a_1 = 0.1$, $a_2 = 2$, b = 2, c = 0.35, A = 3, $\alpha = 0.3$, $\eta = 0.4$, e = 3, m = 0.1. (a) – Поведение во времени, (б) – фазовая диаграмма.



Рис. 15. Устойчивое поведение точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ при $\tau_2 = 5.5 < \tau_2^* = 17.6726$ и $t_1 = 0$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – стабильная спираль.

 $E^*(2.0850, 5.4742)$ устойчива при $0 < \tau_2 < \tau_2^*$ и неустойчива при $\tau_2 > \tau_2^*$, т.е. система (7.1) теряет устойчивость и совершает колебания предельного цикла за счет бифуркации Хопфа при $\tau_2^* =$ 17.6726 вокруг $E^*(2.0850, 5.4742)$.

Рис. 15 показывает устойчивый характер точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ при $\tau_2 = 5.5 < \tau_2^* = 17.6726$, тогда как рис. 16 представляет колебание предельного цикла для $\tau_2 = 30 > \tau_2^* = 17.6726$. Рис. 17 и 18 изоб-

ражают бифуркационную диаграмму с τ_2 в качестве параметра бифуркации при $\tau_1 = 0$. Аналогично, точка $E^*(2.0850, 5.4742)$ ассимптотически устойчива для $\tau_1 < \tau_1^* = 23.8002$ и неустойчива при $\tau_1 > \tau_1^* = 23.8002$ когда $\tau_2 = 0$, т.е. точка $E^*(2.0850, 5.4742)$ устойчива ниже порогового значения $\tau_1^* = 23.8002$, а выше его – неустойчива.

Рис. 19 отражает устойчивую природу точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ для $\tau_1 = 15.5 < \tau_1 * = 23.8002$ то-



Рис. 16. Существование периодического решения вокруг точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ с временной задержкой $\tau_2 = 30 > \tau_2^* = 17.6726$ и $\tau_1 = 0$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – фазовая диаграмма (замкнутая орбита).



Рис. 17. Диаграмма бифуркации Хопфа для жертв (x) при τ_2 в качестве параметра бифуркации.

гда как рис. 20 изображает колебания предельного цикла для $\tau_1 = 45 > \tau_1^* = 23.8002$. Рис. 21 и 22 показывают, что система (7.1) проявляет сверхкритичсскую бифуркацию Хопфа при $\tau_1^* = 23.8002$, когда $\tau_2 = 0$. Пусть τ_1 фиксировано в (0, $\tau_1^* = 23.8002$) и τ_2 постепенно увеличивается. Тогда получаем пороговое значение $\tau_2^0 = 11.8244$ такое, что $E^*(2.0850, 5.4742)$ устойчиво для $\tau_2 < \tau_2^0 = 11.8244$ и неустойчиво для $\tau_2 > \tau_2^0 =$ = 11.8244, т.е. система (7.1) теряет свой устойчи-



Рис. 18. Диаграмма бифуркации Хопфа для хищников (*y*) при τ_2 в качестве параметра бифуркациикации.

вый характер и совершает колебания предельного цикла через сверхкритическую бифуркацию Хопфа при $\tau_2^0 = 11.8244$ вокруг точки *E**(2.0850, 5.4742), когда t₁ фиксировано в (0, $\tau_1^* = 23.8002$).

Рис. 23 показывает устойчивый характер точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ для $\tau_2 = 2.5 < \tau_2^{0} = 11.8244$, тогда как рис. 24 демонстрирует колебания предельного цикла при $\tau_2 = 25.5 > \tau_2^{0} = 11.8244$, когда $\tau_1 = 5.5$ фиксировано в (0, $\tau_1^* = 23.8002$). Рис. 25 и



Рис. 19. Устойчивое поведение точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ при временной задержке $\tau_1 = 15.5 < \tau_1^* = 23.8002$ и $\tau_2 = 0$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – устойчивая траектория.



Рис. 20. Существование периодического решения вокруг точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ с временной задержкой $\tau_1 = 45 > \tau_1^* = 23.8002$ и $\tau_2 = 0$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – фазовая диаграмма (замкнутая орбита).

26 изображают бифуркационную диаграмму с τ_2 в качестве параметра бифуркации при фиксированном $\tau_1 = 5.5$. Таким же образом, принимая $\tau_2 = 2.5 \in (0, \tau_2^* = 17.6726)$, можно увидеть из рис. 27 и 28, что точка $E^*(2.0850, 5.4742)$ устойчива при $\tau_1 = 5.5 < \tau_1^{0} = 18.8575$ и неустойчива при $\tau_1 = 35.5 > \tau_1^{0} = 18.8575$, т.е. система (7.1) выполняет колебания предельного цикла от устойчивого характера при увеличении значения τ_1 через пороговое значение $\tau_1^{0} = 18.8575$. Рис. 29 изобра-

жает бифуркационную диаграмму с учетом τ_1 в качестве бифуркационного параметра, когда τ_2 фиксировано в (0, 17.6726).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе для анализа воздействия страха на виды добычи была сформулирована система «хищник—жертва» Беддингтона—ДеАнгелиса в присутствии дополнительной пищи, включающая убежище для добычи. Наша цель — аналитически и численно исследовать влияние страха



Рис. 21. Диаграмма бифуркации Хопфа для жертв (x) при τ_1 в качестве параметра бифуркации.



Рис. 22. Диаграмма бифуркации Хопфа для хищников (*y*) при τ_1 в качестве параметра бифуркации.

хищников на популяцию жертв. Математически мы вывели положительность и равномерную ограниченность решений. Обсуждены критерии вымирания обеих популяций. Были изучены математические свойства, такие как равномерное постоянство, анализ равновесия, локальный и глобальный анализ устойчивости предложенной системы. Мы также вывели достаточные условия возникновения транскритической бифуркации вокруг каждого граничного равновесия. Численно было показано, что эффект страха не только влияет на популяцию жертвы, но также влияет на динамику предложенной системы следующим образом:

1. На рис. 9 и 11 стоит обратить внимание на то, что эффект страха на виды добычи может уменьшить значение компонентов x и y уникального положительного равновесия точки E^* : по мере увеличения уровня страха k прирост обеих популяций постепенно снижается независимо от дополнительной пищи (см. рис. 10).



Рис. 23. Устойчивое поведение точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ при временной задержке $\tau_1 = 5.5 \in (0, \tau_1^* = 23.8002)$ (фиксирована) и $\tau_2 = 2.5 < \tau_2^{0} = 11.8244$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – устойчивая фазовая диаграмма.



Рис. 24. Существование периодического решения вокруг точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ с временной задержкой $\tau_1 = 5.5 \in (0, \tau_1^* = 23.8002)$ (фиксирована) и $\tau_2 = 25.5 > \tau_2^{0} = 11.8244$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – фазовая диаграмма (замкнутая орбита).

2. Убежище жертвы влияет на динамику популяции. Рис. 12 показывает, что с постепенным увеличением параметра убежища жертвы *m* значение *y** уменьшается, несмотря на эффект страха. Но популяция хищников не вымирает из-за предоставления дополнительных кормов. Отсюда можно сделать вывод, что дополнительная пища может контролировать популяцию хищников от вымирания, что является биологически устойчивым.

3. В отсутствие дополнительной пищи популяция хищников вымирает из-за различных уровней страха, когда *m* достигает высокого значения (см. рис. 13).

Эти результаты показывают, что влияние страха и убежища жертвы очень значимо в присутствии дополнительной пищи, которая может обогатить динамику предлагаемой нами системы «хищник—жертва» (2.2).

Более того, эффект страха не снижает мгновенно рождаемость видов-жертв, но требуется некоторое время, чтобы повлиять на скорость рождаемости жертв. Также хищнику нужно время, чтобы переварить пищу. Итак, изучение фак-



Рис. 25. Диаграмма бифуркации Хопфа для жертв (*x*) при τ_2 в качестве параметра бифуркации при τ_1 , фиксированном в области (0, τ_1^*).



Рис. 26. Диаграмма бифуркации Хопфа для хищников (*y*) при τ_2 в качестве параметра бифуркации при τ_1 , фиксированном в области (0, τ_1^*).

торов задержки τ_1 и τ_2 делает систему (7.1) более реалистичной и сложной. Система с задержкой (7.1) демонстрирует все динамические свойства, которые могут обсуждаться относительно системы без задержки (2.2). В этой статье мы изучили влияние двух факторов запаздывания на внутреннюю точку равновесия. Обсуждены все возможные комбинации двух типов факторов задержки. Численно наблюдается, что предложенная система теряет свою устойчивость и выполняет колебания предельного цикла через сверхкритическую бифуркацию Хопфа для непрерывного увеличения параметров задержки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны квалифицированному рецензенту и редактору за их внимательное чтение, ценные комментарии и полезные предложения, которые помогли значительно улучшить представление этой работы.



Рис. 27. Устойчивое поведение точки $E^*(2.0850, 5.4742)$ при временной задержке $\tau_2 = 2.5 \in (0, \tau_2^* = 17.6726)$ (фиксирована) и $\tau_1 = 5.5 < \tau_1^0 = 18.8575$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – устойчивая траектория).



Рис. 28. Существование периодического решения вокруг точки *E**(2.0850, 5.4742) с временной задержкой $\tau_2 = 2.5 \in (0, \tau_2^* = 17.6726)$ (фиксирована) и $\tau_1 = 35.5 > \tau_1^0 = 18.8575$; остальные параметры такие же, как в наборе данных для рис. 14. (а) – Поведение во времени, (б) – фазовая диаграмма (замкнутая орбита).



Рис. 29. Бифуркационные диаграммы Хопфа с τ_1 в качестве параметра бифуркации и τ_2 , фиксированном в области $(0, \tau_2^*)$: (a) – для жертв, (б) – для хищников.

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. J. Taylor, Predation (Chapman & Hall, N. Y., 1984).
- S. L. Lima and L. M. Dill, Canadian J. Zool. 68 (4), 619 (1990).
- 3. C. S. Holling, The Canadian Entomologist **91** (5), 293 (1959).
- 4. C. S. Holling, The Canadian Entomologist **91** (7), 385 (1959).
- 5. C. S. Holling, Memoirs Entomol. Soc. of Canada 97 (S45), 5 (1965).

- 6. J. R. Beddington, J. Animal Ecol. 44 (1), 331 (1975).
- D. L. DeAngelis, R. A. Goldstein, and R. V. O'Neill, Ecology 56 (4), 881 (1975).
- R. Arditi and L. R. Ginzburg, J. Theor. Biol. 139 (3), 311 (1989).
- 9. S. Creel and D. Christianson, Trends Ecology & Evolution 23 (4),194 (2008).
- L. Y. Zanette, M. C. Allen, A. F. White, and M. Clinchy, Science 334 (6061), 1398 (2011).
- S. Creel, D. Christianson, S. Liley, and J. A. Winnie, Science **315** (5814), 960 (2007).
- 12. W. Cresswell, J. Ornithol. 152 (S1), 251 (2010).
- 13. X. Wang, L. Zanette, and X. Zou, J. Math. Biol. 73, 1179 (2016).
- 14. S. Mondal, A. Maiti, and G. P. Samanta, Biophys. Rev. Lett. **13** (4), 157 (2018).
- H. Zhang, Y. Cai, S. Fu, and W. Wang, Appl. Math. Comput. 356, 328 (2019).
- S. Mondal and G. P. Samanta, J. Phys. A: Math. Theor. 53 (29), 295601 (2020). DOI: 10.1088/1751-8121/ab81d8
- 17. P. J. Wangersky and W. J. Cunningham, Ecology **38** (1), 136 (1957).
- E. Beretta and Y. Kuang, J. Math. Anal. Appl. 204, 840 (1996).
- 19. P. D. N. Srinivasu, S. R. V. P. Bhuvanagiri, and M. Venkatesulu, Theor. Popul. Biol. 72, 111 (2007).

- 20. P. D. N. Srinivasu and S. R. V. P. Bhuvanagiri, Journal of Mathematical Biology **60**, 591 (2010).д
- 21. P. D. N. Srinivasu and B. S. R. V. Prasad, Bul. Math. Biol. **73** (10), 2249 (2011).
- 22. T. K. Kar, Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation **10** (6), 681 (2005).
- 23. R. S. Cantrell and C. Cosner, J. Math. Analysis and Applications 257 (1), 206 (2001).
- 24. A. Das and G. P. Samanta, Physica A: Statistical Mechanics and its Applications **538**, 122844 (2020).
- 25. J. P. Tripathi, S. Abbas, and M. Thakur, Non-Linear Dynamics 80, 177 (2015).
- 26. G. Birkhoff and G. C. Rota, *Ordinary Differential Equations* (John Wiley and Sons, N. Y., 1989).
- 27. J. K. Hale, *Theory of Functional Differential Equations* (Springer-Verlag, N. Y., 1977).
- 28. L. Perko, *Differential Equations and Dynamical Systems* (Springer, N. Y., 2001).
- 29. S. Mondal and G. P. Samanta. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications **534**, 122301 (2019).
- 30. S. Mondal and G. P. Samanta, Energy, Ecology and Environment 5 (1), 12 (2020).
- 31. S. Ruan and J. Wei, Dynamics of Continuous, Discrete and Impulsive Systems Series B: Applications and Algorithms **10**, 863 (2003).
- 32. H. I Freedman and V. S. H. Rao, Bul. Math. Biol. 45, 991 (1983).

Impact of Fear Effect in a Delayed Predator-Prey System with Prey Refuge and Additional Food for Predators

S. Mondal and G.P. Samanta

Indian Institute of Engineering Science and Technology, Shibpur, Howrah-711103, India

Evidence from field experiments on terrestrial vertebrates shows that direct predation by predators on preys might not only affect the population dynamics but also have an indirect effect on the predator's fear (felt by prey) through chemical and/or vocal cues, reduce the prey reproduction and change the life-history of species. In the present work, the impact of the fear effect on the prey has been investigated in a Beddington— DeAngelis predator-prey system with prey refuge and additional food for predators. Firstly, we have discussed the properties of solutions such as positivity and uniform boundedness that enable the proposed system to work properly. Criteria for the existence of equilibrium points, local and global stability analysis of all equilibrium points are derived. Secondly, the conditions for the occurrence of transcritical bifurcations are presented. Furthermore, we have studied the local stability behavior of the coexistence equilibrium point for various combinations of the delay factors and found that continuous increment of the delay parameters can replace a stable equilibrium by the stable limit cycle oscillations through supercritical Hopf-bifurcation. Extensive numerical simulations are performed via MATLAB to validate our analytical findings. Numerically, the impact of prey refuge on the survival of the predator in the presence of additional food is shown.

Keywords: prey refuge, fear effect, additional food, local bifurcations, global stability, time-delays

==== БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 519.63

ИДЕАЛЬНОЕ СВОБОДНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В МОДЕЛИ «ХИЩНИК–ЖЕРТВА» ПРИ МНОГОФАКТОРНОМ ТАКСИСЕ

© 2021 г. П.А. Зеленчук, В.Г. Цибулин

Южный федеральный университет, 344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105/42 E-mail: zelenchukpavel@mail.ru, vgcibulin@sfedu.ru Поступила в редакцию 10.07.2020 г. После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 31.07.2020 г.

Анализируется концепция идеального свободного распределения для системы «хищник—жертва» на неоднородном кольцевом ареале. Уравнения диффузия-реакции-адвекции моделируют многофакторный таксис с учетом различных законов роста жертвы. Установлены соотношения на параметры, при которых реализуется идеальное свободное распределение. Изучены трансформации решений при отклонениях параметров от условий, обеспечивающих идеальное свободное распределение, а также возникновение автоколебательных режимов.

Ключевые слова: популяционная динамика, идеальное свободное распределение, таксис, модель «хищник-жертва».

DOI: 10.31857/S0006302921030145

Концепция идеального свободного распределения (ИСР), введенная в работе [1], изначально рассматривала один вид, особи которого имеют полное представление о среде обитания и могут свободно перемещаться в любую ее точку. Это была чисто поведенческая концепция, не учитывающая динамики популяции. Позднее она была распространена на среду с двумя конкурирующими видами с учетом изменения численности популяций [2], а затем и на случай нескольких видов, находящихся во взаимодействии «хищник– жертва» [3,4].

При исследовании локальных («точечных») моделей «хищник-жертва» с ИСР рядом авторов использовались различные предположения относительно миграции видов между двумя участками ареала [5,6]. Сами модели базировались на классических уравнениях Лотки-Вольтерры, модифицированных функциональным откликом Холлинга II рода для хищника или же логистическим законом роста для жертвы.

В некоторых работах для системы «хищникжертва» концепция ИСР связывалась с идеями теории игр и адаптивной динамики [7] и характеризовалась как эволюционно устойчивая стратегия. В работе [8] было исследовано влияние неоднородности ресурсов в модели клеточного автомата 30 × 30 на динамику локальной системы «хищник–жертва» при ИСР. Параллельно развивались исследования, рассматривающее ИСР в системах двух или нескольких конкурирующих за единый ресурс видов, динамика которых описывается уравнениями типа диффузия-реакция-адвекция [9,10,11]. При этом под ИСР подразумевается размещение особей, пропорциональное количеству доступного ресурса. В работе [12] было показано, что ИСР для такого рода моделей обычно является необходимым и часто достаточным условием эволюционно устойчивой стратегии.

К настоящему времени авторам неизвестны работы, в которых бы рассматривалась ИСР в моделях «хищник-жертва», описываемых уравнениями реакция-диффузия-адвекция. Между тем именно это направление представляет значительный интерес для пространственно неоднородных систем и задач с неравномерным распределением ресурса [13,14]. Важным является не только вопрос о том, дает ли ИСР конкурентные преимущества по сравнению с другими стратегиями, но и анализ устойчивости сообщества «хищникжертва» с ИСР при возмущениях параметров системы.

При исследовании динамики системы «хищник-жертва» обычно исходят из большей активности хищника. Так, для уравнений типа диффузия-реакция коэффициент диффузии хищника зачастую на порядок превосходит соответствующий коэффициент жертвы [15], а для уравнений типа диффузия-реакция-адвекция направленной

Сокращение: ИСР – идеальное свободное распределение.

миграцией (таксисом) обладает хищник [16,17]. Для многих реальных биологических систем такое описание вполне оправдано, тем не менее, интересны случаи, когда жертва также обладает адвекцией и диффузией, скорости которых соизмеримы или равны соответствующим скоростям хищника [18].

В работе рассматривается система «хищникжертва» на кольцевом ареале с учетом неоднородного распределения ресурса жертвы и многофакторного таксиса. На основе уравнений диффузии-реакции-адвекции строится модель, в которой рост популяции жертвы описывается полиномиальной функцией, позволяющей получить как стационарное, так и автоколебательное решение для системы. Анализируются условия, при которых получаются решения, отвечающие ИСР, их устойчивость и трансформации при малых отклонениях параметров.

ДИНАМИКА СИСТЕМЫ «ХИЩНИК– ЖЕРТВА» НА НЕОДНОРОДНОМ АРЕАЛЕ

Рассматривается следующая система уравнений диффузии-адвекции-реакции:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = -q'_{1} + u [\eta_{1} f_{n}(u) - \mu_{1} v], \quad q_{1} = -k_{1} u' + u \alpha_{1} Q'_{1} - u \beta_{1} Q'_{2},
\frac{\partial v}{\partial t} = -q'_{2} + v \left[-\eta_{2} + \mu_{2} \frac{u}{p} \right], \qquad q_{2} = -k_{2} v' + v \beta_{2} Q'_{3},$$
(1)

где u и v — плотности популяций жертвы и хищника соответственно, p — ресурс жертвы, q_1, q_2 миграционные потоки, а штрих означает производную по x.

Рост популяции жертвы при отсутствии хищника определяется полиномиальной функцией $f_n(u)$:

$$f_n(u) = u^n \left(1 - \frac{u}{p}\right), \ n = 0, \ 1, \ 2 \ \dots$$
 (2)

В выражении (2) при n = 0 будем иметь логистический, а при n = 1 гиперболический законы роста. Влияние хищника описывается слагаемым $\mu_1 uv$ из классической модели Лотки-Вольтерра.

В отсутствие жертвы хищник вымирает с экспоненциальной скоростью, описываемой членом $(-\eta_2 v)$. Рост хищника задается функцией $\mu_2 uv/p$, которая позволяет учитывать скорость размножения хищника в зависимости от численности жертвы и ее ресурса. Если соотношение u/p мало, скорость размножения хищника также мала, если же $u/p \rightarrow 1$, скорость хищника становится максимальной.

В состав миграционного потока жертвы q_1 входит диффузионное слагаемое ($-k_1u'$), отвечающее за естественное стремление особей вида «распространиться» и занять весь ареал, и два адвективных слагаемых, первое из которых ($u\alpha_1Q_1'$) характеризует таксис жертвы направленный на ресурс, а второе ($-u\beta_1Q_2'$) – таксис жертвы, направленный от хищника. Миграционный поток хищника q_2 содержит диффузионное слагаемое ($-k_2v'$) и таксис, направленный на жертву ($v\beta_2Q_3'$).

Функции Q_j (j = 1, 2, 3) характеризуют стратегии направленной миграции. Именно выбор этих

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

функций будет определять характер пространственного распределения видов.

Система (1) дополняется условиями периодичности:

$$u(0,t) = u(a,t), v(0,t) = v(a,t)$$

$$q_i(0,t) = q_i(a,t), i = 1,2$$
(3)

и начальными условиями

$$u(x,0) = u_0(x), v(x,0) = v_0(x).$$
(4)

Функция ресурса p(x), определяющая неоднородность жизненных условий, является положительной функцией и определяется выражением $p(x) = e^{\mu(x)}$, где $\mu(x)$ – вспомогательная функция, удовлетворяющая условию $\mu(0) = \mu(a)$.

ЛОКАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ

Стационарные решения (1) при отсутствии пространственных потоков ($q_1 = q_2 = 0$) находятся из системы:

$$u[\eta_1 f_n(u) - \mu_1 v] = 0,$$

$$v\left[-\eta_2 + \mu_2 \frac{u}{p}\right] = 0.$$
(5)

При положительных коэффициентах имеются тривиальное равновесие (0, 0), равновесие без хищника (p, 0) и решение с обоими видами:

$$u = \frac{\eta_2 p}{\mu_2}, v_n = \frac{\eta_1 f_n(u)}{\mu_1}.$$
 (6)

Решение (6) устойчиво (в линейном приближении [19]) при выполнении следующих условий:

$$\eta_2 < \mu_2 < \left(\frac{n+1}{n}\right)\eta_2. \tag{7}$$



Рис. 1. Фазовые портреты системы (1) без потоков: (а) – устойчивое равновесие, n = 0, $\eta_2 < \mu_2$; (б) – неустойчивый фокус и установление к предельному циклу, n = 1, $\mu_2 > 2\eta_2$.

Для n = 0 правая часть неравенства (7) теряет свой смысл и поэтому для этого случая условие устойчивости примет вид $\eta_2 < \mu_2$. При n = 0 решение (6) представляет собой «фокус» (рис. la), устойчивый при выполнении неравенства $\eta_2 < \mu_2$ и теряющий устойчивость при его нарушении. Если $n \neq 0$, решение (6) также устойчиво при выполнении неравенства (7). В случае $\mu_2 > 2\eta_2$ возникает устойчивый предельный цикл (см. рис. 16).

При n = 0 ограничений на возрастание коэффициента μ_2 нет и колебаний нет. Для n = 1 интервал устойчивости (7) максимален, выход из этого интервала при возрастании μ_2 сопровождается появлением колебаний. С ростом *n* интервал устойчивости сокращается.

УЧЕТ МИГРАЦИОННЫХ ПОТОКОВ

Покажем, что при наличии в системе (1) миграционных потоков распределение видов хищника и жертвы будет пропорционально ресурсу p(x) при логарифмическом виде функций Q_j :

$$Q_1 = \ln p, Q_2 = \ln v, Q_3 = \ln u.$$
 (8)

Для сохранения полной системой (1) стационарного решения (6) необходимо выполнение условий:

$$k_{1}u' - u\alpha_{1}(\ln p)' + u\beta_{1}(\ln v)' = 0,$$

$$k_{2}v' - v\beta_{2}(\ln u)' = 0.$$
(9)

Подставляя выражения (6) в выражения (8), с учетом уравнения (2) получим:

$$\frac{\eta_2}{\mu_2} p'(k_1 - \alpha_1 + n\beta_1) = 0,$$

$$\frac{\eta_1}{\mu_1} \left(\frac{\eta_2}{\mu_2}\right)^n \left(1 - \frac{\eta_2}{\mu_2}\right) p^n p'[nk_2 - \beta_2] = 0.$$
(10)

Таким образом, получаются условия на коэффициенты системы, при которых имеется стационарное решение (6):

$$k_1 = \alpha_1 - n\beta_1, \ k_2 = \frac{\beta_2}{n}.$$
 (11)

В случае, когда n = 0, производная v' = 0 и условие (10) будет выполнено, если:

$$k_1 = \alpha_1, \, \beta_2 = 0.$$
 (12)

Далее рассмотрим систему (1) на одномерном кольцевом интервале $\Omega = [0, a]$ для случая гиперболического закона роста жертвы (n = 1), интересного с точки зрения существования стационарных решений и периодических колебаний. Кольцевой ареал довольно распространенное явление в природе, например узкая береговая линия озера или уровень постоянной высоты вокруг горы [15].

Для численного анализа задачи (1)–(4) с учетом (8), (11) используем интегро-интерполяционный метод смещенных сеток аналогично [18]. Плотности популяций хищника и жертвы определяются в узлах основной сетки $u(x_k,t)$, $v(x_k,t)$, а миграционные потоки в узлах вспомогательной сетки $q_{i,k+\frac{1}{2}}$, i = 1,2:

$$x_k = kh, \ x_{k+\frac{1}{2}} = \left(k + \frac{1}{2}\right)h, \ k = 0, \dots, n,$$
 (13)

где h = a/ns шаг равномерной дискретизации пространственного интервала.

Так, разностный аналог для популяции жертвы запишется в виде:

$$\frac{\partial u_k}{\partial t} = -\frac{q_{1,k+\frac{1}{2}} - q_{1,k-\frac{1}{2}}}{h} + u_k \left(\eta_{1,k} u_k \left(\frac{1 - u_k}{p_k}\right) - \mu_{1,k} v_k\right), \quad (14)$$

а уравнение для потока будет иметь вид:

$$q_{1,k-\frac{1}{2}} = -k_1 \left(\frac{u_k - u_{k-1}}{h} \right) + (u_{k-1} + u_k) [\alpha_{1,k-1} L p_k - \beta_{1,k} L v_k],$$

$$L p_k = \frac{(p_k - p_{k-1}) / h}{p_k + p_{k-1}}.$$
(15)

Аналогичным образом выводятся выражения для плотности популяции хищника. В результате получается система обыкновенных дифференциальных уравнений относительно u_k , v_k , которая интегрируется методом Рунге-Кутты четвертого порядка в среде MATLAB.

ЧИСЛЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Численные расчеты динамики системы (1) при различных значениях параметров подтвердили реализацию ИСР-решений (6) при выполнении (8) и (11).

На рис. 2 приведены стационарные ИСР-распределения популяций жертвы и хищника, полученные для двух значений параметра μ_2 . Значения остальных коэффициентов были фиксированы: $\mu_1 = 2, k_1 = 0.1, \alpha_1 = 0.2, \beta_1 = 0.1, \eta_1 = 5, \eta_2 = 5, k_2 = 0.2, \beta_2 = 0.2$. Функция ресурса задавалась выражением:

$$p(x) = \exp\left(\frac{\sin 2\pi x}{2}\right). \tag{16}$$

Из рис. 2 видно, что жертва и хищник, распределились по ареалу пропорционально ресурсу, изменение параметра μ_2 сказывалось только на соотношении численностей популяций.



Рис. 2. Идеальное свободное распределение жертвы и хищника по ареалу для двух значений параметра µ2.

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

Рис. 3 иллюстрирует характер установления к ИСР при отклонении начальных условий: $u_0^*(x) = 1.2u_0(x), v_0^*(x) = 0.7v_0(x)$, где $u_0(x), v_0(x)$. отвечают решению (6). Приведены графики изменения по времени численностей популяций в средней точке интервала. В обоих случаях происходит выход на стационарное распределение, соответствующее ИСР.

Далее были проведены численные эксперименты по изучению трансформации ИСР-решений при малых ($\varepsilon = 0.05$) отклонениях миграционных параметров k_1 , α_1 , β_1 , k_2 , β_2 от соотношений, обеспечивающих ИСР.

На рис. 4 представлены результаты вычислений при отклонении коэффициента миграции жертвы $k_1^* = k_1 + \varepsilon$, остальные параметры равны: $\mu_1 = 4, \mu_2 = 6.5, \eta_1 = 5, \eta_2 = 5, \alpha_1 = 0.2, \beta_1 = 0.1, k_2 = 0.2, \beta_2 = 0.2$. На верхнем левом графике показано финальное распределение жертвы, хищника и ресурса вдоль ареала. На правом верхнем графике – относительное отклонение распределений от решения ИСР. На нижних графиках даны графики изменения по времени численностей популяций в средней точке ареала. Видно, что устанавливающиеся распределения близки к решению ИСР, но имеются незначительные откло-



Рис. 3. Установление к идеальному свободному распределению для двух значений параметра μ_2 .

550



Рис. 4. Графики зависимостей плотностей популяций жертвы и и хищника v от координаты (вверху) и времени (внизу) при $k_1 = 0.15$.

нения в численности популяций и характере распределения.

Подобные трансформации происходят при изменении других миграционных параметров. При этом реализуются устойчивые стационарные решения, близкие к ИСР, но с перераспределением видов вдоль ареала. Так, например, на рис. 5 представлены результаты вычислений при отклонении коэффициента таксиса хишника $\beta_2^* = \beta_2 - \varepsilon$ при тех же значениях остальных параметров. Видно, что выросла популяция жертвы (хищник снизил свою поисковую активность), а популяция хищника уменьшилась. Распределение изменилось и стало разнонаправленным для хищника и жертвы.

Теперь рассмотрим вопрос о решениях с ИСР при параметрах, отвечающих автоколебательному режиму для локальной системы. Выберем значение параметра μ_2 , нарушающее неравенство (7) для случая n = 1, и проведем исследования с теми же малыми отклонениями миграционных параметров. При этом будем возмущать начальные значения плотностей популяций.

На рис. 6 представлены пространственно-временные распределения популяций жертвы и хищника при $\alpha_1^* = \alpha_1 - \varepsilon$ и следующих значениях параметров: $\mu_1 = 4$, $\mu_2 = 10.5$, $\eta_1 = \eta_2 = 5$, $k_2 = 0.1$, $\beta_1 = 0.1$, $k_2 = \beta_2 = 0.2$. Соответствующие двумерные графики представлены на рис. 7. Из графиков видно, что получающийся колебательный режим напоминает решение, отвечающее ИСР.

Однако картина существенно изменяется, если коэффициенту таксиса жертвы, направленного на ресурс, дать отклонение в противоположную сторону $\alpha_1^* = \alpha_1 + \varepsilon$. На рис. 8 представлены трехмерные графики поведения популяций для этого случая ($\alpha_1 = 0.25$) и тех же значений остальных параметров. Колебания численностей популяций со временем затухают, и система выходит на стационарный режим, сохраняя при этом ИСР.



Рис. 5. Графики зависимостей плотностей популяций жертвы и и хищника v от координаты (вверху) и времени (внизу) при β₂ = 0.15.

Аналогичным образом, были проведены исследования остальных миграционных параметров, показавшие, что отклонение в одну сторону не нарушает колебательного режима, а в другую — приводят к установлению стационарного режима.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе дифференциальных уравнений в частных производных параболического типа рассмотрена пространственно—временная эволюция системы «хищник—жертва». Задача характеризуется неоднородным распределением ресурса жертвы и многофакторным таксисом обоих видов. Локальный рост популяции жертвы определяется полиномиальной функцией, позволяющей рассмотреть логистический и гиперболический законы, а изменение популяции хищника зависит от отношения численности жертвы к ее ресурсу.

Для задачи на кольцевом ареале найдены условия на параметры системы, при которых имеется ненулевое стационарное аналитическое реше-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

ние, соответствующее ИСР. Представлены численные результаты, демонстрирующие устойчивость найденных решений и их трансформацию при нарушении соотношений между параметрами. Исследованы условия, при которых появляются колебательные решения. Показано, что изменение миграционных параметров (нарушение ИСР) может стабилизировать колебательные режимы пространственно распределенной системы.

Для нелинейных уравнений математической физики отыскание явных аналитических решений является достаточно редким событием. Стационарные распределения, отвечающие концепции ИСР и существующие при найденных соотношениях на параметры, позволяют далее организовать исследование динамики системы при нарушениях этих соотношений. Для анализа многовидовых систем это может быть полезно в сочетании с подходом на основе теории косимметрии [20,21]. В таких задачах также устанавливаются соотношения на параметры, при которых появляются непрерывные семейства стационар-



Рис. 6. Пространственно-временные распределения *и* и *v*, $\alpha_1 = 0.15$.



Рис. 7. Графики зависимостей плотностей популяций жертвы *и* и хищника *v* от координаты (вверху) и времени (внизу) при α₁ = 0.15.



Рис. 8. Пространственно-временные распределения *и* и *v*, $\alpha_1 = 0.25$.

ных решений. Эта идеальная ситуация является далее отправной для анализа вероятных сценариев на основе аппарата селективной функции.

Исследование проводилось при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-01-00453).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. S. D. Fretwell and H. L. Lucas, Acta Biotheoretica **19**, 16 (1970).
- 2. C. M. Lessells, Animal Behav. No. 49, 487 (1995).
- S. Schwinning and M. L. Rosenzweig, OIKOS, No. 59, 85 (1990).
- C. Bernstein, A. Kacelnik, and R. Krebs, Tree 7 (2), 50 (1992).
- 5. P. Auger, C. Bernstein, and J. C. Poggiale, Am. Naturalist **153** (3), 267 (1999).
- R. Cressman and V. Křivan, Am. Naturalist 168 (3), 384 (2006).
- R. Cressman, G. Garay, and V. Křivan, Am. Naturalist 164 (4), 473 (2004).
- A. V. Bell, R. B. Rader, S. L. Peck, and A. Sih, Theor. Popul. Biol., No. 76, 52 (2009).
- R. S. Cantrell, C. Cosner, and Y. Lou, Math. Biosci. Engineer. 7 (1), 17 (2010).
- I. Averill, Y. Lou, and D. Munther, J. Biol. Dynam. 6 (2), 117 (2012).

- R. S. Cantrell, C. Cosner, S. Martinez, and N. Torres, J. Diff. Equations 265, 3464 (2018).
- 12. R. S. Cantrell, C. Cosner, D. L. Deangelis, and V. Padron, J. Biol. Dynam. 1 (3), 249 (2007).
- Дж. Д. Мюррей, Математическая биология. Т. П. Пространственные модели и их приложения в биомедицине (НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», М.-Ижевск, 2011).
- Г. Ю. Ризниченко and А. Б. Рубин, Математические методы в биологии и экологии. Биофизическая динамика продуктивных процессов в 2 ч. (Изд-во Юрайт, М., 2019), ч. 2.
- 15. А. Д. Базыкин, Математическая биофизика взаимодействующих популяций (Наука, М., 1985).
- R. Arditi, Yu. Tyutyunov, A. Morgulis, et al., Theor. Popul Biol., No. 59, 207 (2001).
- Ю. В. Тютюнов, Н. Ю. Сапухина, А. Б. Моргулис и В.Н. Говорухин, Журн. общ. биологии 62 (3), 253 (2001).
- А. В. Будянский и В. Г. Цибулин, Биофизика 64 (2), 343 (2019).
- Н. Н. Баутин и Е. А. Леонтович, Методы и приемы качественного исследования динамических систем на плоскости (Наука, М., 1990).
- 20. А. В. Епифанов и В. Г. Цибулин, Биофизика **61** (4), 823 (2016).
- 21. A. V. Budyansky, K. Frischmuth, and V. Tsybulin, Discrete Contin. Dynam. Syst. 24 (2), 547 (2019).

ЗЕЛЕНЧУК, ЦИБУЛИН

Ideal Free Distribution in the Predator-Prey Model with Multifactor Taxis P.A. Zelenchuk and V.G. Tsybulin

Southern Federal University, ul. Bolshaya Sadovaya 105/42, Rostov-on-Don, 344006 Russia

The concept of ideal free distribution is analyzed for the predator-prey system on an inhomogeneous ring range. The diffusion-reaction-advection equations model multifactorial taxis taking into account various laws of prey growth. Relations are established for the parameters at which the ideal free distribution is realized. We studied the transformation of solutions with deviations of the parameters from the conditions under which ideal free distribution can be seen and autooscillating systems occur.

Keywords: population dynamics, ideal free distribution, taxis, predator-prey model

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 592, 591.88, 591.48, 57.044

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ FMRF-ПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА МЫЩЕЧНОЕ СОКРАЩЕНИЕ У ПЛАНАРИЙ (PLATYHELMINTHES)

© 2021 г. Н.Д. Крещенко

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

E-mail: nkreshch@rambler.ru Поступила в редакцию 10.08.2020 г. После доработки 20.08.2020 г. Принята к публикации 21.08.2020 г.

С помощью гисто- и иммуноцитохимического методов, а также флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии изучена локализация пептидергических нейронов и мышечных волокон мускулатуры тела у планарий Girardia tigrina и Polycelis tenuis. Продемонстрировано тесное пространственное взаиморасположение FMRF-иммунопозитивных нервных волокон и миофиламентов. Такая локализация периферических нервных волокон может указывать на важную роль FMRF-подобных пептидов в осуществлении мышечной функции. Физиологическое исследование с использованием изолированных мышечных клеток планарий Procerodes littoralis подтвердило индуцирующее влияние специфических природных FMRF-подобных нейропептидов – GYIRF и YIRF – на мышечное сокращение у планарий. Установлено, что дигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов – никардипин, нитрендипин и нифедипин, а также антагонист кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума рианодин - подавляли пептид-индуцированное сокращение мышечных клеток. Блокаторы обратного захвата ионов кальция – тапсигаргин и циклопиазоновая кислота – уменьшали число пептид-индуцированных мышечных ответов. Данные свидетельствуют, что мышечное сокращение, вызванное FMRF-подобными пептидами, было зависимым как от внеклеточного, так и от внутриклеточного источника ионов кальция. Результаты могут указывать на наличие разнообразных рецепторов и ионных каналов, опосредующих мышечное сокращение у плоских червей.

Ключевые слова: планарии, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, FMRF-подобные пептиды, мускулатура.

DOI: 10.31857/S0006302921030157

Среди регуляторных нейропептидов, выделенных у плоских червей (Platyhelminthes) особое внимание привлекает семейство FMRF-подобных пептидов [1, 2]. У плоских червей было идентифицировано четыре FMRF-подобных пептида, три из которых выделены у свободноживущих представителей таксона, это YIRF у наземной планарии Bdelloura candida, GYIRF у планарий Dugesia tigrina и B. candida; RYIRF, обнаруженный у турбеллярии Arthioposthia triangulate, а также GNFFRF, выделенный у паразитических цестод Moniezia expansa [3-5]. Пептиды семейства FM-RF-подобных – это короткие молекулы, состоящие из четырех-десяти аминокислотных остатков, обладающие амидированным С-концевым мотивом. Их характеризует структурное сходство

с кардиоактивным пептидом моллюсков *Macrocallista nimbosa*, FMRFамидом, обнаруженным еще в 1977 г. [6]. Применение антител к этим пептидам показало широкое распространение иммуноокраски к FMRF-подобным пептидам в центральных и периферических отделах нервной системы у исследованных в этом отношении видов плоских червей [7, 8]. Физиологическая роль FMRFподобных пептидов остается малоизученной.

Планарии, свободноживущие представители типа Platyhelminthes, характеризуются высокой регенерационной способностью и широко используются в экспериментальной биологии как при исследовании стволовых клеток и молекулярных механизмов их функционирования [9– 11], так и при изучении биофизических аспектов регенерации [12–14]. Будучи близкими родственниками паразитических червей, планарии используются при изучении паразито-хозяинных отношений, а также поиске препаратов с антипа-

Сокращения: PBS-буфер – 4%-й параформальдегид в 0.1 М фосфатном буфере, PBST – PBS-буфер с добавлением 0.3% тритона X-100, FMRF-ип – FMRF-иммунопозитивные нервные волокна.

разитарными свойствами [15–18]. Использование планарий в качестве модельного биологического объекта имеет ряд преимуществ: их добывание и содержание доступны по экономическим соображениям, на них возможна постановка множественных экспериментов, удовлетворяющих любую статистику.

Мускулатура планарий осуществляет функцию поддержания формы тела, а также участвует в различных видах двигательной активности – плавании, поиске и захвате добычи, поглощении пищи, репродуктивном поведении [19, 20]. У паразитических червей мускулатура служит для проникновения в организм хозяина, а также является мишенью действия известных антипаразитарных агентов [21]. Несмотря на определенный интерес исследователей к изучению анатомической организации мышечной системы у представителей паразитических и свободноживущих плоских червей, физиологические аспекты ее функционирования остаются недостаточно изученными. Демонстрация наличия основных белков, принимающих участие в мышечном сокращении – актина и миозина [22, 23], а также разработка гистохимической методики идентификации фибриллярного актина с помощью флуоресцентно-меченого фаллоидина [24] привели к существенному прогрессу в изучении морфологического строения мускулатуры тела у представителей плоских червей [25].

Задачей настоящего исследования явилось изучение структурных и функциональных характеристик мускулатуры тела планарий. С помощью иммуноцитохимического и гистохимического методов и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показано тесное пространственное взаиморасположение FMRFиммунопозитивных (FMRF-ип) нервных волокон и мышечных филаментов у планарий Girardia tigrina и Polycelis tenuis, указывающее на возможное участие данных нейропептидов в регуляции мышечного сокращения. Физиологические исследования, проведенные на изолированных мышечных клетках планарий Procerodes littoralis, продемонстрировали участие FMRF-подобных пептидов (GYIRF и YIRF) в осуществлении и регуляции их мышечной функции. В ходе экспериментальных исследований для определения подходов к изучению механизмов мышечного сокращения у плоских червей были использованы агонисты и антагонисты кальциевых ионных каналов.

Актуальность исследований обусловлена несколькими причинами: во-первых, информация о механизмах функционирования мускулатуры тела у плоских червей, большинство из которых являются опасными паразитами человека и животных, будет чрезвычайно полезна при разработке новых препаратов для борьбы с паразитарными заболеваниями; во-вторых, мы можем получить важную информацию о базовых принципах мышечного сокращения и его регуляторных механизмах, формирующихся у этих простых организмов, предки которых были близки к основанию эволюционного древа всех билатеральносимметричных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гисто- и иммуноцитохимия. Для гистохимического определения мускулатуры и иммуноцитохимического определения элементов нервной системы использовали планарий G. tigrina (длина 8-9 мм) и *P. tenuis* (длина 11-12 мм). Для иммуноцитохимической идентификации FMRF-подобных нейропептидов в тканях планарий готовили замороженные срезы (P. tenuis) и тотальные препараты (G. tigrina). Образцы фиксировали PBS-буфером, содержащим 4% параформальдегида (МР Biomedicals, США) в 0.1 М фосфатном буфере («Helicon», Россия) при рН 7.4 в течение 4 ч при комнатной температуре, все последующие процедуры проводили при 4°С. Для приготовления тотальных препаратов образцы промывали 24 ч в растворе, содержащем PBST (раствор PBS с добавлением 0.3% тритона X-100 (Sigma, США), 0.1% азида натрия («Helicon», Россия) и 0.1% бысывороточного альбумина (Amresco, чьего США)). Затем образцы помещали на 48 ч в раствор (в разведении 1:1000) первичных поликлональных кроличьих антител к нейропептиду FMRFамиду (Immunostar, США), промывали в PBST (12 ч) и переносили во вторичные FITC-(fluorescein isothiocyanate)-коньюгированные свиные антикроличьи иммуноглобулины (Daco, Дания; разведение 1:50) или вторичные козьи антикроличьи AlexaFluor 488 иммуноглобулины (Аbcam, США; разведение 1: 100) на 48 ч. После этого препараты промывали в растворе PBS (1-2 ч).

Для приготовления замороженных срезов фиксированные образцы помещали на четверопятеро суток в 10%-й раствор сахарозы («Helicon», Россия), затем на криотоме Shandon Cryomatrix (Termoelectron Corporation, США) при температуре -18°С готовили срезы, поместив препараты в заливочную среду NEG 20 (Thermo Scientific, США). Замороженные серийные срезы собирали на обработанные предметные стекла (Polysine, Menzel-Glaser, Германия) и хранили при -20°С. Перед окраской препараты промывали в PBST (трижды по 5 мин в горизонтальном положении), окрашивали антителами к FMRF (Immunostar, США; разведение 1 : 1000, 48 ч), горизонтально, во влажной камере при 4°С. После промывки в PBST (трижды по 5 мин) препараты помещали во вторичные флуоресцентно-мече-

ные иммуноглобулины на 24 ч и окончательно промывали в PBS (трижды по 5 мин).

Мускулатуру планарий *P. tenuis* и *G. tigrina* TRITC-(teидентифицировали с помощью tramethylrhodamine В isothiocyanate)-меченого фаллоидина (Sigma-Aldrich, США; в разведении 1:200), докрашивая срезы в течение 6 ч, а тотальные препараты – в течение 12–24 ч при 4°С. После промывки в PBS образцы заключали в 75%-й глицерин («Helicon», Россия) на PBS, накрывали покровным стеклом (Menzel-Glaser, Германия) и хранили при -20°С. Отрицательный контроль включал инкубацию образцов в растворе без первичных антител и замещение иммунной антисыворотки неиммунной. Контрольные образцы показали отсутствие в ткани исследованных образцов неспецифической окраски.

Микроскопия. Для анализа использовали по пять-семь препаратов каждого вида планарий. Готовые окрашенные срезы изучали с помощью флуоресцентного микроскопа DM6000 В (Leica Mycrosystems, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой DC300F (Leica Mycrosystems, Германия), в Секторе оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пущино, Россия). Для анализа использовали фильтры возбуждающего света с длиной волны в 450– 490 нм (I3) для флуорохромов FITC и AlexaFluог488 и длиной волны 515–560 нм (N2.1) для локализации флуорохрома TRITC.

Тотальные препараты планарий анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP5 (Leica Mycrosystems, Германия). Микрофотографии с конфокального лазерного сканирующего микроскопа представлены в виде отдельных оптических срезов, полученых при сканировании через толщину тканей в 30–60 мкм. Микрофотографии, полученные с помощью флуоресцентного и конфокального микроскопов, сохраняли в формате TIFF. Изображения анализировали с помощью программы LAS AF Lite program (версия 2.4.6384.1; Leica Microsystems CMS GmbH, Германия).

Физиология мышечного волокна. Объектом исследования служили изолированные (индивидуальные) мышечные клетки планарий *Procerodes littoralis* (Turbellaria, Tricladida). Культуру мышечных клеток получали при энзиматическом расщеплении тканей. Метод выделения индивидуальных мышечных волокон у паразитических и свободноживущих плоских червей успешно применялся ранее [4, 26]. Для каждого эксперимента использовали свежеприготовленную культуру мышечных клеток планарий. Из 25 особей длиной 9–10 мм с помощью тонкого скальпеля готовили гомогенат тканей, помещали в инкубационную среду, содержащую 13.6 мМ CaCl₂, 13.4 мМ

KCl, 458 мМ NaCl, 9.8 мМ MgCl₂×6H₂O, 13.6 мМ Na₂SO₄, 10 мМ HEPES, 10 мМ D-глюкозы и 1%-й раствор антибиотика (GibcoBRL, Великобритания), в которую добавляли 0.11 мг/мл коллагеназы (type 1A, из Clostridium hystoliticum; Sigma, США), 0.15 мг/мл протеазы (type XIV, из Streptomyces griseus; Sigma, США), 0.15 мг/мл дитиотреитола (Sigma, США), после чего оставляли диспергировать в течение 12 ч при 4°С. Полученную суспензию клеток перемешивали на магнитной мешалке 10 мин, аккуратно пропускали через тонкий кончик пипетки, помещали в 15-миллилитровые пробирки (типа Falcon) и центрифугировали при 28 g в течение 5 мин. Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в инкубационой среде, не содержащей ферментов, в течение 15 мин (4°С). После этого полученную смесь (суспензию) клеток распределяли в пластиковые чашки Петри (50 мм, Falcon) по 3 мл в каждую, и сохраняли при 4°С в течение 30-90 мин для дальнейшего исследования.

Микроперфузионную систему, соединенную с инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Япония; оборудование Королевского университета в г. Белфаст, Великобритания), использовали для визуального наблюдения процесса мышечного сокращения. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (21-23°С). Во всех опытах использовали только неподвижные - спонтанно не сокращающиеся мышечные клетки. Под микроскопом с помощью инжектора и тонкой стеклянной микропипетки (диаметр кончика около 5 мкм) исследуемое вещество вводили в непосредственной близости к мембране мышечной клетки (на расстоянии около 10-15 мкм). Сокращение наблюдали на экране монитора, соединенного с микроскопом. В одной серии использовали сто случайным образом выбранных клеток, взятых по 25 клеток в каждой из четырех чашек Петри с суспензией, приготовленной из тканей 25 особей планарий. Каждую клетку считали положительной при наблюдении ее сокращения в течение 10 с после введения тестируемого вещества. Опыты повторяли минимум три раза. Исследовали влияние нейропептидов GYIRFамида (GYIRF) и YIRFамида (YIRF) (Immunogenetics, США), для сравнения был также использован серотонин (5-НТ; Sigma, США). Данные на графиках и диаграммах представлены в виде процентной доли мышечных клеток, сокращающихся в ответ на введение тестируемого вещества. Перед применением тестируемого вещества проводили аппликацию инкубационной среды (негативный контроль); после аппликации тестируемых веществ в качестве положительного контроля на клетки подавали среду с высоким содержанием ионов калия (15-75 мМ), которая, как известно, вызывает сокращение мышечных волокон [27]. Для статистической обработки результатов использовали *t*-тест Стьюдента. Для построения графиков и диаграмм, а также статистического анализа данных использовали программу GraphPad Prism 3.02 (США).

Для изучения механизмов мышечного сокращения и роли кальция в пептид-индуцируемом мышечном сокращении клетки предварительно инкубировали с избранными антагонистами наружных и внутренних ионных кальциевых каналов: никардипином, нитрендипином, нифедипином, дилтиаземом и верапамилом, рианодином, а также циклопиазоновой кислотой и тапсигаргином (все вещества получены от компании Sigma, США). Во всех опытах вещества в концентрациях 10 и 100 мкМ добавляли в чашки Петри с диспергированными мышечными клетками за 10 мин до начала основного тестирования.

Вещества, используемые для растворения антагонистов, а именно диметилсульфоксид (Sigma, США) и этиловый спирт, были также протестированы для установления их возможного влияния на мышечную активность. Было установлено, что 0.01%-й диметилсульфоксид (n = 11) и этанол в концентрациях 0.1% (n = 7) и 0.5% (n = 10) при их добавлении в культуру мышечных клеток за 10 мин до начала эксперимента не оказывали существенного влияния на базовой уровень мышечного сокращения, вызванного деполяризацией (30 мМ, K⁺) серотонином (10^{-5} М) и пептидами (10^{-5} М).

Иммуноцитохимические и гистохимические исследования по идентификации актина и FM-RF-подобных нейропептидов в тканях планарий *G. tigrina* и *P. tenuis* выполнены в Институте биофизики клетки РАН (ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»). Физиологические исследования мышечного сокращения проводили в Королевском университете г. Белфаст, Великобритания (Queen's University Belfast, UK). Результаты ранее были частично опубликованы в виде тезисов докладов [28, 29].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иннервация мускулатуры тела планарий G. tigrina и P. tenuis FMRF-иммунопозитивными нервными элементами. У P. tenuis и G. tigrina окраска актиновых филаментов флуоресцентно-меченым фаллоидином была обнаружена в мышечных волокнах стенки тела планарий (рис. 1а,6; 2а,г) и окологлоточной зоны (рис. 1в). Мышечная стенка тела хорошо дифференцирована и состоит из компактно упакованных кольцевых, диагональных и продольных мышечных волокон (рис. 1а, острия стрелок, рис. 16, тонкие стрелки). Немногочисленные, редко, но регулярно расположенные диагональные мышечные волокна локализу-



Рис. 1. Иммуношитохимическая окраска нервных FMRF-ип-волокон (зеленое свечение) и гистохимическая окраска актиновых миофиламентов (красное свечение) TRITC-меченым фаллоидином в теле планарий Polycelis tenuis (замороженные срезы, флуоресцентная микроскопия). (а) - Сагиттальный срез головного конца тела планарий: головной нервный ганглий (FMRFип-структуры) отмечен длинными стрелками, диагональные, продольные и кольцевые мышечные филаменты стенки тела планарии отмечены остриями стрелок. (б) – Головной конец тела, фронтальный срез; отнервные FMRF-ип-отростки (короткие мечены толстые стрелки), простирающиеся к переднему краю между мышечными волокнами, тонкие стрелки - кольцевые и продольные мышечные волокна стенки тела. (в) - Нервная FMRF-ип-сеть (короткие стрелки) в окологлоточной области тела планарий.



Рис. 2. Иммуноцитохимическая (зеленое свечение) окраска нервных FMRF-ип-волокон и гистохимическая окраска мышечных филаментов (красное свечение) планарий *Girardia tigrina*, тотальные препараты, световая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (а и г), флуоресцентная микроскопия (б, в). (а) – Головной конец тела, мускулатура стенки тела планарий, оптический срез, отмечены продольные (острия стрелок), диагональные (длинные тонкие стрелки) и кольцевые (короткие стрелки) мышечные волокна; (б) – головной конец тела с тонкими нервными FMRF-ип-волокнами нервного плексуса (тонкие длинные стрелки); (в) – глотка (длинная стрелка) и окологлоточная область тела, видна FMRF-ипокраска в окологлоточном нервном плексусе (короткие стрелки); (г) – нервные FMRF-ип-волокна (тонкие длинные стрелки) и нейроны (острия стрелок), окружающие мышечные филаменты стенки тела (оптический срез), тонкие FMRFип-волокна следуют на близком расстоянии вдоль единичных диагональных и кольцевых мышечных волокон (тонкие длинные стрелки).

ются между продольными и кольцевыми слоями миофибрилл. Дорзо-вентральные мышечные волокна расположены довольно равномерно и пронизывают все тело планарий. FMRF-иммунопозитивная (FMRF-ип) окраска отмечена в головном нервном ганглии планарий *P. tenuis* (рис. 1а, две длинные стрелки), от которого к переднему краю тела простираются FMRF-ип-нервные волокна, располагаясь между мышечными филаментами и следуя вдоль них (рис. 1б, короткие стрелки). FMRF-ип-окраска выявлена в нервных волокнах, иннервирующих мускулатуру тела *P. tenuis* (рис. 1б, короткие стрелки). В окологлоточной области тела (в стенке окологлоточного кар-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

мана) также наблюдали густую нервную сеть FMRF-ип (рис. 1в, короткие стрелки).

Тотальный препарат планарий *G. tigrina* (рис. 2a) демонстрирует мускулатуру стенки головного отдела тела. В мышечной стенке выявлены продольные (рис. 2a, острия стрелок), кольцевые (рис. 2a, короткие стрелки) и диагональные мышечные волокна (рис. 2a, длинные стрелки); диагональные волокна следуют в двух перпендикулярных направлениях. Расположение миофиламентов в стенке тела у *G. tigrina* менее плотное, по сравнению с *P. tenuis*, однако порядок расположения мышечных слоев не отличается от такового у *P. tenuis*. У *G. tigrina* FMRF-ип-окраска выявлена в тонких волокнах субмышечной нервной сети (рис. 2б). Многочисленные нервные FMRFип-элементы обнаружены в окологлоточной области тела (рис. 2в) планарий G. tigrina. Глотка (рис. 2в), лежащая в особом окологлоточном кармане, находится в центре туловища планарии, этот карман (или окологлоточная полость) открывается наружу ротовым отверстием на брюшной стороне тела. Стенка глоточного кармана (как и стенка тела планарии) состоит из продольных, диагональных и кольцевых мышечных волокон. FMRF-ип-окраску наблюдали в телах нейронов (рис. 2г, острия стрелок) и их отростках (рис. 2г, тонкие стрелки), расположенных между мышечными волокнами стенки тела планарий G. tigrina. По нашим наблюдениям, нервные FMRF-ип-клетки периферической нервной сети представлены преимущественно мультиполярными нейронами. Их нервные FMRF-ип-волокна с расширениями (varicosities) следуют как вдоль продольных и кольцевых мышечных волокон, так и вдоль диагональных миофибрилл. По всей вероятности, нервные FMRF-ип-окончания локализуются на продольных, кольцевых, а также диагональных мышечных волокнах.

Таким образом, проведенные у двух видов планарий иммуноцитохимические исследования свидетельствуют о том, что нервные FMRF-ипэлементы принимают участие в иннервации мускулатуры стенки тела, а также мышечной стенки окологлоточной полости *P. tenuis* и *G. tigrina*, указывая на возможную регуляторную функцию FMRF-подобных нейропептидов в сокращении мускулатуры тела планарий.

Физиологические исследования. Для изучения мышечного сокращения были проведены физиологические исследования на изолированных мышечных клетках планарий P. littoralis с использованием природных нейропептидов GYIRF и YIRF, среды с высоким содержанием ионов K^+ , а также дигидропиридиновых (никардипин, нитрендипин, нифедипин), бензотиазепиновых (дилтиазем) и фенилалкиламиновых (верапамил) блокаторов наружных кальциевых каналов и рианодина, блокатора внутриклеточных кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума (или рианодиновых рецепторов). Изучали также влияние ингибиторов обратного захвата кальция в каналах эндоплазматического ретикулума - циклопиазоновой кислоты и тапсигаргина - при их добавлении в культуру мышечных клеток.

Эксперименты на изолированных мышечных клетках планарий показали, что введение нейропептидов GYIRF и YIRF в непосредственной близости к клеточной мембране вызывало сокращение мышечных клеток. Максимальное число сокращений под воздействием пептида YIRF (10^{-3} M) составило 60 ± 1.8%, в то время

как под воздействием пептида GYIRF (10^{-3} M) сокращалось до 76 ± 1.6% мышечных клеток. Пептиды GYIRF и YIRF (в концентрациях от 10^{-3} до 10^{-10} M) вызывали сокращение индивидуальных мышечных клеток планарий в дозозависимой манере (рис. 3а).

Исследования показали, что предварительное (за 10 мин до начала тестирования) добавление никардипина (в концентрации 10 и 100 мкМ), нитрендипина, нифедипина и верапамила (все – в концентрации 100 мкМ) достоверно уменьшало число мышечных клеток планарий, сокращающихся в ответ на введение пептида GYIRF. Порядок ингибирующей активности был следующим: никардипин > нитрендипин > нифедипин > верапамил (рис. 36). Дилтиазем в концентрациях 10 и 100 мкМ не оказал влияния на индуцированное пептидом сокращение мышечных клеток.

В качестве положительного контроля использовали среду с высоким содержанием ионов K^+ , вызывающих деполяризацию клеточной мембраны и сокращение мышечной клетки (рис. 4). Так, в наших опытах при введении вблизи мембраны мышечной клетки среды с 20 мМ ионов калия сокращались около 42 ± 1.6% мышечных клеток (n = 9); при концентрации ионов калия в 30 мМ – 67 ± 2.8% клеток (n = 20), при введении 40 мМ K⁺ – 79.6 ± 4.3% клеток (n = 10), использование концентрации в 50 мМ K⁺ вызывало сокращение 88 ± 2.8% мышечных клеток планарий (n = 4).

Число мышечных клеток, сокращающихся в ответ на введение пептидов YIRF и GYIRF, существенно уменьшалось после предварительной инкубации их с рианодином (рис. 5а,б). Рианодин (в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-8} М) подавлял пептид–индуцированное мышечное сокращение в дозозависимой манере (рис. 5а). Интересно, что рианодин (в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М) блокировал также мышечное сокращение, вызываемое избытком ионов калия (K⁺), но не оказывал существенного влияния на сокращение, вызываемое биогенным амином (серотонином) даже в концентрации 10^{-4} М (рис. 5б).

Тапсигаргин и циклопиазоновая кислота в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-8} М, при добавлении в культуру клеток планарий за 10 мин до начала тестирования, уменьшали число мышечных клеток, сокращающихся в ответ на введение пептида GYIRF (10^{-5} М), а также в ответ на деполяризацию, вызванную высоким содержанием ионов K⁺ (30 мМ), но не оказывали существенного влияния на индуцированное серотонином (10^{-5} М) мышечное сокращение (рис. 6а,б).


Рис. 3. (а) — Кривые пептид-индуцированного (GYIRF — темные квадраты, YIRF — светлые квадраты) сокращения изолированных мышечных клеток планарий *Procerodes littoralis*. По оси ординат — доля сократившихся мышечных клеток в процентах, по оси абсцисс — десятичный логарифм концентрации пептида. Разбросы — стандартная ошибка среднего (*SE*). Число повторных опытов в каждой точке кривой n = 4-8 для GYIRF, n = 4-18 для YIRF. (б) — Доля сократившихся изолированных мышечных клеток в процентах, в процентах, по оси абсцисс — десятичный логарифм концентрации пептида. Разбросы — стандартная ошибка среднего (*SE*). Число повторных опытов в каждой точке кривой n = 4-8 для GYIRF, n = 4-18 для YIRF. (б) — Доля сократившихся изолированных мышечных клеток планарий (ось ординат, в процентах) в ответ на введение нейропептида GYIRF при предварительном инкубировании клеток в течение 10 мин с дигидропиридиновыми блокаторами. Разбросы — стандартная ошибка среднего (*SE*). Различия с контролем (10^{-5} M GYIRF, без инкубации) достоверны при ***p < 0.0001 и *p < 0.01 при использовании непарного (two-tailed) *t*-теста Стьюдента.



Рис. 4. Сокращение мышечных клеток планарий в ответ на введение среды с высоким содержанием ионов K⁺. По оси ординат – доля сократившихся мышечных клеток в процентах, по оси абсцисс – концентрация ионов калия, мМ; разбросы – стандартная ошибка среднего (*SE*). Число повторных измерений в каждой из точек графика – от 4 до 20.

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на некоторый прогресс в изучении мускулатуры паразитических червей, сведения о ее строении и, тем более, функционировании ограничены для большинства видов Platyhelminthes. Необходимость добычи животных в нужном для экспериментов количестве, создания специальных условий для сохранения их жизнеспособности, а также практические трудности воспроизведения в лабораторных условиях сложных и разнообразных жизненных циклов паразитических гельминтов создают объективные трудности в работе с паразитическими представителями плоских червей. Преимущество свободноживущих планарий, при использовании их в качестве биологической модели для изучения механизмов мышечного сокращения, состоит в простоте и удобстве манипуляций с этими организмами, в дешевизне их содержания, в возможности использования большого количества животных и постановки множественных экспериментов, удовлетворяющих любую статистику.

КРЕЩЕНКО



Puc. 5. (a) – Число сокращений изолированных мышечных клеток планарий, индуцированных нейропептидом GYIRF $(5 \cdot 10^{-5} \text{ M}, n = 12,$ темные квадраты), после предварительного культивирования с рианодином (светлые квадраты). По оси ординат – доля сократившихся мышечных клеток в процентах, по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации раствора рианодина, добавленного в культуру мышечных клеток за 10 мин до начала эксперимента. Эмпирическая кривая, описывающая ответы мышечных клеток на введение пептида (GYIRF, $5 \cdot 10^{-5}$ M) после их инкубации с рианодином, построена с помощью анализа методом Fit spline в статистической программе Prizm 3.02 (GraphPad Software Inc., CША). Число повторных опытов в каждой точке кривой – от 4 до 8. Разбросы – стандартная ошибка (*SE*). Достоверность отличий кривой *1* (пептид) от кривой *2* (рианодин + пептид) была оценена согласно непарному *t*-тесту Стьюдента. (б) – Сокращение изолированных мышечных клеток планарий, вызванное деполяризацией (высоким содержанием ионов K⁺), нейропептидом YIRF и серотонином, до и после предварительной инкубации мышечных клеток с рианодином. По оси ординат – доля сократившихся мышечных клеток планарий. Разбросы – стандартная ошибка (*SE*). Различия с контролем (без инкубации) достоверны при ****p* < 0.0001 согласно непарному *t*-тесту Стьюдента.

Мускулатура плоских червей преимущественно гладкомышечного типа. По своему происхождению она относится к первичным мышечным тканям, развившимся из эпителиально-мышечных клеток предков многоклеточных [21]. Механизм сокращения клеток гладкой мускулатуры у плоских червей, как и вообще у беспозвоночных, плохо изучен. Известно, что гладкомышечные клетки подвергаются действию нейромедиаторов, высвобождающихся из варикозных утолщений нерва. Поступление сократительного стимула (деполяризация мембраны, гормон или нейромедиатор) инициирует открытие кальциевых каналов в мембране мышечной клетки и/или эндоплазматического ретикулума. Действие нейромедиатора на сокращение клеток гладких мышц может быть возбуждающим либо тормозным. Возбуждающими нейромедиаторами мускулатуры плоских червей являются ацетилхолин, серотонин и специфические пептиды [21].

У празитических Platyhelminthes положительная иммуноокраска к FMRF-подобным пептидам обнаружена у цестод и трематод в центральной нервной системе, субэпителиальном и субмышечном нервных плексусах, в нервных волокнах, пронизывающих прикрепительные органы - ротовую и брюшную присоски, глотку, репродуктивные структуры [30, 31]. FMRF-подобные пептилы были также показаны иммуноцитохимически у нескольких видов свободноживущих планарий: *B. candida* [4], *Microstomum lineare* [32], Microstomum histricinum marinum [33], Planaria torva [34], Dugesia tigrina [35, 36], P. tenuis u Dendrocoelum lacteum [37], Schmidtea mediterranea [38] с использованием целого ряда разных антител. У планарий P. littoralis нейропептид GNFFRF был иден-



Рис. 6. (а) – Действие тапсигаргина и циклопиазоновой кислоты на сокращение изолированных мышечных клеток, вызванное нейропептидом GYIRF. По оси ординат – доля сократившихся мышечных клеток в ответ на введение пептида (в процентах), по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации тапсигаргина и циклопиазоновой кислоты, добавленных в культуру мышечных клеток планарий за 10 мин до начала эксперимента. 1 – Контроль (пептид GYIRF, 10^{-5} M, n = 4); эмпирические кривые, описывающие ответы мышечных клеток на введение пептида (GYIRF, 10^{-5} M) после их предварительной инкубации с циклопиазоновой кислотой (2) и тапсигаргином (3), построенные с помощью анализа методом Fit spline в статистической программе GraphPad Prizm 3.02. Число повторных опытов в каждой точке – от 3 до 6 (тапсигаргин) и от 4 до 7 (циклопиазоновая кислота). Разбросы – стандартное отклонение (*SD*). (б) – Действие тапсигаргина и циклопиазоновой кислоты на сокращение изолированных клеток, вызванное деполяризацией (30 мМ K⁺) и серотонином в концентрации 10^{-5} М. Число повторных подсчетов в каждой точке n = 4. Разбросы – стандартная ошибка среднего (*SE*).

тифицирован в синапсах нейронов с помощью электронной микроскопии и иммуно-мечения золотом [39]. В большинстве этих работ взаимодействие пептидергических нервных окончаний с мускулатурой тела не изучалось.

Наши данные подтверждают полученные ранее сведения о наличии FMRF-подобных пептидов у планарий. В настоящем исследовании продемонстрировано тесное пространственное взаиморасположение пептидергических нервных волокон и мышечных филаментов у планарий. Показано, что мускулатура стенки тела, а также структуры с сильно развитой мускулатурой, такие как окологлоточная полость, интенсивно иннервируются отростками FMRF-ип-нейронов. Иннервация мускулатуры пептидергическими нервными элементами свидетельствует в пользу того, что эти молекулы могут быть вовлечены в регуляцию мышечной функции у плоских червей. В самом деле, литературные сведения указывают на важную роль FMRF-подобных пептидов в функционировании мускулатуры у паразитических видов червей. Так, было выявлено стимулирующее действие FMRF-подобных пептидов на двигательную активность взрослых моногеней *Diclidophora merlangi* [40], личинок цестод *Mesocestoides corti* [41], обнаружено сократительное влияние FMRF-подобных пептидов на мышечные препараты трематод *Fasciola hepatica* [42, 43].

Успешное изолирование жизнеспособных мышечных волокон стало следующим важным шагом в изучении физиологии мышечного сокращения у плоских червей [44, 45]. В отличие от мышечных препаратов, использование отдельной мышечной клетки позволяет детально изучать фармакологические свойства тестируемых препаратов без влияния на них нейрональных сигналов. Непосредственное участие FMRF-подобных пептидов в индукции мышечного сокращения удалось показать на изолированных мышечных волокнах трематод Schistosoma mansoni [46], турбеллярий *B. candida* [4], *P. littoralis* [27] и *D. tigrina* [47].

Результаты проведенного нами физиологического исследования с использованием изолированных мышечных клеток планарий, а также дан-

ные, полученные другими исследователями [27, 47], свидетельствуют о том, что специфические FMRF-подобные нейропептиды являются мощными индукторами сокращения мускулатуры у плоских червей. Начатые нами исследования механизмов стимулирующего влияния FMRF-подобных пептидов на мускулатуру показали, что у планарий P. littoralis сокращение зависело от поступления ионов Ca²⁺ через плазматическую мембрану, поскольку подавлялось дигидропиридиновыми блокаторами кальциевых каналов (никардипином, нитрендипином и нифедипином), а также фенилалкиламиновым блокатором верапамилом. Это указывает на наличие в мембране мышечной клетки планарий медленных потенциалуправляемых кальциевых ионных каналов L-типа, обладающих, по крайней мере, некоторыми свойствами кальциевых каналов позвоночных животных (дигидропиридиновая чувствительность). Эти предположения подтверждаются данными, полученными также на планариях D. tigrina [48]. Также установлено, что рианодин, антагонист внутренних кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума, блокировал мышечное сокращение, вызываемое пептидами GYIRF и YIRF. Кроме того, тапсигаргин и циклопиазоновая кислота, специфические ингибиторы Ca²⁺-АТР-азы эндоплазматического ретикулума, вызывающие пассивный выход Ca²⁺ из внутриклеточных депо в цитозоль, также значительно уменьшали число мышечных сокращений в ответ на введение пептида. Таким образом, результаты показали, что резерв внутриклеточного кальция играет центральную роль в регуляции пептид-индуцированного мышечного сокращения у планарий. Очевидно, что в ходе пептид-индуцированного мышечного сокращения вход внеклеточного кальция через плазматическую мембрану вызывает Ca²⁺-индуцированный выход ионов кальция Ca²⁺ из внутриклеточного депо через внутренние рианодиновые кальциевые каналы. Полученные сведения в целом соответствуют представлениям о сокращении гладкомышечной мускулатуры и могут указывать на существование универсальных механизмов. залействованных в мышечном сокращении, как у высокоорганизованных, так и v таких простых организмов, как плоские черви. планарии. Индуцирующее влияние ряда агентов, таких как нейропептиды, серотонин, деполяризация, свидетельствует о наличии множества разнообразных специфических рецепторов на мембране мышечной клетки планарий. Результаты показали, что известные для позвоночных животных пути поступления внеклеточного кальция, а также механизмы высвобождения кальция из внутриклеточных депо в цитозоль присутствуют также и в гладкомышечных клетках плоских червей. Для выявления функциональных свойств му-

скулатуры плоских червей необходимо проведение дальнейших экспериментов. Эти исследования практически необходимы — поскольку мускулатура плоских червей является мишенью действия антипаразитарных препаратов. Выявление характерных физиологических свойств мускулатуры плоских червей должно в перспективе помочь в разработке специализированных лекарственных средств, селективно действующих на мускулатуру плоских червей, большинство которых являются возбудителями опасных заболеваний человека и животных.

выводы

Иммуноцитохимические исследования с использованием специфических антител показали тесное пространственное взаиморасположение пептидергических (FMRF-подобных) нервных окончаний с мышечными волокнами стенки тела планарий.

Результаты демонстрируют способность природных нейропептидов (GYIRF и YIRF) индуцировать сокращение изолированных мышечных клеток, что может указывать на существование их специфических рецепторов на мембране мышечной клетки планарий.

Пептид-индуцированное мышечное сокращение подавлялось дигидропиридиновыми блокаторами Ca^{2+} -каналов и, таким образом, было зависимым от поступления внеклеточного Ca^{2+} в клетку.

В регуляции пептид-индуцированного мышечного сокращения у планарий центральную роль играет внутренний резерв ионов кальция Ca²⁺, поступающего из внутриклеточного депо, вероятно через внутренние рианодиновые кальциевые каналы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Д.В. Халтону (prof. D.W. Halton) и А.Г. Молу (prof. A.G. Maule) Королевского Университета г. Белфаст (Queen's University of Belfast, Northern Ireland, UK) за предоставленную возможность работать в лаборатории и их чуткое руководство, а также А. Моусли (dr. A. Mousley) за помощь в освоении методики культивирования мышечных клеток.

В работе использовано оборудование Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пущино, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа по изучению физиологии мышечного сокращения была поддержана стипендией Королевского Общества Великобритании (Royal Society Fel-

lowship Program, Великобритания). Иммуноцитохимические исследования по идентификации FMRFподобных пептидов и гистохимическое исследование мускулатуры у планарий выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-04-00349а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- C. Shaw, A. G. Maule, and D. W. Halton, Int. J. Parasitol. 26 (4), 335 (1996).
- P. McVeigh, G. R. Mair, L. Atkinson, et al., Int. J. Parasitol. 39, 1243 (2009).
- R. N. Johnston, C. Shaw, D. W. Halton, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 209, 689 (1995).
- R. N. Johnston, C. Shaw, D. W. Halton, et al., J. Neurochem. 67, 814 (1996).
- G. Maule, D. W. Halton, and L. Thim, Biochem. Biophys. Res. Comm. **193**, 1054 (1993).
- D. A. Price and M. J. Greenberg, Science 197 (4304), 670 (1977).
- N. D. Kreshchenko, Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology 8 (1), 89 (2014).
- 8. O. O. Tolstenkov, L. Akimova, N. B. Terenina, and M. K. S. Gustafsson, Parasitol. Res. **111**, 1977 (2012).
- M. Almuedo-Castillo, X. Crespo, F. Seebeck, et al., PLoS Genetics 10 (6), e1004400 (2014).
- L.-Ch. Cheng, K. C. Tu, C. W. Seidel, et al., Dev. Biol. 433, 357 (2018).
- J. Bagunà, Seminars in Cell and Developmental Biology 87, 3 (2019).
- V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, Bioelectromagnetics 29 (5), 387 (2008). DOI: 10.1002/bem.20407
- P. G. Barghouth, M. Thiruvalluvan, and N. J. Oviedo, Biochim. Biophys. Acta 1848 (10, Part B), 2629 (2015). DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.02.024
- 14. F. Durant, J. Bischof, Ch. Fields, et al., Biophys. J. 116, 948 (2019).
- T. Nogi, D. Zhang, J. D. Chan, et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 3 (6), e464 (2009).
- J. J. Collins and Ph. A. Newmark, PLoS Pathogens 9 (7), e1003396 (2013).
- N. J. Wheeler, P. N. Agbedanu, M. J. Kimber, et al., Parasitol. Vectors 8, 34 (2015).
- E. I. Maciel, C. Jiang, P. G. Barghouth, et al., Devel. Compar. Immunol. 93, 18 (2019).
- F. Cebrià, Front. Cell Devel. Biol. 4, 8 (2016). DOI: 10.3389/fcell.2016.00008

- 20. N. D. Kreshchenko, Biophysics 62 (2), 271 (2017).
- D. W. Halton and A. G. Maule, Can. J. Zool. 82, 316 (2004).
- 22. R. Pascolini, F. Panara, I. Di Rosa, et al., Cell. Tiss. Res. 267, 499 (1992).
- R. Pascolini, F. Panara, G. Gabbiani, et al., Bolletino di Zoologia 60 (4), 403 (1993). DOI: 10.1080/11250009309355848
- 24. M. H. Wahlberg, Cell. Tiss. Res. 291 (3), 561 (1998).
- 25. G. R. Mair, D. W. Halton, A. G. Maule, and C. Shaw, Parasitology Today 14, 73 (1998).
- K. L. Blair, T. A. Day, M. C. Lewis, et al., Parasitology 102, 251 (1991).
- 27. C. G. Moneypenny, N. Kreshchenko, T. A. Day, et al. Parasitology **122**, 447 (2001).
- N. Kreshchenko, T. A. Day, D. W. Halton, and A. G. Maule, in *Abstr. 8th Eur. Multicolloqium of Parasitology* (Poland, Acta Parasitologica 45 (3), 2000), p. 256.
- 29. N. D. Kreshchenko, M. Totten, A. G. Maule, et al., in Abstr. Book of Int. Symp. "Biological motility: new trends in research" (Pushchino, 2001), pp. 82–83.
- N. B. Terenina, N. D. Kreshchenko, N. V. Mochalova, and S. O. Movsesyan, Helminthologia 55 (3), 185 (2018).
- O. O. Tolstenkov, V. V. Prokofiev, N. B. Terenina, and M. K. S. Gustafsson, Parasitol. Res. 108, 1219 (2011). DOI: 10.1007/s00436-010-2166-6
- 32. M. Reuter, M. K. S. Gustafsson, J. Lang, and C. J. P. Grimmelkuijzen, Zoomorphology **109**, 303 (1990).
- 33. G. R. Mair, R. N. Johnston, D.W. Halton, et al., Zoomorphology **116** (4), 213 (1996).
- K. Mäntylä, D. W. Halton, M. Reuter, et al., Hydrobiologia 383, 167 (1998).
- 35. M. Reuter, M. K. S. Gustafsson, I. M. Sheiman, et al., Invertebrate Neurosci. 1, 133 (1995).
- N. Kreshchenko, M. Reuter, I. Sheiman, et al., Invertebrate Reproduction and Development 35 (2), 109 (1999).
- M. Reuter, M. K. S. Gustafsson, K. Mäntylä, and C. J. P. Grimmelikhuijzen, Zoomorphology 116, 111 (1996).
- 38. F. Cebrià, Neurosci. Res. 61, 375 (2008).
- 39. K. Mäntylä, M. Reuter, D. W. Halton, et al., Acta Zoologica (Stockholm) **79** (1), 1 (1998b).
- 40. C. G. Moneypenny, A. G. Maule, C. Shaw, et al., Parasitology **115**, 281 (1997).
- G. Hrôkova, S. Velebný, D. W. Halton, et al., Int. J. Parasitol. 34, 83 (2004).
- 42. N. J. Marks, S. Johnson, D. W. Halton, et al., Parasitology **113**, 394 (1996).
- 43. M. K. Graham, I. Fairweather, and J. G. McGeown, Parasitology **114**, 455 (1997).
- 44. K. L. Blair and P. A. V. Anderson, Parasitology **109**, 325 (1994).
- T. A. Day, A. G. Maule, C. Shaw, et al., Parasitology 109, 455 (1994).
- 46. T. A. Day, A. G. Maule, C. Shaw, and R. A. Pax, Peptides **18**, 917 (1997).

КРЕЩЕНКО

47. T. A. Day, J. Haithcock, M. Kimber, and A. G. Maule, Parasitology 120, 417 (2000).
48. P. Cobbett and T. A. Day, Com. Biochem. Physiol. Part A 134, 593 (2003).

An Exploration of the Mechanisms of Action of FMRF-Like Peptides in Inducing Muscle Contraction in Planarians (Platyhelminthes)

N.D. Kreshchenko

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

The present work focuses on the study of localization of peptidergic neurons and muscle fibers of body wall musculature in planarians *Girardia tigrina* and *Polycelis tenuis* with the use of immunohistochemistry and immunocytochemistry methods, fluorescent microscopy and confocal laser scanning microscopy. A close spatial relationship between FMRFamide-immunopositive nerve fibres and myofilaments is shown. Such localization of peripheral peptidergic nerve fibres may suggest an important role FMRF-like neuropeptides play in the regulation of muscle function. Physiological analysis of the muscle cells isolated from planarian *Procerodes littoralis* confirmed that native flatworm FMRF-like peptides GYIRF and YIRF have the inducing effect on muscle contractions in planarian. It was found that dihydropyridine calcium channel blockers, nicardipine, nitrendipine and nifedipine, as well as ryanodine, an antagonist of the endoplasmic reticulum ions reuptake – thapsigargin and cyclopiazonic acid decreased the number of peptide-induced muscular responses. The findings suggest that FMRF-like peptide-induced muscle contraction is dependent on calcium ions from both extracellular pool and intracellular stores. The results demonstrate the presence of different receptors and ion channels controlling muscle contractions in flatworms.

Keywords: planarians, confocal laser scanning microscopy, FMRF-like peptides, musculature

=____ БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ОДНОСТОРОННЕЙ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ ДЕНЕРВАЦИИ НА ПУРИНЕРГИЧЕСКУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ В ХОЛИНЕРГИЧЕСКОМ СИНАПСЕ

© 2021 г. А.Е. Хайруллин, Д.В. Ефимова, В.А. Маркосян, С.Н. Гришин, А.Ю. Теплов, А.У. Зиганшин

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49 E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.02.2021 г. После доработки 26.02.2021 г. Принята к публикации 03.03.2021 г.

Ранее нами было установлено изменение эффективности модулирующего действия АТФ под действием некоторых нефизиологических факторов в нервно-мышечных синапсах грызунов. Цель настоящего исследования — оценить эффект АТФ на синаптическую передачу изолированной m. soleus крысы после травматической денервации. Показано, что семисуточная денервация привела к увеличению силы сокращений m. soleus, вызванных электрической стимуляцией. Аппликация АТФ усиливает сокращения интактной камбаловидной мышцы, вызванные электрической стимуляцией, но не влияет на денервированную мышцу. На фоне неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина прекращалось действие АТФ. Мы предполагаем, что снижение модулирующей способности АТФ на денервированных мышцах, по всей видимости, вызвано снижением количества P2-рецепторов на нервной терминали, возникающем в результате нарушения антероградного транспорта и проводящей способности нервного волокна.

Ключевые слова: денервация, АТФ, Р2-рецепторы, скелетные мышцы, синапс, сурамин. **DOI:** 10.31857/S0006302921030169

Травмы, оперативные вмешательства и ряд других причин могут приводить к нарушению иннервации конечностей, что впоследствии ведет за собой стойкое нарушение функций мышц и постепенные морфологические изменения, проявляющиеся в виде рубцовых перерождений мышечных волокон с утратой способности к сокращению.

Известно, что после механического повреждения тканей из них во внеклеточное пространство высвобождается АТФ. Свои эффекты, например, в виде модуляции синаптической передачи, она способна оказывать через лиганд-управляемые ионные каналы (P2X-рецепторы) и метаботропные P2Y-рецепторы [1]. В настоящее время установлено, что молекула АТФ может активно регулировать эффективность нервно-мышечной передачи, регулируя квантовый и неквантовый выброс ацетилхолина [2].

Известно, что $AT\Phi$, как сигнальная молекула, может частично усугублять нейрональное повреждение, вызванное травмой или нарушением обмена веществ, но при этом в той же степени может выступать в качестве активатора нейропротективных процессов [3]. Посттравматическое высвобождение АТФ активирует Р2-рецепторы. Было показано усиление экспрессии Р2Х7-рецепторов на соседних неповрежденных клетках и тканях [4]. По всей видимости, можно предположить, что Р2-сигнализация являются специфическим участником в механизмах тканевых травм и их последствиях.

Связывание АТФ с Р2Х7-рецептором вызывает в течение миллисекунд открытие канала, избирательного для небольших катионов, на несколько секунд приводит к открытию большой поры, которая позволяет проникнуть в клетку высокомолекулярным соединениям.

Дальнейшая реорганизация цитоскелета приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов (IL-1b) и активации каспазы-3 (триггера апоптоза), способствующего в целом осуществлению некротических и апоптотических эффектов: набухание клетки, разрушение мембраны, дальнейший лизис [5].

Установлено, что антагонисты P2X7-рецепторов могут уменьшать воспаление и рубцевание, возникающее в ответ на повреждения нервов, а также способствовать функциональному восстановлению поврежденных тканей [3]. Считается, что это происходит в результате активации нейротрофических факторов, которые способствуют процессам выживания и роста нервов. Они играют ключевую роль в развитии пластичности и в целом в регенерации структур как центральной, так и периферической нервной систем. Деятельность данных веществ осуществляется путем взаимодействия их со специальными рецепторами, расположенными на поверхности нейронов, шванновских клеток, эндотелиоцитов.

Цель настоящего исследования — оценить эффект АТФ на синаптическую передачу изолированной m. soleus крысы после травматической денервации.

МЕТОДЫ

Подготовительные процедуры. Исследования проводили на белых лабораторных крысах-самцах породы Wistar массой 130—190 г, которых содержали в группах по пять особей с водой и кормом *ad libitum*.

Животных перед началом операции наркотизировали, вводя внутрибрюшинно раствор этаминала натрия в дозе 40 мг/кг. После очистки операционного поля на задней левой конечности от шерсти фиксировали оперируемую конечность для удобства дальнейших манипуляций. Выполняли косой разрез кожи боковой поверхности бедра, после чего последовательно вскрывали подкожно жировую клетчатку, поверхностную фасцию и широкую фасцию бедра. Производили отодвигание в сторону волокон длинной головки двуглавой мышцы бедра для обнажения сосудисто-нервного пучка (седалищный нерв, артерия и вена, сопровождающие седалищный нерв). После этого проводили выделение седалищного нерва, отделение его от сопровождающих кровеносных сосудов с последующей резекцией нерва (удаляли участок нерва размером 5 мм). Конечным этапом операции являлось зашивание раны лавсаном 3.0, обработка операционного поля раствором хлоргексидина и раствором бриллиантового зеленого.

После проведения операции животных содержали в течение семи суток в одиночных клетках с водой и кормом *ad libitum*. После семисуточного восстановления животных предварительно наркотизировали, вводя внутрибрюшинно раствор этаминала натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли *m. soleus* с культей седалищного нерва.

Проведение экспериментов по регистрации параметров сокращения. Выделенные мышцы фиксировали одним сухожильным концом к неподвижному штативу, второй конец прикрепляли лигатурой к датчику двигательной активности и погружали в небольшие резервуары объемом 10 мл, наполненные раствором Кребса (состав в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl₂ – 2.5, NaH-CO₃ – 24.8, KH₂PO₄ – 1.18, MgSO₄ · 7H₂O – 1.18, глюкоза – 11, pH 7.4. Заданное значение температуры (20 \pm 0.5°C) поддерживали с помощью термостата. На мышцы изначально подавали нагрузку в 1 г, затем оставляли в покое на полчаса для адаптации к среде.

Электростимуляцию проводили с помощью «всасывающего» электрода (suction electrode). Культю нерва выделенной мышцы помещали в «всасывающий» электрод оригинальной конструкции. Для раздражения использовали электростимулятор Digitimer MultiStimul D330 (Великобритания). Мышцы стимулировали в течение 2 мин прямоугольными импульсами амплитудой 3 В и продолжительностью 0.5 мс при частоте 0.1 Гц. Силу сокращений мышц регистрировали с помощью датчика двигательной активности Linton FCG-01 (Великобритания), аналоговый сигнал преобразовывался системой сбора данных Віораск MP100MSW (США). Все полученные в течение двух минут ответы (12 сократительных ответов) усредняли и обрабатывали как один результат. Рассчитывали их в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента. Через полчаса после фиксирования нервно-мышечной ткани проводили контрольную стимуляцию мышц дважды с интервалом в пять минут, удостоверившись в стабильности сократительных ответов, начинали экспериментальные процедуры.

Эффекты пуринергических агонистов и антагонистов. В ванночку добавляли 100 мкМ АТФ и через 10 мин оценивали механические ответы мышцы. Затем мышцу промывали раствором Кребса и инкубировали с раствором сурамина в концентрации 100 мкМ в течение 20 мин с последующим добавлением 100 мкМ АТФ и вновь регистрировали механические ответы мышц. Для подтверждения синаптической природы эффектов АТФ в экспериментах нервно-мышечную ткань инкубировали с сурамином в концентрации 100 мкМ, через 20 мин регистрировали сократительные ответы мышц, возникающие в ответ на непрямую стимуляцию электрическим током.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сокращения, вызванные электрической стимуляцией. Усредненная по восьми экспериментам сила сокращения m. soleus интактных крыс составила 2.48 \pm 0.31 г (n = 8), что было принято за 100%. Аппликация АТФ в концентрации 100 мкМ усиливала сокращения интактной камбаловидной мышцы, вызванные электрической стимуляцией, до 117.6 \pm 5.2% (n = 8, p < 0.05) от контроля (рис. 1). На фоне неселективного антагониста Р2-



Рис. 1. Влияние денервации на силу сокращений m. soleus крысы, вызванных электрической стимуляцией, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; n = 8; * – p < 0.05 от контроля интактной мышцы.

рецепторов сурамина в концентрации 100 мкМ прекращалось действие АТФ.

Семисуточная денервация привела к увеличению силы сокращения мышцы до 124.6 \pm 10.1% (n = 8, p < 0.05) от интактного контроля (рис. 1). Инкубация денервированной ткани с АТФ в концентрации 100 мкМ никак не повлияла на сокращения камбаловидной мышцы, вызванные электрической стимуляцией. Введение в ванночку сурамина (100 мкМ) не изменило сократительной активности денервированной мышцы.

При повышении напряжения раздражающих импульсов до 100 В наблюдалась прямая стимуляция мышечной ткани, при этом добавление 100 мкМ АТФ не оказало эффекта на силу сокращения исследуемой мышцы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Статья посвящена исследованию влияния денервации на сократимость скелетной мышцы, а также модулирующих эффектов АТФ на нервномышечную передачу при семисуточной денервации.

Широко известно, что моторная денервация приводит к уменьшению силы, подвижности мышцы и ее атрофии [6]. Семисуточный срок денервации был выбран нами исходя из того, что на более длительных сроках начинаются морфологические изменения в мышцах, подвергнутых денервации или иным расстройствам [7–11], которые будут маскировать изменения в синапсе.

Морфофункциональные изменения, возникающие после денервации, описаны в литературе. В частности, показано изменение активности сар-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

коплазматической кальциевой АТФазы (SERCA) на длительных сроках денервации, приводящее к снижению сократимости мышц [10]. Кроме того, было показано изменение экспрессии митохондриального транскрипционного фактора А (Tfam), белка, который управляет транскрипцией и репликацией митохондриальной ДНК и регулируется во время состояния пониженного содержания органелл, вызванного неиспользованием мышц. Это приводит к снижению мышечной массы на 13 и 38% соответственно через трое и семеро суток после денервации [12]. Другие авторы указывают, что морфологические изменения в денервированных мышцах начинаются позже [7-10]. В одной из работ иммуногистохимически при помощи моноклональных антител к тяжелым цепям быстрого миозина показано, что денервация путем иссечения фрагмента седалищного нерва не изменяет относительное содержание быстрых мышечных волокон в медленной камбаловидной мышце крысы [13].

Казалось бы, все эти изменения должны приводить к угнетению мышечной активности. Тем не менее в наших экспериментах семисуточная денервация привела к увеличению силы сокращения.

Почему это могло произойти? Известно, что при перерезке нерва денервированная часть клеток мишеней может становиться более чувствительной к оставшемуся афферентному входу [14]. Подобное явление известно как «закон денервации». Денервационная суперчувствительность может вести к увеличению рефлекторной активности [15]. В наших экспериментах, конечно, речь идет не о рефлекторной активности, тем не менее, применяемый способ стимуляции электрическим полем генерализирован по своей сути и может затрагивать активированные денервацией суперчувствительные механизмы.

Кроме того, согласуется с нашими данными и объясняет усиление сократимости денервированных мышц в контроле работа, демонстрирующая снижение активности холинэстеразы после сочетанной химической денервации [16]. Вероятнее всего, этот эффект приводит к увеличению количества и времени жизни основного медиатора, ацетилхолина в синаптической щели.

В данной работе показано, что моторная денервация способна существенно изменять известный потенцирующий эффект экзогенного АТФ на нервно-мышечную передачу в условиях стимуляции внешним электрическим полем [17– 20].

Ранее были опубликованы только данные о влиянии денервации на эффект АТФ на состояние постсинаптической мембраны мышечных волокон. [21] Исследования проводили на иннервированной и денервированной m. EDL мыши.



Рис. 2. Предположительная схема пуринергической модуляции нервно-мышечной передачи в мышце m. soleus. АТФ и ее метаболит аденозин участвуют в отдельных механизмах отрицательной обратной связи: АТФ через Р2Урецепторы и аденозин – через рецепторы аденозина A1 и A2A. Показана синаптическая везикула в нервном окончании, заполненная АТФ и ацетилхолином. Экзоцитоз содержимого везикул вызывает активацию пре- и постсинаптических P2-рецепторов АТФ. АСh – ацетилхолин, PLC – фосфолипаза C, AC – аденилатциклаза.

Показано, что после инкубации с АТФ сила сокращения интактной мышцы уменьшалась, а денервированной — повышалась до 120% (постсинаптическое звено).

Демонстрируемое нами снижение модулирующей способности АТФ на денервированных мышцах, по всей видимости, вызвано снижением количества Р2-рецепторов на нервной терминали, возникающим в результате нарушения антероградного транспорта и проводящей способности нервного волокна (рис. 2).

Изучение механизмов синаптической пластичности в условиях деструкции проводящих путей может позволить подобраться чуть ближе к решению таких задач, как реабилитация пациентов с острыми травматическими повреждениями и хроническим сдавливанием нервов, а также нейродегенеративными, воспалительными, метаболическими и неопластическими нарушениями.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, Int. J. Mol. Sci. 21, 6423 (2020).
- С. Н. Гришин и А. У. Зиганшин, Биол. мембраны 30 (4), 243 (2013).
- W. Peng, M. L. Cotrina, X. Han, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 12489 (2009).
- 4. P. Majumder, C. A. Trujillo, and C. G. Lopes, Purinergic Signal. **3** (4), 317 (2007).
- J. G. Boyd and T. Gordon, Mol. Neurobiol. 27 (3), 277 (2003).
- Е. В. Маркелова, Физиология: методическое пособие для студентов институтов физической культуры (МГУ им. адм. Г.И. Невельского, Владивосток, 2009).
- H. J. Finol, D. M. Lewis, and R. Owens, J. Physiol. 319, 81 (1981).
- 8. K. Küllmer, C. D. Reimers, P. Eysel, and U. Harland, Ultraschall Med. 17 (5), 225 (1996).
- 9. M. Midrio, Eur. J. Appl. Physiol. 98 (1), 1 (2006).
- M. Komatsu, T. Nakada, H. Kawagishi, et al., J. Muscle Res. Cell Motil. **39** (5–6), 163 (2018).
- E. V. Ponomareva, E. V. Kachaeva, E. G. Altaeva, et al., Biophysics 53 (6), 615 (2008).
- 12. L. D. Tryon, M. J. Crilly and D. A. Hood, Am. J. Physiol. Cell Physiol. **309** (4), 228 (2015).
- Р. Р. Исламов, Д. С. Гусева, Ю. А. Челышев и В. В. Валиуллин, Бюл. эксперим. биологии и медицины 131 (4), 477 (2001).

- W. B. Cannon and A. Rosenblueth, *The supersensitivityof denervated structures: a law of denervation* (Macmillan Co., N.Y., 1949).
- 15. M. Goldberger, Trends Neurosci. 3 (11), 288 (1980).
- Т. Р. Ковригина и В. И. Филимонов, Морфология 146 (6), 54 (2014).
- 17. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, B. A. Ziganshin, et al., Muscle and Nerve 55 (3), 417 (2017).
- A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., Muscle and Nerve **59** (4), 509 (2019).
- A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, et al., Biophysics 64, 812 (2019).
- 20. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, Biophysics **65**, 858 (2020).
- 21. А. М. Фархутдинов, Вестник РГМУ **3** (42), 191 (2005).

Effect of Acute Unilateral Denervation Injury on Purinergic Signaling in the Cholinergic Synapse

A.E. Khairullin, D.V. Efimova, V.A. Markosyan, S.N. Grishin, A.Yu. Teplov, and A.U. Ziganshin

Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

Previously, we found a change in the efficiency of the modulating action of ATP under the influence of some non-physiological factors at neuromuscular synapses in rodents. The aim of this study was to evaluate the effect of ATP on synaptic transmission of isolated rat soleus muscles after denervation injury. It was shown that after 7 days of denervation, rats exhibited an increase in the strength of electrical stimulation-evoked contractions of the soleus muscles. Application of ATP increased the electrically evoked but not denervated contractions of the intact soleus muscle. In the presence of the non-selective P2-receptor antagonist suramin, ATP stopped its action. We speculate that a reduction in the ATP activity in a rat model of denervation is most likely caused by a decrease in the number of P2 receptors on the nerve terminal because of impairment of anterograde transport and a decline in nerve fiber conduction velocity.

Keywords: denervation, ATP, P2-receptors, skeletal muscles, synapse, suramin

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 577.35+612.17

ПРОДУКЦИЯ ОКСИДА АЗОТА В ТКАНЯХ КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

© 2021 г. Р.И. Зарипова*, Г.Г. Яфарова*, В.В. Андрианов*, **, Х.Л. Гайнутдинов^{*, **}, Т.Л. Зефиров*

*Казанский федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18 **Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 420034, Казань, ул. Сибирский тракт, 10/7

> *E-mail: kh_gainutdinov@mail.ru* Поступила в редакцию 27.12.2019 г. После доработки 23.03.2020 г. Принята к публикации 04.03.2021 г.

Проведено ЭПР-исследование интенсивности продукции оксида азота у крыс путем анализа количества NO-содержащих парамагнитных комплексов в тканях сердца и печени в постнатальном онтогенезе. Количество оксида азота оценивали по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу (ДЭТК)₂–Fe²⁺–NO. Полученные результаты показывают, что содержание NO в тканях печени с 28- до 56-суточного возраста возрастает, в постпубертатный период изменяется несущественно. В тканях сердца наблюдается повышение количества NO к половозрелому периоду по сравнению с пубертатным периодом. Во всех исследованных возрастных группах содержание NO в печени крыс было значительно больше, чем в тканях сердца.

Ключевые слова: оксид азота, крыса, онтогенез, сердце, печень, электронный парамагнитный резонанс. **DOI:** 10.31857/S0006302921030170

Оксид азота (NO) – газообразный химический мессенджер, являющийся высоколабильным, короткоживущим, реактивным свободным радикалом, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов [1-6]. В организме оксид азота синтезируется двумя основными путями: ферментативным и неферментативным. Ферментативный синтез NO осуществляется ферментом NO-синтазой в присутствии О2 и НАДФ-Н в результате окисления аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты – L-цитруллина [7]. Коронарный и эндокардиальный эндотелий, кардиомиоциты в норме являются источником базальной продукции NO и регулируют функции сердца через сосудистозависимые и сосудистонезависимые эффекты [1, 8–11]. NO контролирует сосудистый тонус, артериальное давление, пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудистой стенки, участвует в возникновении атеросклероза и гипертензий, регулирует сократимость миокарда [9-14]. Доказано токсическое действие NO на кардиомиоциты при патологических состояниях [15].

NO широко представлен в центральной и периферической нервной системе [6, 16–17]. NO выполняет роль сигнальной молекулы, модулируя адренергические и холинергические влияния на сердце [4, 10, 16–19]. Система NO играет важную роль при адаптации организма к различным изменениям внешней среды и внешних условий жизнедеятельности, в том числе и на изменение двигательной активности [20-22]. Активация NO-системы – один из тех механизмов, за счет которого организм предупреждает стрессорные повреждения. Система оксида азота, играющая роль в активации антиоксидантных ферментов, ограничивает стресс-реакцию [23, 24]. NO ввиду свойственной ему реактивности способен взаимодействовать с разнообразными веществами, образуя структуры, служащие в качестве депо для NO, – тиолами, белками, сахарами, ионами металлов, гемами протеинов и т.д., локализованными в самых различных тканях и органеллах, что предполагает наличие NO и его комплексов в различных тканях. Депо NO может служить дополнительным неферментативным источником NO в случае его дефицита. Под неферментативным пу-

Сокращения: NO – оксид азота, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.



Рис. 1. Спектр ЭПР тканей печени крысы. Пунктиром выделен сигнал от комплекса (ДЭТК)₂ $-Fe^{2+}-NO$, p < 0.05.

тем обычно понимают восстановление нитритов или нитратов до NO [3]. Данная способность является одним из способов предупреждения токсических эффектов избытка NO [25, 26].

Значительная роль NO во многих физиологических и патофизиологических процессах, а также недостаточность сведений об интенсивности синтеза NO в растущем организме предопределяют значимость исследований в данном направлении. Является актуальным определение количественного содержания NO как внутриклеточного, межклеточного, тканевого и межорганного посредника в различных тканях.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание NO в тканях сердца и печени крыс определяли методом спинового захвата в четырех возрастных группах животных: 28-, 56-, 81и 110-суточного возрастов, в каждой возрастной группе n = 10. Эксперименты проводили в соответствии с нормативными положениями о правилах обращения с лабораторными животными. Метод спинового захвата основан на реакции радикала NO со спиновой ловушкой [27, 28]. Был применен комплекс Fe²⁺ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO [27-29]. Для образования в организме данного комплекса животным вводили водный раствор ДЭТК-Nа в дозе 500 мг/кг в 2.5 мл воды внутрибрюшинно и раствор цитрата железа (сульфат железа (II) (FeSO₄ \cdot 7H₂O, Sigma, CША) в дозе 37.5 мг/кг + цитрат натрия, 187.5 мг/кг) внутримышечно (подробности метода описаны

стабильный радикал (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO. Данкомплекс является парамагнитным ный (SFe = 1/2, и IN = 3/2) и может быть зарегистрирован методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [28]. Комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением *g*-фактора g = 2.038 и триплетной сверхтонкой структурой (рис. 1). Количество NO оценивали по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO. Сигналы сравнивали по величине интегральной интенсивности, так как интегральная интенсивность сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации парамагнитных комплексов [29]. Через 30 мин после введения препаратов наркотизированную уретаном крысу фиксировали на операционном столе, вскрывали, извлеченные органы быстро просушивали и замораживали в жидком азоте в капиллярах для измерений. Регистрацию спектров ЭПР приготовленных образцов проводили при 77 К на ЭПР-спектрометре X-диапазона ER-200E-SRC EMX/plus (Bruker, США) с температурной приставкой ER-4112HV. Во всех экспериментах сохраняли постоянными следующие параметры: СВЧ мощность – 30 мВт, модуляция — 5 Гс, усиление — $4 \cdot 10^4$, постоянная времени -100 мс, время записи спектра -50 с, число накоплений – 8. При накоплениях и регистрации спектров использовали компьютер спектрометра Aspect 3000 (Bruker, США).

нами ранее [30, 31]). Комплекс ДЭТК-Fe(II) вза-

имодействует с NO, в результате чего образуется

При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандарт-



Рис. 2. Интенсивность сигнала ЭПР спиновой ловушки $(ДЭТК)_2$ -Fe²⁺-NO в тканях предсердий сердца крыс. По оси ординат – интегральная интенсивность сигнала от комплекса, * – p < 0.05.

ную ошибку среднего $M \pm SEM$. С применением *t*-критерия Стьюдента и *U*-критерия Манна— Уитни проверяли достоверность отличия средних значений уровней NO в разных тканях крыс разного возраста. Различия считали значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, 28-суточные крысы являются неполовозрелыми, пик становления симпатической иннервации в сердце; 56суточный возраст соответствует пубертатному периоду развития, сопровождающемуся выраженными изменениями эндокринной системы, ока-



Рис. 3. Интенсивность сигнала ЭПР спиновой ловушки (ДЭТК)₂—Fe²⁺—NO в тканях желудочков сердца крыс. По оси ординат — интегральная интенсивность сигнала от комплекса,* — p < 0.05.



Рис. 4. Интенсивность сигнала ЭПР спиновой ловушки $(ДЭТК)_2 - Fe^{2+} - NO$ в тканях печени крыс. По оси ординат — интегральная интенсивность сигнала от комплекса,* – p < 0.05.

зывающей активное влияние на регуляцию сердечной деятельности, 81-суточные животные – переходный период от пубертата к половозрелости, 110-суточные – половозрелые крысы [32– 34]. При таком подходе, на наш взгляд, удается охватить основные периоды развития крыс и проследить формирование регуляции сердечной деятельности в разные этапы постнатального онтогенеза. При сопоставлении спектров ЭПР тканей предсердий сердца крыс разных возрастов было обнаружено, что количество NO с 56- по 81-суточный возраст существенно не изменяется. К 110-суточному возрасту количество (ДЭТК)2-Fe²⁺-NO) повысилось в среднем на 19% по сравнению с 56-суточным возрастом (p < 0.05, рис. 2). Количество NO в тканях желудочков сердца крыс с 56- по 81-суточный возраст, в отличие от предсердий, увеличивается в среднем на 30% (p < 0.05), у 81- и 110-суточных крыс количество NO не отличается (рис. 3). Выявлено, что в тканях печени крыс интенсивность сигналов ЭПР у крыс с 28- до 56-суточного возраста увеличивается в среднем на 85% (*p* < 0.05), а к 110-суточному возрасту существенно не изменяется (рис. 4). Оксид азота участвует в большинстве метаболических процессов, протекающих в печени, поэтому его динамика свидетельствует об изменениях интенсивности метаболизма в печени в ходе онтогенеза.

Наибольшее содержание NO у крыс обнаружено в печени, далее по убывающей — в тканях предсердий и желудочков сердца. Возможно, это объясняется тем, что печень является мощным фильтратом крови. Влияние NO на печень не ограничивается септическими состояниями.

Имеются сведения о важной роли NO в функциональных сдвигах, наблюдаемых в печени при ишемии и реперфузии, злокачественных новообразованиях, циррозе и ряде других патологических состояний [35].

Исследованиями показано, что концентрация оксида азота в организме различается в зависимости от возраста людей. Так, максимальное содержание этого соединения наблюдалось в возрасте 5-12 лет и составляло 152.0 ± 16.2 мкг/мл. Далее с увеличением возраста продукция NO снижалась и в 19–30 лет достигала минимальных значений [36]. По мере старения организма нарушается функция эндотелия сосудов, и главной причиной дисфункции эндотелия считается снижение продукции эндотелиального NO [37].

В возрасте 7-10 лет выявлены высокие темпы нарастания показателей плотности холин- и адренергических терминалей в миокарде, наибольшая их концентрация постоянно регистрируется в стенке правого предсердия, затем по количественным показателям следуют левое предсердие, правый желудочек и, наконец, - стенка левого желудочка. В период половой зрелости насыщенность стенок сердца нервными сплетениями становится максимальной. С 35-40-летнего возраста возникает снижение симпатической активности. В результате применения иммуногистохимических методов обнаружена солокализация оксида азота в перицеллюлярных окончаниях, нейронах сердца и холинергических синапсах человека и животных. Установлено, что эффекты оксида азота и его метаболитов выражены в областях мозга, которые контролируют симпатическую активность и влияния блуждающего нерва, и, кроме того, оксид азота модулирует трансмиссию вегетативной деятельности на органы-мишени, воздействуя на уровне спинного мозга, ганглиев и нейромышечных контактов [38].

Полученные нами результаты показывают, что содержание NO в тканях печени с 28- до 56-суточного возраста возрастает, а в постпубертатный период изменяется не существенно. В тканях сердца наблюдается повышение количества NO к половозрелому периоду по сравнению с пубертатным периодом. Было обнаружено, что установление стабильного уровня NO в исследованных нами тканях происходит в разные возрастные периоды: в тканях печени – в начале пубертатного периода (56-суточный возраст), в тканях желудочков сердца – к 81-суточному, а в предсердиях – к 110-суточному возрасту. NO модулирует или опосредует почти все сигнальные пути сердечно-сосудистой системы на каждом уровне, начиная от центральной нервной системы и кончая кардиомиоцитами [39, 40]. Видимо, оксид азота наряду с нейромедиаторами и гормонами является ключевой молекулой в становлении регуляции

деятельности сердечно-сосудистой системы в постнатальном онтогенезе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидией, выделенной Казанскому федеральному университету по Государственному заданию № 0671-2020-0059 в сфере научной деятельности.

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

- А. Ф. Ванин, Соросовский образоват. журн. 7 (11), 7 (2001).
- 2. Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков и В. П. Реутов, Биохимия **65** (4), 485 (2000).
- 3. В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Щуклин и др., Успехи физиол. наук **38** (4), 39 (2007).
- E. M. Schuman and D. V. Madison, Annu. Rev. Neurosci. 17, 153 (1994).
- D. Boehning and S. H. Snyder, Annu. Rev. Neurosci. 26, 105 (2003).
- 6. J. R. Steinert, T. Chernova, and I. D. Forsythe, Neuroscientist 16, 435 (2010).
- M. Mori and T. Gotoh, Biochem. Biophys. Res. Commun. 275, 715 (2000).
- А. А. Сосунов, Соросовский образоват. журн. 6 (12), 31 (2000).
- 9. D. L. Brutsaert, Physiol. Rev. 83, 59 (2003).
- В. В. Андрианов, Ф. Г. Ситдиков, Х. Л. Гайнутдинов и др., Онтогенез **39** (6), 437 (2008).
- 11. B. Casadei and E. C. Sears, Prog. Biophys. Mol. Biol. **82**, 67 (2003).
- A. Piech, C. Dessy, X. Havaux, et al., Cardiovasc. Res. 57, 456 (2003).
- A. I. Ismailova, O. I. Gnezdilov, L. N. Muranova, et al., Appl. Magn. Res. 28, 421 (2005).
- 14. R. I. Zaripova, N. I. Ziyatdinova, and T. L. Zefirov, Bul. Exp. Biol. Med. **161** (2), 215 (2016).
- В. А. Невзорова, М. В. Зуга и Б. И. Гельцер, Терапевт, № 3, 64 (1997).
- V. V. Andrianov, S. G. Pashkevich, G. G. Yafarova, et al., Appl. Magn. Res. 47 (9), 965 (2016).
- А. Л. Зефиров и А. Х. Уразаев, Успехи физиол. наук 30 (1), 547 (1999).
- M. P. Gallo, D. Malan, I. Bedendi, et al., Pflugers Arch. 441 (5), 621 (2001).

- 19. S. Thomas and R. Robitaille, J. Neurosci. **21** (4), 1087 (2001).
- Малышев И.Ю., Манухина Е.Б., Биохимия, 63 (7), 992 (1998).
- Р. И. Зарипова, Х. Л. Гайнутдинов и Т. Л. Зефиров, Бюл. эксперим. биол. мед. 157 (5), 554 (2014).
- 22. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, В. С. Июдин и др., Биофизика **58** (2), 276 (2013).
- Ю. Г. Камскова, Теория и практика физ. культуры, № 10, 20 (2002).
- 24. Л. Л. Гудков, К. Б. Шумаев, Е. И. Каленикова и др., Биофизика **52** (3), 503 2007.
- А. Н. Осипов, Г. Г. Борисенко и Ю. А. Владимиров, Успехи биол. химии 47, 259 (2007).
- А. А. Тимошин, Ц. Р. Орлова, А. Ф. Ванин и др., Рос. хим. журн. 52 (1), 88 (2007).
- 27. V. V. Khramtsov and L. B. Volodarsky, Biol. Magn. Res. 14, 109 (1998).
- 28. A. F. Vanin, A. Huisman, and E. E. Van Faassen, Methods Enzymol. **359**, 27 (2003).
- В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина и А. Ф. Ванин, Биофизика **39**, 915 (1994).
- Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S. et al, Appl. Magn. Res. 40, 267 (2011).

- 31. Р. И. Зарипова, В. В. Андрианов, Г. Г. Яфарова и др., Росс. физиол. журн. **100** (8), 926 (2014).
- И. А. Аршавский, Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития (Наука, М., 1982).
- Т. Л. Зефиров, Н. В. Святова и Н. И. Зиятдинова, Бюл. эксперим. биол. мед. № 6, 611 (2000).
- A. M. Kuptsova, N. I. Ziyatdinova, R. G. Biktemirova, and T. L. Zefirov, Intern. J. Pharm. Technol. 8 (3), 14999 (2016).
- 35. З. А. Лупинская, А. Г. Зарифьян, Т. Ц. Гурович и С. Г. Шлейфер, Эндотелий. Функция и дисфункция (КРСУ, Бишкек, 2008).
- 36. О. В. Клименко, Дис. ... к-та мед. наук (Читинская гос. мед. академия, Чита, 2002).
- О. Д. Остроумова и Р. Э. Дубинская, Кардиоваскулярная терапия и профилактика 3 (4), 83 (2004).
- В. Швалев, Тихоокеанский мед. журн., № 2, 94 (2012).
- 39. J. R. Docherty, Autonom. Neurosci., Basic and Clinical 96, 8 (2002).
- 40. M. D. Esler, A. G. Tumer, D. M. Kaye, et al., Am. J. Physiol. **268**, 278 (1995).

Nitric Oxide Production in Rat Tissues in Postnatal Ontogenesis: Studies by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy

R.I. Zaripova*, G.G. Jafarova*, V.V. Andrianov*, **, Kh.L. Gainutdinov*, **, and T.L. Zefirov*

*Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

**Kazan E.K. Zavoisky Physical-Technical Institute of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, ul. Sibirskij tract 10/7, Kazan, 420034 Russia

The EPR spectroscopy was used to study the intensity of nitric oxide production in rats by evaluating the level of nitric oxide-containing paramagnetic complexes in heart and liver tissues in postnatal ontogenesis. The amount of nitric oxide was estimated by the intensity of a characteristic EPR signal belonging to the $(DETC)_2$ -Fe²⁺-NO complex. The results show that the content of NO in liver tissues increases after the age of 28 days till 56-days without significant changes in the post-puberty period. In heart tissues, the nitric oxide level increases in the mature period as compared to puberty. The nitric oxide level in the rat liver was significantly higher than that in heart tissues in all studied age groups.

Keywords: nitric oxide, rat, ontogenesis, heart, liver, electron paramagnetic resonance

==== БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 577.3

РАЗВИТИЕ МЕТОДА МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНТАНИЛА В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ

© 2021 г. И.И. Колесниченко*, Л.М. Балашова**, ***, Л.С. Коробова**, ***

*Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 31/4 **НП Международный научно-практический Центр пролиферации тканей, 119034, Москва, ул. Пречистенка, 29/14 ***Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ,

> 117997, Москва, ул. Островитянова, 1 E-mail: kolesnichenko-ii@mail.ru Поступила в редакцию 28.12.2020 г. После доработки 22.03.2021 г. Принята к публикации 26.03.2021 г.

Для эффективной дозировки офтальмологических препаратов требуется оценка динамики изменения их концентрации в слезной жидкости во времени. В работе приведены примеры определения с помощью мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии анальгезирующего препарата фентанил, применяемого для премедикации перед офтальмологическими хирургическими операциями. Изучено поведение данного препарата в слезной жидкости пациентов при проведении операции в детской офтальмологии.

Ключевые слова: мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия, планарные электроды, фентанил, премедикация, офтальмология.

DOI: 10.31857/S0006302921030182

Известно, что, среди электрохимических методов анализа, одним из наиболее информативных является метод инверсионной вольтамперометрии [1]. Этот метод широко используется при анализе неорганических веществ, в частности тяжелых металлов. В известных электрохимических устройствах типа «Электронный язык» в качестве линейки сенсоров используется набор электродов с различными аналитическими характеристиками (мультиэлектродные системы).

Сенсоры, используемые в аналитических исследованиях, должны одновременно обладать воспроизводимыми аналитическими характеристиками и высокой перекрестной чувствительностью, под которой понимается чувствительность к нескольким компонентам анализируемого раствора [2]. Необходимы новые усилия по созданию оригинальных сенсорных композиций, а также по разработке методик практического применения «электронного языка» для решения конкретных задач. При этом достаточно трудно добиться воспроизводимости характеристик каждого электрода, что, в конечном счете, отрицательно сказывается на разрешающей способности и достоверности идентификации. На практике реализация метода инверсионной вольтамперометрии требует также тщательной пробоподготовки, заключающейся в удалении из анализируемой пробы органических веществ, которые существенным образом влияют на вид аналитических вольтамперограмм. С другой стороны, именно эта способность органических веществ изменять поведение электрохимической системы, содержащей катионы различных металлов, может быть использована для анализа соответствующих объектов.

В Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (Москва) был разработан электрохимический метод анализа органических веществ - мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия [1, 3]. Этим методом определяется изменение электрохимической активности катионов металлов в растворе в результате их взаимодействия с органическими веществами. В качестве линейки сенсоров было предложено использовать содержащиеся в составе фонового электролита катионы металлов с частично заполненными *d*-орбиталями, которые обладают способностью образовывать комплексные соединения с алкалоидами и, таким образом, формировать мультисенсорную тест-систему. Эти металлы хорошо определяются методом ин-

версионной вольтамперометрии, что позволяет осуществлять идентификацию различных веществ на основании анализа характерных изменений вольтамперных кривых, происходящих в результате введения различных алкалоидов в исходную тест-систему. При этом открывается возможность получения необходимой информации на единичном электроде. Таким образом, отпадает необходимость использования набора из нескольких индикаторных электродов, от количества которых зависит число информативных параметров. На получаемой вольтамперограмме 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, в которых используют набор электродов. При решении задачи идентификации конкретного органического вещества данным методом требуется сравнение с предварительно составленной базой данных.

Преимуществами мультисенсорного анализа органических веществ методом инверсионной вольтамперометрии являются:

 простота формирования и высокая стабильность рабочих характеристик мультисенсорной системы;

 – минимальное количество стадий аналитического процесса и, как следствие, простота алгоритма и малое время проведения анализа;

портативность и невысокая стоимость аппаратуры;

 возможность проведения экспресс-анализа как в лабораторных, так и во внелабораторных условиях;

 полная автоматизация процесса обработки данных и формирования протокола измерения;

- низкая стоимость расходных материалов.

Ранее для экспресс-диагностики биологических объектов с использованием мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии нами был опробован метод ранней диагностики глаукомы по сыворотке крови [4]. В дальнейшем работоспособность и эффективность метода была показана нами, в частности, при определении ряда офтальмологических препаратов — визомитина [5, 6], ланостерола [7], бетоптика и его дженериков [8, 9], а также местноанальгезирующих препаратов — наропина, хирокаина и лидокаина [10].

Для выяснения эффективной дозировки вновь разрабатываемых анальгизирующих офтальмологических препаратов требуется оценка динамики изменения их концентрации в слезной жидкости во времени. Целью данной работы являлось ис-



Рис. 1. Структурная формула фентанила.

следование методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии фармакокинетики поведения в слезной жидкости препарата опиоидного ряда — фентанила — в детской офтальмологии у больных при проведении операции по коррекции косоглазия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вещество фентанил (N-фенил-N-[1-(2-фенилэтил)-4-пиперидинил]пропанамид, бруттоформула C₂₂H₂₈N₂O) (рис. 1) – белый кристаллический порошок, практически нерастворимый в воде, но легко растворимый в спирте. Фармакологическое действие – анальгезирующее (опиоидное). Фентанил возбуждает опиатные (преимущественно мю-) рецепторы центральной нервной системы, спинного мозга и периферических тканей, повышает активность антиноцицептивной системы, увеличивает пороги болевой чувствительности. Он нарушает передачу возбуждения по специфическому и неспецифическому болевым путям к ядрам таламуса, гипоталамуса и миндалевидному комплексу, изменяет эмоциональную окраску боли. Также оказывает снотворное влияние (преимущественно в связи со снятием болевого синдрома). Применяется фентанил для премедикации перед хирургическими операциями, для вводного наркоза, послеоперационной анальгезии, при выраженном болевом синдроме и др.

Исследование проведено на больных детях в возрасте от 2 лет 4 мес. до 17 лет, которым была проведена операция по коррекции косоглазия. Послеоперационный период протекал без осложнений. Перед хирургическими вмешательствами детям проводили ингаляцию препарата «Севоран®» (действующее вещество –севофлуран) в концентрации до 8%, что обычно обеспечивает введение в общую анестезию в течение менее 2 мин. Низкая растворимость севофлурана в кро-



Рис. 2. (а) – Внешний вид прибора ЭЛ-02; (б) – схема планарного электрода (трехэлектродная конфигурация).

ви обеспечивает быстрое повышение альвеолярной концентрации при введении в наркоз и быстрое снижение после прекращения ингаляции. Быстрое выведение севофлурана из легких сводило к минимуму метаболизм препарата. Затем внутривенно (по стандартной методике) вводили 0.005%-й раствора фентанила, объем вводимого препарата составлял 1 мл на 10 кг веса пациента.

Для получения образцов слезной жидкости в конъюктивальный мешок глаза пациента помещали диск диаметром 8 мм из предварительно обработанного пористого материала (фильтровальной бумаги, которую тщательно промывали в спирте и дистиллированной воде и сушили при 80°С в течение трех часов). С целью возможного выявления растворов анестезиологических препаратов в слезе через определенное время (до введения препарата, через 10 мин и через 40 мин после его введения) бумажный диск извлекали из конъюктивального мешка, помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой и снимали инверсионные вольтамперограммы. Всего было взято 15 проб.

Исследования осуществляли с помощью электрохимического мультисенсорного анализатора, разработанного в ИФХЭ РАН. Общий вид анализатора ЭЛ-02 и схема планарной электродной системы представлена на рис. 2а. Для обнаружения и идентификации алкалоидов формировали тестсистемы, в которых использовали растворы следующих солей: нитраты ртути, цинка, кадмия, свинца, галлия, кобальта.

Исследования проводили на планарных электродах (ООО «КолорЭлектроникс»), представляющих собой полипропиленовую пластину с нанесенными рабочим и вспомогательным электродами (углеродный материал) и хлорсеребряным электродом сравнения. Схема планарного электрода представлена на рис. 26. Так как планарные электроды являются одноразовыми, производить подготовку поверхности индикаторного электрода не требовалось.

Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве электрохимической «тест-системы» использовали раствор электролита, содержащий катионы ряда металлов, обладающих способностью образовывать комплексные соединения с органическими веществами: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Hg^{2+} [1, 3]. Сформированная таким образом на индикаторном электроде матрица сенсоров в нашем случае обеспечивала работу прибора в формате «Электронный язык» [2].

Вольтамперограммы, получаемые методом инверсионной вольтамперометрии. имеют определенный вид (рис. 3, кривая 1) и хорошо воспроизводимы. Они представляют собой зависимости тока от потенциала рабочего электрода, меняюшегося по линейному закону во времени. Регистрируемые пики соответствуют окислению разных металлов, входящих в тест-систему. Введение в тест-систему анализируемых органических веществ приводит к изменению спектра вольтамперограмм. Эти изменения характерны для каждого из органических веществ (или смеси веществ), что позволяет проводить их идентификацию. При электрорастворении металлов с поверхности электрода потенциалы пиков токов растворения являются определяющей характери-

I, A $3.0 \cdot 10^{-4}$ $2.5 \cdot 10^{-4}$ $2.0 \cdot 10^{-4}$ $1.5 \cdot 10^{-4}$ $1.0 \cdot 10^{-4}$ $5.0 \cdot 10^{-5}$ 0.0 $-5.0 \cdot 10^{-5}$ -1.5 -1.0 -0.5 0.0 E, B

Рис. 3. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы при воздействии на нее фентанила в различных концентрациях (%): 1 - 0 (фон), 2 - 10%; 3 - 25%.

стикой растворяющегося металла, а их амплитуда зависит от количества электрорастворенного металла. Состав фоновых электролитов заметно влияет как на величину токов растворения металлов, так и на потенциалы пиков.

Были исследованы токи электрорастворения металлов в следующих фоновых электролитах: 0.5 M KCl, 0.1 M HCl, 0.05 M KCl, 0.1 M K₂SO₄.

Возрастание прочности комплекса, присутствующего в фоне, приводит к увеличению высоты пика тока растворения металла и соответственно к уменьшению его ширины [11]. Ряд по прочности комплексов в растворе совпадает с улучшением формы токов растворения металлов и выглядит следующим образом:

0.5 M KCl > 0.1 M HCl > 0.05 M KCl > 0.1 M K₂SO₄.



Рис. 4. Инверсионные вольтамперограммы, демонстрирующие влияние слезной жидкости на тест-систему: *1* – тест-система, *2* – слезная жидкость через 10 мин. после введения фентанила.

Критерием выбора фонового электролита являлась степень влияния алкалоидов на пики токов растворения металлов электрохимической тест-системы. Влияние фентанила на пики токов растворения цинка, кадмия, свинца и кобальта в перечисленных выше растворах приведено в табл. 1. Из опробованных фоновых растворов наибольшее влияние алкалоидов на пики токов растворения металлов наблюдается в 0.05 М КСІ. Поэтому именно раствор 0.05 М КСІ в дальнейшем использовали в качестве фонового электролита.

При проведении испытаний на планарные электроды наносили 50 мкл тест-системы, содержащей ионы металлов в одинаковых концентрациях ($5 \cdot 10^{-5}$ M), и снимали фоновую инверсионную вольтамперограмму при потенциале катод-

N⁰	Фоновый	Изменение пиков токов растворения металлов ($\Delta I, \%$)				
	электролит	Zn	Cd	Pb	Со	
1	0.1 M K ₂ SO ₄	-1	—7	-9	0	
2	0.5 M KCl	0	0	0	-100	
3	0.05 M KCl	-3	-10	0	-70	
4	0.1 M HCl	0	0	0	0	

Таблица 1. Влияние фентанила на пики токов растворения металлов для разных фоновых электролитов

Примечание. «-» – Уменьшение пиков токов растворения металлов; «0» – пики токов растворения металлов не изменялись.

Анестетик	Концентрация	Пики токов растворения металлов, мкА				
/ meererink	фентанила	Zn	Cd	Pb	Со	
Фон	_	48	84	140	124	
	10%	47	78	134	98	
Фентанил	12%	28	72	122	88	
	25%	29	69	115	86	

Таблица 2. Влияние фентанила на тест-систему

Таблица 3. Влияние на слезную жидкость фентанила после его внутривенного введения

Анестетик	Время отбора пробы	Пики токов растворения металлов, мкА				
		Zn	Cd	Pb	Co	
	48	84	140	124		
	До введения препарата	33	71	71	31	
Фентанил	Через 10 мин после введения	22	50	50	20	
	Через 40 мин после введения	20	21	21	20	

ного осаждения металлов —1.55 В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой потенциала до 0.3 В. Затем на электрод помещали 50 мкл свежего раствора тест-системы и диск из пористого материала (фильтровальной бумаги) с нанесенным на него тем или иным препаратом в различной концентрации и снова снимали инверсионные вольтамперограммы.

Влияние фентанила на тест-систему. На рис. 3 показаны фоновая вольтамперограмма и вольтамперограммы, полученные для фентанила в различных концентрациях *in vitro*.

Можно видеть, что в присутствии фентанила токи ионов металлов, входящих в тест-систему, изменяются в разной степени в зависимости от концентрации фентанила: с ростом концентрации ток иона ртути возрастает, а у остальных металлов — уменьшается.

Влияние фентанила на токи растворения металлов тест-системы можно объяснить двумя причинами. Первая – способность алкалоидов образовывать комплексы с металлами, вторая – адсорбция алкалоидов на электроде. Обе эти причины приводят к затруднению процессов электровосстановления и электроокисления металлов. Комплексы могут оказаться не электроактивны, вследствие чего выделение из них металлов на электроде будет затруднено. В этом случае количество электроосажденных металлов на электроде уменьшается, что вызывает последующее уменьшение токов электрорастворения. На образование комплексов металлов с алкалоидами

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

влияют различные причины: pH раствора, наличие различных анионов, величина концентрации металлов. Те же условия влияют на токи растворения электроосажденных металлов. Важным критерием выбора фонового электролита является степень влияния алкалоидов на пики токов растворения металлов тест-системы.

В исследованном диапазоне концентраций фентанила наиболее заметным было изменение тока ионов кобальта — от 124 до 70 мкА, цинка от 48 до 16 мкА. Несколько меньшим оказалось изменение тока ионов кадмия и свинца. Следовательно, в дальнейшем достаточно ограничиться изучением влияния слезной жидкости пациентов только на эти ионы, а остальные ионы из тест-системы были исключены. Данные по воздействию фентанила на тест-систему приведены в табл. 2.

Анализ слезной жидкости пациентов после внутривенного введения фентанила. Группа пациентов, поступивших на операцию по поводу косоглазия, которым вводили фентанил внутривенно, состояла из семи человек. Был проведен отбор образцов слезной жидкости для исследования, как описано в разделе «Материалы и методы». Рис. 2 демонстрирует влияние слезной жидкости после введения фентанила на тест-систему. Результаты анализа методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии образцов слезной жидкости пациентов этой группы представлены в табл. 3. На основе полученных данных можно сделать заключение, что наиболее значительными оказались изменения токов растворения для ионов кобальта и свинца.

выводы

1. Разработана электрохимическая мультисенсорная тест-система, обеспечивающая проведение экспресс-анализа алкалоидов (на примере фентанила) в формате «Электронный язык» методом инверсионной вольтамперометрии на единичном электроде.

2. Представлен новый подход к анализу алкалоидов, основанный на регистрации и количественном учете влияния комплексообразования органических лигандов на мультисенсорную тест-систему, представляющую собой раствор солей металлов с частично заполненными *d*-орбиталями.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с участием пациентов соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. С учетом возраста пациентов письменное информированное согласие на проведение исследования подписывали их родители, которые получили полную информацию о методах и целях исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Х. З. Брайнина, Е. Я. Нейман и В. В. Слепушкин, Инверсионные электроаналитические методы («Химия», М., 1988).
- 2. В. Н. Андреев, В. М. Ганшин, А. Н. Доронин и др., Патент на изобретение № 2375705 от 22.08.2008.
- Г. К. Будников, В. Н. Майстренко и М. Р Вяселев, Основы современного электрохимического анализа («Мир», М., 2003).
- 4. И. И. Колесниченко, А. Л. Клюев, В. М. Ганшин и др., Физикохимия поверхности и защита материалов **50** (4), 440 (2014).
- 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.
- 6. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко и Е. П. Кантаржи, Клин. геронтология **23** (9–10), 6 (2017).
- 7. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., Биофизика **63** (4), 825 (2018).
- Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., Биофизика 64 (6), 1088 (2019).
- 9. I. I. Kolesnichenko, L. M. Balachova, and E. P. Kantarzhi, Am. J. Anal. Chem. 7 (7), 588 (2016).
- 10. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., Биофизика **65** (6), 1211 (2020).
- 11. Г. Л. Шлефер, Комплексообразование в растворах («Химия», М., 1964).

Development of a Method of Multisensory Stripping Voltammetry for Analysis of Medical Preparations. Determination of Fentanyl in Lacrimal Fluid

I.I. Kolesnichenko, L.M. Balashova**, ***, and L.S. Korobova**, ***

*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 31/4, Moscow, 119071 Russia

**International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, ul. Prechistenka 29/14, Moscow, 119034 Russia

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

For effective dosage of ophthalmic drugs, it is necessary to assess the dynamics of changes in drug concentration in the lacrimal fluid over time. The paper provides information about premedication of surgical patients before ocular surgery with focus on the application of fentanyl, belonging to the class of analgesics. A multisensory stripping voltammetric method was used to determine this drug. The behavior of the drug in the lacrimal fluid of pediatric patients undergoing ophthalmic surgery was studied.

Keywords: multisensory stripping voltammetry, planar electrodes, fentanyl, premedication, ophthalmology

УДК 004.5

ЧАСТОТНАЯ МОДУЛЯЦИЯ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ ПРИ ФОТОСТИМУЛЯЦИИ

© 2021 г. Я.А. Туровский*, **, С.В. Борзунов*, В.Ю. Алексеев*, М.А. Карпова*

*Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1 **Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН, 117997, Профсоюзная ул., 65

> *E-mail: Yaroslav_turovsk@mail.ru* Поступила в редакцию 11.04.2020 г. После доработки 08.02.2021 г. Принята к публикации 24.02.2021 г.

Предложен метод оценки частотной модуляции электроэнцефалограммы на основе Фурье-фильтрации исходного сигнала в узких частотных диапазонах, с последующим расчетом периодов пикпик как для максимумов, так и для минимумов восстановленного сигнала. Полученные последовательности обрабатывались с использованием преобразования Фурье. В качестве объектов исследования были использованы электроэнцефалограммы здоровых добровольцев, полученные в ходе фотостимуляции. В целом диапазон электроэнцефалограмм в 7–9 Гц продемонстрировал для затылочных отведений более выраженный феномен частотной модуляции, в отличие от диапазона 13– 15 Гц. Выявлено практически полное отсутствие различий для относительных к общей мощности спектральных показателей влияний, модулирующих электроэнцефалограмму. Выявлены два типа частотной модуляции электроэнцефалограмм в исследуемых частотных диапазонах – первый не связан с частотами и характеризуется либо высоким, либо низким уровнем воздействия, второй имеет связь характера модуляции с «несущей» частотой сигнала.

Ключевые слова: ЭЭГ, частотная модуляция, вызванные потенциалы. **DOI:** 10.31857/S0006302921030194

Анализ сигналов, порождаемых биологическим системами, с целью последующей расшифровки их работы является одной из ключевых как фундаментальных, так и прикладных задач. Очевидно, что биологические системы представляют собой сложно организованный набор осцилляторов, функционирующих на различной частоте и связанных друг с другом в общем случае нелинейными зависимостями. Одним из примеров сигналов, порождаемых подобными системами, является электроэнцефалограмма (ЭЭГ). Огромный массив методов анализа, разработанных для ее изучения, к настоящему времени можно, с известной долей условности, разделить на две части: методы, анализирующие амплитудно-частотные характеристики сигналов, и методы, анализирующие взаимосвязь сигналов ЭЭГ. В первом случае достаточно распространенным подходом в оценке взаимодействия различных контуров управления и регуляции является анализ амплитуд ритмов ЭЭГ [1, 2] и оценка амплитудной модуляции [3]. Однако можно предполо-

Сокращения: ЭЭГ — электроэнцефалограмма, СПМ — спектральная плотность мощности, ΦC — фотостимуляция.

жить, что наряду с амплитудной модуляцией информацию несет и частотная модуляция ЭЭГ, подходы к анализу которой встречаются существенно реже. Таким образом, актуальным представляется разработка методов оценки частотной модуляции ЭЭГ, обеспечивающих физиологически значимую интерпретацию результатов цифровой обработки сигнала. Одним из таких методов является, например, метод расчета цепочек локальных максимумов квадратов коэффициентов вейвлет-преобразования [4]. Данный подход основан на анализе значимых по амплитуде компонентов ЭЭГ в частотно-временной области. В то же время следует, учитывая непрерывность ЭЭГ-спектра, рассмотреть возможность выделения низкоамплитудных компонентов ЭЭГ и оценку их частотной модуляции.

Целью работы была оценка частотной модуляции ЭЭГ на примере проб с фотостимуляцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 14 добровольцев в возрасте от 19 до 23 лет (10 юношей и 4 девушки). Испытуемые не имели неврологической и психиатрической патологии, не принима-



Рис. 1. (а) — Результаты Фурье-фильтрации ЭЭГ (отведение О1, частота дискретизации 1 кГц) в диапазоне 8–12 Гц при фотостимуляции. Цифрами 1, ..., 4 обозначены интервалы «пик–пик» для локальных максимумов; (б) — вариабельность периодов «пик– пик» для рис. 1а.

ли лекарств, влияющих на координацию движений и скорость принятия решения. Фотостимуляцию (ФС) на частотах 1, 8, 14 Гц осуществляли четырьмя диодами белого цвета, расположенными на расстоянии 1 м от глаз испытуемого. Ее длительность составляла 3 мин, перерыв между сеансами фотостимуляции — не менее 5 мин. Данные фиксировали электроэнцефалографом «Нейрон-Спектр 4 ВП» (ООО «Нейрософт», Россия) в отведениях О1, О2, Оz, Р3, Р4, Рz с частотой дискретизации 1 кГц, включенным режекторным фильтром и отключенным фильтром высоких частот.

Для оценки частотной модуляции использовали анализ кривой «пик—пик» для отфильтрованной ЭЭГ. Фильтрацию с помощью прямого и обратного преобразования Фурье [5] проводили в частотных диапазонах 7—9, 9—11 и 13—15 Гц. Основой предложенного подхода является известная из методологии анализа вариабельности сердечного ритма методика расчета во временном пространстве отрезков «пик—пик» для отфильтрованного в заданном частотном диапазоне сигнала (рис. 1).

Методологически данный подход похож на ранние попытки анализа ЭЭГ: велся подсчет частотных пиков на единицу времени записи. Однако в этом случае учитываются все частоты ЭЭГ, что, очевидно, существенно искажает картину, поскольку пики, соответствующие высокочастотным колебаниям, будут превалировать по встречаемости над пиками низкочастотных колебаний. Для избежания этой ситуации необходимо фильтровать сигналы в достаточно узких частотных диапазонах и соответственно учитывать эту особенность при содержательной интерпретации.

Очевидно, что параметры фильтра могут оказать влияние на характер локальных экстремумов (рис. 2 и 3). Так, например, из рис. 2 следует, что только на относительно небольших отрезках времени в исследуемом частотном диапазоне (ограничен параллельными линиями от масштаба вейвлет-преобразования 91 до масштаба 111) присутствуют выраженные частотные компоненты сигнала — цепочки локальных максимумов локальных спектров. В остальных максимумов локальных спектров. В остальных случаях полученный в этом частотном диапазоне сигнал представляет собой выделенный в отдельной частотно-временной области фрагмент исследуемого сигнала. Отметим, что в общем случае последова-



Рис. 2. Цепочки локальных максимумов и выделенный частотный диапазон для обратного преобразования Фурье. Частота фотостимуляции 14 Гц, отведение O1.



Рис. 3. Оценка последовательности «пик–пик» (максимумы) для сигнала ЭЭГ (отведение O1, частота фотостимуляции 14 Гц), отфильтрованного с использованием преобразования Фурье в частотном диапазоне 10–11 Гц.

тельности «пик—пик» для локальных максимумов и локальных минимумов не являются тождественными.

На рис. 3, представляющем собой результат оценки последовательности «пик–пик» для результата Фурье-фильтрации в диапазоне 9–11 Гц, обращает на себя внимание наличие «выбросов», отражающих как увеличение периода «пик–пик», так и его уменьшение. Для понимания механизма образования данных феноменов достаточно взглянуть на рис. 1. Из него следует, что второй период «пик–пик» оказался существенно длиннее предыдущего и последующего, что вызвано сдвигом фазы исследуемого сигнала. Таким образом, выявленные пики можно рассматривать как изменение фазы модуляции ЭЭГ в заданном частотном диапазоне.

Следует отметить, что изложенный подход является дополнением подхода, основанного на анализе «цепочек локальных максимумов». Последний основан на выделении наиболее выраженных частотных компонент сигнала, в то время как расчет периодов сигнала в узких частотных диапазонах позволяет, с учетом необходимой фильтрации, анализировать относительно незначительные по амплитуде колебания, качественное обнаружение которых на фоне высокоамплитудных компонентов не всегда возможно.

Получив искомые последовательности, можно, очевидно, использовать парадигмы анализа вариабельности сердечного ритма. Иными словами, в данном случае можно использовать как статистические подходы, так и спектральные, основанные на преобразовании Фурье [6] или вейвлет-преобразовании [7]. В исследовании анализировали два частотных диапазона модуляции – 1-3 Гц и 3-5 Гц, которые в дальнейшем будем обозначать как СПМ1 и СПМ2. При этом оценивали как абсолютные значения спектральной плотности мощности (СПМ), так и их значения (в процентах) по отношению к СПМ всего спектра. В статистическом анализе использовали методы дескриптивной статистики, критерии Крускала–Уоллеса, Манна–Уитни, Фридмана для парных случаев [8, 9], при этом параметр α принимался равным 5%. Для анализа категориальных переменных использовали точный критерий Фишера. Для статистического изучения связи между явлениями использовали непараметрический метод – коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Учитывался эффект множественных сравнений. Для кластерного анализа использовали метод *К*-средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным результатам, различия в зависимости от частот фотостимуляции по-разному связаны с последовательностями для локальных максимумов и для последовательности локальных минимумов, что подтверждает подход об информационной ценности каждой из этих временных серий частотной модуляции. Ожидаемо, что в затылочных отведениях выявлены различные изменения модулирующих воздействий в зависимости от частоты фотостимуляции (табл. 1). Наименьшие значения в обоих исследуемых диапазонах СПМ были получены для фотостимуляции 8 Гц при сравнении абсолютных значений, а максимальные соответствовали 1 Гц. В то же время в процентных величинах от общей мощности спектра различий выявлено не было, что свидетельствует об общем снижении модулирующих влияний в данном исследуемом частотном диапазоне. Теменные отведения продемонстрировали наибольшие относительные значения в диапазоне модуляции от 3 до 5 Гц для частоты стимуляции 14 Гц. Очевидно, что сам факт ФС обеспечивает известный эффект навязывания ритма, что, очевидно, и приводит к подавлению эндогенных модулирующих воздействий. При этом относительно низкая частота ФС в 1 Гц обеспечивает возможность восстановления этих влияний в межстимульный интервал. Действительно, согласно работе [10] длительность зри-

ТУРОВСКИЙ и др.

	Частоты ФС	Отведе- ния	СПМ1, мс ² ***	СПМ2, мс ² **	Доля СПМ1, %	Доля СПМ2, % #
Максимумы	1 Гц	3	15174628 ± 1054802	6952903 ± 627845	30.8 ± 0.3	13.8 ± 0.4
		Т	13307450 ± 302978	5622702 ± 256878	30.3 ± 0.2	12.6 ± 0.4
	14 Гц	3	14531435 ± 564121	6807009 ± 348066	31.0 ± 0.3	14.4 ± 0.4
		Т	14317992 ± 554601	6408949 ± 332299	30.6 ± 0.2	13.5 ± 0.4
	8 Гц	3	13662689 ± 736953	5895261 ± 453282	30.6 ± 0.3	12.9 ± 0.4
		Т	13999356 ± 740497	6174009 ± 441059	30.7 ± 0.3	13.3 ± 0.4
Минимумы	1 Гц	3	15073799 ± 1010941	6728760 ± 533460	30.9 ± 0.3	13.6 ± 0.3
		Т	13426671 ± 317632	5855746 ± 264322	30.2 ± 0.2	13.0 ± 0.3
	14 Гц	3	14503626 ± 566858	6824103 ± 352276	30.9 ± 0.3	14.4 ± 0.4
		Т	14325370 ± 544686	6388815 ± 343779	30.6 ± 0.2	13.4 ± 0.4
	8 Гц	3	13650197 ± 718358	6000650 ± 409554	30.5 ± 0.3	13.2 ± 0.3
		Т	14079751 ± 754800	6259775 ± 427153	30.8 ± 0.3	13.5 ± 0.4

Таблица 1. Значения СПМ и доля СПМ от общей мощности спектра

Примечание. Фильтрация в диапазоне 10–11 Гц. Различия: ** – для затылочных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов, p < 0.01, *** – p < 0.001; # – для теменных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов, p < 0.01; 3 – затылочные отведения, T – теменные.

тельного вызванного потенциала составляет 150— 300 мс. Следовательно, остальные 700 мс межстимульного интервала могут обеспечивать восстановление эндогенной модуляции. Можно предположить, что при более частой ФС межстимульный период для такого восстановления будет недостаточен.

Рассмотрим результаты фильтрации сигналов в диапазонах, совпадающих с частотами фотостимуляции, находящимися в частотной области α-ритма или близкой к нему. Для диапазона 13-15 Гц различия для разных режимов фотостимуляции и для затылочных и для теменных отведений характеризовались наиболее выраженными модуляционными воздействиями в частотном диапазоне 1-3 Гц (табл. 2). Это подтверждает изложенную выше гипотезу о быстром восстановлении эндогенной частотной модуляции ЭЭГ. Следует отметить, что, в отличие от фильтрации ЭЭГ в диапазоне, отличном от частот ΦC , картина была иной: с одной стороны, наиболее выраженные частотно-модуляционные воздействия наблюдались для частоты ФС в 8 Гц, с другой – более высокочастотный диапазон модуляции не продемонстрировал значимых различий ни для одной из исследуемых частот.

При оценке вариабельности периодов «пикпик» для сигнала, отфильтрованного в диапазоне 7–9 Гц, были получены достоверные различия для обоих исследуемых частотных диапазонов модуляции. В этом случае наиболее выраженные модуляционный воздействия наблюдали для частоты ΦC в 14 Гц. В целом диапазон ЭЭГ в 7–9 Гц продемонстрировал для затылочных отведений более выраженный феномен частотной модуляции, в отличие от диапазона 13–15 Гц, что, вероятно, связано с его нахождением в районе верхней границы α -ритма. Другое объяснение данного наблюдения также связано со временем, необходимым для восстановления эндогенной частотной модуляции после фотостимуляции. В этом случае более высокочастотные ΦC дают меньшее время для этого восстановления.

Поскольку в общем случае частотная модуляция в виде последовательностей периода «пикпик» различается при анализе максимумов и минимумов отфильтрованного сигнала, в табл. 3 представлены результаты анализа последовательностей, построенных на основе оценки периода минимумов. Обращает на себя внимание тот факт, что, в отличие от вариабельности периодов максимумов мгновенных амплитуд, в случае минимумов различия отсутствуют для теменных электродов, вне зависимости от того, в каком частотном диапазоне осуществлялась фильтрация. Также не выявлены статистически значимые различия в эффектах модуляции для сигнала, отфильтрованного в диапазоне 7-9 Гц. Для сигнала, отфильтрованного в диапазоне 13–15 Гц, картина в целом повторяла полученную для последовательности максимумов мгновенных амплитуд. Наиболее значимая частотная модуляция была выявлена для фотостимуляции в 8 Гц для последовательностей, построенных на макси-

ЧАСТОТНАЯ МОДУЛЯЦИЯ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ

Фильтрация в диапазоне 13–15 Гц								
Отведения	Частоты ФС	СПМ1, мс ² ** #	СПМ2, мс ²	Доля СПМ1, %	Доля СПМ2, %			
3	1 Гц	28873401 ± 925346	13023808 ± 644770.3	34.0 ± 0.7	15.0 ± 0.3			
	14 Гц	25321517 ± 1199166	11656437 ± 645991.6	33.4 ± 0.3	15.2 ± 0.3			
	8 Гц	31406175м1383432	14200736 ± 776664.3	33.7 ± 0.2	15.1 ± 0.3			
Т	1 Гц	29519212 ± 580094	13354085 ± 376103.3	33.8 ± 0.2	15.2 ± 0.2			
	14 Гц	28641901 ± 1280082	13464547 ± 719586.1	33.7 ± 0.2	15.7 ± 0.3			
	8 Гц	32352703 ± 1459955	15178001 ± 834247.1	33.9 ± 0.3	15.8 ± 0.4			
Фильтрация в диапазоне 7–9 Гц								
		Фильтрация	н в диапазоне 7—9 I ц					
Отведения	Частоты ФС	Фильтрация СПМ1, мс ² **	н в диапазоне 7—91 ц СПМ2, мс ² **	Доля СПМ1, %	Доля СПМ2, % *			
Отведения 3	Частоты ФС 1 Гц	Фильтрация СПМ1, мс ² ** 79172037 ± 3198985	а в диапазоне 7–91ц СПМ2, мс ² ** 38244204 ± 2062255	Доля СПМ1, % 38.8 ± 0.4	Доля СПМ2, % * 18.4 ± 0.3			
Отведения 3	Частоты ФС 1 Гц 14 Гц	Фильтрация СПМ1, мс ² ** 79172037 ± 3198985 79438523 ± 2492632	а в диапазоне 7–91 ц СПМ2, мс ² ** 38244204 ± 2062255 39036726 ± 1609176	Доля СПМ1, % 38.8 ± 0.4 37.7 ± 0.4	Доля СПМ2, % * 18.4 ± 0.3 18.4 ± 0.3			
Отведения 3	Частоты ФС 1 Гц 14 Гц 8 Гц	Фильтрация СПМ1, мс ² ** 79172037 ± 3198985 79438523 ± 2492632 73423324 ± 3212182	а в диапазоне 7–91 ц СПМ2, мс ² ** 38244204 ± 2062255 39036726 ± 1609176 33544958 ± 1883178	Доля СПМ1, % 38.8 ± 0.4 37.7 ± 0.4 38.5 ± 0.3	Доля СПМ2, % * 18.4 ± 0.3 18.4 ± 0.3 17.3 ± 0.2			
Отведения 3 Т	Частоты ФС 1 Гц 14 Гц 8 Гц 1 Гц	Фильтрация СПМ1, мс ² ** 79172037 ± 3198985 79438523 ± 2492632 73423324 ± 3212182 77821508 ± 1792666	СПМ2, мс ² ** 38244204 ± 2062255 39036726 ± 1609176 33544958 ± 1883178 37107762 ± 1287237	Доля СПМ1, % 38.8 ± 0.4 37.7 ± 0.4 38.5 ± 0.3 38.1 ± 0.3	Доля СПМ2, % * 18.4 ± 0.3 18.4 ± 0.3 17.3 ± 0.2 18.0 ± 0.3			
Отведения 3 Т	Частоты ФС 1 Гц 14 Гц 8 Гц 1 Гц 14 Гц	Фильтрация СПМ1, мс ² ** 79172037 ± 3198985 79438523 ± 2492632 73423324 ± 3212182 77821508 ± 1792666 80230827 ± 2513995	а в диапазоне 7–91 ц СПМ2, мс ² ** 38244204 ± 2062255 39036726 ± 1609176 33544958 ± 1883178 37107762 ± 1287237 39475647 ± 1607629	Доля СПМ1, % 38.8 ± 0.4 37.7 ± 0.4 38.5 ± 0.3 38.1 ± 0.3 37.8 ± 0.3	Доля СПМ2, % * 18.4 ± 0.3 18.4 ± 0.3 17.3 ± 0.2 18.0 ± 0.3 18.5 ± 0.3			

Таблица 2. Расчет модуляции по максимумам отфильтрованных сигналов ЭЭГ

Примечание. Различия: * – p < 0.05 для затылочных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов,** – p < 0.01 для затылочных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов,; # – p < 0.01 для теменных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов,; # – p < 0.01 для теменных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов, Т – теменные.

мумах отфильтрованных сигналов. При этом данная зависимость наблюдалась в обоих исследованных частотных диапазонах модуляции.

Обращает на себя внимание практически полное отсутствие различий при сравнении не абсолютных, а относительных (по сравнению с общей мощностью спектра) показателей. Это может служить маркером того, что изменения в спектральных характеристиках частотной модуляции ЭЭГсигнала не локализованы в каком-то узком диапазоне, а охватывают значительные диапазоны

Фильтрация в диапазоне 13–15 Гц								
Отведения	Частоты ФС	СПМ1, мс ² **	СПМ2, мс ² *	Доля СПМ1, %	Доля СПМ2, %			
3	1 Гц	28985860 ± 908163	13242805 ± 639664.0	34.0 ± 0.7	15.2 ± 0.4			
	14 Гц	25331539 ± 1167444	11475922 ± 548032.0	33.5 ± 0.3	15.1 ± 0.3			
	8 Гц	31450558 ± 1411787	14162871 ± 794502.7	33.8 ± 0.3	15.1 ± 0.3			
Т	1 Гц	29633339 ± 595901	13743830 ± 433834.1	33.8 ± 0.2	15.6 ± 0.3			
	14 Гц	28576864 ± 1272135	13315756 ± 717138.0	33.7 ± 0.2	15.6 ± 0.3			
	8 Гц	32245880 ± 1462047	15060723 ± 790362.9	33.9 ± 0.3	15.7 ± 0.3			
		Фильтрация	я в диапазоне 7–9 Гц					
Отведения	Частоты ФС	СПМ1, мс ²	СПМ2, мс ²	Доля СПМ1, %	Доля СПМ2, %			
3	1 Гц	79754278 ± 3195667	39502493 ± 1967363	38.7 ± 0.4	19.6 ± 0.8			
	14 Гц	79081770 ± 2524279	37698557 ± 1575707	37.8 ± 0.4	17.9 ± 0.3			
	8 Гц	73853033 ± 3149986	34196724 ± 1761056	38.4 ± 0.4	17.6 ± 0.3			
Т	1 Гц	77916559 ± 1736560	37591372 ± 1221652	38.1 ± 0.2	$18. \pm 0.3$			
	14 Гц	80385029 ± 2586603	39080684 ± 1692198	37.9 ± 0.3	18.3 ± 0.3			
	8 Гц	79271414 ± 2818233	37419431 ± 1802944	38.3 ± 0.4	17.8 ± 0.2			

Таблица 3. Расчет модуляции по минимумам отфильтрованных сигналов ЭЭГ

Примечание. Различия: * – p < 0.05 для затылочных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов, ** – p < 0.01 для затылочных отведений при сравнении по разным частотам для максимумов; 3 – затылочные отведения, T – теменные.



Рис. 4. Результаты кластерного анализа относительных значений СПМ в диапазоне 1–3 Гц.

частот, выходя за пределы выбранных в исследовании диапазонов.

Рассмотрим возможные групповые особенности выявленных изменений (рис. 4). В качестве объекта кластеризации были выбраны относительные показатели СПМ как для затылочных, так и для теменных отведений, построенных основе результатов Фурье-фильтрации в диапазонах 7-9 Гц и 13-15 Гц. Использовали все варианты фотостимуляции (таким образом, для каждого испытуемого могло быть получено 18 наблюдений). Были исключены наблюдения, характеризующиеся так называемыми «выбросами» - высокоамплитудными отклонениями от распределения выборки. Кластеры № 1 (103 наблюдения) и № 2 (31 наблюдение) демонстрируют схожую динамику, различаясь только процентной долей значений СПМ от общей мощности спектра. Наиболее интересную картину частотной модуляции демонстрирует кластер № 3 (78 наблюдений). Для него характерны наиболее выраженные модуляционные воздействия для частот в диапазоне 7-9 Гц, но при этом минимальные для частот, отфильтрованных в диапазоне 13-15 Гц. Для значений СПМ, рассчитанной на основе последовательности минимумов и максимумов для диапазона 7–9 Гц, средние значения кластера № 1 отличались от таковых для кластеров № 2 и № 3 (*p* << 0.001). Для частот 13–15 Гц, наоборот, значения кластера № 2 отличались от значений кластеров № 1 и № 3. Таким образом, можно говорить о выявлении двух типов частотной модуляции ЭЭГ в исследуемых частотных диапазонах - первый не связан с частотами и характеризуется либо высоким, либо низким уровнем воздействия, второй имеет связь характера модуляции с «несущей» частотой сигнала. Можно предположить, что данная связь является следствием индивидуально-типологических различий, связанных с восстановлением эндогенной частотной модуляции, нарушенной после каждой вспышки света, соответствующей периодической фотостимуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен метод оценки частотной модуляции ЭЭГ на основе Фурье-фильтрации исходного сигнала в узких частотных диапазонах, с последующим расчетом периодов «пик-пик» как для максимумов, так и для минимумов восстановленного сигнала. Полученные последовательности обрабатывались с использованием преобразования Фурье. В качестве объектов исследования были использованы ЭЭГ здоровых добровольцев, полученные в ходе фотостимуляции. В целом диапазон ЭЭГ в 7–9 Гц продемонстрировал для затылочных отведений более выраженный феномен частотной модуляции, в отличие от диапазона 13-15 Гц, что, вероятно, связано с его нахождением в районе верхней границы α-ритма. Возможное альтернативное объяснение – больший период времени между вспышками света для низкочастотной ФС в большей степени способствует восстановлению эндогенных модулирующих воздействий. Выявлено практически полное отсутствие различий при сравнении не абсолютных, а относительных по сравнению с общей мощностью спектра показателей. Это может служить маркером того, что изменения в спектральных характеристиках частотной модуляции ЭЭГ сигнала не локализованы в каком-то узком диапазоне, а охватывают значительные диапазоны частот, выходя за пределы выбранных в исследовании диапазонов. Выявлены два типа частотной модуляции ЭЭГ в исследуемых частотных диапазонах. Первый не связан с частотами и характеризуется либо высоким, либо низким уровнем воздействия, второй имеет связь характера модуляции с «несущей» частотой сигнала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-29-01156мк).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От всех участников предварительно было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- В. Н. Думенко, М. К. Козлов и Е. А. Черемушкин, Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова 64 (4), 401 (2014).
- 2. С. И. Новикова, Е. В. Малаховская, Н. П. Пушина и др., Физиология человека **35** (4), 20 (2009).
- А. Б. Трембач, С. Р. Гутман, А. Л. Корепанов и О. В. Пирожков, Биофизика 35 (5), 850 (1990).

- 4. Я. А. Туровский, С. Д. Кургалин и А. Г. Семенов, Биофизика **59** (1), 185 (2014).
- 5. К. В. Титов, Инж. вестн., № 6, 32 (2017).
- 6. И. В. Таротин и Г. А. Иваницкий, Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **64** (6), 615 (2014).
- 7. Я. А. Туровский, С. Д. Кургалин и А. Г. Семёнов, Цифровая обработка сигналов, № 2, 20 (2013).
- 8. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика* (Практика, М., 1998).
- Р. Рунион, Справочник по непараметрической статистике. Современный подход (Финансы и статистика, М., 1982).
- В. В. Гнездицкий, Вызванные потенциалы мозга в клинической практике (МЕДпресс информ., М., 2003).

Frequency Modulation of Electroencephalogram under Photostimulation

Ya.A. Turovsky*, **, S.V. Borzunov*, V.Yu. Alekseev*, and M.A. Karpova*

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**V.A. Trapeznikov Institute of Control Sciences, Russian Academy of Sciences, Profsoyuznaya ul. 65, Moscow, 117997 Russia

In this paper, we propose a method for estimating the frequency modulation of EEG based on Fourier filtering of the initial signal on a narrow frequency band, followed by calculation of the time taken to reach both maximum and minimum peak values of the reconstructed signal (peak-to-peak periods). The resulting sequences were processed using the Fourier transform. EEGs recorded from healthy volunteers during photostimulation were used as objects of study. Overall, EEG responses with a frequency range of 7 to 9 Hz demonstrated more pronounced phenomenon of frequency modulation for occipital leads than those with the frequency range of 13 to 15 Hz. There were almost no differences in power spectral indices that modulate EEG. Two types of EEG frequency modulation were revealed in the studied frequency ranges – the first is not related to frequencies and is characterized by either a high or low level of exposure, the second has a connection between the nature of the modulation and the "carrier" frequency of the signal.

Keywords: EEG, frequency modulation, evoked potentials

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ=

УДК 612.014.464, 577.23, 577.346, 576.32/36, 577.175.5, 577.152.198

АНАЛИЗ РОЛИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АЛЬФА1-АДРЕНЕНЕРГИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ИХ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ СВОЙСТВ

© 2021 г. М.В. Васин*, И.Б. Ушаков**

*Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

**Государственный научный центр — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182, Москва, Живописная ул., 46

E-mail: mikhail-v-vasin@yandex.ru Поступила в редакцию 13.07.2020 г. После доработки 13.07.2020 г. Принята к публикации 12.08.2020 г.

Проведен анализ современных представлений о механизме противолучевого действия альфа1-адренергических агонистов, представляющих большой интерес в клинической практике радиохимиотерапии онкологических больных. Первое объяснение механизма их действия основано на роли циркуляторной гипоксии в радиочувствительных тканях за счет вазоконстрикторного эффекта альфаадреноагонистов. При дальнейшем изучении реального снижения напряжения кислорода в ткани при циркуляторной гипоксии было установлено, что его недостаточно для полного обеспечения отмечаемого роста радиорезистентности организма под их воздействием. Вторым важным фактом является то, что в ходе снижения базового потребления кислорода на единицу массы тела при переходе от мелких до крупных животных противолучевой эффект циркуляторной и гипоксической гипоксии снижается из-за больших адаптивных возможностей в поддержке кислородного гомеостаза клетки в этих условиях. Данное положение имеет прямое отношение к человеку. Для объяснения высокой противолучевой защиты на крупных животных под действием альфа1-адреноагонистов предложена гипотеза о развитии острой тканевой гипоксии за счет интенсификации потребления кислорода при стимуляции альфа1-адренорецепторов. Третье положение – альфа1-адреноагонисты могут стабилизировать митохондриальный гомеостаз при воздействии радиации, тем самым, снижая вероятность радиационного апоптоза клеток и сохранения оптимального функционирования ткани. Все три отмеченных компонента механизма противолучевого эффекта альфа1-адреноагонистов могут взаимодействовать между собой, позволяя достигнуть высоких результатов защиты. Роль каждого компонента может меняться и доминировать при каждом конкретном сценарии их практического применения.

Ключевые слова: циркуляторная и тканевая гипоксия, потребление кислорода, альфа 1-адренорецепторы, альфа 1-адренергические агонисты, индралин, фенилэфрин. **DOI:** 10.31857/S0006302921030200

Впервые противолучевые свойства адреналина были обнаружены в начале 50-х гг. прошлого века [1, 2], практически одновременно с открытием первого радиопротектора цистамина [3]. Радио-

защитный эффект норадреналина и дофамина

был подтвержден позже [4, 5]. Выявленные противолучевые свойства катехоламинов были крайне ограничены, прежде всего, как выяснилось позже, из-за весьма кратковременного из действия [6, 7]. Повышенное внимание к адреномиметикам появилось значительно позже, когда были обнаружены высокоэффективные их аналоги (метоксамин, фенилэфрин, нафазолин, индралин) [8–16]. Большое значение имеет факт высокой противолучевой эффективности альфа1-агониста индралина на крупных животных (собаки, обезьяны) [15, 17–21]. Установлены выраженные противолучевые свойства индралина на кроветворной системе, кишечнике, коже, семенниках

Сокращения: PPAR – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (peroxisome proliferator-activated receptors), AMPK – 5'-AMΦ-активируемая протеинкиназа (AMP activated protein kinase), PGC-1α – рецептор пероксисом, активируемый пролифератором гаммакоактиватор 1-альфа (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha), PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphoinositide 3-kinases), NAMPT – никотинамидфосфорибозилтрансфераза (nicotinamide phosphoribosyltransferase).

и слюнных железах [15, 22-28] и фенилэфрина на кроветворной системе, коже и слюнных железах [9, 29–31]. Защитные свойства индралина подтверждены на шести видах животных (мыши, крысы, хомячки, кролики, собаки и обезьяны) [15, 21]. Проводимые в настоящее время клинические испытания альфа1-агонистов при радиотерапии онкологических больных свидетельствуют о достаточно выраженных их противолучевых свойствах с фактором уменьшения дозы (отношение $\mathcal{I}\mathcal{I}_{50}$ подопытной группы к $\mathcal{I}\mathcal{I}_{50}$ контрольной группы), по нашим подсчетам превышающим 1.4 [32, 33]. Лекарственный препарат Б-190 (индралин) является средством медицинской защиты для персонала атомной энергетики [15], по своей эффективности у человека близкой по фактору уменьшения дозы к 1.5 [34]. Адренергические альфа1-агонисты являются перспективными высокоэффективными радиопротекторами, механизм действия которых еще недостаточно изучен и заслуживает тщательного углубленного анализа.

РОЛЬ ЦИРКУЛЯТОРНОЙ ГИПОКСИИ В МЕХАНИЗМЕ ПРОТИВОЛУЧЕВОГО ДЕЙСТВИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ

Изменение радиорезистентности животных и человека тесно связано с модуляциями в реализации окислительного стресса при поглощении энергии ионизирующего излучения. Практически значимое повышение устойчивости организма к поражающему действию радиации имеет место при применении радиопротекторов, частично нейтрализующих «кислородный эффект» как важнейший радиобиологический феномен. Противолучевые свойства радиопротекторов, прежде всего, обусловлены развитием в радиочувствительных тканях острой гипоксии вследствие нарушения в них кровоснабжения и клеточного дыхания как итога их фармакологического действия. Резкое снижение напряжения кислорода в клетке в условиях острой гипоксии снижает интенсивность продукции активных форм кислорода – индукторов перекисных процессов в органических веществах. Наиболее интенсивно они происходят в виде цепных перекисных реакций в ненасыщенных жирных кислотах, составляющих основу клеточных мембран. При смертельных дозах радиации наиболее значимы повреждения ДНК в процессе ее радиолиза. Токсическое действие ионизирующего излучения завершается исчезновением в клетках АТФ и гибелью клеток вследствие индукции процессов апоптоза, некроза, пироптоза и аутофагии. Для кроветворных клеток доминирующее место занимают процессы апоптоза. Радиационный стресс и сопряженные с ним воспалительные реакции являются одновременно индукторами антивоспалительных и антиапоптических адаптивных процессов, лимитирующих по механизму обратной связи чрезмерную их активность [35].

591

Механизм противолучевого действия биогенных аминов (серотонин, гистамин, катехоламины), выявленного в ранних работах на мелких лабораторных животных, связывали с циркуляторной гипоксией под действием вызываемой ими вазоконстрикции или вазодилятации [7, 36–39]. При облучении животных в условиях гипероксии противолучевой эффект серотонина и альфа1-адреномиметика индралина снижается [22, 34, 40, 41].

Позже было выявлено, что циркуляторная и гипоксическая гипоксия при переходе от мелких грызунов к более крупным животным теряет свои потенциальные противолучевые свойства [17, 18, 42]. Это связано с тем, что базисный исходный уровень потребления кислорода при переходе к более крупным животным и, тем более, к человеку уменьшается, по крайней мере, из-за снижения отношения поверхности тела к его массе, и что предопределяет большие возможности по времени для мобилизации адаптивных возможностей организма в условиях острой гипоксии.

БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОЛУЧЕВОГО ДЕЙСТВИЯ АЛЬФА1-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ

Впервые высокоаффинные альфа1-адренорецепторы на лимфоидных клетках костного мозга обнаружил Дж. Маестрони [43, 44]. Альфа1-адренорецепторы есть также на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и фибробластах кожи, при стимуляции которых происходит активация синтеза ДНК [45, 46]. Реализация противолучевого эффекта альфа1-адреноагонистов может осуществляться in vitro при непосредственном воздействии на клетку через альфа1-адренорецепторы клетки [47, 48]. При физиологических концентрациях норадреналина этот процесс завершается ускорением дифференцировки гемопоэтических полипотентных предшественников костного мозга и их миграции в новые ниши организма [49-53].

Альфа1-адренорецепторы представляют собой $G_q/11$ рецепторы из семейства G-протеин-связанных рецепторов, при стимуляции которых активизируется фосфолипаза Cbeta₁ на плазматической мембране, которая расщепляет фосфатидилинозитол на инозитолтрифосфат и диацилглицерол. Инозитолтрифосфат воздействует на инозитолтрифосфат - рецепторы эндоплазматического ретикулума и тем самым высвобождает внутриклеточный кальций из депо. При участии свободного кальция через вовлечение PPAR-AMPK-PGC-1 α -пути (PPAR – рецепторы, акти-

вируемые пероксисомными пролифераторами (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), АМРК – 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа (AMP Activated Protein Kinase), PGC-1 α – рецептор пероксисом, активируемый пролифератором гамма-коактиватор 1-альфа (Peroxisome proliferator-activated receptor – Gamma Coactivator 1-alpha)) и экспрессию глюкозного транспортера типа 4 альфа1-адреноагонисты усиливают окислительное фосфорилирование и синтез АТФ, которые сопровождаются повышенным потреблением кислорода в клетке [54]. Одновременно с циркуляторной гипоксией альфа1-адреноагонисты продолжают поддерживать функцию клетки и ее метаболический гомеостаз. При большой функциональной нагрузке это может привести к острому снижению напряжения кислорода в клетке с развитием в целом острой тканевой гипоксии. В больших дозах альфа1-адреноагонисты воздействуют также и на бета-адренорецепторы, при блокаде которых противолучевой эффект альфа-агонистов возрастает, что свидетельствует о антагонистических взаимодействиях между ними в реализации, в том числе, радиозащитного действия [55, 56].

Начиная с ранних работ, ставилась под сомнение роль циркуляторной гипоксии как фактора, определяющего противолучевой эффект альфа1адреноагонистов [57, 58]. Данный факт был подтвержден в исследованиях на крупных животных. При одинаковом практически двукратном снижении кровотока в костном мозге за счет вазоконстрикторного действия индралина или производного серотонина мексамина индралин защищал 100% собак при абсолютно смертельной дозе облучения, мексамин в тех же условиях был неэффективен [17]. Действительно, при снижении поступления в организм кислорода в два раза при дыхании газовой гипоксической смесью с 10%-м содержанием кислорода радиорезистентность крупных животных (собак) существенно не меняется [17]. Об отсутствии определяющей роли циркуляторной гипоксии в механизме противолучевого действия альфа1-адреноагонистов также свидетельствуют данные о том, что вазодилятатор монооксид азота, снижающий вазоконстрикторный эффект индралина, не оказывал существенного влияния в тех же дозах на его радиозащитный эффект [59]. Важно отметить, что есть различия при реализации вазоконстрикторного эффекта между норадреналином и серотонином. Норадреналин при этом повышает потребление кислорода, а серотонин его снижает [60].

Предложена рабочая гипотеза о том, что усиление тканевого дыхания под действием симпатомиметиков может индуцировать острую тканевую гипоксию [17, 57, 61]. Возможно ли вследствие усиления тканевого дыхания проявление острой тканевой гипоксии, приводящей к росту

радиорезистентности организма? Действительно, в опытах на мышах при разобщении окислительного фосфорилирования с помощью динитрофенола имеет место рост потребления кислорода и развитие острой тканевой гипоксии, вызывающей 100% радиозащитный эффект [62, 63]. Адреномиметики не вызывают разобщение окислительного фосфорилирования [64], но, тем не менее, трофическая функция катехоламинов по Л.А. Орбели [65] проявляется в том, что при истощении функциональных возможностей ткани симпатическая нервная система способна поддерживать эту функцию при сохранении интенсивности потребления кислорода в клетке в условиях гипоксии. Катехоламины осуществляют противолучевое действие через альфа1-адренорецепторы путем усиления тканевого дыхания при стимуляции окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ [54, 60, 64, 66-68]. Что касается альфа1-адреноагониста индралина [16], то в опытах in vitro на клетках костного мозга мышей он повышал потребление кислорода клетками в полтора раза в случае снижения напряжения кислорода в среде ниже 10 мкМ, т.е. в условиях гипоксии, не влияя на скорость метаболизма при нормоксии [69]. Необходимо отметить, что при отсутствии стимуляции со стороны норадреналина при снижении напряжения кислорода в ткани в условиях гипоксии интенсивность тканевого дыхания снижается за счет адаптивной реакции со стороны митохондриального монооксида азота, подавляющего активность цитохром с-оксидазы, последней стадии синтеза АТФ [70].

РОЛЬ АНТИАПОПТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА АЛЬФА1-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ СВОЙСТВ

Сведения о противолучевом эффекте адреномиметиков в опытах *in vitro* невозможно объяснить развитием острой тканевой гипоксии при обычном содержании кислорода в окружающей среде. Возможной причиной данного факта может быть выраженные антиоксидантные свойства катехоламинов, превышающие активность аскорбиновой кислоты и способствующие тем самым проявлению противолучевых свойств в этих условиях. Что касается их синтетического производного альфа1-адреноагониста фенилэфрина, то он как антиоксидант мало активен [71], но тем не менее проявляет противолучевые свойства при прямом взаимодействии с альфа1-адренорецепторами в опытах *in vitro* [48].

Известно, что фенилэфрин снижает ишемическое реперфузионное повреждение миокарда путем снижения нагрузки кальцием митохондрий и подавления пути апоптоза «цитохром *c*/каспаза 9», которое устраняется блокадой фосфатидилинози-

тол-3-киназ (PI3K — phosphoinositide 3-kinases) [72]. Бета-адреноагонисты усиливают тканевое дыхание, но не обладают антиапоптическим действием [73–74]. Стимуляция альфа1-адренорецепторов играет важную адаптивную роль в поддержке митохондриального гомеостаза и сохранении функциональной активности клетки.

При радиационном поражении слюнных желез в клинически значимых дозах имеет место разрушение структуры мембран митохондрий, снижение их мембранного потенциала и запуск процессов апоптоза. На фоне данных процессов экспрессия сиртуина 1, никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT – nicotinamide phosphoribosyltransferase) и PGC-1 α , а также уровни НАД и АТФ снижались. Противолучевой эффект фенилфрина на слюнных железах связан со снижением радиационного поражения митохондрий [75]. Фенилэфрин был способен снизить выраженность структурных лучевых поражений митохондрий и стимулировать функцию клеток в условиях ее ослабления под действием радиации. Он устранял отрицательное действие радиации на экспрессию NAMPT и при этом увеличивал ее активность в два раза [76]. NAMPT катализирует конденсацию никотинамида с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом с образованием никотинамидмононуклеотида, первой ступени синтеза НАД+, ключевого субстрата цикла Кребса. NAMPT является лимитирующим фактором синтеза НАД и функционировання НАД-зависимых ферментов [77]. К ним относятся НАД-зависимые ядерные деацетилазы – сиртуины. Фенилэфрин устраняет подавление радиацией функции сиртуина 1, увеличивая ее в два раза [78]. Сиртуин 1 стимулирует функцию АМРК, тем самым повышая уровень НАД+ и биогенез митохондрий, а деацетилируя PGC-1а, обеспечивает митохондриальный биогенез, необходимую интенсивность метаболизма и клеточного дыхания и ограничивает процессы гликолиза и воспаления [79]. Сиртуин 1 через PI3K/Akt-сигнальный путь участвует в регуляции энергетического метаболизма, окислительного стресса и продукции индуцированных радиацией активных форм кислорода [80, 81].

Все эти процессы играют позитивную роль в реализации антиапоптической активности альфаl-адреноагонистов. До последнего времени привлечено внимание к анализу противолучевых свойств альфаl-адреноагонистов при радиационных поражениях слюнных железах в связи с позитивными результатами клинических испытаний радиопротекторов для снижения побочных эффектов (ксеростомии) от радиотерапии опухолей головы и шеи [82–84]. В отличие от радиочувствительных тканей (кроветворная система, кишечник, кожа) слюнные железы не имеют стволовых клеток, наиболее чувствительных к

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

действию радиации, и относятся к радиорезистентным тканям.

Альфа1-адреноагонисты, воздействуя на расположенные на слюнных железах альфа1В-адренорецепторы, через активацию ERK1/2 усиливают их секрецию [85, 86]. Фармакодинамика противолучевого действия альфа1-адреноагонистов на слюнных железах по временным параметрам ее проявления совпадает с реализацией их влияния на секреторную функцию желез с максимальным эффектом через 30-60 мин, т.е. когда вазоконстрикторный и гипоксический эффекты альфа1-адреноагонистов завершаются [27, 87]. На этом основании можно исключить роль гипоксического механизма в противолучевом действии альфа1-адренлагонистов на слюнных железах. Важно подчеркнуть, что потенциальная возможность снижения лучевого поражения слюнных желез под действием альфа1-агонистов достаточно высокая и соответствует индралину по фактору уменьшения дозы 1.5, что сопоставимо с его защитным эффектом на костном мозге и коже [16, 23, 27].

Одна из причин этого эффекта, возможно, связана с тем, что альфаl-адреноагонисты, усиливая секрецию желез, тем самым удаляют большую часть их секрета из ткани слюнных желез, в том числе немалую долю содержащихся в нем атомов железа и меди, что в принципе снижает поглощенную дозу лучевой нагрузки на ткань железы, но не известно насколько это снижение значимо [88].

Во-вторых, при десенситизации альфа1-адренорецепторов под действием радиации альфа1адреноагонисты способны усилить секреторную функцию, тем самым, частично снижая проявление пострадиационной ксеростомии. Однако это не объясняет защитный эффект альфа1-адреноагонистов по поздним проявлениям лучевого поражения слюнных желез вследствие их пострадиационого фиброза.

Наиболее обосновано положение, что защитный механизм альфа1-адреноагонистов на слюнных железах связан с его антиапоптическим эффектом. Более детально это явление исследовано по механизму действия фенилэфрина [78, 83, 84]. Фенилэфрин через экспрессию транскриптационного ядерного фактора PPAR и индукцию фосфорилирования АМРК повышает выживаемость клеток, сохраняет мембранный потенциал митохондрий и путем активации PI3K/Akt- и ERK1/2пути подавляет проапоптические белки Bad, благодаря стимуляции их фосфорилирования, тем самым, усиливая антиапоптическое действие семейства Bcl-2 [89, 90]. Процессы, связанные с экспрессией PPAR, происходят относительно медленно, достигая максимума через 3-6 ч после воздействия фенилэфрина.

Все три отмеченных компонента механизма противолучевого эффекта альфаl-адреноагонистов могут взаимодействовать между собой, позволяя достигнуть высоких результатов защиты, роль каждого из них может меняться и доминировать при радиационном поражении различных тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм противолучевого действия альфа1адренергических агонистов норадреналина, фенилэфрина и индралина представляет большой интерес для анализа клинических перспектив применения противолучевых средств в практике радиохимиотерапии онкологических больных. Первые представления о механизме их действия были связаны с ролью циркуляторной гипоксии в радиочувствительных тканях за счет вазоконстрикторного эффекта альфа1-адреноагонистов. При изучении реального снижения напряжения кислорода в ткани при циркуляторной гипоксии было установлено, что его недостаточно для обеспечения отмечаемого роста радиорезистентности организма под воздействием альфа-адреноагониста индралина.

Вторым важным фактом является то, что при снижении базового потребления кислорода при переходе от мелких к крупным животным противолучевой эффект циркуляторной и гипоксической гипоксии снижается из-за больших адаптивных возможностей в поддержке кислородного гомеостаза в клетке в этих условиях. Данное положение полностью справедливо при экстраполяции экспериментальных данных на человека. Для объяснения высокой противолучевой защиты на крупных животных под действием индралина была предложена гипотеза о развитии острой тканевой гипоксии за счет интенсификации потребления кислорода при стимуляции альфа1-адренорецепторов. Тем не менее данный механизм действия альфа-адреноагонистов исключается при анализе противолучевого действия фенилэфрина на слюнных железах. По фармакодинамике данного эффекта он имеет место, когда завершается его вазоконстрикторное действие и имеет место реализация воздействия фенилэфрина на секреторную функцию железы. Третье положение по механизму действия альфа1-адреноагонистов связано с их способностью стабилизировать митохондриальный гомеостаз при воздействии радиации через PPAR-AMPK-PGC-1α-путь, что приводит к снижению радиационного апоптоза клеток и обеспечения оптимального функционирования ткани.

Все три отмеченных выше компонента потенциального механизма противолучевого эффекта альфа1-адреноагонистов могут взаимодействовать между собой, позволяя достигнуть высоких результатов защиты, роль каждого которого может меняться и приобретать доминирование при радиационном поражении каждой конкретной ткани. Например, циркуляторная гипоксия может потенцировать эффект тканевой гипоксии за счет интенсификации тканевого дыхания. Антиапоптическое действие альфа1-адреноагонистов снижает радиационное поражение как радиорезистентных, так и ралиочувствительных тканей аддитивно по отношению к реализации противолучевого действия адреномиметиков по механизму острой гипоксии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- J. L. Gray, E. J. Moulden, J. T. Tew, and H. Jensen, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 79 (3), 384 (1952).
- 2. Z. M. Bacq, Acta Radiol. 41 (2), 47 (1954).
- 3. Z. M. Bacq, A. Herve, J. Lecomte, et al., Arch. Intern. Physiol. **59** (4), 442 (1951)
- 4. H. Nakatsuka, Y. Shakudo, and M. Fujino, Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi **26**, 437 (1966).
- 5. K. N. Prasad and M. H. Van Woert, Radiat. Res. **37** (2), 305 (1969).
- Л. Ф. Семенов, и Е. А. Прокудина, Мед. радиол. 2 (3), 35 (1957).
- 7. М. М. Константинова, и Э. Я. Граевский, Докл. АН СССР **133**, 1427 (1960).
- A. D. Smith, M. J. Ashwood-Smith, and D. Lowman, Nature 184 (Suppl. 22), 1729 (1959).
- 9. H. Nakatsuka, and H. Ochi, Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi 26 (8), 993 (1966).
- 10. C. Prouillac, B. Célariès, P. Vicendo, et al., Comptes Rendus Biol. **329**, 196 (2006).
- 11. A. Mourret, C. Agnius-Delord, and R. Rinaldi, C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D **275**, 1575 (1972).
- A. Mourret, C. Agnius-Delord, C. Martinet, et al., Comptes Rendus Acad. Sci. Hebd, Seances Acad. Sci. D 279, 1963 (1974).
- 13. J. P. Caravel and C. Luu Duc, Farmaco Prat. **36**, 49 (1981).
- В. И. Кулинский и А. Д. Климова, Радиац. биология. Радиоэкология 33 (5), 681 (1993).
- Л. А. Ильин, Н. М. Рудный, Н. Н. Суворов и др. Индралин – радиопротектор экстренного действия. Противолучевые свойства, фармакология, механизм действия, клиника. (МЗ РФ, М., 1994).

- М. В. Васин, Г. А. Чернов, Л. В. Королева и др., Радиац. биология. Радиоэкология **36** (1), 36 (1996).
- М. В. Васин, В. В. Антипов, Г. А. Чернов и др., Радиац. биология. Радиоэкология **37** (1), 46 (1997).
- М. В. Васин, Г. А. Чернов и В. В. Антипов, Радиац. биология. Радиоэкология **37** (6), 896 (1997).
- 19. И. С. Колесниченко, Л. С. Михайлов, А. С. Бояринов и А. В. Гришин, Ветеринария, № 12, 52 (2005).
- 20. В. С. Шашков, В. И. Ефимов, М. В. Васин, и др. Авиакосмич. эколог. мед. 44 (1), 15 (2010)
- 21. 21. M. V. Vasin, L. F. Semenov, N. N. Suvorov, et al., J. Radiat. Res. 55 (6), 51049 (2014). DOI: 10.1093/jrr/rru046
- М. В. Васин, Г. А. Чернов, Л. В. Королева и др., Радиац. биология. Радиоэкология 36 (2), 168 (1996).
- 23. М. В. Васин, И. Б. Ушаков и Н. Н. Суворов, Радиац. биология. Радиоэкология **38** (1), 42 (1998).
- М. В. Васин, И. Б. Ушаков, Л. А. Семенова и др., Радиац. биология. Радиоэкология **39** (2–3), 249 (1999).
- М. Д. Померанцева, Л. К. Рамайя, М. В. Васин и В. В. Антипов, Генетика **39** (9), 1293 (2003).
- 26. М. В. Васин, И. Б. Ушаков, В. Ю. Ковтун и др., Радиац. биология. Радиоэкология **44** (1), 68 (2004).
- М. В. Васин, И. Б. Ушаков, Э. П. Коровкина и В. Ю. Ковтун, Радиац. биология. Радиоэкология 44 (3), 333 (2004).
- 28. М. В. Васин, И. Б. Ушаков и В. Ю. Ковтун, Вопр. онкологии **62** (3), 406 (2016).
- 29. I. Aoki, N. Abe, and K. Toyama, Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi 48 (5), 1154 (1985).
- A. Graul-Conroy, E. J. Hicks, and W. E. Fahl, Int. J. Cancer 138 (12), 3011 (2016). DOI:10.1002/ijc.30037
- W. E. Fahl, Arch. Dermatol. Res. 308 (10), 751 (2016). DOI: 10.1007/s00403-016-1691-2
- 32. A. Graul-Conroy, M. Hoover-Regan, K. B. DeSantes, et al., Integr. Cancer Sci. Ther. 5 (6), 10 (2018). DOI: 10.15761/ICST.1000293
- J. F. Cleary, A. M. Anderson, J. C. Eickhoff, et al., Radiat. Oncol. 12 (1), 201 (2017). DOI: 10.1186/s13014-017-0940-7
- 34. М. В. Васин, И. Б. Ушаков, Л. В. Королева и В. В. Антипов, Радиац. биология. Радиоэкология 39 (2–3), 238 (1999).
- М. В. Васин, В. Ю. Соловьев, В. Н. Мальцев и др., Мед. радиология. Радиац. безопасность 63 (6), 71 (2018).
- 36. C. van der Meer and D. W. van Bekkum, Int. J. Radiat. Biol. 1 (1), 5 (1959).
- П. Г. Жеребченко и Н. Н. Суворов, Радиобиология 3 (4), 595 (1963).
- С. П. Ярмоненко, Ю. И. Рампан, Б. Б. Карочкин и др. Радиобиология 10 (5), 700 (1970).
- R. L. Prewitt and X. J. Musacchia, Int. J. Radiat. Biol. 27, 181 (1975). DOI: 10.1080/09553007514550181
- H. van den Brenk and D. Jamieson, Int. J. Radiat. Biol. 4 (4), 379 (1962).
- 41. H. van den Brenk and R. Moore, Nature **183** (4674), 1530 (1959).
- 42. М. В. Васин, Радиобиология 26 (4), 563 (1986).

- 43. G. J. Maestroni, and A. Conti, Exp. Hematol. 22 (3), 313 (1994).
- 44. G. J. M. Maestroni, Neuroimmune Pharmacol. **15** (1), 82 (2020). DOI: 10.1007/s11481-019-09840-7
- J. Han, Z. Zou, C. Zhu, et al., Arch. Biochem. Biophys. 490 (2), 96 (2009). DOI: 10.1016/ j.abb.2009.08.009
- 46. L. Sterin-Borda, C. Furlan, B. Orman, and E. Borda, Biochem. Pharmacol. **74** (9), 1401 (2007).
- И. Б. Смирнова, Г. В. Донцова, М. И. Янушевская и Э. Я. Граевскийй, Радиобиология 15 (5), 680 (1975).
- Е. И. Ярцев, В. И. Кулинский, С. Д. Новосельцева и В. Г. Яшунский, Радиобиология 19 (2), 229 (1979).
- Е. Г. Скурихин, Е. С. Хмелевская, О. В. Першина, и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины 10 (3), 128 (2010).
- A. Spiegel, S. Shivtiel, A. Kalinkovich, et al., Nat. Immunol. 8 (10), 1123 (2007).
- 51. Y. Katayama, M. Battista, W. M. Kao, et al., Cell. **124** (2), 407 (2006). DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.041.
- A. Récalde, A. Richart, C. Guérin, et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **32** (3), 643 (2012). DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.244392.
- K. Lapid, T. Itkin, G. D'Uva, et al., J. Clin. Invest. 123 (4), 1705 (2013). DOI: 10.1172/JCI64149
- 54. Y.-J. Lee, H. S. Kim, H. S. Seo, et al., PPAR Res. **2020**, 3785137) (2020). DOI: 10.1155/2020/3785137
- 55. В. И. Кулинский и В. Г. Яшунский, Радиобиология **18** (5), 667 (1978).
- M. Nakaoka, E. Iwai-Kanai, and M. Katamura, Biochem. Biophys. Res. Commun. 456 (1), 250 (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.067
- 57. В. И. Кулинский и Л. И. Золочевская, Радиобиология **13** (3) 373 (1973).
- А. А. Орловский и Л. М. Рождественский, Радиобиология 25 (2) 230 (1985).
- 59. M. V. Vasin, I. B. Ushakov, V. Yu. Kovtun, et al., J. Radioprotection Res. 2 (2), 3 (2014).
- K. A. Dora, S. M. Richards, S. Rattigan, et al., Am. J. Physiol. 262 (3, Pt 2), H698 (1992). DOI: 10.1152/ajpheart.1992.262.3.H698
- 61. Л. И. Золочевская, Радиобиология **13** (6), 926 (1973).
- M. Praslicka, M. Hill, and L. Novak, Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 4, 567 (1962). DOI: 10.1080/09553006214550381
- A. Vacek, and D. Rotkovska, Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 8, 285 (1964). DOI: 10.1080/09553006414550301
- 64. M. Okuda, H. C. Lee., C. Kumar, and B. Chance, Acta Physiol. Scand. **145** (2), 159 (1992).
- Л. А. Орбели, Физиол. журн. СССР 35 (5), 594 (1949).
- В. И. Кулинский, А. Д. Климова, В. Г. Яшунский и др. Радиобиология 26 (1), 11 (1986).
- В. И. Кулинский, А. К. Кунцевич, и Л. В. Труфанова, Бюл. эксперим. биологии и медицины 92 (3), 33 (1981).

- 68. В. И., Кулинский и Л. В. Труфанова, Докл. АН СССР **224** (6), 1439 (1975).
- М. В. Васин, И. Б. Ушаков, Э. П. Коровкина и В. Ю. Ковтун, Бюл. эксперим. биологии и медицины 155 (3), 337 (2013).
- E. Nisoli and M. O. Carruba, J. Cell Sci. 119, 2855 (2006). DOI: 10.1242/jcs.03062
- C. Sârbu, and D. Casoni, Cent. Eur. J. Chem. 11 (5) 679 (2013). DOI: 10.2478/s11532-013-0210-y
- 72. H. Zhu, S. McElwee-Witme, and M. Perrone, Cell Death Differentiation 7, 773 (2000).
- H. Gao, L. Chen, and H. T. Yang, Cardiovasc. Res. 75, 584 (2007).
- 74. R. Naderi, A. Imani, M. Faghihi, and M. Moghimian, J. Surg. Res. **164** (1), e37(2010). DOI: 10.1016/j.jss.2010.04.060
- X. Y. Wang, J. Yu, F. Y. Zhang, et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **104** (3) 644 (2019). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2019.02.048
- 76. Z. Ju, H. Li-chi, W. Yi-fei, and Y. Xiao-xu, Chinese J. Tissue Engineer. Res. 22 (8), 1161 (2018). DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.0814
- 77. A. Garten, S. Schuster, M. Penke, et al., Nat. Rev. Endocrinol. 11 (9), 535 (2015). DOI: 10.1038/nrendo.2015.117
- B. Xiang, L. Han, X. Wang, et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **96** (3), 538 (2016). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2016.06.2442

- 79. N. B. Ruderman, X. J. Xu, L. Nelson, et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 298 (4), E751 (2010) DOI: 10.1152/ajpendo.00745.2009
- A. Kauppinen, T. Suuronen, and J. Ojala, Cell Signal.
 25 (10), 1939 (2013) DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.06.007
- C. K. Singh, G. Chhabra, and A. Ndiaye, Antioxid. Redox Signal. 28 (8), 643 (2018). DOI: 10.1089/ars.2017.7290
- R. M. Nagler and D. Laufer, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 40, 477 (1998).
- B. Xiang, Y.-J. LIm., and X.-B. Zhao, Exp. Ther. Med. 5 (3), 875 (2013).
- B. Xiang, Y.-J. LIm., and X.-B. Zhao, Radiat. Res. 183 (6), 693 (2015). DOI: 10.1667/RR13890.1
- J. C. Elverdin, M. O. Kaniucki, F. J. Stefano, and V. J. Perec, Acta Odontol. Latinoam. 5 (1), 31 (1990).
- N. R. Bruchas, N. L. Toews, C. S. Bockman, and P. W. Abel, Eur. J. Pharmacol. **578** (2–3), 349 (2008). DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.09.029
- М. В. Васин, Т. С. Ганьшина, Р. С. Мирзоян и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины 165 (3), 340 (2018).
- R. Nagler, Y. Marmary, P. C. Fox, et al., Radiat. Res. 147, 468 (1997).
- J.-S. Wu, T.-N. Lin, and K. K. J. Wu, Cell Physiol. 220 (1), 58 (2009). DOI: 10.1002/jcp.21730.
- 90. D. M. Valks, S. A. Cook, F. H. Pham, et al., Mol. Cell Cardiol. **34** (7), 749 (2002). DOI: 10.1006/jmcc.2002.2014∖

Analysis of the Role of Bioenergetic Processes under the Radioprotective Effects Mediated by Alpha-1-Adrenergic Agonists

M.V. Vasin* and I.B. Ushakov**

*Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Barrikadnaya ul. 2/1, Moscow, 123995 Russia

**State Research Center - Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical-Biological Agency of the Russian Federation, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123182 Russia

The analysis of modern concepts on the mechanism of radiation protective action of alpha-1-adrenergic agonists, which are gaining popularity as chemoradiotherapy for oncological patients in clinical practice was carried out. The first explanation of the mechanism of their action is based on a role of circulatory hypoxia in radiosensitive tissues due to the vasoconstrictive effect of alpha-1-adrenergic agonists. Our further study of continuing reduction in tissue oxygen tension in circulatory hypoxia showed that insufficient supply of oxygen results in an inability to ensure efficient delivery of oxygen to cells around the body in response to an increase in radioresistance caused by agonists. The second important fact is that large animals use less oxygen per unit of body weight than small ones do, so the radioprotective effect of circulatory and hypoxic hypoxia is reduced due to great adaptive ability to support oxygen homeostasis in the cell under these conditions. This explanation can also be applied to humans. In order to explain high radiation protection in large animals under the action of alpha-1-adrenoceptor, a hypothesis is proposed that the development of acute tissue hypoxia is due to intensification of oxygen consumption during stimulation of alpha-1-adrenoceptors in tissues. The third point is that alpha-1- adrenergic agonists can stabilize mitochondrial homeostasis when exposed to radiation, thereby reducing the probability of radiation-induced apoptosis and maintaining optimal tissue functioning. These three aspects of the radioprotective mechanism of alpha-1-adrenergic agonists may supplement each other leading to high protection against damage to healthy cells. A part these aspects are assigned to in a particular scenario may depend on practical application of treatment strategy.

Keywords: circulatory hypoxia, tissue hypoxia, oxygen consumption, alpha-1-adrenoceptors, alpha-1-adrenergic agonists, indraline, phenylephrine
———— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 616.892

МУЛЬТИФРАКТАЛЬНЫЙ И ВЕЙВЛЕТНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ПАТТЕРНОВ НЕПРОИЗВОЛЬНЫХ КОЛЕБАНИЙ РУКИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2021 г. О.Е. Дик

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, б

E-mail: dickviola@gmail.com Поступила в редакцию 07.07.2020 г. После доработки 07.07.2020 г. Принята к публикации 20.07.2020 г.

С помощью методов вейвлетного и мультифрактального анализа показано, что при двигательных нарушениях в структуре паттернов непроизвольных колебаний руки человека, возникающих в процессе выполнения им двигательной задачи, появляются перестройки, сопровождающиеся возникновением долговременных корреляций между последовательными значениями этих колебаний. Эти перестройки являются причиной значительного повышения амплитуды непроизвольных колебаний руки человека с болезнью Паркинсона, по сравнению с такими колебаниями руки здорового человека. Механизм возникновения коррелированной динамики связан с повышением вклада сильных флуктуаций последовательных значений непроизвольных колебаний. Уменьшение амплитуды этих колебаний и энергии их вейвлетного спектра на фоне приема антипаркинсонических препаратов сопровождается уменьшением долговременных корреляций и смещением мультифрактальных характеристик в диапазон, характерный для здорового человека.

Ключевые слова: непроизвольные колебания руки человека, паркинсонический тремор, вейвлет, мультифрактальность.

DOI: 10.31857/S0006302921030212

При выполнении человеком определенных двигательных задач, например, при поддержании усилия пальцами руки возникают непроизвольные колебания (тремор). У здорового человека эти непроизвольные колебания имеют малую амплитуду и не мешают выполнению задачи [1]. Разброс частот непроизвольных колебаний в диапазоне от 7 до 20 Гц, характерный для здорового человека, свидетельствует об асинхронности разрядов мотонейронов [2]. При двигательных нарушениях возникает патологический тремор, который мешает выполнению двигательной задачи и имеет большую амплитуду, по сравнению с физиологическим тремором, что объясняется возрастающей синхронизацией мотонейронов [3]. Известно, что различным частотам соответствуют специфические уровни регуляции движениями. Например, у пациентов с болезнью Паркинсона в частотном спектре отсутствуют частоты, превышающие 12 Гц [4]. Возвращение этих частот в спектр после приема препаратов, уменьшающих паркинсонические симптомы, свидетельствует о важности высокочастотного диапазона в выполнении двигательной функции [5].

Поскольку возникающие непроизвольные колебания существенно нестационарны, для их анализа подходят концепции вейвлетов и мультифрактальности, с помощью которых можно получить информацию об изменении частотных характеристик сигнала во времени и вычислить спектр фрактальных размерностей [6-10]. Актуальность таких подходов с теоретической точки зрения обусловлена необходимостью понимания того, каким образом происходят изменения в структуре паттернов колебаний при возникновении патологического состояния, а с практической точки зрения – тем, что клиническая медицина нуждается в разработке эффективных алгоритмов, применимых для достоверной диагностики состояния пациента.

Целью настоящей работы является применение методов вейвлетного и мультифрактального анализа для определения биофизического механизма, лежащего в основе изменения структуры паттернов непроизвольных колебаний руки человека при двигательных нарушениях у лиц с дрожательной формой болезни Паркинсона.

МЕТОДЫ

Были проанализированы характеристики непроизвольных колебаний руки одиннадцати здоровых испытуемых в возрасте от 47 до 56 лет и одиннадцати пациентов с болезнью Паркинсона с двусторонними проявлениями тремора в возрасте от 46 до 63 лет при выполнении ими двигательной задачи, состоящей в поддержании усилия пальцами руки. Двигательная задача заключалась в управлении напряжением мышц с возможностью слежения за величиной усилия по смещению меток на экране монитора. Данные были предоставлены клиникой Института мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН.

Удаление медленного тренда из анализируемых данных осуществлялось с помощью адаптивного метода (the adaptive detrending method) [11]. К не содержащим тренд непроизвольным колебаниям были применены методы вейвлетного и мультифрактального анализа.

Метод вейвлетного анализа основан на разложении сигнала x(t) по набору копий ба-

зисного вейвлета, растягивающегося во времени и сдвигающегося на некоторое расстояние [12]:

$$W(a,b) = \left(1 / \sqrt{a}\right) \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \psi^* \left((t-b) / a\right) dt,$$

где *a* – параметр масштаба, *b* – параметр временного сдвига, $\psi((t - b)/a)$ – вейвлет-функция, полученная из базисного вейвлета $\psi(t)$, символ * означает комплексное сопряжение. Смещение вейвлета вдоль сигнала дает возможность обнаружить изменение во времени частоты сигнала f = 1/a.

В качестве базисного вейвлета в работе использовался вейвлет Морле:

$$\Psi(t) = \pi^{-1/4} \exp(-0.5t^2) \left(\exp(i\omega_0 t) - \exp(-0.5\omega_0^2) \right),$$

в соответствии с которым вейвлетное преобразование сигнала x(t) вычислялось в следующем виде:

$$W(f,b) = \pi^{-1/4} \sqrt{f} \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \exp(-0.5(t-b)^2 f^2) \left(\exp(-i2\pi(t-b)f) dt \right).$$

Величина квадрата модуля вейвлетного преобразования $|W(f,b)|^2$ определяет локальный вейвлетный спектр энергии сигнала в момент времени *b*, т.е. мгновенное распределение энергии по частотам *f*.

Для оценки энергии вейвлетного спектра использовался интеграл

$$E(f) = \int_{t_1}^{t_2} \left| W(f,b) \right|^2 db,$$

определяющий усредненное по времени распределение энергии спектра по частотам на заданном временном интервале $[t_1, t_2]$.

Для оценивания мультифрактальности сигнала применялся метод анализа флуктуаций относительно тренда [13]. Алгоритм этого метода состоит из следующей последовательности процедур:

1) для исходного ряда значений $\{x(t_i)\}_{i=1}^N$ вычислялась последовательность, состоящая из накопленных отклонений от среднего \hat{x} :

$$y(i) = \sum_{k=1}^{i} (x_k - \hat{x}), \quad i = 1, ..., N;$$

2) эта последовательность разбивалась на m = N/n неперекрывающихся интервалов длины

n, разбиение повторялось, начиная с противоположного конца, в итоге получалось 2*m* интервалов;

3) для каждого из интервалов полученную последовательность аппроксимировали прямой по методу наименьших квадратов, в результате чего определялся локальный тренд $v_s(i)$ в пределах выбранного интервала,

4) далее определяли отклонения вычисленных последовательностей относительно локального тренда для каждого интервала s = 1,..., m и s = m+1,..., 2m:

$$F^{2}(n,s) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} [y((s-1)n+i) - v_{s}(i)]^{2},$$

$$F^{2}(n,s) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} [y((N-(s-m)n+i) - v_{s}(i))]^{2},$$

5) вычисляли функцию флуктуаций $F_q(n)$ *q*-го порядка:

$$F_q(n) = \left\{\frac{1}{2m}\sum_{s=1}^{2m} \left[F^2(n,s)\right]^{q/2}\right\}^{1/q},$$

6) вычисления повторяли для других значений длины интервала *n* от 5 до 100.



Рис. 1. Зависимости экспонент Гельдера h(q) и спектры сингулярности D(h) для сигнала, в котором последовательные значения коррелированы (a, б), и для сигнала, в котором последовательные значения антикоррелированы (b, г).

В силу того, что при увеличении длины интервала n значение $F_q(n)$ возрастает по степенному закону:

$$F_q(n) \sim n^{h(q)},$$

экспоненту Гельдера h(q) вычисляли как угловой коэффициент прямой, определяющей зависимость log $F_q(n)$ от log n.

Известно, что линейная зависимость h(q) дает постоянное значение экспоненты Гельдера h для монофрактальных сигналов, а нелинейная множество экспонент Гельдера для мультифрактальных сигналов, называемое спектром сингулярности D(h) [14]. Ширина этого спектра Δh характеризует степень мультифрактальности анализируемого сигнала, т.е. чем больше величина Δh , тем выше степень его мультифрактальности.

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

Основной вклад в спектр сингулярности D(h) при q > 0 дают паттерны, проявляющие большие флуктуации, а при q < 0 доминируют паттерны с малыми флуктуациями [14, 15]. При этом положение спектра сингулярности D(h) дает информацию о степени коррелированности последовательных значений сигнала, поскольку значения экспонент Гельдера h < 0.5 соответствуют антикоррелированной динамике, в то время как значения h > 0.5 – коррелированной [15].

Например, для сигнала, чей спектр сингулярности D(h) представлен на рис. 16, последовательные значения сигнала коррелированы, об этом свидетельствует нахождение спектра в области значений экспонент Гельдера h > 0.5. Коррелированность последовательных значений сигнала означает, что с большей вероятностью за большим значением сигнала следует большее, и наоборот. Для сигнала, спектр сингулярности D(h)



(a)





Рис. 2. Непроизвольные колебания руки здорового человека (а) и больного с дрожательной формой болезни Паркинсона (б). Проекции вейвлетных спектров | W(f,b)|² для этих колебаний (в, г) и усредненное по времени распределение энергии вейвлетного спектра по частотам (д, е).

которого представлен на рис. 1г, последовательные значения антикоррелированы (h < 0.5), это означает, что с большей вероятностью за большим значением сигнала следует малое. В случае если динамика является одновременно коррелированной и антикоррелированной, спектр сингулярности будет находиться в интервале 0 < h < 1.

При этом в спектр сингулярности D(h), представленный на рис. 16, вносят вклад как сильные флуктуации (при q > 0), так и слабые флуктуации (при q < 0), а для спектра сингулярности D(h), представленного на рис. 1г, доминируют слабые флуктуации, потому что при q > 0 значения hблизки к нулю (рис. 1в).

Как отмечается в работах [14, 15], мультифрактальный анализ позволяет оценивать корреляционные свойства сигнала даже при сравнительно не очень длинных записях, что является несомненным преимуществом этого метода нелинейной динамики.

Отметим, что простое увеличение амплитуды сигнала без каких-либо перестроек стуктуры сигнала не изменит степени его мультифрактальности. Поэтому предварительное выявление изменения частотной структуры сигнала с помощью вейвлетного анализа важно для последующей оценки изменения его мультифрактальности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Непроизвольные колебания руки здорового человека (физиологический тремор) при выполнении им двигательной задачи и паркинсонический тремор руки человека с болезнью Паркинсона приведены на рис. 2а и 26 соответственно. Амплитуда паркинсонического тремора до приема больным антипаркинсонического препарата накома (комбинация леводопы с карбидопой в дозе 250/25 мг) в два с половиной раза превышает амплитуду физиологического тремора. Мгновенные распределения энергии тремора по частотам $|W(f, b)|^2$ и интегральные распределения энергии вейвлетного спектра E(f) позволяют определить значительное повышение энергии вейвлетного спектра паркинсонического тремора, по сравнению с тремором физиологическим (рис. 2в-е). Проекция локального вейвлетного спектра непроизвольных колебаний руки здорового человека демонстрирует множество максимумов на частотах в диапазоне от 4 до 16 Гц (рис. 2в) и яркую полосу в диапазоне частот от 5 до 7 Гц для тремора больного паркинсонизмом (рис. 2г). Максимум энергии вейвлетного спектра Е_{тах} для паркинсонического тремора имеет на два порядка большую величину, чем максимум энергии спектра

> БИОФИЗИКА том 66 Nº 3 2021

дик



Рис. 3. Усредненные зависимости h(q) и спектры сингулярностей D(h) физиологического и паркинсонического тремора (a, б) и паркинсонического тремора до и после приема антипаркинсонического препарата (в, г).

физиологического тремора (≈0.3 и ≈0.001 соответственно) (рис. 2д,е).

На рис. 3 представлены усредненные (по тестируемым) зависимости экспоненты Гельдера от момента q (кривые h(q)) и спектры сингулярности D(h) для физиологического и паркинсонического тремора. Форма кривых указывает на мультафрактальность как физиологического, так и паркинсонического тремора. При этом непроизвольные колебания руки здорового человека, возникающие при выполнении поставленной двигательной задачи, характеризуются большей, по сравнению с тремором руки больного паркинсоспектра низмом. шириной сингулярности (рис. 3б). Уменьшение ширины спектра сингулярности для паркинсонического тремора показывает уменьшение неоднородности и снижение степени мультифрактальности непроизвольных

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

колебаний руки в случае наличия у человека двигательной патологии. Это уменьшение ширины спектра для паркинсонического тремора, по сравнению с физиологическим тремором, происходит за счет роста вклада сильных флуктуаций, поддерживающих при положительных значениях q ненулевое значение экспоненты Гельдера $(h \approx 0.5)$ (рис. 3а,б).

Широкий спектр сингулярности физиологического тремора соответствует как антикоррелированной динамике последовательных значений тремора (при h < 0.5), так и коррелированной динамике (при h > 0.5). Для паркинсонического тремора характерно исчезновение антикоррелированной динамики и возникновение исключительно коррелированных последовательных значений тремора (h > 0.5). Увеличение степени коррелированности последовательных значений

ДИК

1 1		1	1 1	
Тремор	Рука	$E_{\rm max} imes 10^{-4}$	Δh	Клинические проявления тремора
Физиологический	правая	4.5 ± 0.3	0.85 ± 0.08	Цет
	левая	6.8 ± 0.2	0.92 ± 0.08	ner
Паркинсонический	правая	2567 ± 176	0.47 ± 0.04	па
	левая	2391 ± 156	0.43 ± 0.04	да
Паркинсонический после препарата (68 ± 6% лиц)	правая	6.2 ± 0.1	0.71 ± 0.07	Uet
	левая	8.2 ± 0.3	0.76 ± 0.07	нет
Паркинсонический после препарата (32 ± 3% лиц)	правая	1870 106	0.44 ± 0.04	10
	левая	1787 ± 92	0.53 ± 0.05	да

Сравнение средних значений характеристик тремора руки здоровых добровольцев и пациентов с болезнью Паркинсона до и после приема последними антипаркинсонического препарата

Примечание: достоверность различий между двумя средними величинами составляет не менее 95% (p < 0.05).

тремора является причиной значительного повышения амплитуды паркинсонического тремора и энергии его вейвлетного спектра.

На рис. Зв.г представлены усредненные кривые h(q) и спектры сингулярности D(h) для для непроизвольных колебаний руки во время выполнения двигательной задачи пациентами с болезнью Паркинсона до и через три часа после приема антипаркинсонического препарата. После приема препарата наблюдается увеличение ширины спектра сингулярности, т.е повышение степени мультифрактальности, и преимущественное смещение спектра сингулярности в диапазон значений экспонент Гельдера h < 0.5, т.е. в сторону антикоррелированной динамики последовательных значений тремора (рис. 3г). Это обусловлено уменьшением вклада сильных флуктуаций, приводящем к уменьшению долговременных корреляций (рис. 3в).

Подобная динамика вейвлетных и мультифрактальных характеристик наблюдалась на фоне антипаркинсонического лечения не менее чем для 60% лиц с болезнью Паркинсона. Обобщенные сравнительные данные, касающиеся изменения вейвлетных и мультифрактальных параметров непроизвольных колебаний руки здоровых добровольцев и лиц с болезнью Паркинсона до и после приема последними антипаркинсонического препарата представлены в таблице. Достоверность различий между двумя средними величинами для здоровых тестируемых и больных до приема лекарственного препарата составляла не менее 95% (p < 0.05, тест Манна–Уитни). Статистически значимые отличия между состояниями (паркинсонический или физиологический тремор) выявлялись по величине максимума энергии вейвлетного спектра тремора E_{max} и по значению ширины Δh спектра сингулярности.

Для непроизвольных колебаний руки здорового человека ширина спектра сингулярности имела максимальные значения ($\Delta h > 0.8$), а энергия вейвлетного спектра тремора — минимальные ($E_{\rm max} \approx 5 \cdot 10^{-4}$). Для тремора пациентов с болезнью Паркинсона, наоборот, ширина спектра сингулярности минимальна ($\Delta h < 0.5$), а энергия вейвлетного спектра — намного больше энергии спектра физиологического тремора ($E_{\rm max} \approx 2 \cdot 10^{-1}$).

Исчезновение клинических признаков патологического тремора на фоне приема антипаркинсонических препаратов, регистрируемое в среднем у 68 ± 6% пациентов с болезнью Паркинсона, сопровождалось приближением мультифрактальных и вейвлетных параметров к значехарактерным для ниям. здоровых лиц $(E_{\text{max}} \approx 6 \cdot 10^{-4}$ и $\Delta h \approx 0.7$). Для 32 ±3 % пациентов через 3 ч после приема лекарственного препарата энергия вейвлетного спектра тремора или не снижалась, или снижалась в меньшей степени, а мультифрактальные параметры, увеличиваясь, не достигали физиологических значений. Это коррелировало с отсутствием у этих пациентов полного исчезновения клинических проявлений тремора.

Таким образом, клинические проявления паркинсонического тремора коррелировали, вопервых, со значительным повышением энергии вейвлетного спектра и, во-вторых, с уменьшением ширины спектра сингулярности. При этом улучшение функционального состояния (снижение амплитуды патологического тремора) соответствовало уменьшению долговременных корреляций и смещению спектра сингулярности в диапазон значений экспонент Гельдера, характерный для тремора руки здорового человека.

Уменьшение степени мультифрактальности, обнаруженное для паркинсонического тремора, связано с уменьшением динамической сложности, по сравнению с тремором физиологическим [10]. Динамическая сложность тремора руки здорового человека связана с расширением диапазона коррелированных и антикорелированных последовательных значений непроизвольных колебаний, в отличие от паркинсонического тремора, для которого характерна только коррелированная динамика. Как известно, при долговременных корреляциях уровень случайного фактора снижается, а колебательный процесс сохраняет тренд [14], что может лежать в основе повышения долговременной памяти при паркинсоническом повреждении управления движениями. Таким образом, мультифрактальный анализ позволяет выявить механизм, лежащий в основе изменения структуры паттернов непроизвольных колебаний руки человека при двигательных нарушениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникновение исключительно коррелированной динамики последовательных значений непроизвольных колебаний руки при выполнении определенной двигательной задачи является причиной значительного повышения амплитуды паркинсонического тремора и энергии его вейвлетного спектра. В основе механизма возникновения коррелированной динамики лежит увеличение вклада сильных флуктуаций последовательных значений тремора.

Исчезновение клинических признаков тремора на фоне приема антипаркинсонических препаратов сопровождается уменьшением долговременных корреляций, что приводит к смещению спектра сингулярности в диапазон антикоррелированных последовательных значений, характерный для тремора руки здорового человека. Эти особенности в изменениях паттернов тремора дают возможность количественно оценить степень двигательных нарушений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность за предоставленные экспериментальные данные врачу-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

нейрофизиологу З.А. Алексанян (Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013— 2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От всех участников предварительно было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. R. J. Elble, Clin. Neurophysiol. 114, 624 (2003).
- 2. S. Grillner, Nature Rev. Neurosci. 4, 573 (2003).
- 3. J. H. McAuley and C. D. Marsden, Brain **123**, 1545 (2000).
- 4. B. Hellwig, P. Mund, B. Schelter, et al., Clin. Neurophysiol. **120**, 431 (2009).
- 5. J. H. McAuley, J. C. Rothwell, and C. D. Marsden, Exp. Brain Res. **114**, 525 (1997).
- 6. J. Stam, Clin, Neurophysiol. 116, 2266 (2005).
- O. E. Dick and I. A. Mochovikova, in *Chaos Theory: Modeling, Simulation and Applications*, Ed. by C. H. Skiadas, I. Dimotikalis, and C. Skiadas (World Scientific Publishing, 2011), pp. 159–166.
- 8. O. E. Dick and I. A. Svyatogor, Neurocomputing **82**, 207 (2012).
- 9. G. E. Polychronaki, P. Y. Ktonas, S. Gatzonis, et al., J. Neural Engineer. 7, 60 (2010).
- 10. O. E. Dick, Neurocomputing 243, 142 (2017).
- 11. J. Hu, J. B. Gao, and X. S. Wang, J. Stat. Mech. 1, 2066 (2009).
- 12. A. Grinsted, J. C. Moor, and S. Jevrejeva, Nonlinear Process. Geophys. **11**, 561 (2004).
- 13. J. W. Kantelhardt, S. A. Zschiegner, E. Koscielny-Bunde, et al., Physica A **316**, 87 (2002).
- А. Н. Павлов и В. С. Анищенко, Успехи физ. наук 177, 859 (2007).
- Y. Xu, Q. D. Y. Ma, D. T. Schmitt, et al., Physica A 390, 4057 (2011).

ДИК

Multifractal and Wavelet Analysis of Changes in the Structure of Patterns of Involuntary Oscillatory Hand Movements in Parkinson Individual

O.E. Dick

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

Using the methods of wavelet and multifractal analysis, it was shown that alterations in oscillatory activity, accompanied by the appearance of long-term correlations between successive values of these oscillations occur as the result of movement disorders in the structure of patterns of involuntary oscillatory hand movements arising during the performance of a motor task. These alterations cause a significant increase in the amplitude variation of involuntary oscillatory hand movements in the individual with Parkinson's disease, compared to healthy individuals. The mechanism of the appearance of correlated dynamics is associated with an increase in the amplitude variation of strong fluctuations of successive values of involuntary oscillations. A decrease in the amplitude variation of these oscillations and the energy of their wavelet spectrum in association with antiparkinsonian drugs is accompanied by a decrease in long-term correlations and multifractal characteristics tend to be attributed to the range characteristic of healthy individuals.

Keywords: involuntary oscillatory hand mpvements, Parkinson's tremor, wavelet, multifractality

——— ДИСКУССИИ ——

УДК 577.359

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ОТ ТКАНИ НОРМАЛЬНОЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

© 2020 г. А.Г. Маленков

ООО «Научный центр интегративной медицины», 111020, Москва, ул. 2-я Синичкина, 26, кв. 29

E-mail: barsuk-13@mail.ru Поступила в редакцию 20.05.2020 г. После доработки 20.05.2020 г. Принята к публикации 27.05.2020 г.

Отмечены четыре универсальных отличия опухолевых клеток и ткани от нормальных. Показано, как эти отличия можно использовать для целей ранней диагностики и нетоксической терапии онкологических заболеваний. Утверждается, что уже разработанные, но широко не применяемые методы диагностики и лечения, основанные на использовании этих универсальных отличий, позволяют кардинально изменить ситуацию в онкологии: на порядок снизить заболеваемость и существенно повысить уровень полного излечения на третьей-четвертой стадиях болезни.

Ключевые слова: гликолиз, контактная стимуляция деления, адгезионные факторы, онколитический вирус, ферромагнитная хирургия, явление информационного переноса действующего начала.

DOI: 10.31857/S0006302920040224

Все отличия опухолевых клеток и ткани опухоли от нормальных клеток и тканей организма в постнатальном периоде можно разделить на три группы по уровню специфичности. К первой группе следует отнести обязательные, универсальные отличия, которые и определяют основные особенности поведения опухолей – фундаментальные отличия. Ко второй группе - отличия, характерные для опухолей определенного гистогенеза или нескольких гистогенезов и встречающихся в большинстве случаев опухолевого роста данного типа (сюда относятся, например, онкомаркеры и гормональная зависимость). Именно эту группу отличий стремятся использовать те, кто работает над созданием средств таргетной терапии. К третьей, самой многочисленной группе, относятся признаки, которые подчиняются эмпирическому обобщению Фулдса – закону независимой прогрессии признаков [1]. Таковы отличия ткани опухоли по большинству ферментов, мутациям в генах и т. д.

Интересно отметить, что все четыре фундаментальные отличия опухоли от нормальной ткани проявляются на уровне целостной клетки или ткани и являются, по сути, отличиями биофизическими.

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОТЛИЧИЯ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ И ТКАНИ ОПУХОЛИ ОТ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНИ

Первое фундаментальное отличие опухолевых клеток от клеток нормальных обнаружил О. фон Варбург [2]. Он установил, что для опухолевых клеток гликолиз – основной источник энергии, тогда как для нормальных клеток таковым является окислительное фосфорилирование, осуществляемое митохондриями. За это открытие в 1931 г. была присуждена Нобелевская премия. Тот факт, что гликолиз у нейтрофилов является главным источником энергии и что он играет важную роль при некоторых обстоятельствах в мышечной ткани [3], совсем не умаляет значения открытия Варбурга. В этих случаях гликолиз не обеспечивает энергией размножение клеток, как это происходит у клеток опухолей. В свете современных знаний о роли митохондрий ясно, что переход клеток при их малигнизации на гликолиз не только обеспечивает им возможность жить и размножаться в условиях дефицита кислорода и микроэлементов [4], но также позволяет избежать апоптоза, который не могут осуществить ослабленные и немногочисленные митохондрии [5]. Мощность гликолиза в опухоли, определяемая активностью конститутивного фермента -

гексокиназы, — прямо пропорциональна скорости роста опухоли [6].

Первое фундаментальное отличие дало для практики:

 метод ранней диагностики (на стадии предрака) и мониторинга активности опухоли в реальном времени;

 способ избирательного, не токсического разрушения опухоли, в основе которого лежит использование вируса с онколитической активностью, способного размножаться только в клетках с гликолитическим метаболизмом (см. последний раздел).

Второе фундаментальное отличие опухоли реализуется на тканевом уровне организации. Заключается оно в системном изменении мембранно-контактного аппарата регуляции поведения ткани опухоли. Для опухолевой ткани характерно многократное ослабление силы межклеточного сцепления, нарушение ионной и метаболической связи между контактирующими клетками, значительное снижение мембранного потенциала, многократное увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны для ионов, замена контактного торможения деления на контактную стимуляцию оного.

Выявление этих отличий осуществлено разными группами исследователей и растянуто во времени.

В 1944 г. канадский исследователь Д. Коман, используя микроманипуляционную технологию, показал, что сила сцепления клеток опухоли в десять раз меньше таковой в гомологичной нормальной ткани [7]. Продолжая эту линию исследований, автор настоящей работы с коллегами в 1960—1980 гг. установили, что:

1. Сила сцепления клеток в опухоли закономерно убывает по мере прогрессии опухоли [8]; в частности, можно установить пороговое значение силы сцепления клеток, ниже которой вероятность метастазирования резко возрастает [9].

2. Сила сцепления клеток у животных высокораковых линий в органе, в котором во второй половине жизни с большой вероятностью возникнут опухоли, в раннем постнатальном периоде не увеличивается в три-четыре раза, как это происходит у нормальных животных. При рождении сила сцепления клеток у животных низко- и высоко раковых линий одинакова [10, 11].

3. После воздействия промотора канцерогенеза в дозах, значительно повышающих выход опухолей после предварительного воздействия мутагеном, сила сцепления клеток уменьшается ниже порогового значения устойчивости ткани к канцерогенезу [11]. Величина порога устойчивости одинакова при спонтанном и индуцированном канцерогенезе [11]. 4. Пролиферативный пул в опухоли образуют клетки, слабо связанные с соседними клетками. При диспергировании ткани опухоли цитоплазматическая мембрана таких клеток сохраняет целостность, вследствие чего они не лизируются трипсином. На этом свойстве основан «трипсиновый тест», который и позволил установить совпадение пролиферативного пула опухоли и доли слабосвязанных клеток в опухоли. Было показано, что эта доля прямо пропорциональна скорости роста опухоли [12].

При исследовании механических свойств межклеточных контактов нам удалось из смыва, не содержащего кальция, выделить молекулярный компонент, обеспечивающий прочность контакта [13]. При дальнейшем исследовании этого компонента, названного контактином, было установлено следующее:

 – контактин имеет молекулярную массу около 70 кДа и является гликопротеином [11];

 адгезионная активность контактинов, выделенных из разных органов, строго органо- и тканеспецифична, при этом видовая и даже классовая специфичность не отмечается [11, 14];

– контактины обеспечивают более 90% прочности межклеточного контакта, образуя в зоне простого соединения прочные, высокоадгезивные участки[15]; дозовая зависимость эффекта контактинов на прочность межклеточного контакта имеет колоколообразный вид [11];

– контактины в тех же дозах, в которых они усиливают прочность контактов, вызывают *in vitro* и *in vivo* обратимое органспецифическое подавление синтеза ДНК; этот эффект запаздывает по отношению эффекта на адгезию на длительность G1-периода [16–18]. Таким образом, именно контактины являются давно предсказанными, но ранее не найденными кейлонами;

 контактины, обеспечивая прочность межклеточных контактов, одновременно вызывают фазовый переход всей цитоплазматической мембраны, в разы изменяя ее вязкоупругие свойства и подвижность белков мембраны [11, 19];

 контактины появляются в раннем постнатальном периоде, когда происходит «созревание» ткани органа; их появление обеспечивает целостность ткани, ее дифференцировку и устойчивость к спонтанному и индуцированному канцерогенезу [11].

Контактины обеспечивают свойство контактного торможения деления клеток. Этот механизм – базовый для устойчивости ткани к опухолевому перерождению. Но ткань опухоли не только утрачивает контактное торможение деления, она приобретает свойство контактной стимуляции деления. Впервые это явление было четко показано и детально исследовано на примере клеточных островков асцитных гепатом. Было установлено, что

контактирующие опухолевые клетки не только стимулируют деление друг друга, но и синхронизируют взаимное прохождение по митотическому циклу [20]. Поэтому, когда 30 лет спустя А.И. Агеенко и В.С. Ерхов обнаружили молекулярный механизм, обеспечивающий контактную стимуляцию деления опухолевых клеток, - появление на поверхности клеток при их злокачественной трансформации эмбрионального поверхностного антигена ЭПА-10 [21, 22], - стало ясно, что ЭПА-10 должен проявляться уже на стадии предрака. Как следствие, предложенный данными авторами метод диагностики – Ро-тест – должен выявлять не только рак, но и предрак [23]. Ведь именно контактная стимуляция деления, обеспечивая высокую синхронизацию прохождения по митотическому циклу контактирующих клеток, обуславливает видимую на гистологических препаратах очаговую гиперплазию! Так завершился цикл исследований изменений митотических контактов при опухолевой трансформации и прогрессии опухоли.

Дальнейшее биохимическое изучение и фракционирование контактинов, проведенное группой исследователей под руководством В.П. Ямсковой, позволило выделить с помощью электрофокусировки кислую фракцию, обладающую основными свойствами контактинов. Фракция получила название виоргонов [24, 25]. Было показано, что виоргоны представляют собой гликопротеины молекулярной массой 12-13 кДа, образованы ранее неизвестной последовательностью аминокислот и относятся к классу белков S-100. Эти белки, как известно, не образуют глобулярной структуры, очень слабо иммуногенны, выдерживают кипячение и не разрушаются в кислой среде желудка. Все это делает виоргоны крайне удобными для практического использования. К настоящему времени Ямсковой с коллегами получены виоргоны из всех органов и тканей (из глаза, например, получено восемь разных виоргонов). Виоргоноподобные вещества получены также из растений и грибов. Все это позволяет предположить, что виоргоны и контактины представляют собой очень консервативную группу эндогенных регуляторов, обеспечивающих образование, стабильность и регулируемость тканевых систем, появивившуюся во время «кембрийского взрыва» [26].

Сказанное выше о межклеточных контактах и контактинах позволяет утверждать, что снижение мембранного потенциала и увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны у опухолевых клеток является следствием нарушения межклеточных контактов. При опухолевой трансформации происходит увеличение проницаемости цитоплазматической мембран клеток по отношению к ионам почти на порядок [27] и одновременно отмечается значительное сниже-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

ние буферной емкости их цитоплазмы [28]. Это отличие позволяет практически использовать некоторые вещества, как разрушающие опухоль средства. Особенно удобен в этом отношении природный минерал, называемый «каменное масло» (известно также как «горное масло», «горный воск», «белое мумие»). Этот минерал обладает свойствами слабой кислоты и квасцов. Кроме того, он обеспечивает дефицитными микроэлементами окружающую опухоль нормальную ткань. Все это в совокупности обеспечивает высокую избирательность лизирующего действия каменного масла на опухоль при прямом с ней контакте [29].

Таким образом, изучение второго фундаментального отличия опухоли от нормы дало для практики:

 вещества позволяющие устранять предрасположенность к опухолевому перерождению и вообще повышать устойчивость тканевых систем;

 иммунно-химический метод, позволяющий выявлять рак и предрак в организме;

 нетоксический способ избирательно разрушать опухолевые клетки.

Третье фундаментальное отличие опухолевой ткани от нормальной — особенности антиоксидантной системы. Кратко эти особенности можно описать следующим образом: в опухолевой ткани значительно повышены концентрации низкомолекулярных компонентов этой системы и, напротив, значительно снижены активности ферментов. В целом это приводит к слабости антиоксидантной системы. Это отличие с успехом использует фотодинамическая терапия и особенно ферромагнитная хирургия [30].

Четвертое фундаментальное отличие — опухоль гибнет при нагреве до 43.5°С, тогда как нормальные ткани выдерживают нагрев до 44.5°С. Это отличие можно использовать в варианте ферромагнитной хирургии, когда ее сочетают со сверхвысокочастотным нагревом. Есть и другие способы использования этого отличия [30].

ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ОТЛИЧИЙ ОПУХОЛИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

Предрасположенность к опухолевому перерождению можно устранить в раннем постнатальном периоде. Было показано, что десятикратное введение в ткань специфического адгезионного фактора контактина в то время, когда в норме происходит трех-четырехкратное усиление силы сцепления клеток, перепрограммирует работу генома. Это приводит к тому, что нормальная сила сцепления сохраняется всю жизнь, и вероятность возникновения опухоли снижается во много раз [11].

До сих пор нет удобного неинвазивного метода, позволяющего определить состояние предрасположенности ткани органа к опухолевому перерождению. Вероятно, такой метод можно разработать, развивая акустическую технологию, показавшую высокую эффективность при контакте датчика с тканью [31]. Однако отсутствие такой технологии не является серьезным препятствием для использования открытия № 330 в целях профилактики [32].

Во-первых, может быть известно о наследственной предрасположенности некоего органа пациента к появлению в нем опухоли. В этом случае, безусловно, целесообразно уже на первом году жизни такого ребенка применить адгезионный фактор, соответствующий органу, подозреваемому на предрасположенность к возникновению в нем опухоли. Применить адгезионный фактор можно в виде двух-трехнедельного курса — интранозально два раза в день.

Во-вторых, всем младенцам этого возраста можно рекомендовать таким же образом применять адгезионные факторы соединительной ткани. В очень изяшном исследовании, осуществленном Т.С. Колесниченко с коллегами. показачто ЛЛЯ опухолевой трансформации но. канцероген должен подействовать и на эпителиальную ткань, и на соединительнотканную систему. Если соединительная ткань не ослаблена – вероятность опухолевой трансформации мала. Колесниченко изучала трансплацентарный канцерогенез, который реализовался далее в органной культуре. Ткань легких эмбрионов контрольных животных и животных, подвергнутых воздействию уретана, диспергировали, разделяя при этом эпителиальные и соединительнотканные клетки. Затем эти клетки соединяли в четырех возможных комбинациях. Клетки агрегировали, образуя органную культуру, ее культивировали в висячей капле, где культура продолжала развитие. Метаплазия эпителия (опухолевая трансформация) возникала только в том случае, если оба компонента – эпителий и соединительная ткань – подверглись действию уретана [33, 34].

В-третьих, можно воспользоваться вместо адгезионного фактора адаптогеном растительного происхождения, например, радиолой розовой (золотой корень). Показано, что воздействие адаптогена эффективно, как и адгезионного фактора для устранения состояния предрасположенности [11, 35].

Конечно, состояние предрасположенности может возникнуть в любом возрасте под воздействием внешних факторов. Методы устранения этого состояния те же, но надо иметь в виду, что во взрослом состоянии переключение генетической программы удается осуществить только временно (на несколько лет).

Следующим этапом на пути опухолевого перерождения ткани является предрак. В терминах гистологии предрак – очаговая гиперплазия [23]. На этом этапе основные отличия опухолевой ткани – гликолитический метаболизм и контактная стимуляция деления – уже существуют. Следовательно, возможна и диагностика этого состояния – по избыточной теплопродукции и выявлению ЭПА-10, определяющего свойство контактной стимуляции деления. Практически эти возможности реализованы методом радиотермометрии и Ро-теста [36, 37].

Предраковое состояние спонтанно обратимо в 60–70% случаев. Но без целенаправленного воздействия в течение трех-пяти лет в 30–40% случаев предрак переходит в рак [37]. Нетоксическая терапия под мониторинговым контролем радиотермометрии и Ро-теста, как правило, не менее чем в 97–98% случаев за два-четыре месяца позволяет ликвидировать предраковое состояние. «Конструктор», т.е. система технологий, разработанная нами и опробованная более чем на 2000 пациентах, представлена:

методами мониторинга – радиотермометрия, Ро-тест, биоинформационные методы;

- технологиями восстановления и поддержания гомеостаза организма и органов - антистрессорной, активационной терапией, восстановлением и поддержанием микроэлементного баланса (применение препаратов «Геомалин», «Селекор»), восстановлением работы детоксиционной и иммунной систем, мембранно-контактной системы ослабленных органов (использование адгезионных факторов). Геомалин – препарат на основе так называемого «каменного масла», идеально компенсирующий дефицит хрома, никеля, молибдена, марганца, титана, т.е. тех элементов, по которым у онкологических больных имеется значительный дефицит. Третий раздел «Конструктора» - нетоксические способы уничтожения опухолевых клеток. Об этих методах подробнее написано далее.

НЕТОКСИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ УНИЧТОЖЕНИЯ КЛЕТОК, ВСТАВШИХ НА ПУТЬ МАЛИГНИЗАЦИИ

Применение препарата «Бластофаг». Действующим началом данного препарата является вирус с онколитической активностью. «Бластофаг» избирательно нарушает адгезию, синтез ДНК и целостность цитоплазматической мембраны опухолевых клеток. Избирательность действия «Бластофага» на опухолевые клетки базируется на способности вируса размножаться только в клетках с гликолитическим метаболизмом. Важно,

что полулетальная доза «Бластофага» более чем в 1000 раз превосходит терапевтическую дозу. Кроме того, в терапевтической дозе «Бластофаг» мощно стимулирует реакцию бласттрансформации лимфоцитов, укрепляя иммунитет и активирует выработку интерферона организмом [30].

Локальное применение «Геомалина» как онколитического средства позволяет ликвидировать предраковое состояние в легких, молочной, щитовидной и предстательной железах, мочевом пузыре, шейке матки [30].

Интегративная онкология. Избранный нами подход интегративной онкологии позволил использовать все достижения химиотерапии в варианте, исключающем ее токсическое воздействие на организм. Это удается сделать, используя явление информационного переноса действующего начала [39–44]. Само же это явление – проявление пятого фундаментального взаимодействия, т.е. взаимодействия спиновых полей макрообъектов [45, 46].

При лечении онкологических больных используется тот же «конструктор», что и при устранении предракового состояния. «Конструктор» расширяют за счет индивидуального выбора питания и специальных методов психотерапии. Кроме того, к нему добавляют в качестве диагностических и мониторинговых общепринятые методы: ультразвуковое исследование, магнитнорезонансную томографию, компьютерную томографию, сцинцеграфию, позитронно-эмиссионную томографию. Самое главное - весь выше описанный подход нетоксической терапии сочетают с хирургией. В рамках подхода интегративной онкологии, которого мы придерживаемся, взаимодействие с хирургией значительно отличается от подхода, принятого в настоящее время [30].

Использование радиотермометрии и Ро-теста в качестве методов мониторинга позволяет определять в реальном времени активность метаболизма и пролиферации опухолевых клеток. Это дает возможность выбрать благоприятный для операции момент, когда операция будет наиболее безопасна и эффективна с точки зрения окончательного излечения.

Высокая безопасность и эффективность разрушающих опухоль технологий «конструктора» в отношении отдаленных метастазов делает возможным и желательным удаление основного опухолевого очага и на четвертой стадии процесса.

Располагая достаточным временем для подготовки операции, во многих случаях удается добиться значительной регрессии опухоли, что нередко позволяет значительно сократить необходимый объем операции, сделать саму операцию не калечащей, иногда заменить полостную операцию на эндоскопическую. Применение Ро-теста после операции, во время реабилитации, позволяет вовремя обнаружить возобновление онкопроцесса и прекратить его.

Наконец, сам арсенал хирургических методов расширяется за счет включения ферромагнитной хирургии. Этот метод хирургии не требует общего наркоза и позволяет уничтожать опухоль, не удаляя орган, в котором эта опухоль находится. Применение ферромагнитной хирургии позволяет также уничтожать отдаленные метастазы без дополнительного хирургического вмешательства [30].

В целом такой подход позволяет:

 – многократно снизить заболеваемость раком за счет устранения предрасположенности к раковому перерождению, выявления и устранения предракового состояния;

– в большинстве случаев добиться полного излечения, в том числе и на третьей-четвертой стадиях, не калеча организм. Именно излечения, а не жалкого продления жизни на пять лет, при том, что при применении химиотерапии не менее 16% пациентов в течение этого периода заболевают новым злокачественным заболеванием, вызванным таким лечением [47].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено на собственные средства автора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. L. Foulds, J. Natl. Cancer Inst. 17, 755 (1956).
- 2. O. Warburg, *Uber den Stoffwechsel der Tumoren* (Springler, Berlin, 1926)
- 3. И. Ф. Сейц и П. Г. Князев, Молекулярная онкология (М., 1986).
- 4. И. В. Косьяненко и О. А. Кульская, *Микроэлементы у больных раком и предопухолевым состоянием внутренних органов* (Наук. думка, Киев, 1972).
- 5. D. R. Green and J. C. Reed, Science 281, 1301 (1998).
- В. Н. Гобеев, С. Я. Давыдова, Л. В. Хрипач и В. С. Шапот, Докл. АН СССР 226 (3), 1210 (1976).
- 7. D. R. Coman, Cancer Res. 4, 625 (1944).
- A. G. Malenkov and E. A. Modjanova, Exper. Cell Res. 76, 305 (1973).

- А. Г. Маленков, Е. А. Модянова и И. М. Колотыгина, Биофизика 35 (2), 356 (1990).
- О. А. Бочарова и Е. А. Модянова, Онтогенез, № 4, 427 (1882).
- А. Г. Маленков и Е. А. Модянова, Биологические основы профилактики и нетоксической терапии рака (Маджерик, М., 2006).
- А. Г. Маленков и Е. А. Модянова, Цитология 8 (5), 539 (1966).
- А. Г. Маленков и Е. А. Модянова, Цитология 12, 388 (1970).
- 14. Е. А. Модянова, Онтогенез 5 (2), 198 (1974).
- 15. В. Ф. Ушаков, Биофизика 25 (3), 499 (1980).
- А. Г. Маленков и Е. А. Модянова, Цитология 17 (10), 1155 (1975).
- 17. А. Г. Маленков, Е. А. Модянова и В. П. Ямскова, Цитология **20** (8), 957 (1978).
- Н. Н. Касаткина и Е. А. Модянова, Цитология 24 (9), 53 (1982).
- 19. С. В. Конев, Структурная лабильность биологических мембран (Наука и техника, Минск, 1987).
- Ju. Vasiliev, I. M. Gelfand, V. I. Gelshtein, and A. G. Malenkov, Inter. J. Cancer 1, 451 (1973).
- 21. А. И. Агеенко, Новая диагностика рака. Теория, диагностика, реабилитация (РАЕН, М., 2003).
- 22. А. И. Агеенко и В. С. Ерхов, в сб. Актуальные проблемы проктологии (Нижний Новгород, 1994), сс. 71-72.
- 23. Л. М. Шабад, Предрак в экспериментально-морфологическом аспекте (Медицина, М., 1961).
- 24. В. П. Ямскова и И. А. Ямсков, Онтогенез **31 (**4), 69 (2003).
- 25. В. П. Ямскова и И. А. Ямсков, Онтогенез **31** (4), 270 (2003).
- 26. А. Г. Маленков, Биофизика 63, 613, 2018).
- 27. A. G. Malenkov, V. L. Vojekov, and Ju. A. Ovchinnikov, Biochim. Biophys. Acta **255**, 254 (1973).
- 28. Б. С. Балмуханов, Изв. КазАН ССР 1, 54 (1971).
- 29. А. Г. Маленков, Патент № 2 034 543, Способы локального применения минерала «каменное масло», как опухоль разрушающего средства (2000).

- А. Г. Маленков и Л. Н. Мишуркина, Интегративная онкология. Наш опыт (Евразия, Оренбург, 2018).
- 31. А. Г. Маленков и К. В. Асоян, Биофизика **28** (2), 326 (1883).
- А. Г. Маленков, Е. А. Модянова и О. А. Бочарова, Открытие № 330 (1986).
- Т. С. Колесниченко, Е. Е. Антошина и А. Л. Медвинский, в сб. Материалылы IV Всес. съезда онкологов (Л., 1986), сс. 525–529.
- Т. С. Колесниченко и А. Л. Медвинский, Онтогенез 13 (3), 293 (1985).
- 35. О. А. Бочарова и А. Ю. Барышников, Фитоадаптогены в онкологии (М., 2004).
- 36. В. С. Вайсблат, Патент № 2 082 118, Медицинский радиотермометр (1994).
- 37. А. И. Агеенко и В. С. Ерхов, Патент № 2, Ро-тест.
- 38. M. Gautherie, in Biomedical Thermology (1982), p. 21.
- 39. А. Е. Бояршинов, А. В. Клюев, Н. А. Кокарева и др., Патент № 2 324 575, Способ обработки расплавленных материалов электро-магнитными полями (2008).
- 40. А. Е. Бояршинов, А. В. Клюев, Н. А. Кокарева и др., Металловедение и термообработка, № 7, 3 (2009).
- В. Я. Тарасенко и С. Ю. Толмачёв, Патент № 2 297 392, Устройство для обработки водных растворов «Акватор» от 28.12.2004.
- 42. С. Ю. Толмачев и А. И. Чабан, Агропромышленная газета Юга России, № 5-6 (2010).
- С. Ю. Толмачев и А. И. Чабан, Агробизнес, № 6 (52), 80 (2018).
- 44. Е. Г. Квартикова, С. Ю. Толмачев и А. И.Чабан, Эффективное животноводство, № 1, 80 (2019).
- 45. А. В. Бобров, Журнал формирующихся направлений науки, № 1 (1), 48 (2013)
- 46. А. В. Бобров, Журнал формирующихся направлений науки, № 1 (2), 8 (2013)
- Г. А. Белицкий, Е. А. Лесовая, К. И. Кирсанов и М. Г. Якубовская, Успехи молек. онкологии, № 3, 44 (2016).

Fundamental Biophysical Differences between Tumor Tissue and Normal Tissue and Their Use in Diagnostics and Treatment

A.G. Malenkov

LLC "Scientific Center for Integrative Medicine", ul. 2-ya Sinichkina 26-29, Moscow, 111020 Russia

Four universal differences between tumor and normal cells and tissues are described. It is shown how these differences can be used for cancer diagnostics and non-toxic therapy. It is concluded that already existing methods which have been developed taking into account these differences but as yet not widely used may help improve detection of cancer by an order as a result to reduce cancer incidence and significantly increase the level of full recovery while being in stage 3 and stage 4 of disease.

Keywords: glycolysis, contact stimulation of division, adhesive factors, oncolytic virus, ferromagnetic surgical system, phenomenon of information transfer of active substance

—— ДИСКУССИИ ——

УДК 577.35

ГИПОТЕЗА ОБ ЭНТРОПИЙНОМ ИНВАРИАНТЕ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОРГАНИЗМОВ

© 2021 г. В.Т. Волов

Самарский государственный университет путей сообщения, 443110, Самара, ул. Свободы, 2в E-mail: vtvolov@mail.ru Поступила в редакцию 20.12.2019 г. После доработки 18.01.2021 г.

Принята к публикации 22.01.2021 г.

Представлены обзор исследований, посвященных проблеме собственного (физиологического) времени биологических организмов и интегральных характеристик их жизнедеятельности, и результаты оригинальных исследований автора. Сформулирована гипотеза об инвариантности вновь введенной интегральной характеристики жизни организма – функционала действия энтропии. Согласно данной гипотезе, значение функционала действия энтропии является одинаковым для всех организмов конкретного вида. Базируясь на предложенной гипотезе, выявлена связь между собственным и хронологическим временами жизни организма. Полученная формула этой связи включает фундаментальную функцию теории структуры И. Пригожина – второй дифференциал энтропии. Показано, что собственное время жизни организма имеет фрактальную структуру. Предложена формула математической меры – детерминированной энтропии метаболизма организмов. Обсуждаются возможные перспективы тестирования предложенной гипотезы для организмов.

Ключевые слова: константа Рубнера, энтропийный инвариант, собственное (физиологическое) время организма, функционал действия энтропии, второй дифференциал энтропии. **DOI:** 10.31857/S0006302921020236

В фундаментальных работах И. Пригожина [1, 2, 3] разработана теория структуры или неравновесной термодинамики, ставшая основой прорывного направления в науке конца XX-начала XXI века – синергетики. Преимуществом термодинамического подхода И. Пригожина является отсутствие необходимости эмпирического определения параметров порядка системы [4], поскольку в данном подходе используется универсальный аппарат термодинамики (II начало термодинамики, теорема о минимуме производства энтропии, понятие «локального равновесия»).

Главной причиной, побудившей И. Пригожина заняться разработкой «теории структуры», было, с его точки зрения, противоречие, заключавшееся в отсутствии в термодинамике такой важнейшей величины, как время, с одной стороны, и противоречие со II началом термодинамики факта существования организмов — с другой стороны. Однако, как известно, время жизни организмов варьируется в достаточно широком диапазоне, т.е. продолжительность жизни организма конкретного вида может существенно отличаться от максимального значения в популяции. Данное обстоятельство побудило автора статьи преодолеть данное противоречие.

Необходимо отметить, что проблема собственного (индивидуального) времени развития организмов имеет довольно длинную историю в биологической науке, начиная с классических работ М. Рубнера [5] и его последователей [6-10], а также работ, представленных в исследованиях конца XX – начала XXI веков [11–18], где, в частности, предпринимались попытки термодинамического подхода решения данной проблемы. Осознание того, что живой организм существует в собственном времени, скорость течения которого зависит от различных процессов, происходящих в организме, пришло достаточно давно. Одна из первых попыток формализации понятия собственного времени организма была предпринята Г. Бакманом [7]. В качестве определяющего процесса Бакман выделил процесс роста организма. Собственное время организма по Бакману могло принимать как положительные, так и отрицательные значения, а в момент достижения половой зрелости становилось равным нулю. Функция роста массы организма также была принята за основу при определении собственного времени в работах [18, 19].

В работах [14–21] дано определение единицы собственного времени организма, которая опре-

деляется как время удвоения массы и растет с увеличением общей массы организма.

Необходимо подчеркнуть, что собственное время, определенное в работе [18] как $\tau(t) = w(t)/W'(t)$, имеет место только для организмов не имеющих границ роста.

В исследовании [20] в качестве меры собственного времени был принят период эмбрионального развития – интервал времени между появлением одноименных фаз митоза двух последовательделений дробления. Определение ных собственного (физиологического) времени, основанное на процессе метаболизма, предложил Дж. Райс [21]. Он в качестве основы собственного (физиологического) времени взял введенное М. Боддингтоном [22] понятие «показатель абсолютного метаболизма» (absolute metabolic scope) константу, равную произведению максимальной длительности жизни (пропорциональной $W^{1/4}$) и скорости базального метаболизма, деленному на единицу массы ($W^{-1/4}$, где W – масса взрослого организма (достигшего границы роста). Данная константа представляет собой минимальное количество энергии, потребленное единицей массы организма за время жизни, и не зависит от значения W. Данная константа имеет размерность $EM^{-1}T^{-1}$. Пренебрежение временем развития организма от момента зарождения до момента достижения массы Шприводит к тому, что показатель абсолютного метаболизма оказывается равным константе Рубнера и может служить, согласно работе [21], инвариантом максимального возраста.

Недостатком введенного Боддингтоном «показателя абсолютного метаболизма» было то, что показатель не учитывал изменения массы и скорости удельного метаболизма организма в онтогенезе, в частности, в раннем возрасте скорость метаболизма выше, чем в остальное время жизни. Учитывая данный факт, Райс ввел понятие «удельный метаболизм за время жизни» и определил его следующим образом:

Specific limetime metabolism =
$$\int_{t_0}^{t_{max}} q(t) dt$$
, (1)

где q(t) = Q(t)/w(t) – удельная скорость потребления энергии (кислорода), Q(t) – потребление энергии организмом в единицу физического времени, w(t) – значение массы организма в текущий момент времени, t_{max} и t_0 – продолжительность жизни и начальное время организма соответственно.

Вводя гипотезу о пропорциональности скорости физиологического времени и удельного метаболизма, Боддингтон дал его определение [21]:

Physiological time =
$$\int_{t_{\alpha}}^{t_{\beta}} q(t) dt$$
, (2)

где t_{α} и t_{β} — соответственно начало и конец рассматриваемого периода. Физиологическому времени (2) придается размерность EM^{-1} (выражается в ккал/г сухой массы, понимаемой как соответствующее количество единиц физиологического времени).

Базируясь на предложенной Рубнером гипотезе о приблизительно равном количестве энергии, используемом единицей массы взрослого животного за период жизни от момента прекращения роста до смерти для некоторых видов млекопитающих, Э. Бауэр [6] распространил это равенство потребления энергии на единицу массы животного на весь период жизни и на животных других уровней организации. Данную количественную меру Бауэр [6] назвал константой Рубнера, которая определялась как произведение основного обмена за сутки на продолжительность жизни в сутках, деленное на массу организма. Тем не менее позже Бауэр подтвердил неправомочность расширения предложенного понятия и предположил, что константа Рубнера является критерием принадлежности животного к определенному уровню эволюционного развития и определяется приблизительно одинаковой свободной энергией зародышевых клеток внутри него. С ростом сложности организации животных в процессе эволюции данная константа увеличивается.

Анализ научной литературы по данному вопросу приводит к выводу, что в большинстве случаев этому понятию придается не тот смысл, что оно имело первоначально. В биологической литературе конца XX — начале XXI века часто константой Рубнера называют суммарный удельный метаболизм за весь период жизни животного [11— 19]. Например, в исследованиях [18, 19], базируясь на вышеотмеченных работах [6, 21], константой Рубнера называют следующую величину:

$$t_{\max} \ \overline{q}(t) = \int_{0}^{t_{\max}} q(t) dt, \qquad (3)$$

где \overline{q} – усредненный удельный метаболизм за весь период жизни [0, t_{max}]. Принимается, что величина (3) может служить характеристикой вида, т.е. имеет определенное значение для каждого вида. Отсюда следует, что имеет место существенное отличие от определения, данного Рубнером: а) константой Рубнера называют не суммарное количество энергии, использованное единицей активной массы организма за всю жизнь от момента прекращения роста до смерти, а суммарный метаболизм единицы массы организма за всю жизнь (E_{max}); б) считается доказанным по-





Рис. 1. Иллюстрация эталонного тренда энтропии в течении жизни организма: (a) $-\tilde{N}_{\max}^{i}$, \tilde{N}_{\min}^{i} , $\tilde{N}_{paзb}^{i}$, – максимальное и минимальное значения энтропии, а также значение энтропии развитого организма *i*-го вида соответств енно, T_{fact}^{i} – фактическое время жизни *i*-го вида организма; (б) – H_0 – энтропия «золотого сечения», \bar{t} – нормированное время организма.

стоянство величины E_{\max} для вида. Между тем Рубнер показал, что величину $\int_{t_A}^{t_{\max}} q(t)dt$ можно считать постоянной только при достаточно большом разбросе конкретных значений.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что, как отмечено в работе [18], постулирование постоянства «константы Рубнера» для конкретного вида организмов, в том числе пойкилотермных животных, например для моллюсков и рыб, не имеющих границы роста [17], представляется необоснованным.

В представленной статье вводится новая интегральная характеристики жизни организма – так называемый функционал действия энтропии и выдвигается гипотеза его инвариантности для организмов конкретного вида. На основе данной гипотезы определяется собственное (физиологическое) время жизни организма и устанавливается связь между собственным и хронологическим временем. Базируясь на предложенной гипотезе и фундаментальном аппарате неравновесной термодинамики [1-4], а также инструментарии фрактально-кластерной теории [23-25], закладываются основы термодинамической теории эволюции организма. Следует отметить, что аппарат линейной термодинамики неравновесных процессов И. Пригожина предназначен для исследования самоорганизующихся систем, находящихся вблизи положения равновесия [1-3], в то время как для исследования самоорганизую-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

щихся систем вдали от равновесия необходима информация из дополнительных эмпирических данных по квадратичной форме — производству избыточной энтропии. Данное противоречие преодолевается в цитируемой выше литературе с помощью фрактально-кластерной теории [23— 25], разработанной для самоорганизующихся систем класса «организм». В статье используются эквивалентные понятия «собственное» и «физиологическое» время развития организма.

ФУНКЦИОНАЛ ДЕЙСТВИЯ ЭНТРОПИИ И ЕГО ИНВАРИАНТНОСТЬ

Смысл определяемого нами функционала действия энтропии заключается в следующем. Допустим, что имеется тренд энтропии развития организма, представленной на рис. 1. В контексте настоящего исследования, энтропия представляет собой математическую меру, отвечающую правилам построения теории математической энтропии [8]. Представленная математическая мера определяет интегральную характеристику состояния всего организма. Этой измеряемой характеристикой может быть, например, метаболизм, рост организма (для организмов, не имеющих границ роста), водно-белковый, кислотно-щелочной баланс, липидный обмен, иммунный статус, гормональный фон и т.д., а также нормированная мера всех вышеперечисленных характеристик организма. Из данной иллюстрации следует, что имеется три периода: первый - устойчивый рост $(\delta^2 \tilde{H} > 0)$; второй – гомеостаз $(\delta^2 \tilde{H} \approx 0)$ и третий – неустойчивое развитие (старение) «организма» ($\delta^2 \tilde{H} < 0$). Эталонный тренд эволюции энтропии (рис. 1) согласуется, во-первых, со вторым началом термодинамики для необратимых неравновесных процессов $(d\tilde{H} / dt \ge 0)$, во-вторых, с фундаментальной теоремой неравновесной термодинамики о минимуме производства энтропии [1-3] и, в-третьих, с опытом жизнедеятельности самоорганизующихся систем различной природы – биологическим, социально-экономическим и др. [23-25]. Производство энтропии (P = dH/dt), согласно эталонному тренду, на этапе развития (I) уменьшается до нуля (II этап), а затем начинает экспоненциально возрастать (III этап). Согласно положениям неравновесной термодинамики, I этап соответствует уменьшению диссипативных процессов в системе, второй этап – балансу регенеративных и диссипативных этап – интенсивному процессов, а III увеличению диссипаций в системе, которые в конечном результате приводят к ее полному разрушению.

Например, для человека энтропийный тренд (рис. 1) можно интерпретировать следующим образом: первый этап связан с энергией роста ребенка, второй – энергетический баланс между регенеративными и диссипативными процессами организма, а третий – например, с энергией роста патологических образований, приводящих в конечном счете к его смерти.

Согласно общему определению энтропии [26, 27], энтропия «организма» есть функция \tilde{H} его состояния, которая удовлетворяет следующим свойствам:

1) Аддитивность
$$\tilde{H} \ge \sum_{l=1}^{N} \tilde{H}_{l}$$
, т.е. энтропия си-

стемы не может быть меньше суммы энтропий подсистем, из которых она состоит (здесь знак «>» относится к случаю взаимозависимости подсистем).

2) Приращение энтропии $d\widetilde{H}$ есть сумма ее приращения за счет взаимодействия с внешними системами $d\widetilde{H}^{\text{ext}}$ и ее приращения за счет внутренних изменений в системы $d\widetilde{H}^{\text{inner}}$:

$$d\tilde{H} = d\tilde{H}^{\text{inner}} + d\tilde{H}^{\text{ext}}$$

3) Внутреннее приращение энтропии всегда неотрицательно, т.е. $d\widetilde{H}^{\text{inner}} \ge 0$.

- 4) Ограниченность $\exists \widetilde{H}_{\max} > 0: \widetilde{H} \leq \widetilde{H}_{\max}$.
- 5) Неотрицательность $H \ge 0$.

В дальнейшем мы будем обозначать через \tilde{H}_i энтропию, относящуюся к определенному *i*-му виду организмов. Величину \tilde{H}_i , удовлетворяющую свойствам 1–5, удобно нормировать:

$$H_i = \frac{\tilde{H}_i}{\tilde{H}_i^{\max}},$$

где \widetilde{H}_i^{\max} — максимальное значение энтропии организма данного типа, и считать, что $0 \le H_i \le 1$.

Введем новую физическую величину — функционал действия энтропии — для самоорганизующейся системы, определяемую следующим образом:

$$F_{H_i}^{\text{action}} = \int_{t_1}^{t_2} \tilde{H}_i dt, \qquad (4)$$

где t_1 и t_2 – начальное и конечное время ее развития; \tilde{H}_i – размерное текущее значение энтропии определенного организма.

Предлагаемая гипотеза об энтропийном инварианте для организмов заключается в постулировании инвариантности функционала действия энтропии F_{H}^{action} :

$$\int_{0}^{T^{i}_{\text{fact}}} \tilde{H}_{i}(t) dt = \int_{0}^{T^{i}_{\text{max}}} \tilde{H}_{i}^{\text{ideal}}(t) dt = const \equiv \gamma_{i}, \quad (5)$$

где $\tilde{H}_i(t)$ — тренд энтропии конкретного организма из выбранного i-го вида как функции времени t, T_i^{fact} — фактическое время жизни организма, $\tilde{N}_i^{\text{ideal}}(t)$ — идеальный (эталонный) тренд энтропии, T_i^{max} — идеальное (максимальное) фактическое время жизни организма. Соотношение (5) представляет константу для конкретного i-го вида организма.

Согласно свойству 2) энтропии имеем

$$dH_i = dH_i^{\text{inner}} + dH_i^{\text{ext}}.$$
 (6)

Здесь внутреннее изменение энтропии dH_i^{inner} обусловлено естественным старением системы, а ее внешнее изменение dH_i^{ext} связанно с взаимодействием с внешней средой (другими системами); dH_i^{ext} может иметь как положительное, так и отрицательное значение. Ниже мы будем исследовать только случай слабой зависимости $H_i^{\text{inner}} = fH_i^{\text{ext}}$). Идеальный или эталонный тренд энтропии (рис. 1) реализуется при $dH_i^{\text{ext}} \rightarrow \text{min.}$



Рис. 2. Иллюстрация гипотезы о постоянстве функционала действия энтропии для организма. $H_{\text{max}}^{\text{ideal}}$, $H_{\text{max}}^{\text{fact}}$ – максимальное значение идеального и фактического трендов соответственно; T_{max} , T_{fact} – максимальное и фактическое время жизни организма конкретного вида соответственно.

Введя безразмерные обозначения $\bar{t} = \frac{t}{T_i^{\text{max}}}$ и

 $\beta_i = rac{ ilde{H}_i^{ ext{ideal}}}{ ilde{H}_{ ext{max}}^{ ext{ideal}}},$ уравнение (5) можно переписать в виде:

$$\tilde{H}_{i}^{\max} \int_{0}^{\xi_{i}} H_{i} d\overline{t} = \tilde{H}_{i_{\max}}^{\text{ideal}} \int_{0}^{1} H_{i}^{\text{ideal}} d\overline{t}, \qquad (7)$$

где $\xi_i = \frac{T_i^{\text{ract}}}{T_i^{\text{max}}}$. В дальнейшем при рассмотрении конкретного организма мы будем опускать индекс *i*.

При расчете интеграла (7) по эталонному тренду энтропии (рис. 1б) был использован принцип симметрии и принцип «золотого сечения» [27]. Проблеме взаимосвязи «золотого сечения» и строения и функционирования организмов, начиная с Древней Греции и в эпоху Возрождения, посвящено значительное количество публикаций и исследований. Люди находили «золотое сечение» в различных пропорциях живых организмов [24, 27, 28]. Эта пропорция проявилась не только в пропорциях организма, но и в функциональных характеристиках организмов (нормативы артериального давления (80/120 мм рт. ст.), соотношение осевой и вращательной составляющих кровотока в сосудах и так далее). Существует мнение, отраженное в различных научных публикациях, что наличие «золотого сечения» во множестве наблюдаемых в природе фактов отнюдь не случайно, а закономерно. Как известно, существуют несколько видов баланса: дихотомия, т. е. деление

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

отрезка пополам (0.5/0.5), и «золотое сечение» (0.38/0.62). Таким образом, у живых существ проблема «золотого сечения» четко коррелирует с обобщенной проблемой устойчивости (гомеостаза) организмов. Не случайно в этой связи была разработана математическая теория «золотого сечения» [27].

В соответствии с теоремой о среднем для монотонных функций, принципом симметрии $(\Delta ABH_0 \approx \Delta CH_0 D)$ и принципом «золотого сечения» [28] интеграл (7) будет равен:

$$\int_{0}^{1} H^{\text{ideal}} d\overline{t} \equiv H_0 \approx 0.618.$$
(8)

2. СВЯЗЬ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ОРГАНИЗМА С ХРОНОЛОГИЧЕСКИМ ВРЕМЕНЕМ

Для организма, находящегося в реальных условиях, фактическое время жизни Т будет отличаться от максимального времени жизни организма T_{max}, соответствующего идеальному (эталонному) тренду (рис. 2). Если перенести данное утверждение на человека, то можно представить следующую ситуацию: в горах Азербайджана, где, как известно, живут долгожители, родились близнецы. Один из них остался жить в горах, в экологически чистом месте, дышал ионизированным горным воздухом, питался натуральными продуктами, выращенными в горах, не имел вредных привычек и так далее и, как результат, дожил до своих 120 лет. Другой близнец спустился с гор в город, где экологическая обстановка была далека от международных стандартов, питался продуктами с разнообразными добавками, имел весь спектр вредных привычек и постоянные стрессы и, как результат, дожил до 69 лет. Налицо реализация, так называемого, принципа «шагреневой кожи» В данном случае «аналогом» «шагреневой кожи» является интегративная мера состояния

здоровья — это энтропийный инвариант F_{H}^{action} — энтропия действия. Увеличение энтропии, адаптированной организмом, приводит к сокращению длительности жизни.

Однако в силу свойства ограниченности условной энтропии (4) выполнение гипотезы об энтропийном инварианте на всем протяжении жизни организма может реализовываться только на определенном интервале шкалы хронологического времени:

$$H_0 \cdot T_{\max} < T_{\text{fact}} < T_{\max}$$
.

При временах жизни организма T_{fact} , меньших значения H_0 . T_{max} , для выполнения гипотезы энтропийного инварианта необходимо ввести новую шкалу времени (индивидуальное время организма) описываемую переменной θ , которая будет отличаться от шкалы хронологического времени (переменная t). Индивидуальное время всей жизни организма будем обозначать как Θ . Оно определяется требованием выполнения следующей гипотезы:

$$\int_{0}^{\Theta} \tilde{H}(\tau) d\tau = \int_{0}^{T_{\text{max}}} \tilde{H}^{\text{ideal}}(t) dt.$$
(9)

Из условия ограниченности энтропии (4) и выполнения энтропийного инварианта следует, что индивидуальное время организма имеет фрактальную структуру. Под термином «фрактальная» структура понимается дробная степенная зависимость между физическими величинами в исследуемом процессе или явлении. Из соотношения (10) при предположении равенства максимальной продолжительности жизни организма в собственном (Θ) и хронологическом (физическом) времени T_{max} следует $T_{\text{fact}}^{D} = \Theta$, где $D \ge 1$. Величина D может быть интерпретирована как формальный аналог фрактальной размерности собственного времени жизни организма и определена из уравнения

$$\int_{0}^{T_{\text{fact}}^{D}} H(\tau) d\tau = \beta \int_{0}^{T_{\text{max}}} H^{\text{ideal}}(t) dt = \beta H_{0}T_{\text{max}}, \quad (10)$$
где $\beta = \frac{\tilde{H}_{\text{max}}^{\text{ideal}}}{\tilde{H}_{\text{max}}}.$

Возникает вопрос: как связано текущее индивидуальное время в жизни организма и хронологическое время? Гипотеза об инвариантности энтропийного функционала (действия энтропии) была сформулирована для всего времени жизни организма. Требование инвариантности действия энтропии для любого временного интервала приводит к появлению новой временной шкалы шкалы индивидуального (или собственного) времени θ . А именно, мы потребуем, чтобы для любого временного отрезка [t_1, t_2] существовал такой отрезок [θ_1, θ_2] на оси индивидуального времени, что

$$\int_{\theta_{1}}^{\theta_{2}} H(\Theta') d\Theta' = \beta \int_{t_{1}}^{t_{2}} H_{0} dt.$$

Это означает, что имеется следующее биективное отображение между переменными хронологического t и индивидуального времени θ , которое выражается следующей формулой:

$$\int_{0}^{\theta} H(\theta') d\theta' = \beta H_0 \Delta t$$
(11)

и которое в дифференциальной форме принимает вид:

$$d\theta \frac{H(\theta)}{\beta H_0} = dt.$$
(12)

Разобьем временной отрезок $[0,\Delta t]$ на конечные временные шаги величиной Δt_j , где j – номер шага. Такому разбиению будет соответствовать разбиение интервала $[0, \theta]$ на отрезки величиной $\Delta \theta_j$. Используя теорему о среднем и разлагая с точностью до членов второго порядка в ряд Тейлора значение энтропии $H(\theta')$ на отрезке $[0, \theta]$ относительно ее равновесного значения H_j на j-м временном отрезке после интегрирования в уравнении (11), получаем:

$$\Delta \theta_j = W_j \Delta t_j, \tag{13}$$

где $W_j(H) \equiv \frac{\beta H_0/H_j}{1 + \frac{\delta H_j}{H_j} + \frac{\delta^2 H_j}{H_j}}, H_j$ – равновесное зна-

чение энтропии на *j*-м отрезке, δH_j и $\delta^2 H_j$ – члены, пропорциональные значениям первого и второго дифференциала тренда энтропии. Динамика изменения численного значения второго дифференциала тренда энтропии определяет устойчивость функционирования организма и в соответствии с предложенной гипотезой энтропийного инварианта показывает отличие его собственного (физиологического) времени от хронологического.

Соотношение (13) позволяет определить замедление или ускорение индивидуального времени организма по сравнению с хронологическим временем как функцию энтропийного фактора.



Рис. 3. Иллюстрация связи индивидуального времени с хронологическим временем: T и T_{fact} – максимальная и фактическая продолжительность жизни организма, τ_{fact} и τ^{ideal} – фактическое и максимальное (идеальное) значение собственного времени организма.

Как следует из формулы (13), текущее значение индивидуального времени организма зависит от фундаментальной величины теории И. Пригожина – второго дифференциала энтропии $\delta^2 H$, а также от первого дифференциала энтропии δ*H*. В случае отрицательного значения $\delta^2 H$ и при условии, что $|\delta^2 H| > |\delta H|$, собственное время организма $\Delta \theta_i$ больше хронологического Δt_i , в противном случае собственное время меньше хронологического. На рис. 3 представлена геометрическая иллюстрация соотношения (13). Изоморфное соответствие между индивидуальным и хронологическим временами определяется кривизной тренда энтропии, которая определяется из опыта или расчета, например, используя аналитический аппарат фрактально-кластерной теории [19].

Уравнение (13), формализующее гипотезу инвариантности функционала действия энтропии для полной продолжительности организма (глобальная инвариантность), можно переписать с учетом выше приведенных допущений для отрезка времени (локальная инвариантность) следующим образом:

$$\Delta t_i^{D_j} = \Delta \theta_i, \tag{14}$$

где величина D_j может быть интерпретирована как аналог фрактальной размерности шкалы собственного времени организма. Эта величина может быть определена как формальное решение уравнения

т.е.

$$\Delta I_j \stackrel{\wedge}{=} W_j \cdot \Delta I_j, \tag{13}$$

(15)

$$D_j = 1 + \frac{\log W_j}{\log \Delta t_i}.$$
 (16)

Из соотношения (16) следует, что размерность D_j текущего индивидуального времени на *j*-м отрезке, в отличие от усредненной размерности индивидуального времени жизни организма D, мо-

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

• , D:

жет принимать значение как больше, так и меньше единицы.

НЕПРЕРЫВНО-ДИСКРЕТНОЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЕ ПРОСТРАНСТВО-ВРЕМЯ ОРГАНИЗМА

Изучению свойств непрерывно-дискретного пространства-времени посвящено значительное число исследований философов, начиная с античных времен [28, 29] и до современного изучения данной проблемы [30]. В работе В.И. Вернадского [31] время рассматривается как единство длительности (дления) и бренности (разрушения и длительности). Существенное число исследований в психофизиологии посвящено проблеме индивидуального времени [32-37]. Психика человека, дублирующая работу центральной нервной системы для более совершенной адаптации организма и личности в окружающей действительности (изначально только к биологической и материальной, а затем и к социальной), является наиболее сложной, а поэтому и наиболее информативной системой на предмет исследования собственного времени. Проблема психофизиологического параллелизма была поднята Р. Декартом еще в XVIII веке. С тех пор многочисленные и разноплановые работы по выявлению механизмов и характера взаимосвязи психического и физиологического открыли путь к созданию психофизиологии, нейропсихологии ряда и наук о мозге. Протекание психических функций, как и их развитие, неизбежно привело к вопросу индивидуального времени. В тех редких трудах, в которых этот вопрос был поставлен открыто, были получены мировые открытия в области психологии. Так, например, на основе идей Л.С. Выготского были открыты законы гетерохронии в развитии центральной нервной системы, а также общие законы психического развития в норме и при дизонтогенезе, легшие в основу дефектологии, специальной психологии, коррекционной педагогики и др. [32]. Кроме того, сама постанов-

ка проблемы темпа и времени развития высших психических функций как «психологических систем», их несовпадения во времени, предопределило появление науки нейропсихологии, открывшей законы функционирования головного мозга при формировании и реализации высших психических функций, и понимание основ происхождения психики как системы (культурно-историческая теория). Однако прецедент в постановке вопроса о собственном (индивидуальном) психическом времени был совершен еще З. Фрейдом [33], вне связи с физиологией. Идея влечения к смерти в психодинамике больного неврозом и здорового индивида получила адекватное развитие в теории Г.М. Назлояна [34], введшего понятие «психической смерти» и «психической паузы», ставшей основой уникальной психотехнологии в лечении шизофрении [34]. Восприятие и переживание времени как когнитивный феномен был исследован в работах Б.И. Цуканова, выявившего инвариант временного самоощущения, который оказался врожденной константой биологических часов индивида [35]. В обыденной жизни феномен ускорения и замедления индивидуального времени известен по данным интроспекции (самоотчет на основе субъективных данных). Так, по ощущению в детстве (этап I на рис. 1) собственное время течет медленнее, а в зрелом возрасте, с годами, все быстрее и быстрее (этап III на рис.1).

Наиболее близкой работой в этом ряду к настоящему исследованию является монография В.И. Жаркова [30]. Сформулированные в вышеприведенных работах свойства дискретности пространства и индивидуального времени и континуальности единого пространства-времени соответствуют предложенному энтропийному инварианту. Дискретность энтропии сложной системы (организма) может быть объяснена особенностью термодинамического метода описания явлений: любой неравновесный процесс заменяется совокупностью равновесных процессов. В контексте настоящей работы непрерывность пространства-времени сложной системы проявляется в инвариантности функционала действия энтропии (4).

Следует отметить, что минимальный масштаб времени, на котором можно исследовать самоорганизующуюся систему, будет различен для различных видов организмов, но для любой эволюции системы каждый ее временный этап будет кратен ее минимальному временному масштабу Δt_{\min} , т.е.

$$\Delta t_i = M_i \Delta t_{\min}, \tag{17}$$

где M_i – натуральное число, зависящее от номера этапа *i*.

Примем, что минимальный масштаб времени в шкале хронологического и индивидуального времени один и тот же:

$$\Delta t_{\min} = \Delta \theta_{\min}$$

Тогда

$$\Delta \theta_j = N_j \Delta \theta_{\min},$$

где N_i – натуральное число, и мы имеем:

$$N_i = W_i \cdot M_j. \tag{18}$$

Из анализа различных процессов в организмах следует, что имеет место иерархия их длительности. Так, например, у человека время импульсов в нейронах мозга соответствует $\Delta t = 10^{-5}$ с, α -циклы мозга имеют длительность $\Delta t = 0.1$ с, частота сердечных сокращений составляет примерно 1 Гц, т.е. один удар в секунду. Однако в контексте настоящего исследования важен минимальный промежуток времени, в течение которого происходит значимые измеряемые изменения состояния организма. Возможно, инвариант временного самоощущения, выявленного Б.И. Цукановым [39], который оказался врожденной константой биологических часов индивида, может быть связан с минимальным масштабом времени Δt_{\min} . Однако данное предположение требует отдельного изучения.

Очевидно, что в контексте предлагаемой гипотезы энтропийного инварианта целесообразно ввести понятие условного «кванта» действия энтропии или «кванта» старения организма, представляющего собой порцию энтропии, получаемой (генерируемой) организмом за минимально возможный промежуток времени своего развития Δt_{min} :

$$\varepsilon_i = \Delta t_{\min} \cdot H_i. \tag{19}$$

Примем, что при выборе масштаба деления шкалы времени внутри отрезка длительности Δt_i кривизна тренда энтропии будет иметь постоянное значение ($\delta^2 H = \text{const}$). Уравнение (15) с учетом «квантования» действия энтропии примет следующий вид:

$$D_j = 1 + \frac{\log W_j(H)}{\log (M_j \cdot \Delta t_{\min})}.$$
(20)

В уравнении (20) осуществлена перенормировка времени на максимальное время жизни организма и оно дает связь между размерностью текущего индивидуального времени, энтропией и минимальным масштабом времени.

Водоем	W _{inf} , г.	k	$T_{ m fact}$, годы	<i>W</i> , г	E_{\max} , ккал/г	$F_i(H_i)$	Источник
Оз. Баунт	3212	0.621	9	1946	91	0.619	Бобков и др., 1987 [40]
Оз. Чернявское	4917	0.570	10	3040	93	93 0.627	
Оз. Кудо	8801	0.394	14	5261	114 0.622		Руденко, 2000 [43]
Оз. Жемчужное	7525	0.368	15	4496	123 0.618		
Оз. Сомнино	17411	0.257	19	10633	132 0.6077		
Оз. Ужо	13259	0.267	21	8048	150	0.621	
Оз. Кокотель	22823	0.240	24	13870	157	0.631	Бобков, Соколов,198 8 [41]
Оз. Кривое	52519	0.175	32	31890	176	0.632	Руденко, 2000 [43]
Оз.Красненькое	54064	0.121	47	33232	248 0.624		
Щука (Красненькое)	5762	0.29	19	3465		0.607	
Среднее)					142.7 ± 45.9	0.622 ± 0.01	

Таблица 1. Показатели суммарного за потенциальное время жизни удельного метаболизма щуки из разных водоемов, а также параметры аппроксимации роста на основе уравнения Берталанфи

ОБСУЖДЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРОВЕРКИ ГИПОТЕЗЫ ЭНТРОПИЙНОГО ИНВАРИАНТА ОРГАНИЗМА

Проверка выдвинутой гипотезы о глобальной и локальной инвариантности энтропийного функционала F(H)-действия энтропии может, в частности, апробирована на опытных данных по метаболизму организмов [36—40]. Как известно, рост беспозвоночных и рыб продолжается в тече-

ние всей жизни. В связи с данным фактом функция роста может быть аппроксимирована уравнением Берталанфи [18]. В табл. 1 и 2 представлен суммарный за потенциальное время жизни удельный метаболизм ($E_{\rm max}$) шуки и окуня из разных водоемов, а также параметры аппроксимации роста рыб на основе уравнения Берталанфи ($k, W_{\rm inf}, T_{\rm fact}, E_{\rm max}$):

$$W(t) = [(W_{\text{inf}})^{1/3} - ((W_{\text{inf}})^{1/3} - (w_0)^{1/3})\exp(-kt/3)]^3,$$
(21)

где W_{inf} – асимптота уравнения (21), k – параметр

уравнения, W_0 — значение активной массы организма в момент времени t = 0. Скорость потребления кислорода единицей массы рыбы определяется по следующей аллометрической формуле [18]:

$$q(t) = 0.31(w(t))^{-0.19}.$$
 (22)

БИОФИЗИКА том 66 № 3 2021

Предлагаемая математическая мера — детерминированная энтропия метаболизма — будет иметь следующий вид:

$$H_i(q_i(t) = [-\alpha_i \log(q_i(t)/q_{i\max})]^{\mu_i}, \qquad (23)$$

где $\alpha_i = -1/(\log(q_{imin}/q_{imax})), \mu_i = f_i(T_{ifact}/T_{imax})H_0/f_i),$ q_{imin} и q_{imax} — минимальное и максимальное значение удельного потребления кислорода (метаболизма) организмом *i*-го вида соответственно,

Таблица 2. Показатели суммарного за потенциальное время жизни удельного метаболизма окуня из разных водоемов, а также параметры аппроксимации роста на основе уравнения Берталанфи

Водоем	W _{inf} , годы	k	$T_{ m fact}$, годы	<i>W</i> , г	<i>E</i> _{max} , ккал/г	$F_i(H_i)$	Источник
Оз. Сосновое	797	0.438	12	468	131	0.57	Озера Хакассии, [42]
Оз. Жемчужное	1039	0.240	23	629	232	0.566	Руденко, 2000 [43]
Оз. Рубанково	810	0.248	23	507	239	239 0.567	
Оз. Бугаево	6850	0.234	24	4132	179	0.601	Озера Хакасси, 1976 [42]
Среднее					195.3±43.8	0.575 ± 0.025	

 T_{ifact} и T_{imax} — фактическая и максимальная продолжительность жизни *i*-го вида организма соответственно, f_i — константа *i*-го вида организма.

Из данной формулы следует, что предложенная нормированная мера — детерминированная энтропия метаболизма *i*-го организма H_i — соответствует всем правилам построения математической энтропии [27]. Она позитивна ($H_i > 0$), изменяется в пределах от нуля до единицы и аддитивна. Энтропийный функционал $F_i(H_i)$ согласно выражению (7) определится следующим образом:

$$F(H_i) = \int_0^{T_{\text{fact}}} H_i(q_i(t)) dt / T_{\text{fact}}.$$
 (24)

Константа f_i для *i*-го вида организма в формуле детерминированной энтропии метаболизма организма (23) определяется по калибровке функционала (24) на значение энтропии «золотого сечения» H_0 для организма в популяции с максимальной продолжительностью жизни T_{max} .

Как следует из табл. 1 и 2, энтропийный инвариант $F(H_i)$ для рыб (щуки, окуни) из разных водоемов имеет практически постоянное значение. Так, например, для щук и окуней с различной продолжительностью жизни значение энтропийного инварианта $F(H_i)$ составляет соответственно 0.622 ± 0.01 и 0.575 ± 0.025 . В работе [44] предложены соотношения роста и метаболизма для рыб, отличающиеся от аллометрических соотношений в работе (22):

$$q(t) = q_0(1 - \omega^{1+\beta} t^{\beta}), (25)$$
(25)

где $\omega(M) = 0.41 M^{-0.25}$, $\beta = 2.6 \pm 0.18$.

Необходимо отметить, что различие аллометрических соотношений (22) и (25) принципиальных различий не имеет, так как оно обусловлено разными аппроксимациями экспериментальных данных, используемыми авторами представленных работ, и для них всегда характерна отрицательная степенная зависимость метаболизма от массы организма.

Как следует из табл. 3, для других видов рыб из разных водоемов значение энтропийного инварианта $F(H_i)$ также принимает значение, близкое к энтропии «золотого сечения» ($F(H_i)$ = $= 0.6125 \pm 0.08$). В табл. 3 параметры *р* и *r* – достоверность и коэффициент корреляции опытных данных. Таким образом, для разных видов рыб получено подтверждение инвариантности энтропийного функционала метаболизма при фиксированном значении f показателя энтропии (24). Среднее значение энтропийного инварианта $F(H_i)$ при фиксированном значении $f(f = \delta =$ = 0.46609 – первая постоянная Фегенбаума) для рассмотренных видов рыб составляет $\langle F(H_i) \rangle =$ $= 0.603 \pm 0.028$, т.е. отклонение от среднего значения не превышает 5%. В то же время отклонения от среднего значения потребления полной энергии (кислорода) на один грамм веса организма E_{max} за весь период жизни превышают 30% (табл. 1 и 2). Необходимо отметить, что в формуле детерминированной энтропии метаболизма (23)

ГИПОТЕЗА ОБ ЭНТРОПИЙНОМ ИНВАРИАНТЕ

Вид, водоем	w ₀	р	r	k	W _{inf}	T _{fact}	W	$F(H_i)$
Густера (Волгоград. водохр.)	0.005	0.91 ± 0.04	1.09±0.15	0.28	1867	20	1131	0.606
Ерш (Рубанково)	0.001	0.67 ± 0.06	1.08 ± 0.16	1.22	34	5	22	0.58
Лещ (Жижицкое)	0.001	0.95 ± 0.03	1.00 ± 0.20	0.17	6111	34	3772	0.65
Лещ (Локново)	0.001	0.92 ± 0.02	1.23 ± 0.10	0.27	3087	21	1855	0.66
Плотва (Жемчужное 1)	0.011	0.95 ± 0.05	0.75±0.18	0.16	2908	35	1788	0.604
Плотва (Жемчужное 2)	0.011	0.94 ± 0.08	0.78 ± 0.24	0.20	1876	29	1161	0.6012
Плотва (Сомино)	0.011	0.89 ± 0.16	0.96 ± 0.52	0.34	754	17	470	0.602
Плотва (Чернявское)	0.011	0.90 ± 0.07	0.98 ± 0.26	0.31	1013	18	612	0.6
Среднее								0.613 ± 0.033

Таблица 3. Результаты расчетов величины энтропийного инварианта $F(H_i)$ для некоторых популяций рыб из разных водоемов (W_0 , M_{∞} , m_{max} [г], t_{max} [годы])

показатель *f* для рыб разных видов равен первой универсальной константе Фегенбаума ($\delta = 4.669$), связанной с процессом удвоения логистического отображения, что, возможно, имеет глубинную связь с единицей внутреннего времени, введенной в работе [18], которая определяется как время удвоения массы организма для пойкилотермных животных.

Как отмечено выше, для расчета составляющих энтропийного фактора W(H), в частности, можно использовать аппарат неравновесной термодинамики [1], фрактально-кластерной теории [23–25] и аппарат построения условных энтропий [26, 27].

Проведенный в работе [25] анализ на основе фрактально-кластерной теории [25] развития 39 видов организмов, список которых начинается с древнейших хламидомонад, гидр и до *Homo sapiens*, также позволяет количественно подтвердить постулируемую гипотезу — в среднем отклонение по рассматриваемым видам от выполнения гипотезы энтропийного инварианта не превышает 2–3%.

Косвенным подтверждением гипотезы об энтропийном инварианте для организмов также являются исследования, проведенные в работах [41–43]. Нормированная энтропия двигательной активности молодых здоровых людей соответствует энтропии «золотого сечения», что можно сопоставить II этапу эталонного тренда энтропии (рис. 1а).

Как отмечено выше, феномен ускорения и замедления индивидуального времени известен по данным интроспекции: в детстве (этап I на рис. 1) собственное время течет медленнее, а в зрелом возрасте, с годами, все быстрее и быстрее (этап III на рис. 1). Это также является косвенным подтверждением предложенной гипотезы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлен обзор исследований, посвященных проблеме собственного (физиологического)

времени биологических организмов и интегральных характеристик их жизнедеятельности, и изложены результаты оригинальных исследований автора. Проверка в многочисленных исследованиях [15–21, 39] гипотезы Рубнера [5], постулирующей для некоторых видов млекопитающих приблизительно равное количество энергии, используемое единицей массы взрослого животного за период жизни от момента прекращения роста до смерти, показало, что расширение постоянства «константы Рубнера» для видов, в том числе пойкилотермных животных, например для моллюсков и рыб, не имеющих границы роста, представляется необоснованным.

Ввиду данного факта была предложена гипотеза энтропийного инварианта для организмов. Суть данной гипотезы заключается в постулировании инвариантности вновь введенной физической величины – функционала действия энтропии для полной продолжительности жизни организма (глобальная инвариантность) и для любого отрезка жизни организма, в течение которого имеет место измеряемое изменение его состояния (локальная инвариантность). Одним из следствий данной гипотезы является полученная связь индивидуального времени организма с хронологическим временем. Полученная формула включает фундаментальную физическую величину теории структуры И. Пригожина – второй дифференциал энтропии.

Введено понятие «кванта» действия энтропии или «кванта» старения организма, представляющего собой порцию энтропии получаемой (генерируемой) организмом за минимально возможный промежуток времени Δt_{\min} развития системы *i*-го типа.

Другим следствием данной гипотезы является утверждение о фрактальной структуре индивидуального времени организма. Важно отметить, что имеет место глубинная аналогия между Вторым началом термодинамики ($\Delta S \ge 0$), где знак равенства изменения термодинамической энтропии ΔS относится к обратимым (идеальным процессам)) и отклонением размерности индивидуального времени жизни организма от его идеального значения $\Delta D = D - D^{\text{ideal}} \ge 0$ (где знак равенства относится к организмам, имеющим идеальный (эталонный) тренд энтропии). Проверка выдвинутой гипотезы о глобальной и локальной инвариантности функционала действия энтропии F(H) была апробирована на опытных данных по метаболизму рыб разных видов [36–38]. Для разных видов рыб получено подтверждение инвариантности функционала действия энтропии при фиксированном значении показателя энтропии f. Среднее значение энтропийного инварианта $F(H_i)$ при фиксированном значении $f(f = \delta = 0.46609 - первая по-$ стоянная Фегенбаума) для рассмотренных видов рыб составляет $\langle F(H_i) \rangle = 0.603 \pm 0.028$, т.е. отклонение от среднего значения не превышает 5%. Интересным является факт, что в формуле (23) детерминированной энтропии метаболизма организма показатель *f* для рыб разных видов равен первой универсальной константе Фегенбаума, связанной с процессом удвоения логистического отображения, что, возможно, имеет глубинную связь с единицей собственного (физиологического) времени, введенной в работе [18], которая определяется как время удвоения массы организма для пойкилотермных животных.

Необходимо позиционировать единицу собственного времени организма, введенную в представленной статье, и единицу собственного (физиологического) времени, введенную в работе [18]. Единица собственного (физиологического) времени, введенная авторами работы [18], представляет собой значимый временной период, в течение которого происходит удвоение массы организма, не имеющего границу роста.

В контексте настоящего исследования единица собственного времени — это минимальный промежуток времени, в течение которого происходит измеряемое изменение состояния организма. Этой минимальной единицей собственного времени организма (для человека) может быть инвариант временного самоощущения, выявленного Б.И. Цукановым [3], который оказался врожденной константой биологических часов индивида и может быть связан с минимальным масштабом времени Δt_{min} . Также кандидатом на минимальную единицу собственного времени организма может быть цитохрон (время деления клетки). Однако данные предположения требуют отдельного изучения.

Для дальнейшей проверки предложенной гипотезы энтропийного инварианта должны быть проведены широкомасштабные исследования с использованием опытных данных по метаболизму и росту организмов для следующих организмов: 1) млекопитающих; 2) птиц; 3) пойкилотермных (моллюски, рыбы); 4) насекомых; 5) амфибий и 6) организованных клеточных структур.

Несомненно, актуальным исследованием может быть:

 определение зависимости продолжительности жизни организмов (высших млекопитающих) от аккумулированной организмом энтропии, обусловленной внешними условиями и внутренними причинами;

2) в сравнительном анализе результатов жизнедеятельности тех организмов, продолжительность жизни которых находится во взаимно однозначном соответствии с размерами и массой тела

(моллюски, рыбы и др.) по валидным методам оценки [6–19] и предлагаемой гипотезе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность доц. к.ф.-м.н. А.П.Зубареву, и к.псих.н. В.В. Волову за обсуждения и ценные замечания по статье.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- П. Гленсдорф и И. Пригожин, Термодинамическая теория структуры устойчивости и флуктуации (Мир, М., 1973).
- 2. И. Пригожин и И. Стенгерс, Прядок из хаоса: Новый диалог человека с природой (Прогресс, М., 1986).
- 3. И. Пригожин, Введение в термодинамику необратимых процессов (ИИЛ, М., 1960).
- Г. Хакен, Информация и самоорганизация. Макроскопический подход к сложным системам (Мир, М., 1991).
- 5. M. Rubner, Das problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zu Wachstum und Ernährung (München; Berlin, 1908).
- 6. B. E. Lebensdauer, Biol. Zentralblatt **51** (1/2), 74 (1931).
- 7. G. Backman, *Wachstum und organiche Zeit* (J.A. Barth, Leipzig, 1943).
- 8. L. P. du Noüy, Biological time (Methuen, L., 1936).
- 9. S. Brody, Growth 1 (1), 60 (1973).
- 10. S. Brody, *Bioenergetics and growth* (Reinhold Publ. Corp., N.Y., 1945).
- А. И. Зотин, Термодинамический подход к проблемам развития, роста и старения (Наука, М., 1974).
- А. И. Зотин, в сб. Биология старения (Наука, Л., 1982), сс. 116–129.
- А. И. Зотин, Термодинамическая основа реакции организмов на внешние и внутренние факторы (Наука, М., 1988).
- 14. А. И. Зотин и А. А. Зотин, Онтогенез **27** (2), 147 (1996).
- А. И. Зотин и Р. С. Зотина, Феноменологическая теория развития, роста и старения организма (Наука, М., 1993).
- А. И. Зотин и Т. А. Алексеева, Физиол. журн. 30 (1), 59 (1984).

- А. А. Зотин и И. Г. Владимирова, Изв. РАН. Сер. биол. № 3, 331 (2001).
- А. Ф. Алимов и Т. И. Казанцева, Изв. РАН. Сер. биол., № 3, 347 (2007).
- А. Ф. Алимов и Т. И. Казанцева, Докл. РАН **396** (4), 561 (2004).
- Т. А. Детлаф, в кн. Конструкция времени в естествознании. Ч. 1. Междисциплинарное исследование (Изд-во МГУ, М., 1996), сс. 59–64.
- 21. J. O. Reiss, Amer. Natur. 134 (2), 170 (1989).
- 22. M. J. Boddington, J. Theor. Biol. 75 (4), 443 (1978).
- 23. V. T. Volov, arXiv preprint, arXiv: 1309.1415 (2013).
- 24. В. П. Бурдаков, Эффективность жизни (Энергоиздат, М., 1997).
- 25. В. Т. Волов, Экономика. Флуктуации и термодинамика (Изд-во СНЦ РАН, Самара, 2001).
- 26. Н. Ингленд и Дж. Мартин, *Математическая теория энтропии* (Мир, М., 1988).
- 27. A. Stakhov, *Chaos, Solitons* & Fractals 26 (2), 263 (2005).
- 28. С. Аристотель, *О частях животных* (Биомедгиз, ВПМ, 1937).
- 29. М. А. Дынник, Диалектика Гераклита Эфесского (РАНИОН, М., 1929).
- В. И. Жарков, Непрерывно-дискретное пространство и время микрообъектов (Наука, Новосибирск, 1971).
- 31. В. И. Вернадский, Изв. АН СССР. Отд. мат. и естеств. наук **4**, 511 (1932).
- 32. Л. С. Выготский, *Психология развития* (Эксмо, М., 2004).
- 33. 3. Фрейд, По ту сторону принципа удовольствия (Фолио, М., 2013).
- 34. Г. М. Назлоян, http://mask-therapy.ru/cntnt/knigi/rojdenie-i-smert.html.
- 35. Б. И. Цуканов, Время в психике человека (Астропринт, Одесса, 1999).
- А. И. Бобков, Л. Ф. Калягин и Н. Ф. Калягина, в Сб. науч. тр. ГосНИОРХ (1987), вып. 272, сс. 52–66.
- А. И. Бобков и А. В. Соколов, в Сб. науч. тр. Гос-НИОРХ (1988), вып. 279, сс. 118-130.
- Озера Хакасии и их рыбохозяйственная оценка, под ред. Б.П. Сигиневича (Кн. изд-во, Красноярск, 1976).
- Г.П. Руденко, Продукционные особенности ихтиоценозов малых и средних озер Северо-запада и их классификация (ГосНИОРХ, СПб., 2000).
- 40. R. E. Ricklefs, J. Avian Biol. 31, 2 (2000).
- 41. В. Т. Волов, Известия Самарского научного центра РАН 5 (2), 204 (2018).
- 42. V. T. Volov and V. V. Volov, arXiv: 1510.02679 [q-bio.NC].
- В. Т. Волов и В. В. Волов, Нац. психологич. журн. 4 (24), 98 (2016).

The Hypothesis about Entropy Invariant for Biological Organisms

V.T. Volov

Samara State University of Railway Transport, ul. Svobody 2v, Samara, 443110 Russia

The article presents an overview of studies devoted to the problem of intrinsic factors (physiological history) and extrinsic factors that shape the life history of biological organisms including new original author's results. A hypothesis about the invariance of a newly introduced extrinsic factor as the functional of the entropy action has been formulated. According to this hypothesis, the value of the entropy action functional is the same for all organisms of a particular species. Based on the proposed hypothesis, the interaction has been found between the intrinsic (chronological) and environmental (extrinsic) factors that control the growth of biological organism. The resulting formula for this interaction includes the fundamental function of I. Prigogine's theory of structure; it is the second differential of entropy. It is shown that the intrinsic factor of an organism has a fractal structure. A formula for a mathematical measure - the deterministic entropy of the organism's metabolism - has been proposed, and allowed us to test this hypothesis for some groups of organisms. The perspectives of the proposed hypothesis testing for organisms are discussed.

Keywords: Rubner's constant, entropy invariant, intrinsic (physiological) factor of an organism, functional of entropy action, second differential of entropy