СОДЕРЖАНИЕ

Том 66, номер 4, 2021

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Пространственная структура молекулы АСТН-(7-10)

Л.Н. Агаева, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова, Н.А. Ахмедов 629

Антитромбоцитарное действие и химическая активность N6-хлораденозинфосфата

М.А. Мурина, Д.И. Рощупкин, В.И. Сергиенко 634

Роль генов *Hsp70* в контроле жизнеспособности *Drosophila melanogaster* при действии микроволнового излучения

О.В. Горенская, А.Б. Гаврилов, О.Г. Зацепина, Ю.Г. Шкорбатов, М.Б. Евгеньев 641

АТФ-зависимые пути регуляции сигналлинга скелетных мышц и их взаимосвязь с генной экспрессией при функциональной разгрузке: роль «медленного» кальция

Т.Л. Немировская 651

Биосенсорные системы для определения антибиотиков

О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, А.К.М. Алсовэйди, О.А. Караваева, Л.Г. Ловцова, И.А. Бородина 657

Наноструктурные биосенсоры на основе компонентов бактериальных мембран

О.Д. Новикова, Г.А. Набережных, А.А. Сергеев 668

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Возможный механизм модуляции короткими пептидами медленных натриевых каналов мембраны сенсорного нейрона

И.В. Рогачевский, А.Д. Калинина, В.А. Пенниайнен, С.Г. Терехин, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов, В.Б. Плахова 684

Радиационная инактивация возбудителя коронавирусной инфекции на примере вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней

В.Н. Морозов, А.Н. Мухин, М.А. Колыванова, А.В. Белоусов, Ю.А. Бушманов, Т.В. Гребенникова, А.С. Самойлов 696

Регуляция цикла синаптических везикул и образования активных форм кислорода в синаптосомах мозга крыс при действии лактата

Т.Г. Дубовская, С.В. Гриневич, С.В. Федорович, 704

Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца и действие динитрозильных комплексов железа и ферритина

В.А. Медведева, М.В. Иванова, К.Б. Шумаев , А.Л. Дудылина, Э.К. Рууге 711

Изменение оснащенности митохондрий миокарда кролика эндогенными энергетическими субстратами в зависимости от частоты и длительности вибрации

В.В. Воробьева, П.Д. Шабанов 720

Влияние импульсных магнитных полей на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами

В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, А.П. Кадырков, Е.Е. Фесенко 724

Синергизм антибактериального действия наночастиц серебра и экстрактов *T. polium*

Ш.А. Казарян, Л.Р. Ртуни, А.А. Оганесян 734

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Регуляция окислительных процессов в органах мышей при действии химических и физических факторов в малых дозах

А.Г. Кудяшева, Н.Г. Загорская, О.В Раскоша, Л.Н. Шишкина 741

Роль квантового туннелирования ионов в патогенезе сердечных аритмий, обусловленных каналопатиями, ишемией и механическим растяжением

А.Б. Касвал 750

Активная и пассивная составляющие нейронального возбуждения и его глиальное сопровождение

Ю.С. Медникова, Д.Н. Воронков, Р.М. Худоерков, Н.В. Пасикова, Н.М. Захарова 756

Фетальная сыворотка в сочетании с 5% диметилсульфоксида эффективно защищает микробиоту кишечника человека в процессе криоконсервации в жидком азоте

Л.В. Заломова, Д.А. Решетников, С.В. Уграицкая, Л.М. Межевикина, А.В. Загайнова, В.В. Макаров, С.М. Юдин, Е.Е Фесенко (мл) 774

Модель генерации активности в эпилептическом фокусе

Е.Л. Машеров 784

Стойкое снижение числа функциональных связей мозга предопределяет длительное нарушение сознания у пациентов с черепно-мозговой травмой

Л.Б. Окнина, О.С. Зайцев, Е.Л. Машеров, Э.Л. Погосбекян, А.С. Зигмантович, М.М. Копачка, Е.В. Александрова 791

Эффекты фазозависимой чрескожной стимуляции спинного мозга в регуляции кинематики шагательных движений человека

И.Н. Богачева, Н.А. Щербакова, А.А. Савохин, А.А. Гришин, Ю.П. Герасименко 802

Экспериментальное исследование армирующей конструкции протеза кровеносного сосуда на основе внутренней грудной артерии крупного рогатого скота

К.Ю. Клышников, М.А. Резвова, Е.А. Овчаренко, Т.В. Глушкова, А.В. Батранин, Д.В. Нуштаев, Ю.Н. Захаров , В.Г. Борисов, Ю.А. Кудрявцева, Л.С. Барбараш 811

Устойчивость рекуррентных свойств гидробиологических характеристик озерной экосистемы в условиях изменения антропогенной нагрузки

А.В. Русаков, Б.В. Адамович, Т.В. Жукова, Р.З. Ковалевская, А.Б. Медвинский, Т.М. Михеева, Н.И. Нуриева, Н.П. Радчикова 823

Contents

Vol. 66, No. 4, 2021

Molecular Biophysics

Spatial Structure of the ACTH-(7-10) Molecule

L.N. Agayeva, A.A. Abdinova, S.R. Akhmedova, and N.A. Akhmedov 629

Antiplatelet Effect and Chemical Nature of N6-Chloroadenosine Phosphate

M.A. Murina, D.I. Roshchupkin, and V.I. Sergienko 634

The Role of *Hsp70* Genes in Promoting Control of Viability in *Drosophila melanogaster* Subjected to Microwave Irradiation

O.V. Gorenskaya, A.B. Gavrilov, O.G. Zatsepina, Yu.G. Shckorbatov, and M.B. Evgen'ev 641

ATP-Dependent Pathways Involved in the Regulation of Skeletal Muscle Signaling and the Relationship between These Pathways and Gene Expression during Muscle Unloading: the Role of «Slow» Calcium

T.L. Nemirovskaya 651

Biosensor Systems for Antibiotics Detection

O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, A.K.M Alsowaidi, O.A. Karavaeva, L.G. Lovtsova, and I.A. Borodina 657

Nanostructural Biosensors Based on Components of Bacterial Membranes

O.D. Novikova, G.A. Naberezhnykh, and A.A. Sergeev 668

Cell Biophysics

A Possible Mechanism of Modulation of Slow Sodium Channels in the Sensory Neuron Membrane by Short Peptides

I.V. Rogachevsky, A.D. Kalinina, V.A. Penniyaynen, S.G. Terekhin, S.A. Podzorova, B.V. Krylov, and V.B. Plakhova 684

Radiation Inactivation of Coronavirus Infection Pathogen by the Example of Transmissible Gastroenteritis Virus

V.N. Morozov, A.N. Mukhin, M.A. Kolyvanova, A.V. Belousov, Y.A. Bushmanov, T.V. Grebennikova, and A.S. Samoylov 696

Regulation of the Synaptic Vesicle Cycle and Reactive Oxygen Species Generation in Rat Brain Synaptosomes in the Presence of Lactate

T.G. Dubouskaya, S.V. Hrynevich, and S.V. Fedorovich 704

Generation of Superoxide Radicals by Heart Mitochondria and the Action of Dinitrosyl Iron Complexes and Ferritin

V.A. Medvedeva, M.V. Ivanova, K.B. Shumaev, A.L. Dudylina, and E.K. Ruuge 711

A Change in the Content of Endogenous Energy Substrates in Rabbit Myocardium Mitochondria Depending upon Frequency and Duration of Vibration

V.V. Vorobieva and P.D. Shabanov 720

Effects of Pulsed Magnetic Fields on the Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, A.P. Kadyrkov, and E.E. Fesenko 724

Synergistic Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles and T. polium Extracts

Sh.A. Kazaryan, L.R. Rshtuni, and A.A. Hovhannisyan 734

Complex Systems Biophysics

Regulation of the Oxidative Processes in Organs of Mice under Action of the Chemical and Physical Factors at Low Doses

A.G. Kudyasheva, N.G. Zagorskaya, O.V. Raskosha, and L.N. Shishkina 741

The Role of Quantum Tunneling of Ions in the Pathogenesis of the Cardiac Arrhythmias due to Channelopathies, Ischemia, and Mechanical Stretch

A.B. Qaswal 750

Active and Passive Components of Neuronal Excitation and Its Glial Support

Yu.S. Mednikova, D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov, N.V. Pasikova, and N.M. Zakharova 756

Fetal Serum in Combination with 5% Dimethyl Sulfoxide Effectively Protects the Human Gut Microbiota during Cryopreservation in Liquid Nitrogen

L.V. Zalomova, D.A. Reshetnikov, S.V. Ugraitskaya, L.M. Mezhevikina, A.V. Zagainova, V.V. Makarov, S.M. Yudin, and E.E. Fesenko (Jr) 774

A Model of Activity Generation in the Epileptic Focus

E.L. Masherov 784

A Stable Breakdown of the Number of Brain Functional Connectivity Patterns Predetermines Prolonged Disorders of Consciousness in Patients with Traumatic Brain Injuries

L.B. Oknina, O.S. Zaitsev, E.L. Masherov, E.L. Pogosbekyan, A.S. Zigmantovich, M.M. Kopachka, and E.V. Alexandrova 791

Phase-Dependent Effects of Transcutaneous Spinal Cord Stimulation on Regulation of Kinematics of Human Stepping Motions

I.N. Bogacheva, N.A. Shcherbakova, A.A. Savokhin, A.A. Grishin, and Yu.P. Gerasimenko 802

Experimental Study of the Reinforcing Element of a Vascular Prosthesis Fabricated Using Internal Thoracic Artery of Big Cattle

K.U. Klyshnikov, M.A. Rezvova, E.A. Ovcharenko, T.V. Glushkova, A.V. Batranin, D.V. Nyshtaev, Yu.N. Zakharov, V.G. Borisov, Yu.A. Kudryavtseva, and L.S. Barbarash 811

Stability of Recurrent Properties of the Hydrobiological Characteristics of a Lake Ecosystem in Response to the Contribution of Anthropogenic Influences

A.V. Rusakov, B.V.Adamovich, T.V. Zhukova, R.Z. Kovalevskaya, A.B. Medvinsky, T.M. Mikheyeva, N.I. Nurieva, and N.P. Radchikova 823

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 629–633

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ АСТН-(7-10)

© 2021 г. Л.Н. Агаева*, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова***, Н.А. Ахмедов***

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

***Азербайджанский государственный педагогический университет, AZ1000, Баку, ул. Узеира Гаджибейли, 68, Азербайджан*

****Азербайджанский технический университет, AZ1073, Баку, просп. Г. Джавида, 25, Азербайджан*

E-mail: leylanamig@mail.ru

Поступила в редакцию 29.12.2019 г.
После доработки 29.12.2019 г.
Принята к публикации 14.04.2021 г.

Методом теоретического конформационного анализа исследована пространственная структура молекулы АСТН-(7-10) – фрагмента 7-10 адренокортикотропного гормона с аминокислотной последовательностью Phe-Arg-Trp-Gly. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Пространственная структура молекулы Phe-Arg-Trp-Gly рассчитана на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков. Показано, что пространственная структура тетрапептидной молекулы может быть представлена восемью низкоэнергетическими формами основной цепи. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий.

Ключевые слова: АСТН-(7-10), теоретический конформационный анализ, пространственная структура, конформация.

DOI: 10.31857/S0006302921040013

В качестве пептидов, которые по своей ноотропной и нейропротективной активности не уступали бы семаксу – синтетическому пептидному препарату, относящемуся к классу регуляторных пептидов и оказывающему ноотропное, психостимулирующее, нейрозащитное, антиоксидантное и антигипоксическое действие, испытывали различные фрагменты молекулы адренокортикотропного гормона АСТН: АСТН-(7-10)-PGP, АСТН-(4-10)-PGP, АСТН-(6-10)-PGP, АСТН-(5-7)-PGP. Эти пептиды проявляли не только ноотропную и анксиолитическую активность, но также увеличивали жизнеспособность культивируемых клеток глии, полученных из коры больших полушарий мозга крыс с ишемическим повреждением мозга. При исследовании влияния АСТН-(4-10)-PGP на размер некротического очага у крыс оказалось, что данный пептид, как и семакс, уменьшает размер некроза при развитии ишемического инсульта у крыс приблизительно на 50%. Все эти препараты планируются использовать в качестве лекарственных средств. При разных способах введения из исходных пептидов образуется разный набор продуктов гидролиза, при этом известно, что образующиеся более короткие пептиды часто имеют собственную биологическую активность [1–4].

Данная работа посвящена расчету пространственной структуры молекулы АСТН-(7-10) – Phe7-Arg8-Trp9-Gly10 – и является продолжением наших исследований в этой области [5–11]. Для нахождения пространственного строения пептидной молекулы использовали метод теоретического конформационного анализа, позволяющий рассчитывать трехмерную структуру биомолекул исходя из известной аминокислотной последовательности.

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда–Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы

Таблица 1. Энергетические вклады разных видов взаимодействий и относительная энергия предпочтительных конформаций молекулы АСТН-(7-10)

№	Шейп	Конформация	$U_{нев}$	$U_{эл}$	$U_{торс}$	$U_{отн}$
1	efe	$B_2R_{3122}B_{21}B$	−73.9	14.3	12.2	0
2	fee	$R_2B_{33}B_{13}B$	−69.7	16.0	10.9	4.2
3	eee	$B_2B_{2322}B_{11}B$	−63.0	13.9	6.3	4.6
4	ffe	$R_2R_{3322}B_{13}B$	−66.8	16.4	8.8	5.5
5	fef	$R_2B_{3322}R_{31}R$	−67.2	18.1	8.0	6.3
6	eef	$B_2B_{2322}R_{13}P$	−64.7	11.3	11.8	6.3
7	eff	$B_1R_{3122}R_{33}R$	−70.1	16.8	13.9	8.0
8	fff	$R_2R_{3322}R_{21}R$	−64.3	18.1	8.0	9.2

Примечание. $U_{нев}$ – энергия невалентных взаимодействий, $U_{эл}$ – электростатических, $U_{торс}$ – торсионных; $U_{отн}$ – относительная энергия предпочтительных конформаций; величины взаимодействий приведены в кДж/моль.

АСТН-(7-10) изучены в условиях водного окружения, в связи с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергию водородных связей оценивали с помощью потенциала Морзе.

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислотных остатков, входящих в данную молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R, B и L остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа X_{ij}, где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты φ–ψ: $R(\varphi,\psi = -180° - 0°)$, $B(\varphi = -180° - 0°, \psi = 0° - 180°)$, $L(\varphi,\psi = 0° - 180°)$, и $P(\varphi = 0° - 180°, \psi = -180° - 0°)$, $ij... = 11..., 12..., 13..., 21...$ определяет положение боковой цепи ($\chi_1,\chi_2...$), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до 120°, индекс 2 – от 120° до (–120°) и индекс 3 – от –120° до 0°. Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [12].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пространственная структура молекулы АСТН-(7-10) – Phe7-Arg8-Trp9-Gly10 – исследована на основе низкоэнергетических конформаций метиламида N-ацетил-L-фенилаланина, метиламида N-ацетил-L-аргинина, метиламида N-ацетил-L-триптофана и метиламида N-ацетилглицина. Результаты расчета представлны в табл. 1–3. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий этих конформаций молекулы АСТН-(7-10) представлены в табл. 1. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий самой низкоэнергетической конформации каждой формы даны в табл. 2, а геометрические параметры этих конформаций – в табл. 3. Пространственное расположение аминокислот в низкоэнергетических конформациях $B_2R_{3122}B_{21}B$, $R_2B_{3322}B_{13}B$, $B_2B_{2322}B_{11}B$ и $R_2R_{3322}B_{13}B$ представлено на рисунке.

Результаты расчета молекулы АСТН-(7-10) показывают, что происходит энергетическая дифференциация по конформациям и по формам основной цепи. В энергетический интервал 0–10 кДж/моль попадают конформацци всех возможных восьми шейпов. В этих конформациях вклады энергии невалентных взаимодействий изменяются в энергетическом интервале (−63.0)–(−73.9) кДж/моль, электростатических взаимодействий – в энергетическом интервале 11.3–18.1 кДж/моль, торсионных взаимодействий – в энергетическом интервале 6.3–13.9 кДж/моль (табл. 1). Глобальной конформацией молекулы АСТН-(7-10) является $B_2R_{3122}B_{21}B$ (табл. 1). Такая конформация одновременно выгодна по невалентным и электростатическим взаимодействиям. В этой структуре возникают эффективные взаимодействия Phe7 с Arg8, с Trp9 и Gly10, которые вносят вклад в общую энергию, равный

Таблица 2. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (кДж/моль) для разных конформаций молекулы АСТН-(7-10)

Phe7	Arg8	Trp9	Gly10	
−0.4 −1.7 0 −1.7	−21.0 −20.0 −11.8 −18.5	−12.2 −11.8 −12.2 −5.0	−4.6 0 −0.4 −1.3	Phe7
	2.1 0.4 5.0 0	−6.7 −8.8 −17.6 −10.9	−2.1 −2.1 −4.6 −2.1	Arg8
		−2.1 −3.8 −3.4 −4.6	−18.5 −11.3 −10.1 −11.8	Trp9
			5.5 5.5 5.5 5.5	Gly10

Примечание. Первая строка – конформация $B_{11}PRB_{11}$ ($U_{отн}$ = 0 кДж/моль), вторая строка – $B_{11}BRB_{11}$ ($U_{отн}$ = 15.5 кДж/моль), третья строка – $B_{11}BLR_{11}$ ($U_{отн}$ = 21.8 кДж/моль), четвертая строка – $B_{11}PLR_{11}$ ($U_{отн}$ = 23.5 кДж/моль).

Таблица 3. Геометрические параметры оптимальных конформаций молекулы АСТН-(7-10)

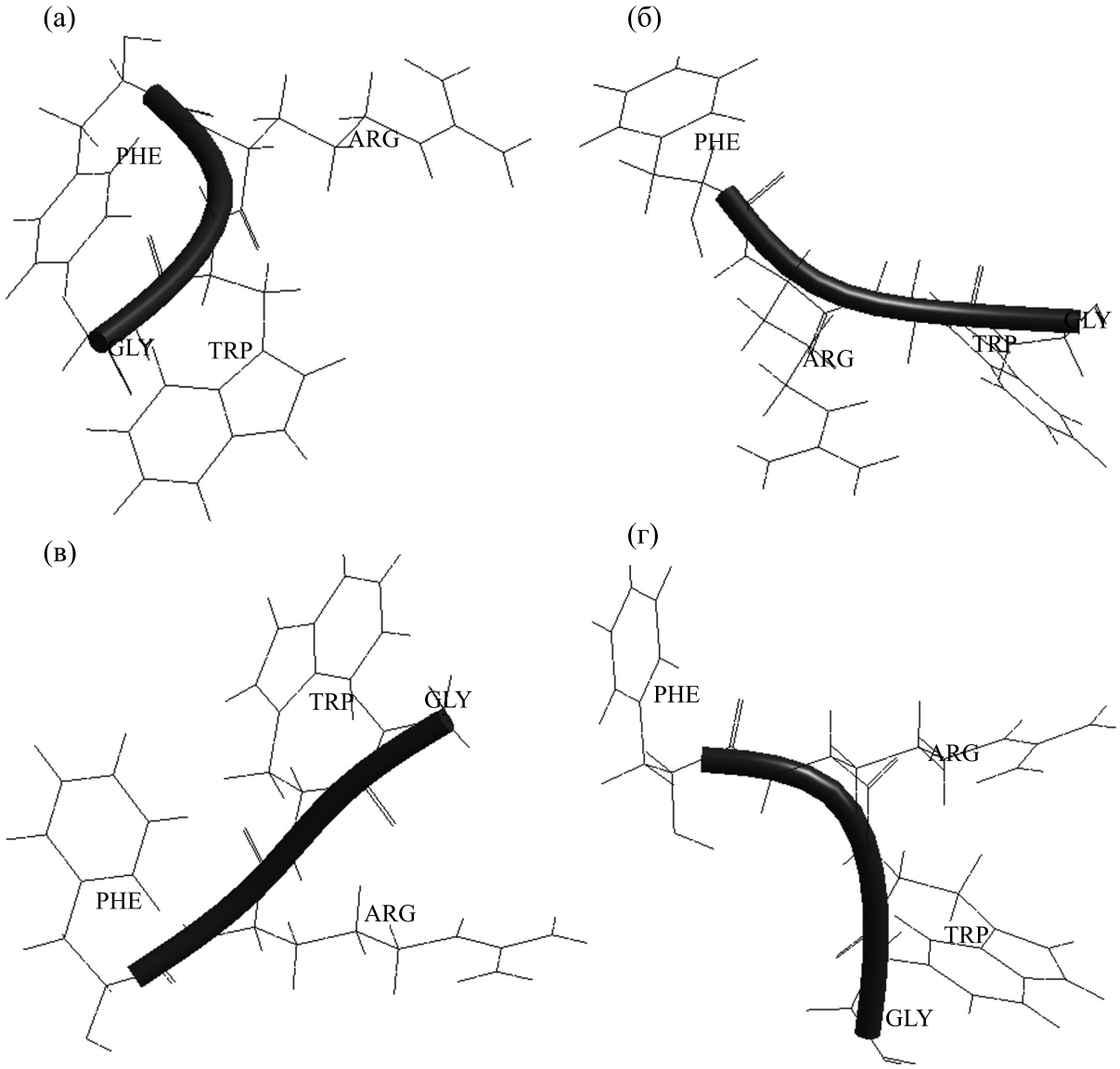
Остаток	Конформации			
	$B_2R_{3122}B_{21}B$	$R_2B_{33}B_{13}B$	$B_2B_{2322}B_{11}B$	$R_2R_{3322}B_{13}B$
Phe7	−106 144 180 −179 88	−94 −44 177 −169 85	−113 149 −172 −177 83	−96 −46 178 −170 85
Arg8	−111 −68 −174 −69 81 171 −174	−101 113 −179 −58 −63 −172 −178	−113 134 177 178 −66 179 −176	−99 −54 178 −56 −62 −174 −178
Trp9	−158 149 −178 176 76	−157 152 −179 50 −86	−127 164 178 62 93	−147 150 −177 55 −87
Gly10	−85 112 180	−86 112 179	−76 112 180	−76 112 180
$U_{отн.}$	0	4.2	4.6	5.5

Примечание. Значения двугранных углов приведены в градусах и даны в последовательности φ, ψ, ω, χ_1, χ_2 ...

−37.8 кДж/моль, Arg8 – с Trp9 и Gly10 (−8.8 кДж/моль), Trp9 – с Gly10 (−18.8 кДж/моль) (табл. 2). Конформация $R_2B_{3322}B_{13}B$ шейпа fee имеет относительную энергию 4.2 кДж/моль. В этой конформации взаимодействия Phe7 с Arg8, с Trp9 и Gly10 вносят вклад в общую энергию, равный −31.8 кДж/моль, Arg8 с Trp9 и Gly10 дают −10.9 кДж/моль, Trp9 с Gly10 – вклад −11.3 кДж/моль (табл. 2). Как видно из табл. 1, сильной энергетической дифференциации между шейпами не происходит, так как в последовательность молекулы входят аминокислотные остатки с ароматическими и заряженными боковыми цепями и во всех шейпах возникают эффективные взаимодействия между атомами боковых и основных цепей (см. рисунок).

ВЫВОДЫ

Теоретический конформационный анализ молекулы АСТН-(7-10) показал, что пространствен-



Пространственное расположение аминокислот в низкоэнергетических конформациях: (а) – $B_2R_{3122}B_{21}B$, (б) – $R_2B_{33}B_{13}B$, (в) – $B_2B_{2322}B_{11}B$, (г) – $R_2R_{3322}B_{13}B$.

ная структура молекулы может быть представлена восемью структурными типами, приводящими к таким структурным организациям молекулы, которые не исключают реализацию целого ряда самых разнообразных функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

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. П. Ашмарин, Р. А. Данилова и О. И. Рудько, Биомедицина **6**, 103 (2007).

2. Н. Г. Левицкая и А. А. Каменский, Природа **1058** (10), 24 (2003).

3. Е. А. Чеснокова, Н. Ю. Сарычева, В. А. Дубынин и А. А. Каменский, Успехи физиол. наук **46** (1), 22 (2015).

4. К. В. Шевченко, С. А. Дулов, Л. А. Андреева и др., Биоорган. химия **42** (2), 171 (2016).

5. Ш. Н. Гаджиева, Н. А. Ахмедов, Э. А. Масимов и Н. М. Годжаев, Биофизика **58** (4), 587 (2013).

6. С. Р. Ахмедова, Л. Н. Агаева, Н. Ф. Ахмедов и Н. А. Ахмедов, Sci. Pages (Чехия), 37 (2017).

7. Э. М. Гасанов, З. Г. Тагиев, Н. Ф Ахмедов и Н. А. Ахмедов, Актуальная наука, 12 (2017).

8. G. A. Akverdieva, N. A. Akhmedov, and N. M. Godjayev, Fizika **XXII** (4), 6, (2017).

9. E. M. Hasanov and N. A. Akhmedov, Int. J. Innovative Sci. Res. Technol. **3** (3), 72 (2018).

10. N. A. Akhmedov, R. M. Abbasli, L. N. Agayeva, and L. I. Ismailova, in *Proc. Conf. "Modern Trends in Physics"* (2019), p. 201.

11. L. N. Agayeva, A. A. Abdinova, and N. F. Akhmedov, in *Proc. Conf. "Modern Trends in Physics"* (2019), p. 157.

12. *IUPAC-IUB, Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry* (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988), V. **39**.

Spatial Structure of the ACTH-(7-10) Molecule

L.N. Agayeva*, A.A. Abdinova, S.R. Akhmedova***, and N.A. Akhmedov***

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

***Azerbaijan State Pedagogical University, ul. Uzeyir Hajibeyli 68, Baku, AZ1148 Azerbaijan*

****Azerbaijan Technical University, prosp. H. Javid 25, Baku, AZ1073 Azerbaijan*

The spatial structure of the ACTH-(7-10)-PGP molecule – *adrenocorticotropic hormone* fragment 7-10 with amino acid sequence Phe-Arg-Trp-Gly has been investigated using theoretical conformational analysis method. The potential function of the system is the sum of nonvalent, electrostatic and torsional interactions and the energy of hydrogen bonds. The spatial structure of the Phe-Arg-Trp-Gly molecule was estimated based on low-energy conformations of appropriate amino acid residues. It is shown that the spatial structure of tetrapeptide molecule can be represented by eight low-energy forms of the main chain. The low-energy conformations of this molecule, the values of dihedral angles of the backbone and side chains of the amino acid residues were found and energies of intra- and inter-residue interactions were evaluated.

Keywords: ACTH-(7-10), theoretical conformational analysis, spatial structure, conformation

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 634–640

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.32

АНТИТРОМБОЦИТАРНОЕ ДЕЙСТВИЕ И ХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ N6-ХЛОРАДЕНОЗИНФОСФАТА

© 2021 г. М.А. Мурина*, Д.И. Рощупкин*, **, В.И. Сергиенко*

**Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА РФ, Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а*

***Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1а*

E-mail: marina_murina@mail.ru

Поступила в редакцию 14.05.2021 г.
После доработки 14.05.2021 г.
Принята к публикации 17.05.2021 г.

Создана технология получения новых хлораминовых соединений, относящихся к производным аденозина. Выяснены абсорбционные оптические характеристики N6-хлораденозин-5'-фосфата (хлораминового производного АМФ). В частности, показано, что его спектр поглощения света занимает диапазон длин волн 220–340 нм с максимумом и минимумом при 265 и 233 нм. Исследована химическая модифицирующая способность N6-хлораденозинфосфата по отношению к биологически значимым соединениям, имеющим сульфгидрильные (например, сывороточный альбумин) или сульфидные (например, остатки метионина в фибриногене) функциональные группы. Количественным показателем этой способности служила константа скорости реакций. Спектрофотометрическим методом зарегистрированы кинетические кривые убыли хлорамина АМФ после быстрого смешивания с серосодержащими субстратами и затем рассчитаны константы скорости с использованием теоретического уравнения кинетики бимолекулярных реакций. N6-хлораденозинфосфат очень быстро реагирует с тиольными соединениями; его константы скорости с сывороточным альбумином, N-ацетилцистеином, восстановленным глутатионом и цистеином (pH 7.4) достигают соответственно 24000, 58000, 240000, 1200000 M^{-1} c^{-1}. Такое отличие в величинах констант обусловлено в основном разницей в степени диссоциации сульфгидрильных групп. Константа скорости реакции N6-хлораденозинфосфата с метионином составляет 1.40 ± 0.09 М–1с–1, с фибриногеном – 28.0 ± 1.6 M^{-1} c^{-1}, с окисленным глутатионом – 0.230 ± 0.066 M^{-1} c^{-1}. Таким образом, хлораминовое производное АМФ характеризуется повышенной реакционной способностью по отношению к сульфгидрильной группе. Установлено, что N6-хлораденозинфосфат эффективно угнетает АДФ-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазмы крови.

Ключевые слова: хлораминовое производное АМФ, спектрофотометрия, серосодержащие соединения, константа скорости, тромбоцит, антиагрегант.

DOI: 10.31857/S0006302921040025

В крови в результате активации фагоцитирующих клеток их миелопероксидаза синтезирует хлорноватистую кислоту (гипохлорит), а при реакции гипохлорита с аминогруппами образуются хлораминовые производные белков, пептидов, аминокислот и других соединений [1]. Некоторые специально синтезированные устойчивые хлораминовые соединения, прежде всего N-хлортаурин, N,N-дихлортаурин и их структурные аналоги, представляют биомедицинский интерес: они оказывают выраженные противомикробный [2] и противотромботический [3, 4] эффекты. Противотромботическое действие в значительной степени обусловлено ингибированием агрегационной функции тромбоцитов. Это ингибирование характеризуется избирательностью в сравнении с другими клетками крови [5]. Обсуждаемые эффекты – результат ковалентной (химической) модификации сульфгидрильных и сульфидных групп в молекулярных мишенях [6, 7]. Активность созданных до сих пор хлораминовых соединений как антиагрегантов, вероятно, определяется соотношением скорости их взаимодействия с плазматической мембраной тромбоцитов и скорости побочных реакций, прежде всего, реакции с сывороточным альбумином.

Можно полагать, что эффективность действия хлораминового антиагреганта резко увеличится,

Сокращение: ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма.

если он вначале специфически связывается с мембраной и уже в этом состоянии необратимо модифицирует тромбоцит. В связи с этим предположением мы обратились к аденозиновым соединениям. Известно, что тромбоциты имеют на внешней поверхности специфические рецепторы к аденозину, АМФ, АДФ, АТФ [8]. В некоторых работах приводятся данные о том, что при взаимодействии аденозинмонофосфата с гипохлоритом образуется хлораминовое производное [9]. Однако его свойства и основные аспекты способа получения не изучены.

Задачами настоящей работы было следующее: (1) выяснение оптимальных условий получения хлорамина АМФ в растворе и определение его оптических абсорбционных характеристик; (2) исследование химической модифицирующей способности по отношению к биологически значимым соединениям, имеющим сульфгидрильные (альбумин, восстановленный глутатион, цистеин и др.) или сульфидные (свободный метионин и остатки метионина в фибриногене) функциональные группы, и оценка антиагрегантной эффективности. Работа преследовала цель выяснить возможность создания хлораминового ингибитора тромбоцитов повышенной эффективности, обусловленной первичным связыванием с клетками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали коммерческие препараты АМФ, восстановленного и окисленного глутатиона, цистеина, N-ацетилцистеина, метионина, бычьего сывороточного альбумина, фибриногена, HEPES, неорганических солей и гипохлорита натрия (все реактивы – фирмы Sigma-Aldrich, США). В опытах соединения растворяли в 50 мМ фосфатном буферном растворе, содержащем гидрофосфат и дигидрофосфат натрия, значения pH которого доводили до 7.4 или 5.4.

Спектры поглощения исследуемых соединений и кинетические кривые изменения величины абсорбции в ходе реакций хлорамина АМФ с тиольными и сульфидными соединениями регистрировали на спектрофотометре Cary 50 Bio UV-Visible фирмы Varian (Австралия).

Эксперименты по изучению антиагрегационного действия исследуемых соединений проведены на изолированных тромбоцитах и тромбоцитах в составе обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) крови, которую получали из краевой вены уха кролика.

Кровь стабилизировали 3.8%-м раствором трехзамещенного цитрата натрия в соотношении 9:1 по объему и центрифугировали 15 мин при 460 *g*. Супернатант, представляющий собой ОТП, хранили не более 3 ч. Для получения суспензии изолированных тромбоцитов кровь кролика стабилизировали раствором кислого цитрата натрия (85 мМ трехзамещенного цитрата натрия, 71 мМ лимонной кислоты, 11 мМ D-глюкозы, pH 4.5) в соотношении 5:1 по объему. После центрифугирования к ОТП добавляли ЭДТА (1 мМ) и центрифугировали 7 мин при 1850 *g* [10, 11]. Для дальнейшей работы осадок тромбоцитов ресуспендировали в фосфатном буфере (10 мМ HEPES, 134 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.0 мМ $MgS0_4$, 0.5 мМ Na_2HPO_4, 0.5 мМ D-глюкозы, pH 7.4) и хранили при комнатной температуре.

Агрегацию тромбоцитов исследовали кинетическим турбидиметрическим методом Борна на анализаторе агрегации фирмы «Биола» (Россия). В образцы клеток (в объеме 270 мкл) при интенсивном перемешивании вводили исследуемое соединение (30 мкл), смесь инкубировали 3 мин при комнатной температуре. Перед введением агониста в образец изолированных тромбоцитов добавляли аутологичную плазму крови в объемной конечной концентрации 2% и хлорид кальция (0.2 мМ). Путем добавления агониста АДФ (10 мкМ) запускали процесс агрегации тромбоцитов, приводящий к постепенному увеличению светопропускания образца. Известно, что максимальное увеличение светопропускания характеризует приближенно количество клеток, вошедших в состав агрегатов. Агрегационную способность тромбоцитов оценивали следующими турбидиметрическими количественными показателями. Один из них – отношение максимального изменения светопропускания в опытных образцах к изменению в контроле, этот показатель именуют относительной максимальной степенью агрегации. Второй показатель – размерный угловой коэффициент кривой светопропускания на начальном отрезке его увеличения, этот показатель называют начальной скоростью агрегации.

Данные измерения спектров поглощения, кинетических кривых абсорбции обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. В этой же программе проводили статистическую обработку данных, результаты представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способ получения N6-хлораденозинфосфата в растворе. Хлораминовые производные биологически значимых соединений чаще всего получают в реакции с гипохлоритом натрия [11] или при взаимодействии с *трет*-бутилгипохлоритом [12]. Активный хлор этих соединений с высокими константами скорости замещает атом водорода в свободной функциональной аминогруппе ($R_1{-}NH_2$) или замещенной группе ($R_1{-}NH{-}R_2$). В случае *трет*-бутилгипохлорита в реакционной

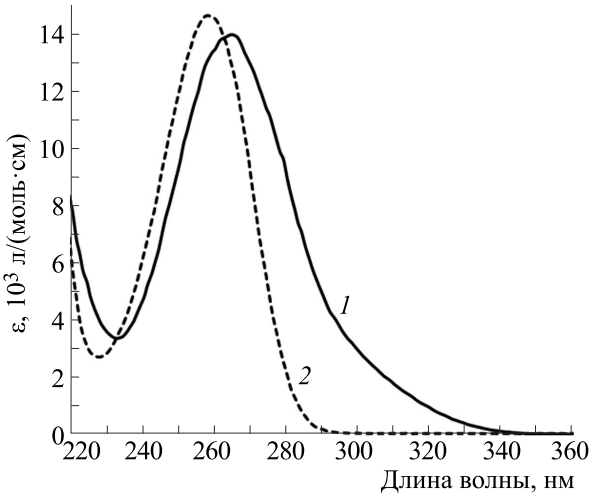


Рис. 1. Спектры поглощения N6-хлораденозинмонофосфата (*1*) и АМФ (*2*); ε – молярный коэффициент поглощения.

системе образуется продукт терт-бутанол [12]. Во избежание процедуры очистки от этого продукта в качестве источника активного хлора мы использовали гипохлорит натрия.

Известно, что атом хлора способен присоединяться, кроме аминогруппы, к атому углерода в положении 8 пуриновой части АМФ [13]. Протекание такой побочной реакции мы наблюдали в опытах при использовании АМФ и соответственно гипохлорита натрия в высоких концентрациях. Также было установлено, что выход синтеза хлорамина АМФ существенно зависит от pH реакционной смеси. В итоге была разработана следующая процедура синтеза N6-хлораденозинфосфата. АМФ растворяли в бидистиллированной воде и доводили pH раствора до 4.3. К 5 мл раствора АМФ в концентрации 3 мМ добавляли по каплям равный объем водного раствора гипохлорита натрия. Смесь непрерывно энергично перемешивали на магнитной мешалке. Конечная молярная концентрация гипохлорита была на 3–5% меньше концентрации АМФ. Поэтому в конечном образце присутствовал небольшой остаток АМФ. При этом свободный (непрореагировавший) гипохлорит отсутствовал. Это следует из того, что при добавлении в образец N6-хлораденозинфосфата иодида калия реакция его окисления происходила медленно (при pH 7.4 константа скорости реакции составляла 4.6 ± 0.48 M^{-1} c^{-1}), в отличие от реакции с гипохлоритом натрия. Выход N6-хлораденозинфосфата, определяемый по концентрации активного хлора, составлял 98–99%. Анализ активного хлора проводили йодометрическим методом с применением спектрофотомерии. Регистрируя абсорбцию при 352 нм, определяли молекулярный йод – продукт реакции N6-хлораденозинфосфата с иодидом калия. Поглощение света при указанной длине волны непосредственно обусловлено анионом трийодида $(J_3)^-$ [14].

Оптический абсорбционный спектр хлорамина АМФ получали как разницу величин абсорбции конечной смеси и абсорбции остаточного АМФ. Спектры хлорамина АМФ и самого АМФ в ультрафиолетовой области длин волн сильно различаются. Спектр N6-хлораденозинфосфата сдвинут в длинноволновую область, его максимум приходится на 265 нм, а минимум – на 233 нм. Кроме того, для абсорбционного спектра хлорамина АМФ характерен «затянутый» длинноволновый спад (рис. 1). Важно, что на этом спаде молярные коэффициенты поглощения достигают больших значений в диапазоне длин волн 290–315 нм. Здесь поглощение ультрафиолетового света аминокислотами, пептидами и белками слабое. Поэтому, измеряя абсорбцию в этом диапазоне длин волн, исследовали кинетические превращения N6-хлораденозинфосфата в присутствии исследуемых серосодержащих соединений.

Химическая активность N6-хлораденозинфосфата по отношению к серосодержащим соединениям. Важнейшая количественная характеристика активности N6-хлораденозинфосфата как химического модификатора – константа скорости соответствующей реакции. В работе спектрофотометрическим методом измеряли кинетические кривые реакций после быстрого смешивания реагирующих соединений. Метод позволял регистрировать в течение порядка десяти секунд количество оставшихся исходных соединений. В целом процедура определения констант скоростей состояла в следующем. В кювете (толщиной 1 см) спектрофотометра быстро смешивали равные объемы растворов исследуемых соединений и после этого измеряли зависимость величины абсорбции хлорамина от времени. Измерения повторяли не менее пяти раз с изменением начальной концентрации реагирующих соединений. Длины волн также изменяли с расчетом зарегистрировать убыль хлорамина в области минимального поглощения исследуемых серосодержащих соединений, как это показано в качестве примера для реакции N6-хлораденозинфосфата с сывороточным альбумином (рис. 2) и восстановленным глутатионом (рис. 3).

Отсчеты величин абсорбции проводили через 0.0125 с, а в случае медленных процессов – через 1 с. Константу скорости находили путем сравнения экспериментальной кинетической кривой убыли абсорбции с расчетной кривой. Уравнение расчетной кривой убыли хлораминов в своей основе представляет собой кинетическое уравнение

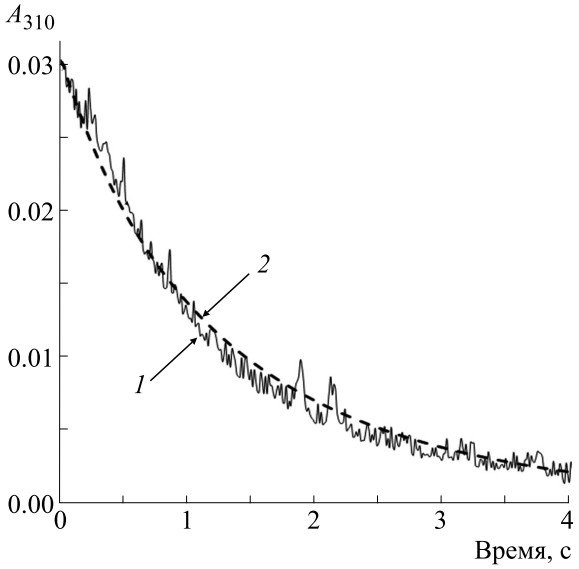


Рис. 2. Экспериментальная (*1*) и расчетная (пунктирная линия *2*) кинетические кривые абсорбции (A_{310}) смеси N6-хлораденозинмонофосфата (14 мкМ) с бычьим сывороточным альбумином (34 мкМ) в фосфатном буфере, pH 7.4.

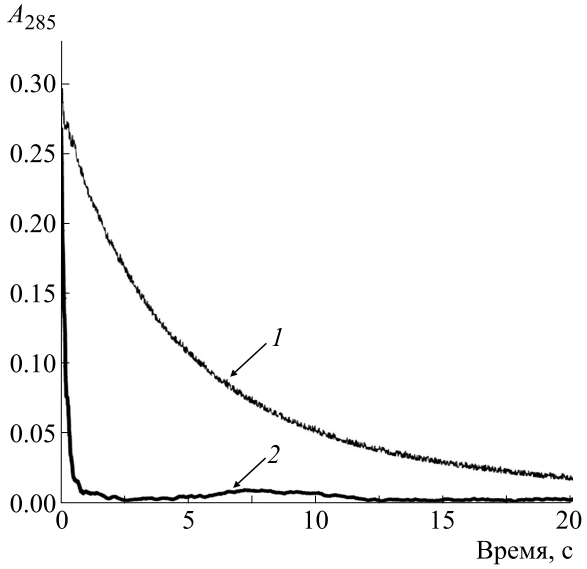


Рис. 3. Кинетические кривые абсорбции (A_{285}) смеси N6-хлораденозинмонофосфата (37 мкМ) с восстановленным глутатионом (87 мкМ) в фосфатном буфере при pH 7.4 (*1*) и pH 5.4 (*2*).

бимолекулярной реакции второго порядка, в которое введена величина абсорбции (A).

$$A = A_0 - A_0\,(\exp(k(C_a - C_s)t) - 1)/ ((C_a/C_s)\exp(k(C_a - C_s)t) - 1).$$

В этом уравнении A_0 и A – абсорбция в начальный момент (первый отсчет по окончании смешивания) и в данное время t; k – константа скорости реакции; C_a и C_s – концентрации хлорамина и серосодержащего соединения в начальный момент.

Концентрации C_a и C_s вследствие протекания взаимодействия в период смешивания несколько меньше тех, которые были до смешивания. Величину C_a находили по значениям молярного коэффициента поглощения и измеряемой величины A_0 в начальный момент. Значение C_s – разность концентрации до смешивания и величины, на которую она уменьшается в период смешивания. Благодаря описанной процедуре и использованию исходно низких концентраций удавалось определять сравнительно высокие константы скорости.

Процедура нахождения реальной константы включала расчет семейства зависимостей абсорбции от времени при разных значениях k. Искомой константой скорости считали то значение, при котором расчетная зависимость была близка к экспериментальной; отличие составляло не более нескольких процентов (рис. 2, кривая *2*).

Реакция между N6-хлораденозинфосфатом и большинством изучаемых тиолов протекает с высокой скоростью, так что измерить кинетику его превращения при физиологических значениях pH не удавалось. Однако она резко замедляется в кислой среде (рис. 3). Известно, что взаимодействие хлораминовых соединений непосредственно происходит с анионом сульфгидрильной группы тиолов ($R{-}S^-$) [15, 16]. Поэтому вначале экспериментально измеряли константу скорости в кислой среде (pH 5.4) и затем ее умножали на отношение концентрации формы $R{-}S^-$ при pH 7.4 к ее концентрации в кислой среде. Расчет этого отношения проводили на основе уравнения Гендерсона–Хассельбаха и литературных данных о pK_a сульфгидрильных групп [17, 18]. Полученные данные приведены в таблице. Интересно, что при значении pH 7.4 константа скорости реакции N6-хлораденозинфосфата с цистеином по сравнению с восстановленным глутатионом, N-ацетилцистеином и сывороточным альбумином выше соответственно в 5, 24 и 50 раз (таблица). Такое отличие в величинах констант обусловлено в основном разницей в степени диссоциации сульфгидрильной группы этих соединений.

При изучении реакций с метионином, остатками метионина в фибриногене, дисульфидным мостиком в окисленном глутатионе константу скорости находили по начальной скорости убыли N6-хлораденозинфосфата. Начальный участок снижения абсорбции (в пределах не более 5%) имеет линейную зависимость от времени. Угло-

Константы скорости реакции N6-хлораденозинмонофосфата с тиольными соединениями

Константа скорости реакции второго порядка (М−1 с−1)			
N-Ацетилцистеин	Глутатион восстановленный	Цистеин	*Сывороточный альбумин быка
(5.80 ± 0.66) ×104	(2.40 ± 0.19) ×105	(1.20 ± 0.23) ×106	(2.04 ± 0.52) ×104

Примечание. Константы получены для значения pH 7.4 (с использованием pK_a тиолов, см. текст). При пересчете использованы значения pK_a тиолов (в порядке слева направо): 9.52 [17], 8.66 [18], 8.33 [17]. * – Измерения проведены в фосфатном буфере, pH 7.4.

вой коэффициент этой зависимости равен $k\varepsilon C_aC_s$. Отсюда, зная исходные концентрации хлорамина (C_a), субстрата (C_s) и молярный коэффициент поглощения (ε), получали значение константы скорости.

Установлено, что N6-хлораденозинфосфат модифицирует дисульфид- и сульфидсодержащие соединения гораздо медленнее, чем тиольные. Константа скорости реакции с окисленным глутатионом, метионином и фибриногеном составляет соответственно 0.23 ± 0.066, 1.4 ± 0.09 и 27.7 ± 1.60 $M^{-1}c^{-1}$. Таким образом, хлораминовое производное АМФ характеризуется повышенной реакционной способностью по отношению к сульфгидрильной группе в биологически значимых серосодержащих соединениях.

Антиагрегантное действие на тромбоциты N6-хлораденозинфосфата. Известно, что внутриартериальное тромбообразование начинается с активации тромбоцитов, которая в большинстве случаев заключается во взаимодействии молекул коллагена поврежденной атеросклеротической бляшки со специфическими рецепторами. В дальнейшем процесс активации усиливается за счет агониста АДФ, действующего на поверхностные пуриновые рецепторы $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ тромбоцита. Пуриновые рецепторы – перспективные мишени при разработке новых антитромботических препаратов, блокирующих их активность. Мы исследовали антиагрегантное действие на тромбоциты N6-хлораденозинфосфата в сравнении с АМФ. В работе других авторов [19] показано, что АМФ сам по себе (без активного хлора) в высоких концентрациях (0.1–3.0 мМ) за счет активации аденозинового рецептора A_{2a} ингибирует аллостерически функции тромбоцитов человека, в том числе агрегацию. На модели тромбоза у животных также показано, что АМФ ингибирует образование тромбов *in vivo*. В наших экспериментах N6-хлораденозинфосфат в сравнительно низкой концентрации, начиная с 50 мкМ, значительно ослабляет агрегацию тромбоцитов в ОТП: уменьшаются начальная скорость агрегации и максимальная степень агрегации. На рис. 4 представлены типичные кинетические кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в ОТП в контроле (кривая *1*) и после введения АМФ и его N-хлорпроизводного (кривые *2* и *3*).

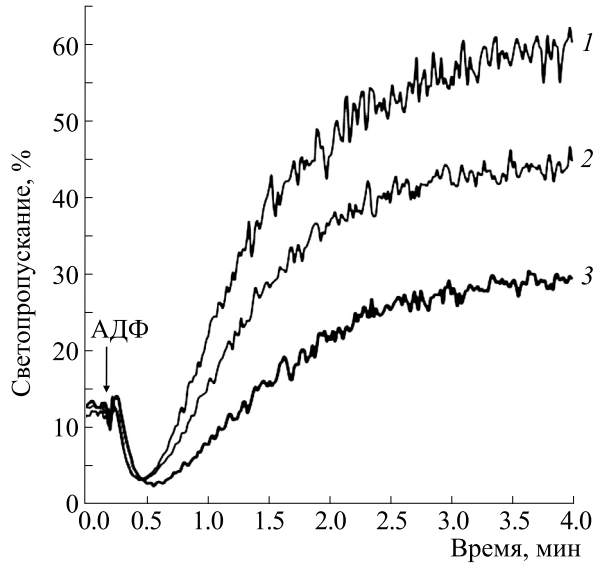


Рис. 4. Типичные кинетические кривые агрегации тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазмы в контроле (*1*), при действии 100 мкм АМФ (*2*) и N6-хлораденозинмонофосфата (*3*). Стрелкой указан момент введения агониста АДФ (10 мкм).

Мы сравнили эффективность влияния на тромбоциты N6-хлораденозинфосфата и АМФ, во-первых, измеряя уменьшение начальной скорости агрегации. N6-Хлораденозинфосфат в концентрациях 50, 150 и 250 мкМ снижал начальную скорость с 35.0 ± 3.1 c^{-1} (в контроле) соответственно до 30.0 ± 1.5, 22.0 ± 3.6 и 18.0 ± 0.2 c^{-1}. В случае действия АМФ начальная скорость при указанных концентрациях составляла соответственно 35.0 ± 3.1, 27.0 ± 3.2, 24.0 ± 1.5 c^{-1}. Вся совокупность данных свидетельствует, что хлораминовое производное АМФ определенно проявляет более высокую ингибирующую способность

($p < 0.009$, парный двух выборочного t-теста для средних значений).

Во-вторых, мы определяли ингибирование максимальной агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. Под действием N6-хлораденозинфосфата в концентрации 50, 100, 150 и 300 мкМ степень агрегации снижалась соответственно на 25 ± 6, 48 ± 7, 51 ± 14 и 70 ± 8% от контроля; концентрация полумаксимального снижения степени агрегации (IC_{50}) составляла приблизительно 100 мкМ. АМФ в такой концентрации (100 мкМ) вызывал снижение агрегации тромбоцитов лишь на 25–30%, а величина IC_{50}, согласно концентрационным зависимостям (данные не приведены), достигает приблизительно 300 мкМ. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными о действии АМФ на тромбоциты человека: величина IC_{50} для АДФ-индуцированной агрегации составляет 280 мкМ [19].

Интересно, что N6-хлораденозинфосфат гораздо сильнее ингибирует тромбоциты в изолированном состоянии (суспензия клеток в физиологическом растворе), чем в составе ОТП. Степень агрегации изолированных тромбоцитов в присутствии N6-хлораденозинфосфата в концентрации 5, 10 и 25 мкМ снижалась соответственно на 22 ± 12, 55 ± 9 и 95.0 ± 0.1%. Таким образом, в случае изолированных тромбоцитов концентрация полумаксимального ингибирования агрегации составила приблизительно 10 мкМ. АМФ в диапазоне концентраций 10–50 мкМ не оказывал антиагрегационного действия на тромбоциты. Сильное различие действующих концентраций N6-хлораденозинфосфата в составе ОТП и суспензии изолированных тромбоцитов, скорее всего, обусловлено протеканием в ОТП дополнительной реакции хлорамина АМФ с сывороточным альбумином, конкурирующей с взаимодействием с тромбоцитами.

Для объяснения усиленного ингибирующего действия N6-хлораденозинфосфата на агрегацию тромбоцитов по сравнению с АМФ важны сведения о структурных особенностях аденозинового рецептора A_{2a}. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [20], в этом рецепторе вблизи места связывания агониста имеется сульфгидрильная группа. Можно предполагать, что N6-хлораденозинфосфат не только связывается с аденозиновым рецептором подобно АМФ, но и при этом ковалентно (химически) модифицирует его сульфгидрильную группу; в результате происходит структурная перестройка рецептора, стабилизирующая его в определенной конфигурации активного состояния. Все это обеспечивает усиленное аллостерическое подавление экспрессии рецептора АДФ P_2Y_1.

Таким образом, разработана технология получения устойчивого хлораминового производного АМФ, выяснены его оптические характеристики. Установлено, что спектр поглощения N6-хлораденозинфосфата сдвинут на 5 нм в длинноволновую область по сравнению с исходным соединением – АМФ. Определены молярные коэффициенты поглощения N6-хлораденозинфосфата при длинах волн 285, 290, 300 и 310 нм, которые составили соответственно 6889 ± 155, 5228 ± 211, 3185 ± 107 и 2020 ± 86 $М^{-1}см^{-1}$.

Исследована химическая модифицирующая способность N6-хлораденозинфосфата по отношению к серосодержащим соединениям. Благодаря методическому приему, который предусматривает первоначальное определение константы скорости реакции в кислой среде и последующий пересчет для физиологического значения pH, определены высокие константы скорости реакции с сульфгидрильными группами ряда соединений. Способность N6-хлораденозинфосфата модифицировать тиольные соединения варьирует в широких пределах: разница в величинах констант скоростей окисления сульфгидрильной группы (цистеина, восстановленного глутатиона, N-ацетилцистеина) составляет более одного порядка. Определена, в частности, константа скорости N6-хлораденозинфосфата с сульфгидрильной группой глутатиона, которая составляет 240000 $М^{-1}$ $с^{-1}$. Такая высокая константа может обеспечить эффективную модификацию рецептора в тромбоцитах, содержащего доступный свободный остаток цистеина.

Установлено, что N6-хлораденозинфосфат сильно ослабляет АДФ-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в составе ОТП. Можно полагать, что это обусловлено не только связыванием и активацией аденозинового рецептора A_{2A}, как это характерно для АМФ, но и дополнительной химической модификацией его серосодержащих групп.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00532).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

были соблюдены. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, and M. B. Hampton, Annu. Rev. Biochem. **85**, 765 (2016).
2. M. Gruber, I. Moser, M. Nagl, et al., Antimicrob. Agents Chemother. **61**, e02527-16 (2017).
3. M. A. Murina, D. I. Roshchupkin, N. N. Kravchenko, et al., Biophysics **42**, 1311 (1997).
4. T. W. Stief., U. Feek, and A. Ramaswamy, Thromb. Res. **104**, 361 (2001).
5. Д. И. Рощупкин, М. А. Мурина, Н. Н. Кравченко и др., Биофизика **52** (3), 527 (2007).
6. A. V. Peskin and C. C. Winterbourn, Free Radic. Biol. Med. **30**, 572 (2001).
7. D. I. Roshchupkin, K. V. Kondrashova, and M. A. Murina, Biophysics **59**, 849 (2014).
8. P. Schmidt, L Ritscher, E. N. Dong, et al., Mol. Pharmacol. **83**, 256 (2013).
9. W. A. Prutz, Arch. Biochem. Biophys. **332** (1), 110 (1996).
10. T. K. Bills, J. B. Smith, and M. J. Silver, J. Clin. Invest. **60**, 1 (1977).
11. M. A. Murina, E. L. Savel'eva, and D. I. Roshchupkin, Biophysics **51** (2), 258 (2006).
12. C. Pastoriza, J. M. Antelo, and J. Crugeiras, J. Phys. Org. Chem. **27**, 952 (2014).
13. M. Ikehara, Y. Ogiso, and N. Maruyma, Chem. Pharm. Bull. **25**, 575 (1977).
14. P. Calvo, J. Crugerias, A. Rios, et al., J. Org. Chem.**72**, 3171 (2007).
15. M.-H. Chau and J. W. Nelson, FEBS Lett. **291**, 296 (1991).
16. D. I. Roshchupkin, V. L. Sorokin, G. N. Semenkova, et al., Biophysics **64**, 145 (2019).
17. A. Altomare, G. Baron, and M. Brioschi, Antioxidants (Basel) **9**, 367 (2020).
18. Y. Samunia, S. Goldstein, and O. M. Dean, Biochim. Biophys. Acta **1830**, 4117 (2013).
19. E. Fuentes, L. Badimon, and J. Caballero, Thromb. Haemost. **111**, 491 (2014).
20. G. Lebon, T. Warne, P. C. Edwards, et al., Nature **474**, 521 (2011).

Antiplatelet Effect and Chemical Nature of N6-Chloroadenosine Phosphate

M.A. Murina*, D.I. Roshchupkin*, **, and V.I. Sergienko*

**Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow, 119435 Russia*

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

A technology has been developed for the preparation of novel chloramine compounds related to adenosine derivatives. Optical absorption characteristics of N6-chloroadenosine-5'-phosphate (chloramine derivative of AMP) have been elucidated. In particular, it was shown that this compound absorbs light with wavelengths covering a range from 220 to 340 nm, the absorption maximum wavelength is 265 nm and the minimum absorption is at 233 nm. The ability of N6-chloroadenosine phosphate to modify biologically significant compounds that contain the sulfhydryl (serum albumin) or sulfide (methionine residues in fibrinogen) functional groups has been studied. The quantitative indicator of this ability was the reaction rate constant. Spectrophotometer was used for recording the kinetic curve data on chloramine consumption after rapid mixing with sulfur-containing substrates and the rate constants were then calculated using a theoretical kinetic equation for bimolecular reactions. N6-chloroadenosine phosphate reacts very rapidly with thiol compounds; rate constants for the reactions of N6-chloroadenosine phosphate with serum albumin, N-acetylcysteine, reduced glutathione, cysteine (pH 7.4) reach 24000, 58000, 240000, 1200000 $M^{-1} s^{-1}$, respectively. The difference in the rate constant values is mainly due to the difference in the degree of dissociation of sulfhydryl groups. The rate constants for the reactions of N6-chloroadenosine phosphate with methionine, fibrinogen, and oxidized glutathione are 1.4 ± 0.09 $M^{-1} s^{-1}$, 28 ± 1.6 $M^{-1} s^{-1}$, and 0.230 ± 0.066 $M^{-1} s^{-1}$, respectively. Thus, the chloramine derivative of AMP is characterized by increased reactivity towards the sulfhydryl group. It was found that N6-chloroadenosine phosphate effectively inhibits ADP-induced aggregation of isolated platelets and platelets in platelet-rich blood plasma.

Keywords: chloramine derivative of AMP, spectrophotometry, sulfur-containing compounds, rate constant, platelet, antiplatelet agent

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 641–650

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 575.224

РОЛЬ ГЕНОВ *Hsp70* В КОНТРОЛЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *Drosophila melanogaster* ПРИ ДЕЙСТВИИ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2021 г. О.В. Горенская*, А.Б. Гаврилов*, О.Г. Зацепина, Ю.Г. Шкорбатов*, М.Б. Евгеньев**, *****

**Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, 61022, Харьков, пл. Свободы, 4, Украина*

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

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

E-mail: misha672011@yahoo.com

Поступила в редакцию 08.04.2021 г.
После доработки 28.04.2021 г.
Принята к публикации 29.04.2021 г.

Биологические эффекты действия низкоэнергетического электромагнитного излучения часто объясняют индукцией транскрипции генов белков теплового шока. В данном исследовании изучили проявление комплекса адаптивно важных признаков у линий *Drosophila melanogaster* с различным числом копий генов *Hsp70* при действии микроволнового облучения. В экспериментах использовались мутантные линии с делецией всех или нескольких копий *Hsp70* и, в качестве контроля, взяли линию дикого типа *Canton-S*, содержащую в геноме полный набор генов *Hsp70*. Для облучения имаго использовали электромагнитное излучение крайне высокой частоты (мощность 10 мкВт/см^2, частота 37.7 и 65.0 ГГц, длительность воздействия 5 мин). Результаты экспериментов показали, что у линии дикого типа *Canton-S* с полным набором генов белков теплового шока при действии микроволнового облучения не изменяется количество потомков на стадии куколки и имаго, но повышается эмбриональная смертность и увеличивается медианная продолжительность жизни. У линий с отсутствием всех копий или присутствием одной копии гена *Hsp70* изменения показателей жизнеспособности имели в основном негативный характер. В этих линиях внешнее воздействие привело к снижению количества потомков на стадии имаго, к увеличению числа погибших особей на стадиях куколки и раннего онтогенеза, снижению медианной и максимальной продолжительности жизни имаго. Интересные разнонаправленные результаты при действии микроволнового облучения наблюдали у линии, содержащей четыре копии *Hsp70*. В данной линии особи демонстрируют половой диморфизм в реакции на действие внешнего воздействия: снижение медианной и максимальной продолжительности жизни имаго самок и увеличение этих показателей у самцов. Результаты работы показали важность наличия полного набора генов *Hsp70* в геноме для адаптации организмов к действию микроволнового облучения.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, дрозофила, жизнеспособность, эмбриональная смертность, длительность жизни.

DOI: 10.31857/S0006302921040037

Электромагнитное излучение (ЭМИ) как новый антропогенный фактор окружающей среды способно вызвать многообразие генетических эффектов, модифицируя адаптационные способности организмов. Важную роль в формировании устойчивости к действию неблагоприятных факторов окружающей среды играют белки теплового шока Hsp70. На сегодня неизученным остается вопрос о их роли в формировании приспособленности при действии низкоинтенсивного ЭМИ.

В серии работ М. Бланка, Р. Гудман и соавторов в экспериментах на культуре клеток человека показана индукция транскрипции *Hsp70* в ответ на действие низкоинтенсивного ЭМИ (8 мкТл, 60 Гц) [1]. Кроме того, такая обработка приводила к временной активации фактора транскрипции 1 генов белков теплового шока (HSF-1) [2]. В культуре клеток человека, подвергшихся воздействию ЭМИ в течение 3 ч (8 мкТл, 60 Гц), уровни Hsp70 увеличивались после 20 мин воздействия и постепенно снижались, возвращаясь к контрольным значениям, через 2 ч [3]. Воздействие ЭМИ (8 мкТл, 60 Гц, экспозиция 20 мин) индуцировало

Сокращение: ЭМИ – электромагнитное излучение.

активацию и связывание с ДНК факторов транскрипции Hsp70, таких как HIF, AP-1 и SP-1 [4]. Полученные результаты позволили авторам выдвинуть концепцию специфически чувствительного к электромагнитному полю домена, расположенного в промоторе *Hsp70* [5, 6].

Получено много достаточно противоречивых результатов при изучении регуляции активности *Hsp70* различными по интенсивности электромагнитными воздействиями на модельных объектах. Так, показано, что реакция культуры клеток на магнитное поле и микроволны обусловлена активацией гена *Hsp70* [7–9]. Но изменение транскрипции гена *Hsp70* в клетках, подвергнутых воздействию электромагнитных полей, не зарегистрировано. В работе [10] было продемонстрировано, что, хотя ЭМИ не влияет на транскрипцию *Hsp70*, оно может значительно увеличивать конститутивный уровень белка Hsp70, вероятно, за счет повышения его стабильности. С другой стороны, синусоидальное магнитное поле с частотой 50 Гц увеличивает уровень мРНК Hsp70 в эндотелиальных клетках аорты свиней, но не влияет на количество белка Hsp70 [11].

Влияние ЭМИ на экспрессию *Hsp70*, показанное выше, исследовали в основном на различных линиях клеток человека и животных, очень мало экспериментов было выполнено на модельных объектах. В экспериментах на дрозофиле оценивали уровни экспрессии *Hsp70* при действии ЭМП. Включение меченого уридина с помощью авторадиографии выявило транскрипцию, активированную ЭМП, в 87 локусах, содержащих шесть генов *Hsp70* [12]. Излучение сотового телефона также вызывало 3.6-кратное повышение уровня белка Hsp70 у личинок дрозофилы, подвергавшихся воздействию в течение 60 мин дважды в день в течение 10 дней [13].

Новые возможности в изучении механизмов действия ЭМИ в экспериментах на дрозофиле открылись после того, как В. Дж. Гонг и К. Г. Голич [14] получили линии с удаленными генами *Hsp70* (*Hsp70*-null). Было установлено, что гены *Hsp70* необходимы для выживания при достаточном сильном тепловом шоке, но не являются необходимыми при более мягком тепловом воздействии, что указывало на то, что при снижении копий *Hsp70* сохраняется значительная степень термоустойчивости. Кроме того, было продемонстрировано несколько плейотропных эффектов, вызванных делецией *Hsp70* [15]. Эффект теплового шока в экспериментах с линией *Hsp70*-null *Drosophila melanogaster* продемонстрировал активацию синтеза нескольких индуцибельных и конститутивных Hsp. Тепловой шок вызвал как экспрессию новых паттернов генов, так и почти полную смертность особей линии *Hsp70*-null [16].

Цель настоящей работы – изучить некоторые компоненты приспособленности линий *D. melanogaster*, содержащих разное количество генов *Hsp70*, при действии микроволнового облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали мутантные линии *Drosophila melanogaster*, содержащие разное количество копий *Hsp70*: *8841* (*Hsp70*-null), *8842*, *1♀41♂*. У особей линии *8841* отсутствуют оба локуса, содержащими копии *Hsp70* (87A и 87B). У особей линии *8842* удален локус 87A, но присутствует 87B, содержащий четыре копии *Hsp70* [14]. Трансгенная линия *1♀41♂* получена из линии *8841* с помощью метода P-опосредованной трансформации в лаборатории М. Евгеньева [17] и содержит одну копию *Hsp70*. В качестве контроля использовали линию дикого типа *Canton-S*, поскольку, как показано в работе [18], в геноме мух дикого типа присутствуют шесть почти идентичных копий генов, которые кодируют Hsp70.

Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре 23.0 ± 0.5°C. В экспериментах виргинных имаго в возрасте двух суток подвергали внешнему воздействию. На третьи сутки мух скрещивали и оценивали показатели, характеризующие плодовитость (эмбриональную смертность и количество потомков на стадиях куколки и имаго) и длительность жизни родительских особей.

Характеристика внешнего воздействия. Облучали имаго в возрасте двух суток в пробирках со временной средой через вату. Облучение проводили с использованием средств измерений, входящих в состав Вторичного эталона единиц мощности электромагнитных колебаний в волноводных трактах в диапазоне частот (37.50–78.33) ГГц. Этот эталон ежегодно проходит метрологическую аттестацию на Национальном эталоне единиц мощности электромагнитных колебаний в волноводных трактах (путем калибровки эталонов переносчиков единицы поглощенной мощности) в Национальном научном центре «Институт метрологии» (Харьков, Украина) [19].

Возможности эталона позволяют работать с мощностями ЭМИ от $1\cdot10^{-3}$–$1\cdot10^{-2}$ Вт с суммарной относительной погрешностью $0.2\cdot10^{-2}$–$0.5\cdot10^{-2}$. Для генерации излучений на частотах до 37.5 ГГц и до 78.33 ГГц применяются волноводы прямоугольного сечения 5.2×2.6 мм и 3.6×1.8 мм соответственно. В качестве излучателя применяли открытый конец волновода, а пробирку с имаго *Drosophila melanogaster* размещали (надевали на волновод) таким образом, чтобы соблюдалось условие дальней зоны.

Мощность излучения на выходе из волновода измеряли ваттметром проходящей мощности типа М1-25. Для компенсации влияния затухания ЭМИ в вате на облучаемой частоте при помощи ваттметра поглощенной мощности типа М3-22А и термисторной головки методом замещения непосредственно перед экспериментом определяли коэффициент поглощения ваты (3 × 2 см), который на частоте 65.0 ГГц был равен 1.25, а на частоте 37.5 ГГц – 1.12. Значение мощности, подводимой к открытому концу волновода, устанавливалось для плотности потока энергии $W = 10$ мкВт/см^2 (0.1 Вт/м^2) с учетом этого коэффициента с использованием выражения:

$$P_{\text{и}} = \frac{П 4\pi r^2}{K_{\text{и}}},$$

где $П$ – плотность потока энергии ЭМП, Вт/м^2; $P_{\text{и}}$ – мощность излучения от источника, Вт; $K_{\text{н}}$ – коэффициент направленного действия излучателя; r – расстояние до источника излучения, м.

Итоговые параметры микроволнового воздействия на имаго: плотность потока мощности $W = 10$ мкВт/см^2, частота $F = 37.7$ и 65.0 ГГц, длительность воздействия $t = 5$ мин. При облучении в пробирке находилось 15–20 имаго. В зависимости от типа эксперимента необходимо было получить от 70 до 200 облученных мух каждого пола каждой линии.

Включение меченого ^{35}S метионина в белки слюнных желез *D. melanogaster*. Личинок третьего возраста подвергали тепловому шоку (37.5°C) в течение 30 мин. Затем слюнные железы выделяли и инкубировали в течение 40 мин при 25°C в 20 мкл среды Шнайдера для насекомых (Schneider's insect medium), не содержащей метионин (Sigma, США) и дополненной 1 мкл (1 μCi) метионина, меченного ^{35}S (GE Healthcare, Великобритания). В качестве контроля использовали слюнные железы личинок, содержащихся при 25°C. Меченые слюнные железы лизировали в 20 мкл буфера Лэммли (Laemmli buffer). Белковые экстракты разделяли в 10%-м SDS-полиакриламидном геле. Использовали равные количества каждого образца. Включение радиоактивной метки оценивали с помощью радиоавтографии.

Учет показателей, характеризующих репродуктивную ценность имаго. Определяли среднее количество потомков на стадии имаго от двух родительских пар. Для этого в пробирки, содержащие по 5 мл питательной среды, помещали на пять суток по две пары трехсуточных виргинных имаго и учитывали всех потомков. В каждом варианте эксперимента оценивали потомство от 24–30 пар особей. Параллельно подсчитывали количество особей, погибших на стадии куколки.

Для определения стадии гибели эмбрионов анализировали неразвившиеся яйца дрозофилы по методу, описанному в работе [20]. Различали начальные стадии дробления и образования бластодермы (гибель особей произошла до 5.5 ч эмбрионального развития (I)); стадии гаструляции и сегментации (гибель эмбрионов от 5.5 до 17 ч развития (II)) и стадию органогенеза (гибель от 17 до 22 ч эмбрионального развития (III)). Всего в экспериментах проанализированы кладки яиц от около 1200 самок дрозофилы.

Для каждого варианта эксперимента при анализе количества потомков на стадии имаго рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартную ошибку среднего. Результаты анализа показателей гибели особей на стадии куколки и эмбриональной смертности представлены в виде долей (%) с 95%-м доверительным интервалом. Доверительный интервал рассчитывали по Джеффрису [21]. Статистическую значимость отличий контрольных и опытных значений оценивали при помощи критерия Фишера. Проверку нулевых гипотез проводили на уровне значимости 0.05.

Анализ продолжительности жизни имаго. Рассчитывали показатели средней и медианной продолжительность жизни имаго *Drosophila*. Виргинных особей, отдельно самок и самцов, содержали на временной среде в стеклянных пробирках по 25 особей. В каждом варианте эксперимента анализировалась длительность жизни 100–120 имаго каждого пола. Подсчет погибших особей и перенос мух на свежую среду проводили каждые двое суток. Для сравнения различий по показателю медианной продолжительности жизни использовали тест Вилкоксона–Бреслоу–Гехана. Достоверность различий показателя максимальной продолжительности жизни (последние 10% погибших из выборки) оценивали с помощью теста Ванг–Эллисона с поправкой Бонферрони [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки количества копий генов белков теплового шока в линиях *8841* и *1♀41♂* проанализировали включение меченого ^{35}S метионина в слюнные железы личинок дрозофилы трех линий с различным числом копий *Hsp70*. Результаты доказали наличие одной копии (линия *1♀41♂*) и отсутствие генов *Hsp70* в геноме особей мутантной линии *8841* (рис. 1).

Результаты исследований жизнеспособности показали, что в контроле наибольшее количество потомков на стадии имаго характерно для линий дикого типа *Canton-S* и мутантной линии *8842*, которая содержит четыре копии *Hsp70* (рис. 2 и 3). Для линий с делецией всех копий *Hsp70* (*8841*) и только с одной копией этого гена (*1♀41♂*) показа-

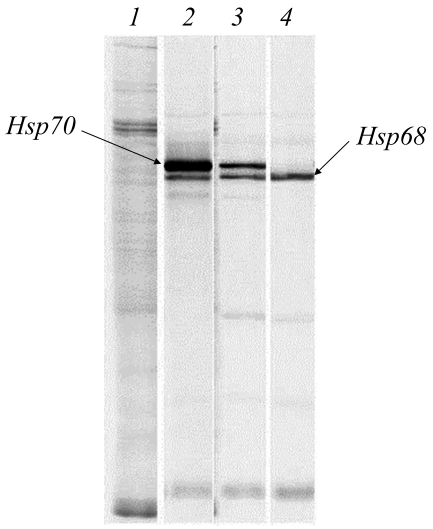


Рис. 1. Включение метионина S^{35} в слюнные железы личинок дрозофилы в нормальных условиях и после теплового шока (37°С, 30 мин): *1* – контроль (линия w^{1188}, содержащая все шесть копий *Hsp70*), развитие при нормальной температуре; *2* – линия w^{1188} после воздействия теплового шока; *3* – линия *1♀41♂*, содержащая одну копию *Hsp70*, после теплового шока; *4* – линия *8841* с делецией всех копий *Hsp70*, после теплового шока. Положение *Hsp70* и *Hsp68* указано стрелками.

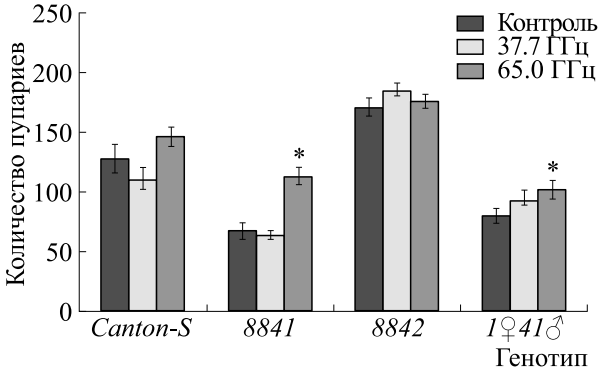


Рис. 2. Количество потомков на стадии куколки у линий дрозофилы с разным количеством *Hsp* после электромагнитного воздействия. * – Уровень значимости различий от контроля $p < 0.05$.

тель плодовитости оказался снижен практически в два раза. Внешнее воздействие не оказало значимого влияния на количество потомков на стадии имаго у линии дикого типа, но привело к увеличению плодовитости линий с разным количеством копий *Hsp70*. Так, облучение с мощностью 37.7 ГГц повысило контроль на 15.84% у линии *8842* (рис. 4а и 5а), с мощностью 65 ГГц – на 48.19% и 29.59% соответственно у линий *8841* и *11♀41♂*(рис. 4б и 5б).

Наблюдаемый эффект действия микроволнового облучения опосредован изменениями количества потомков на стадии куколки. Так, воздействие на родительских особей линий с делецией всех копий *Hsp70* (*8841*) и с одной копией этого гена (*1♀41♂*) с частотой 65 ГГц увеличило количество куколок в 1.7 и в 1.3 раза соответственно (рис. 2). В то же время количество особей, погибших на стадии куколки, у этих же линий увеличилось по сравнению с контролем в среднем в полтора раза (табл. 1).

Полученные в работе результаты, показывающие увеличение фертильности имаго дрозофилы при действии микроволнового облучения, хорошо согласуются с нашими предыдущими результатами [23]. Но следует отметить, что литературные данные достаточно противоречивы, есть сведения как об увеличении эффекта [13], так и его отсутствии [24], а также о снижении плодовитости [25–27]. Различия в полученных результатах связаны, очевидно, с различиями в методике постановки эксперимента, параметрах (частота, мощность, длительность воздействия) микроволнового излучения, стадии онтогенеза, на которой происходит воздействие, и характеристиками линий дрозофилы.

Анализ стадий эмбриональной гибели показал, что у линии дикого типа максимальное количество погибших эмбрионов приходится на начальные этапы фрагментации бластодермы (первые 5.5 ч развития) и стадию органогенеза (последние 17–22 ч развития) (табл. 2). Уменьшение количество копий *Hsp70* в геноме мутантных линий *8841, 8842, 1♀41♂* приводит к снижению жизнеспособности эмбрионов на стадии гаструляции и начальных этапах сегментации (5.5–17 ч развития).

Микроволновое облучение негативно влияет на процессы раннего онтогенеза дрозофилы, увеличивая эмбриональную смертность в основном на стадиях сегментации и органогенеза. У линии дикого типа в 2.29 раза ($p < 0.05$) возросло количество эмбрионов, погибших на стадии гаструляции и начальных этапах сегментации. Аналогичные изменения произошли и у линии *8841* ($p < 0.05$). У особей линии *1♀41♂* увеличилась смертность эмбрионов на начальных этапах дробления ($p < 0.05$).

Таким образом, действие микроволн увеличивает количество погибших эмбрионов у линий *8841* и *1♀41♂* в основном за счет гибели особей на поздних этапах эмбрионального развития. Очевидно, что это один из факторов, приводящий к уменьшению числа потомков у особей этих линий после облучения.

У линии дикого типа *Canton-S* действие микроволн увеличивает медианную продолжительности жизни имаго обоего пола и увеличивается

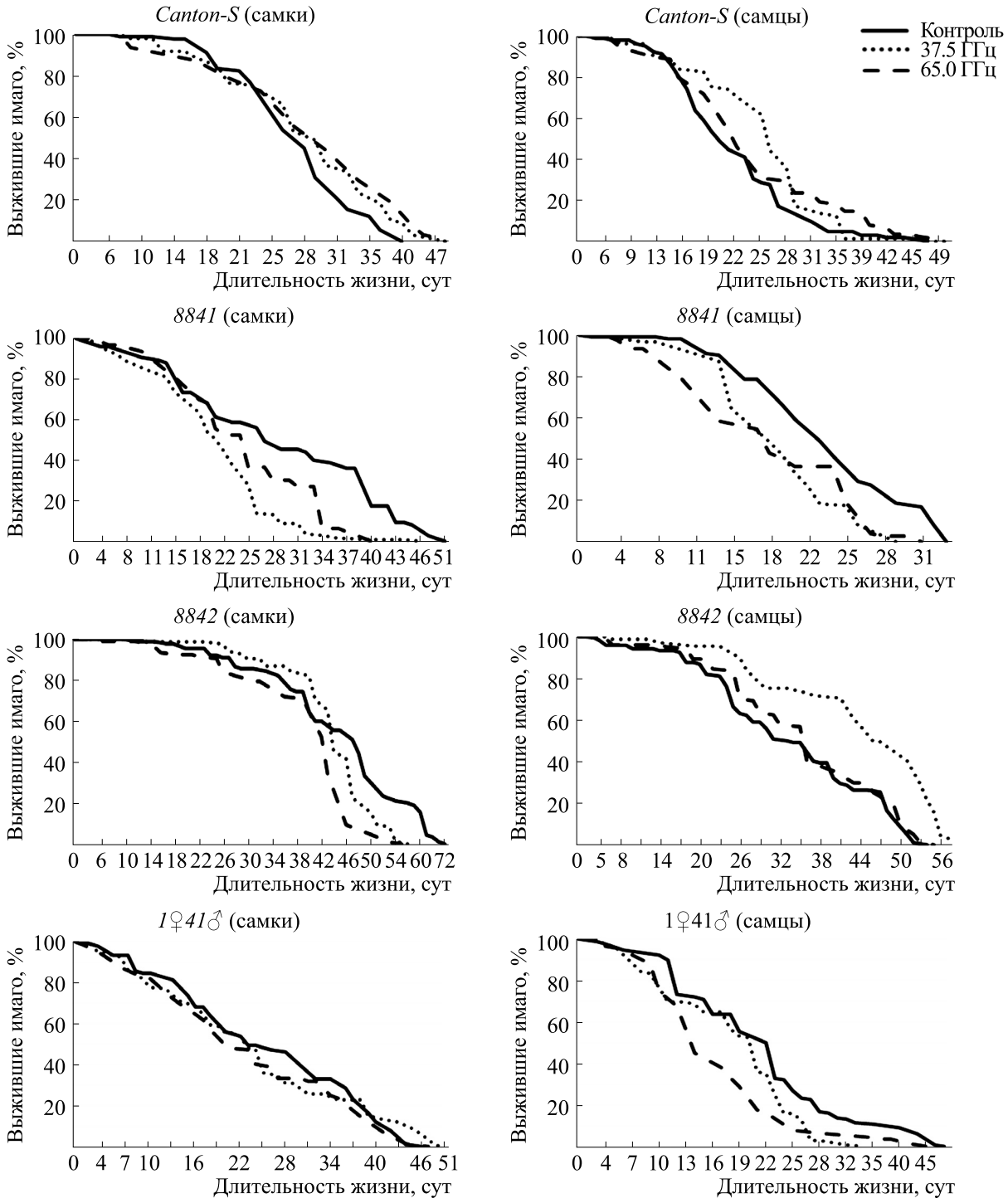


Рис. 3. Кривые дожития имаго линий дрозофилы с разным количеством *Hsp* в контроле и после электромагнитного воздействия.

продолжительность жизни наиболее долгоживущей части особей (рис. 3, табл. 3). У всех мутантных линий, различающихся числом копий *Hsp70*, облучение снижает продолжительность жизни. Однако особенности этого процесса определяются специфическим набором генов белков теплового шока в геноме мух. Так, у линии *Hsp70*-null (*8841*), облучение приводит к снижению как ме-

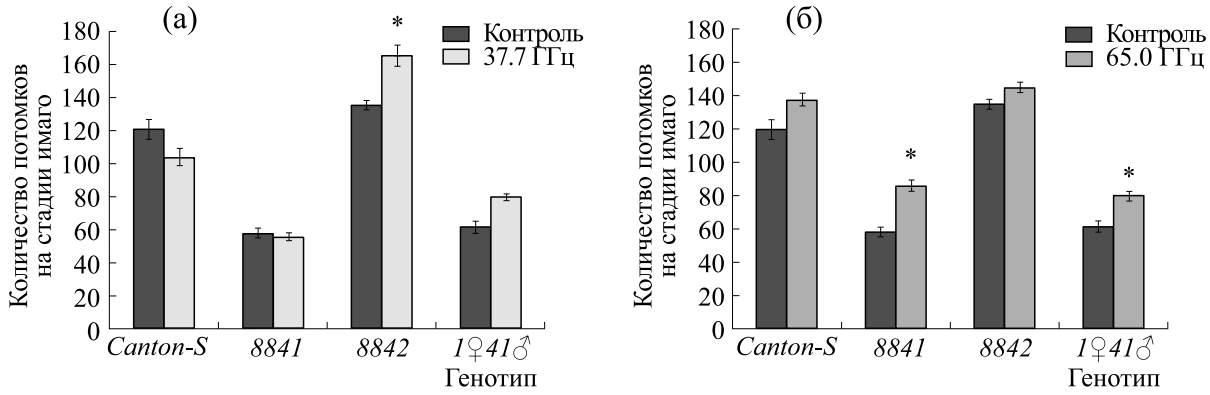


Рис. 4. Плодовитость на стадии имаго (самки) линий дрозофилы с разным количеством *Hsp* после электромагнитного воздействия: (а) – 37.7 ГГц, (б) – 65.0 ГГц. * – Уровень значимости различий от контроля $p < 0.05$.

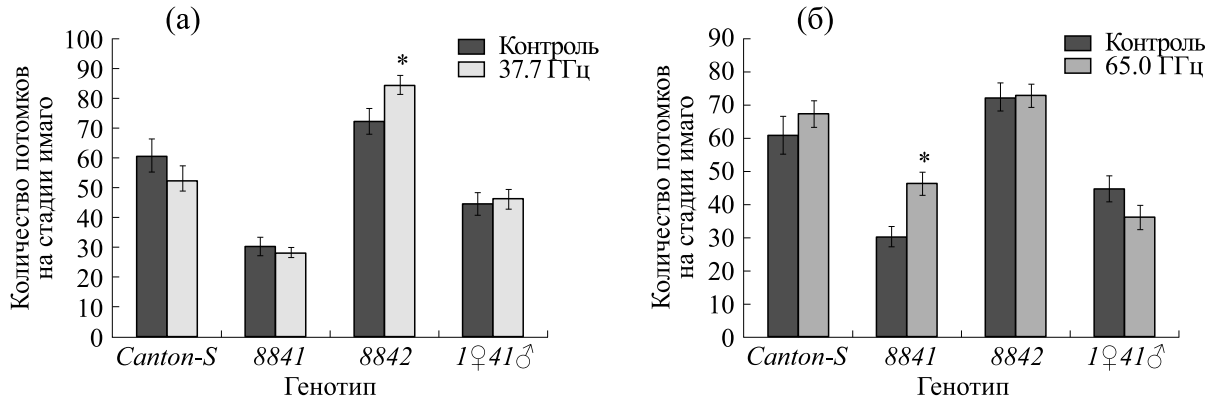


Рис. 5. Плодовитость на стадии имаго (самцы) линий дрозофилы с разным количеством *Hsp* после электромагнитного воздействия: (а) – 37.7 ГГц, (б) – 65.0 ГГц. * – Уровень значимости различий от контроля $p < 0.05$.

дианной, так и максимальной продолжительности жизни имаго обоего пола во всех вариантах экспериментов ($p \le 0.05$).

У линии с одной копией *Hsp70* (*1♀41♂*) снижение средней продолжительности жизни показано только у самцов. Долгоживущая часть выборки (как самки, так и самцы) оказалась чувствительной к действию микроволн, и максимальная продолжительность жизни снижалась во всех вариантах экспериментов ($p \le 0.05$).

Таблица 1. Количество погибших на стадии куколки в потомстве особей дрозофилы, подвергшихся воздействию микроволн

Генотип	Вариант эксперимента		
	Контроль	37.7 ГГц	65 ГГц
Canton-S	5.9 (4.82–7.18)	6.7 (5.22–8.51)	5.9 (4.89–7.10)
8841	13.8 (11.08–17.33)	13.2 (10.30–16.57)	23.9 (21.40–26.64)*
8842	15.2 (13.73–16.83)	10.8 (9.51–12.08)	17.5 (15.90–19.28)
1♀41♂	16.9 (14.74–19.34)	16.6 (14.37–19.09)	23.5 (20.68–26.53)*

Примечание. Доверительный интервал 95%; * – уровень значимости различий от контроля, $p < 0.05$.

Таблица 2. Эмбриональная гибель в потомстве особей дрозофилы, подвергшихся воздействию микроволнового излучения

Генотип	Вариант эксперимента	Эмбрионы, погибшие на разных стадиях онтогенеза, % (доверительный интервал 95%)		
		I (0–5.5 ч)	II (5.5–17 ч)	III (17–22 ч)
Canton-S	Контроль	4.2 (3.30–5.32)	3.1 (2.32–4.05)	6.8 (5.67–8.22)
	37.7 ГГц	3.9 (1.74–7.40)	7.1 (4.06–11.57)*	3.8 (1.74–7.40)
	65 ГГц	4.2 (2.76–6.13)	5.3 (3.65–7.42)	4.8 (3.20–6.78)
8841	Контроль	2.0 (0.84–4.09)	21.7 (17.35–26.67)	1.33 (0.45–3.15)
	37.7 ГГц	0.8 (0.22–2.06)	36.5 (31.84–41.42)*	4.2 (2.49–6.49)
	65 ГГц	2.2 (0.63–5.81)	29.6 (22.42–37.70)	4.4 (1.88–8.93)
8842	Контроль	0.7 (0.35–1.22)	4.3 (3.38–5.48)	0.9 (0.55–1.57)
	37.7 ГГц	0.5 (0.23–1.13)	3.8 (2.82–5.11)	0.9 (0.47–1.62)
	65 ГГц	0.3 (0.10–0.72)	3.6 (2.67–4.69)	0.3 (0.10–0.72)
1♀41♂	Контроль	0.8 (0.23–2.14)	19.6 (15.83–23.89)	2.2 (1.02–4.02)
	37.7 ГГц	1.9 (0.64–4.40)	16.4 (11.92–21.85)	1.4 (0.40–3.71)
	65 ГГц	4.1 (2.19–6.97)*	24.5 (19.68–29.93)	1.9 (0.71–4.03)

Примечание. Доверительный интервал 95%; * – уровень значимости различий от контроля, $p < 0.05$.

Таблица 3. Медианные значения длительности жизни дрозофилы в зависимости от действия микроволн

Генотип	Пол	Вариант эксперимента		
		Контроль	37,7 ГГц	65 ГГц
Canton-S	Самки	28	29	30*
	Самцы	21	27*	23
8841	Самки	27	22*	25
	Самцы	23	18*	18*
8842	Самки	48	44	43*
	Самцы	34	46*	36
1♀41♂	Самки	24	24	21
	Самцы	23	21*	14*

Примечание. * – Уровень значимости различий от контроля $p < 0,05$.

Рассматривая микроволны как стрессовый фактор, снижение медианной продолжительности жизни самок и самцов линии *8841* в опытах можно объяснить пониженной стрессоустойчивостью. Очевидно, что одной копии *Hsp70* у самцов линии *1♀41♂* недостаточно, чтобы нейтрализовать эффекты крайне высоких частот. Самки же этой линии более устойчивы к стрессу, и медианные значения продолжительности жизни в эксперименте соответствуют контрольным (рис. 3).

Линия *8842*, содержащая четыре копии *Hsp70*, характеризуется половым диморфизмом в ответ на использование микроволн. У самок после облучения снизилась как медианная, так и максимальная ($p \leq 0.05$) продолжительность жизни. Самцы продемонстрировали противоположный эффект, и после облучения с частотой 37.7 ГГц наблюдалось весьма значимое увеличение как медианной, так и максимальной ($p \leq 0.05$) продолжительности жизни (рис. 3, табл. 3).

Синтез белков теплового шока у дрозофилы является не только универсальной реакцией на стресс, но и одним из параметров, характеризующих возрастные изменения метаболизма [28]. Так, показано влияние дозы *Hsp70* на жизнеспособность дрозофилы при старении при нормальной температуре [29]. В экспериментах использовали трансгенную линию с двенадцатью дополнительными копиями генов белков теплового шока и линию с уменьшенным количеством копий *Hsp*, которая несла только остаточную конструкцию Р-элемента в том же самом сайте интеграции, где были встроены дополнительные *Hsp70*. Эксперименты, проведенные с этими линиями, показали, что увеличение количества копий генов *Hsp70* улучшает жизнеспособность после теплового шока. С другой стороны, мутантная линия, лишенный копий *Hsp70*, демонстрировала меньшую продолжительность жизни по сравнению с исходной линией и линией с дополнительными копиями генов. Эта разница становилась более выраженной при повышенной температуре (29°C) [30]. Таким образом, полученные в работе результаты, демонстрирующие снижение продолжительности жизни у линии *Drosophila Hsh*70-null *(8841)*, хорошо согласуются с нашими предыдущими исследованиями.

В данном исследовании изучались отсроченные эффекты низкоинтенсивного электромагнитного излучения по показателям жизнеспособности имаго дрозофилы. В работе использовали линии, содержащие разное количество копий генов белков теплового шока. Показано, что действие ЭМИ крайне высоких частот усиливает мутационный процесс, приводящий к увеличению количества эмбрионов, погибших в основном на стадиях сегментации и органогенеза. Эта закономерность не зависит от числа генов *Hsp70* в геноме дрозофилы. Однако наблюдается и увеличение количества потомков на стадии имаго у мутантных линий. Очевидно, внешнее воздействие стимулирует яйцекладку у линий со сниженным количеством генов белков теплового шока, что может быть опосредовано изменениями в гормональном балансе имаго, в частности уменьшением титра экдизона в гемолимфе [31].

Если сравнивать полученные эффекты от облучения имаго ЭМИ крайне высоких частот с разными длинами волн, то показана одинаковая тенденция изменений показателей жизнеспособности. Различия показаны только при анализе медианной продолжительности жизни. Так, у линии *8841* показатель снижается в обоих вариантах эксперимента, но эффект выражен сильнее при действии микроволнового облучения с длиной волны 37.7 ГГц. У линии *1♀41♂* с одной копией *Hsp70* снижение медианной ПЖ в эксперименте сильнее при действии 65 ГГц. И для линии *8842* показан разнонаправленный эффект – повышение медианной ПЖ у самцов при действии 37.7 ГГц (аналогичные результаты получены и у линии дикого типа) и снижение показателя у самок при действии 65 ГГц.

Обобщая полученные в работе результаты, мы видим, что у линии дикого типа *Canton-S* с нормальным набором генов белков теплового шока практически не изменяются показатели репродуктивной способности при действии микроволнового облучения, однако возрастает медианная продолжительность жизни. Линии без (*8841*) или с одной (*1♀41♂*) копиями генов белков теплового шока оказались восприимчивыми к микроволновому облучению. Показанные отсроченные изменения показателей жизнеспособности имели в основном негативный эффект. Так, внешнее воздействие привело к снижению количества потомков на стадии имаго, к увеличению числа погибших особей на стадиях куколки и раннего онтогенеза (в основном на поздних этапах эмбрионального развития), снижению медианной и максимальной продолжительности жизни. Интересные разнонаправленные результаты демонстрирует линия *8842*. Имея четыре копии *Hsp70*, особи линии демонстрируют половой диморфизм в реакции на действие микроволнового облучения: снижение медианной и максимальной продолжительности жизни самок и увеличение этих показателей у самцов. Безусловно, экспериментальные манипуляции с древней и высоко сбалансированной системой генов *Hsp70* [30] приво-

дят к нарушению формирования нормального стрессового ответа организма и наблюдаемым изменениям жизнеспособности после облучения имаго. Планируемые протеомные и транскриптомные методы позволят разобраться в механизмах, лежащих в основе роли *Hsp70* в ответе на микроволновое облучение.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Украины (грант № 0119U002549, О. Горенская) и Российского научного фонда (грант № 17-74-30030, М. Евгеньев).

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. Goodman, M. Blank, H. Lin, et al., Bioelectroch. Bioener. **33** (2), 115 (1994). DOI: 10.1016/0302-4598(95)05040-X
2. H. Lin, M. Opler, M. Head, et al., J. Cell. Biochem. **66** (4), 482, (1997). DOI: 10.1002/(sici)1097-4644(19970915)66:4<482::aid-jcb7>3.0.co;2-h
3. L. Han, H. Lin, M. Head, et al., J. Cell. Biochem. **71** (4), 577 (1998). DOI: 10.1002/(sici)1097-4644(19981215)71:4<577::aid-jcb12>3.0.co;2-v
4. H. Lin, L. Han, M. Blank, et al., J. Cell. Biochem. **70** (3), 297 (1998). DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19980901)70:3<297::AID-JCB2>3.0.CO;2-I
5. H. Lin, M. Blank, and R. Goodman, J. Cell. Biochem. **75** (1), 170 (1999). DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19991001)75:1<170::AID-JCB17>3.0.CO;2-5
6. M. Blank and R. Goodman, Pathophysiology **16** (2–3), 71 (2009). DOI: 10.1016/j.pathophys.2009.01.006
7. A. O. Rodríguez de la Fuente, J. M. Alcocer-González, A. J. Heredia-Rojas, et al., Cell Biol. Int. **33** (3), 419 (2009). DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.09.014
8. A. Garip and Z. Akan, Acta Biol. Hung. **61** (2), 158 (2010). DOI: 10.1556/ABiol.61.2010.2.4
9. A. C. Mannerling, M. Simkó, K. H. Mild, and M. O. Mattsson, Radiat. Environ. Biophys. **49** (4), 731 (2010). DOI: 10.1007/s00411-010-0306-0
10. R. Alfieri, M. Bonelli, G. Pedrazzi, et al., Radiat. Res. **165** (1), 95 (2006). DOI: 10.1667/rr3487.1
11. C. Bernardini, A. Zannoni, M. E. Turba, et al., Bioelectromagnetics **28** (3), 231 (2007). DOI: 10.1002/bem.20299
12. R. Goodman, D. Weisbrot, A. Uluc, and A. Henderson, Bioelectromagnetics **13** (2), 111 (1992). DOI: 10.1002/bem.2250130205
13. D. Weisbrot, H. Lin, L. Ye, et al., J. Cell. Biochem. **89** (1), 48 (2003). DOI: 10.1002/jcb.10480
14. W. J. Gong and K. G. Golic, Genetics **168** (3), 1467 (2004). DOI: 10.1534/genetics.104.030874
15. W. J. Gong and K. G. Golic, Genetics **172** (1), 275 (2006). DOI: 10.1534/genetics.105.048793
16. B. R. Bettencourt, C. C. Hogan, M. Nimali, and B. W. Drohan, BMC Biol. **6** (1), 5 (2008). DOI: 10.1186/1741-7007-6-5
17. V. Shilova, O. G. Zatsepina, D. G. Garbuz, et al., Insect Mol. Biol. **27** (1), 61 (2018). DOI: 10.1111/imb.12339
18. M. E. Feder and R. A. Krebs, Amer. Zool. **38**, 503 (1998). DOI: 10.1093/icb/38.3.503
19. В. П. Середній, В. І. Огар, Т. М. Голякова, та ін., Укр. метрологіч. журн., № 4, 50 (2009).
20. D. L. Hill, Drosophila Information Service **19**, 62 (1945).
21. L. D. Brown, T. T. Cai, and A. DasGupta, Stat. Sci. **16** (2), 101 (2001).
22. S. K. Han, D. Lee, H. Lee, et al., Oncotarget **7**, 56147 (2016). DOI: 10.18632/oncotarget.11269
23. О. В. Горенская, Д. В. Рыбак, Н. В. Рыбак и др., Вісник Харківського нац. унів. ім. В. Н. Каразіна. Сер. «Біологія» 32, 52 (2020). DOI: 10.26565/2075-5457-2020-34-6
24. T. L. Poy, E. C. Beyer, and C. F. Reichelderfer, J. Microwave Power **7** (2), 75 (1972). DOI: 10.1080/00222739.1972.11688836
25. E. Atli and H. Ünlü, Turk. J. Biol. **31** (1), 1 (2007). DOI: 10.1080/09553000600798849
26. L. H. Margaritis, A. K. Manta, K. D. Kokkaliaris, et al., Electromagn. Biol. Med. **33** (3), 165 (2014). DOI: 10.3109/15368378.2013.800102
27. N. E. Sagioglou, A. K. Manta, I. K. Giannarakis, et al., Electromagn. Biol. Med. **35** (1), 40 (2016). DOI: 10.3109/15368378.2014.971959
28. R. I. Morimoto, Cold Spring Harb. Symp. **76**, 91 (2011). DOI: 10.1101/sqb.2012.76.010637
29. M. Tatar, A. A. Khazaeli, and J. W. Curtsinger, Nature. 390 (6655), 30 (1997). DOI: 10.1038/36237
30. M. B. Evgen'ev, D. G. Garbuz, and O. G. Zatsepina, in *Heat shock proteins and whole body adaptation to extreme environments*, DOI: 10.1007/978-94-017-9235-6 (Springer; Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2014), pp. 59–115.
31. M. R. Meiselman, T. G. Kingan, and M. E. Adams, BMC Biol. 16, 18 (2018). DOI: 10.1186/s12915-018-0484-9

The Role of *Hsp70* Genes in Promoting Control of Viability in *Drosophila melanogaster* Subjected to Microwave Irradiation

O.V. Gorenskaya*, A.B. Gavrilov*, O.G. Zatsepina, Yu.G. Shckorbatov*, †, and M.B. Evgen'ev**, *****

**V.N. Karazin Kharkov National University, pl. Svobody 4, Kharkov, 61022 Ukraine*

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

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

Biological effects produced by low-energy electromagnetic radiation were often explained by transcriptional induction of *Hsp70* gene. In this study, we investigated a series of important adaptation traits developed in *Drosophila melanogaster* strains with different copy number of *Hsp70* genes when subjected to microwave irradiation. In our experiments, we used mutant lines with gene deletion in all or several Hsp70 copies. The wild-type line (*Canton-S* containing the full set of *Hsp70* genes in its genome) was used as control. For the irradiation of adult flies (the imago), the electromagnetic radiation (power density10 mW/cm^2, frequency 37.7 GHz and 65.0 GHz, exposure duration 5 min) was used. The experimental results showed that exposure to microwave radiation produced no effect on the number of the wild-type offspring (*Canton-S* with the full set of *Hsp70* genes) by the pupal stage and imago but was accompanied by increased embryonic mortality and increased median lifespan. In most cases, exposure to microwave radiation led to adverse effects on the viability of lines without all copies or with the presence of one copy of *Hsp70* genes. In these lines, the external influence resulted in lower number of offspring by the imago, an increased number of dead individuals during the pupal and early stages of development, and a decrease in the median and maximum lifespan of the imago. Interestingly, when the strain containing four copies of *Hsp70* was exposed to microwave radiation, it was found that individuals tend to show sexual dimorphism in response to such external influence: a decrease in the median and maximum lifespan of the female imago and an increase of the longevity of the male flies. The results of this investigation demonstrate the importance of the presence of the full set of *Hsp70* genes in the Drosophila genome to adapt to microwave radiation.

Keywords: electromagnetic irradiation, Drosophila, viability, embryonic mortality, lifespan

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 651–656

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

АТФ-ЗАВИСИМЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЛИНГА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ: РОЛЬ «МЕДЛЕННОГО» КАЛЬЦИЯ

© 2021 г. Т.Л. Немировская

ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а

E-mail: nemirovskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.
После доработки 27.05.2021 г.
Принята к публикации 28.05.2021 г.

Целью обзора является описание механизмов работы АТФ-зависимых путей регуляции сигналлинга скелетных мышц при их функциональной разгрузке. Особое внимание уделяется описанию роли паннексиновых каналов, P2Y-пуринэргических рецепторов и IP3-рецепторов в активации специфических транскрипционных сигнальных программ m. soleus при ее функциональной разгрузке. Известно, что при функциональной разгрузке мышц происходит накопление макроэргических фосфатов (АТФ, креатинфосфата) и ионов Ca в мышечных волокнах. Ранее показано, что введение при моделировании функциональной разгрузки препарата, снижающего в мышце уровень макроэргических фосфатов, а также уровень кальция, предотвращает трансформацию мышечных волокон в «быструю» сторону и снижает степень ее атрофии. Предлагаемый обзор описывает возможные механизмы, с помощью которых АТФ достигает рецепторов, воспринимающих этот сигнал, а также способ его передачи для запуска «медленного» Ca^{2+}-сигнала, участвующего в активации специфических транскрипционных программ в мышце при моделировании ее функциональной разгрузки.

Ключевые слова: АТФ-зависимая сигнализация, скелетные мышцы, кальциевая сигнализация, функциональная разгрузка мышц.

DOI: 10.31857/S0006302921040049

При длительной гипокинезии, гравитационной разгрузке, иммобилизации конечности, а также при длительном лишении человека обычной двигательной активности скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате нарушающегося баланса между синтезом и деградацией белка. Недавно показано, что даже непродолжительное нахождение крыс в клетках ограниченного размера вызывает атрофию «быстрых» скелетных мышц (и ускоренный набор веса тела) животного [1]. Исследование причины этих изменений и разработка способов профилактики атрофии мышц особенно актуальны сейчас, когда в условиях изоляции в ограниченном пространстве значительное число людей отмечали негативные изменения в своем организме. Для разработки способа предотвращения развития атрофического процесса необходимо выявить фундаментальные механизмы (триггеры) его инициирования. При гипокинезии снижается активность мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR – mammalian target of rapamycin) [2, 3] и увеличивается активность убиквитин-протеасомного сигнального пути, который отвечает за существенную часть круговорота цитоплазматического белка, доступного для протеолиза [4]. Деградация мышечных белков усиливается при увеличении экспрессии убиквитинлигаз E3, определяющих интенсивность протеасомного пути белковой деградации. Однако физиологические механизмы, активизирующие эти процессы, не полностью понятны. Известно, что при функциональной разгрузке мышц происходит накопление макроэргических фосфатов (АТФ, креатинфосфата) и ионов Ca^{2+} в мышечных волокнах [5–8]. Ранее было показано для многих тканей, что внеклеточный АТФ является основным аутокринно-паракринным медиатором для клеточной сигнализации, вызываемой гормонами, факторами роста, нейротрансмиттерами, механическими стимулами и воспалением

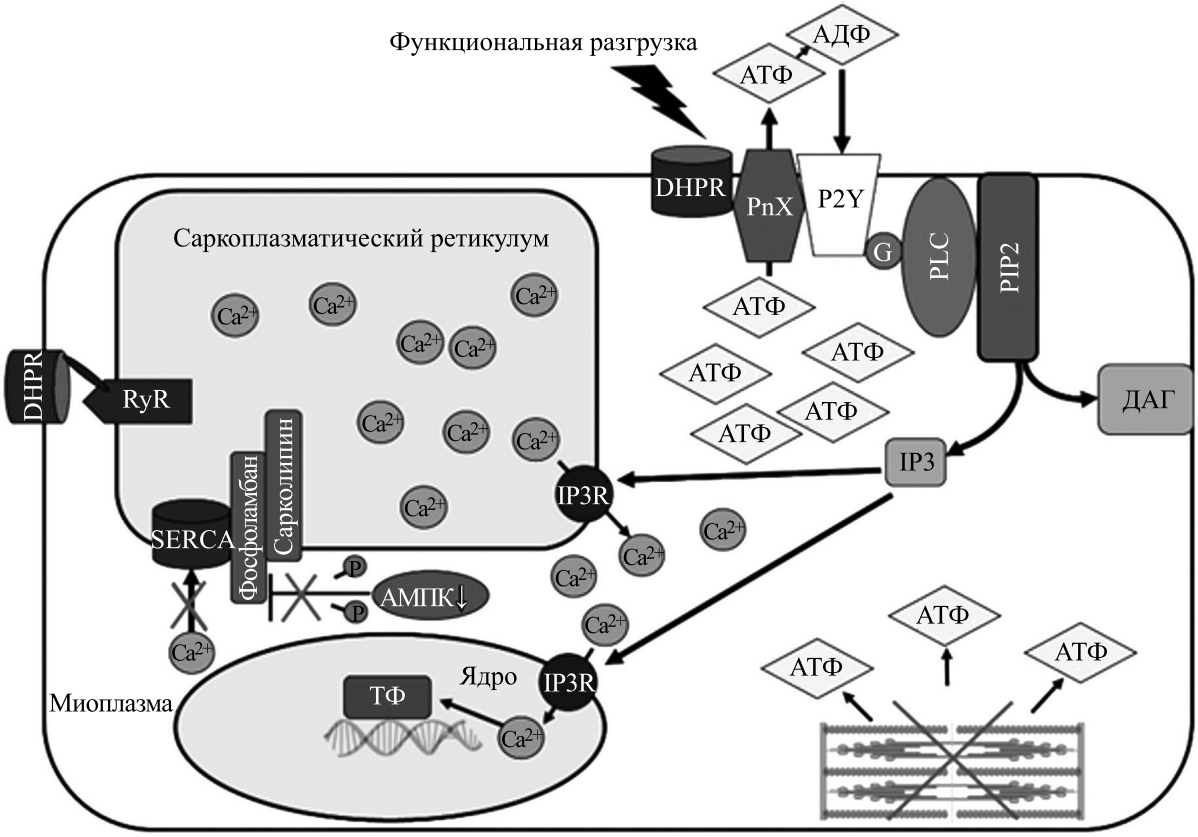
Сокращения: mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих, SERCA – Ca2+-активируемая АТФаза P-типа, DHPR – дигидропиридин, IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат, PnX1 – паннексин 1, PI3K – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа, PLC – фосфолипаза C, АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа.

[9], поэтому мы предполагаем, что АТФ может быть одним из центральных интеграторов стимулов, полученных для клеток скелетных мышц, чтобы позволить и координировать события для экспрессии мышечных генов. Мы предположили, что АТФ и «медленный» Ca^{2+} могут стимулировать запуск внутриклеточных сигнальных путей и атрофических процессов при функциональной разгрузке скелетных мышц. Под термином «медленный» кальций здесь понимается тот кальций, повышенная концентрация которого в течение длительного времени находится в цитоплазме (из-за изменений в ферментах (например, SERCA – Ca2+-активируемая АТФаза Р-типа)) и затруднения его обратного транспорта в саркоплазматический ретикулум. В обзоре будет проанализирован источник поступления, пути передачи и действия этих стимулов на генную экспрессию при функциональной разгрузке мышц.

АТФ-ЗАВИСИМЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Для разработки способа предотвращения развития атрофии мышц необходимо выявить механизмы ее инициирования. В то же время именно ранние этапы развития атрофии при функциональной разгрузке мышц изучены хуже всего. Стимул, активирующий работу АТФ-зависимых путей регуляции сигналлинга скелетных мышц при их разгрузке может быть следующий. Функциональная разгрузка мышц ведет к изменению электромиограммы, открытию дигидропиридиновых каналов (DHPR-каналы, относящиеся к L-типу Ca^{2+}-зависимых каналов), которые плотно соединены с паннексиновыми каналами [10, 11]. Паннексины были открыты в 2000 г. как новое семейство белков, способных формировать каналы в мембране [12, 13]. Они были обнаружены у всех хордовых животных [14]. В скелетных мышцах широко представлен паннексин 1 (48 кДа). Показано, что паннексиновые каналы пропускают АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство [15–17]. АТФ является важной сигнальной молекулой [18, 19]. Мы полагаем, что внеклеточный АТФ при функциональной разгрузке может являться одним из основных сигналов в скелетных мышцах для регулирования различных процессов, среди которых – экспрессия генов. Ранее было показано, что высвобождение АТФ регулируется прямым взаимодействием паннексиновых и DHPR-каналов [10]. Обнаружено, что в мышечных волокнах АТФ выходит из клетки через паннексиновые каналы и взаимодействует с пуринергическими P2Y2-рецепторами [20] (см. рисунок). Было также показано, что активация пуринэргических рецепторов экзогенными агонистами вызывает выход кальция, который зависит от инозитол-1,4,5-трифосфатного (IP3) пути, но не зависит от работы RyR-каналов [21]. Пуринорецепторы делятся на несколько классов и обладают разной чувствительностью к АТФ и продуктам его распада (АДФ, АМФ и аденозину), а также к другим нуклеотидтрифосфатам и их производным [22]. Несколько лет назад мы обнаружили, что метаболические изменения и атрофические процессы в мышце предотвращаются при ингибировании DHPR или снижении концентрации макроэргических фосфатов при вывешивании крыс [8, 23] – наиболее часто используемой модели для исследования функциональной разгрузки мышц [24]. Но схема работы этого механизма была не до конца понятна. Мы предположили, что АТФ и «медленный» Ca^{2+} могут стимулировать запуск внутриклеточных сигнальных путей и атрофических процессов при разгрузке мышц. Механизм этого процесса может быть следующим: при функциональной разгрузке АТФ из мышцы через паннексиновые каналы (pannexin-1; PnX1) может выходить во внеклеточное пространство. Эти нуклеотиды затем могут взаимодействовать с каналами P2Y (G protein Y-coupled receptors), которые, в свою очередь, активируют гамма-субъединицу фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы (PI3K) (в Т-каналах – мембраны и в конечном итоге IP3-рецепторы, находящиеся в ядре и саркоплазматическом ретикулуме). Активация IP3-рецепторов (IP3R) может вызывать слабый сигнал высвобождения кальция, как цитозольный, так и нуклеоплазматический [25, 26], который способствует (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов, что приводит к экспрессии или репрессии генов, участвующих в фенотипе мышц. Мы проверили эту гипотезу в нашей лаборатории, применив в модели функциональной разгрузки мышц крыс (вывешивании) ингибирование паннексиновых каналов (PnX1), пропускающих АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство. Было обнаружено, что PnX1-опосредованный транспорт АТФ влияет на экспрессию мышечно-специфичных Е3-убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx и регулирует сигнальные пути, контролирующие процессы трансляции и элонгации белка.

В настоящее время существует мало информации о сигнальных путях, активируемых конформационными изменениями вольт-чувствительных DHP-каналов в экспериментах *in vivo*. В экспериментах на культуре мышечных клеток было обнаружено новое свойство DHPR как сенсора напряжения для сигнала, регулируемого G-белком цитоплазматической мембраны, включающим активацию фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и фосфолипазы С (PLC) [11]. Авторы показали, что деполяризация мембраны вызывает активацию фосфолипазы С, ведущую к последу-



Схематическое описание АТФ-зависимого механизма передачи сигналов в скелетных мышцах. АТФ высвобождается через паннексиновые каналы (PnX1) при функциональной разгрузке мышц; сенсором напряжения являются дигидропиридиновые рецепторы (DHPR). АТФ быстро распадается на аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ) и аденозин под действием эктонуклеотидаз. АТФ и АДФ могут действовать на P2Y-рецепторы, связанные с G-белком, которые, в свою очередь, активируют PI3-киназу в мембране Т-трубочек. PI3-киназа катализирует фосфорилирование фосфатидилинозитолдифосфата (PIP2), давая PIP3 высокозаряженный остаток, который рекрутирует фосфолипазу C (PLC) в мембрану, запуская гидролиз PIP2 на диацилглицерин (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3). IP3 затем связывается с рецепторами IP3 (IP3R), присутствующими как в ядерной оболочке, так и в саркоплазматической сети, вызывая слабый сигнал высвобождения кальция как в цитозоле, так и нуклеоплазме, что способствует (возможно, с другими сигнальными каскадами) к активации транскрипционных факторов (ТФ), приводящих к экспрессии или репрессии генов, вовлеченных в фенотип мышечных клеток.

ющему высвобождению медленного Ca^{2+}, из-за действия инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3) (рисунок). Введение агониста DHPR (Bay K 8644) при отсутствии внешнего Ca^{2+} ускоряло медленный кальциевый сигнал [27]. Потенциал действия в качестве стимула для медленных сигналов Ca^{2+} был подтвержден путем блокирования тетродотоксином потенцал-зависимых Na^{+}-каналов [28]. Начало медленного кальциевого сигнала, вызванного тетанической стимуляцией миотуб, имело 30-40-секундную задержку после окончания стимуляции, откуда следует, что сигнальный путь должен быть активирован в течение этого периода. В обзоре [11] описана связь между последовательно находящимися в плазмолемме DHPR- и PnX1-каналами, G-белком, PLC и PI3K. Ранее с применением ряда методов исследовали участие PI3K как части этого механизма трансдукции [11, 27, 29]. Показано, что конформационные изменения DHPR могут активировать гамма- и бета-субъединицы G-белка плазмолеммы, который активирует гамма-PI3K и затем гамма-PLC (фосфолипазу C) (см. рисунок). Чтобы дополнительно оценить, участвует ли PI3K в активации PLC, на миотубы воздействовали ингибиторами PI3K (LY294002 и вортманнином) [27]. Оказалось, что они полностью блокировали как медленные сигналы Ca^{2+}, так и кратковременное увеличение содержания IP3, вызванное электростимуляцией (рисунок). Этот результат вместе с тем фактом, что PI3K гамма активируется G-белком (его бета- и гамма-субъединицами), свидетельствует, что гамма-PI3K является хорошим кандидатом для регуляции продукции IP3. Хотя мРНК гамма-PI3K в скелетных мышцах была выявлена более десяти лет назад, ее физиоло-

гическая роль и активирующие ее стимулы все еще не выяснены.

Почему IP3, IP3K и IP3R заинтересовали нас в связи с исследованием АТФ-зависимых атрофических процессов при функциональной разгрузке скелетных мышц? Ранее было показано, что IP3R-зависимые медленные сигналы Ca^{2+} могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ фенотипа медленных и быстрых мышечных волокон [11]. Ранее показано, что транспорт транскрипционного фактора гена медленного миозина NFATC1 в ядро скелетно-мышечных волокон осуществляется при участии IP3R [30]. IP3R, находящиеся как в мембране саркоплазматического ретикулума, так и ядра [25, 26, 31], активируются и IP3, и ионами Ca^{2+} [25]. Нуклеотиды, высвобождаемые из мышечных волокон во внеклеточную среду, вызывают переходные процессы кальция и экспрессию генов в скелетных мышцах [21]. Ранее высказывалось предположение о том, что околоядерные и внутриядерные кальциевые сигналы могут быть мощным инструментом для клетки для регулирования адаптивных процессов, таких как экспрессия генов [26]. Вероятно, кальций при функциональной разгрузке мышцы выполняет роль ключевого вторичного мессенджера, активирующего кальцийзависимые транскрипционные факторы в процессе, называемом сопряжением возбуждения и транскрипции. Можно предположить, что локализованный в цитоплазме кальциевый сигнал запрашивается для активации и транслокации кальций-зависимых транскрипционных факторов (цитоплазматический ядерный фактор активации Т-лимфоцитов-1 (NFATc1); гистоновых деацетилаз (HDACs), миогенина, FOXO3, TFEB и др.)) в ядро (в том числе и, опосредованно, через процессы их фосфорилирования/дефосфорилирования) для последующей экспрессии генов. Вполне вероятно, что IP3-рецепторы являются существенно значимым звеном для трафика транскрипционных факторов в ядро [32]. Подтверждено также участие Ca^{2+}, IP3 и IP3R в процессах сопряжения возбуждения и транскрипции в кардиомиоцитах [31]. Мы полагаем, что при функциональной разгрузке ряд ключевых транскрипционных факторов также может проникать в ядро через IP3-рецепторы и стимулировать экспрессию генов, изменяющих процессы белкового синтеза и деградации.

Итак, можно заключить, что в экспериментах на миотубах и культуре мышечных клеток было обнаружено, что в мышечных волокнах внеклеточная АТФ активирует мембранный сигнальный каскад, который в конечном итоге, высвобождая «медленный» кальций, регулирует экспрессию генов. Аналогичный механизм активации G-белка был обнаружен и в сосудистых клетках [33]. Авторы показали, что АТФ, которая оказывается во внеклеточном пространстве, вызывает отставленное медленное высвобождение кальция через P2Y2R-PLC-IP3 путь. Введение антагониста P2Y2-рецептора блокировало медленное высвобождение кальция, демонстрируя, что оно происходит из-за активации сигнального пути P2Y2R-PLC-IP3. Вполне вероятно, что регуляция этого пути является не уникальной для мышечных волокон, а универсальным механизмом регуляции генной экспрессии при различных физиологических воздействиях *in vivo*.

ВОЗМОЖНОЙ СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА АТФ-ЗАВИСИМЫМ СИГНАЛЛИНГОМ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ

В настоящее время роль макроэргических фосфатов и PnX1-опосредованного транспорта АТФ в регуляции сигнального пути P2Y2R-PLC-IP3 и ядерного транспорта транскрипционных факторов при функциональной разгрузке мышц находится в начале своего исследования. Известно, что IP3K участвует в регуляции анаболических и катаболических процессов в скелетных мышцах [34, 35]. Например, PI3K контролирует и PI3K-Akt-mTORC1/p70S6k и Akt/GSK-сигнальные пути [34, 36]. Мы обнаружили интересный феномен. Если при длительных сроках функциональной разгрузки мышц происходит снижение mTORC1 сигнального пути (семь-четырнадцать суток), то на ранних сроках (после одних-трех суток гравитационной разгрузки) наблюдается повышение содержания фосфорилированной формы ключевой рибосомальной киназы p70S6K [37]. Аналогичное повышение уровня фосфорилирования p70S6k было впоследствии продемонстрировано в эксперименте с двенадцатичасовым вывешиванием задних конечностей крысы [38]. До сих пор не было выяснено, что является источником такого парадоксального поведения компонентов анаболического сигналлинга на ранних сроках функциональной разгрузки мышц. Мы полагаем, что одним из механизмов может быть работа системы передачи АТФ-опосредованного сигнала через PnX1/P2Y2R/IP3K-компоненты этого пути. Ранее в эксперименте с культурой клеток человека показано, что импорт внешней АТФ и АМФ регулирует внутриклеточный сигналлинг AMPK и mTORC1 [39]. В экспериментах с одно-трехсуточной функциональной разгрузкой мышц было показано, что к фосфорилированию p70S6K имеет отношение AMPK [35]. На фосфорилирование/дефосфорилирование IP3R (регулирующих ее функцию) влияет ряд фосфатаз и киназ [40], в том числе, возможно, и АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК). АМПК иг-

рает ключевую роль в регуляции сигнальных путей, которые контролируют метаболические, структурные и функциональные изменения в скелетной мышце при разгрузке. Каким образом АМПК может быть ассоциирована с регуляцией кальциевого обмена при разгрузке мышц? Показано, что АМПК может фосфорилировать фосфоламбан и сарколипин [41]. При разгрузке мышц (а также некоторых мышечных заболеваниях, сопровождающихся атрофией) активность SERCA ингибируется фосфоламбаном (PLN) и сарколипином (SLP), в результате чего нарушается кальциевый обмен [42–44]. AMPK, фосфорилируя PLN и SLP, как известно, активирует SERCA [41]. Потенциально, этот механизм воздействия на активность SERCA при разгрузке можно было бы использовать для снижения негативного эффекта нарушения кальциевого обмена в мышце. Такая взаимосвязь между активностью AMPK и SERCA характерна не только для скелетных мышц. Например, активация АМПК метформином *in vivo* подавляет стресс эндоплазматического ретикулума за счет увеличения фосфорилирования фосфоламбана [41]. Фосфоламбан также регулирует запасы Ca^{2+} в ядре и опосредованный IP3R его обмен (между ядром, эндоплазматическим ретикулумом и саркоплазмой) [45]. Другие авторы также отмечали взаимосвязь между экспрессией SERCA2a и активностью AMPK2α в скелетной мышце [46]. Таким образом, AMPK регулирует множество процессов в мышечном волокне, и одним из стимулов для ее активации, по-видимому, является изменение АТФ-зависимого сигналлинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, АТФ и кальций являются триггерами для активации или репрессии генов при функциональной разгрузке мышц. Механизм их действия может быть следующим. Функциональная разгрузка мышц ведет к изменению электромиограммы, открытию DHPR-каналов, которые плотно соединены с паннексиновыми каналами. DHPR, взаимодействуя с RYR, способствуют быстрому выходу ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Одновременно с этим АТФ, которая быстро накапливается при функциональной разгрузке, выходит из клетки через паннексиновые каналы и взаимодействует с пуринергическими P2Y2-рецепторами. IP3 и Ca^{2+} взаимодействуют с IP3R, которые пропускают в этом состоянии Ca^{2+} и, возможно, транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию генов. Вероятно, активность SERCA и IP3R рецепторов может регулировать АМПК, фосфорилируя PLN и SLP и тем самым влияя на концентрацию ионов Ca^{2+} в волокне.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00228) и Российсского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00138).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. П. Белова, С. А. Тыганов, Е. П. Мочалова и др., Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова **107** (6), 1 (2021).
2. S. C. Bodine, E. Latres, S. Baumhueter, et al., Science **294** (5547), 1704 (2001).
3. S. C. Bodine, J. Appl. Physiol. **129** (2), 272 (2020).
4. D. Aweida and S. Cohen, Biomolecules **11** (1), (2021).
5. Y. Ohira, W. Yasui, F. Kariya, et al., Acta Astronautica **33**, 113 (1994).
6. C. P. Ingalls, G. L. Warren, and R. B. Armstrong, J. Appl. Physiol. **87** (1), 386 (1999).
7. C. P. Ingalls, J. C. Wenke, and R. B. Armstrong, Aviation, Space, and Environ. Medicine **72** (5), 471 (2001).
8. B. S. Shenkman and T. L. Nemirovskaya, J. Muscle Res. Cell Motil. **29** (6–8), 221 (2008).
9. E. R. Lazarowski, R. C. Boucher, and T. K. Harden, Mol. Pharmacol. **64** (4), 785 (2003).
10. M. Casas, S. Buvinic, and E. Jaimovich, Exercise and Sport Sci. Rev. **42** (3), 110 (2014).
11. L. A. Cea, M. A. Riquelme, A. A. Vargas, et al., Front. Physiol. **5**, 139 (2014).
12. Y. Panchin, I. Kelmanson, M. Matz, et al., Curr. Biol. **10** (13), R473 (2000).
13. Y. V. Panchin, J. Exp. Biol. **208** (Pt 8), 1415 (2005).
14. V. I. Shestopalov and Y. Panchin, Cell. Mol. Life Sci. **65** (3), 376 (2008).
15. B. A. MacVicar and R. J. Thompson, Trends Neurosci. **33** (2), 93 (2010).
16. S. Penuela, R. Gehi, and D. W. Laird, Biochim. Biophys. Acta **1828** (1), 15 (2013).
17. G. Dahl, Philos. Trans. Roy. Soc. B **370** (1672), (2015).
18. G. Burnstock, J. Theor. Biol. **62** (2), 491 (1976).
19. G. Burnstock, BioEssays **34** (3), 218 (2012).
20. S. Buvinic, G. Almarza, M. Bustamante, et al., J. Biol. Chem. **284** (50), 34490 (2009).

21. C. May, L. Weigl, A. Karel, et al., Biochem. Pharmacol. **71** (10), 1497 (2006).
22. T. L. Nemirovskaya, B. S. Shenkman, D. D. Matsievskii, et al., Doklady Biol. Sci. **370** (1–6), 10 (2000).
23. V. Ralevic and G. Burnstock, Pharmacol. Rev. **50** (3), 413 (1998).
24. E. Morey-Holton, R. K. Globus, A. Kaplansky, et al., Adv. Space Biol. Med. **10**, 7 (2005).
25. C. W. Taylor and S. C. Tovey, Cold Spring Harbor Persp. Biol. **2** (12), a004010 (2010).
26. T. Georgiev, M. Svirin, E. Jaimovich, et al., Front. Physiol. **6** (263 (2015).
27. M. Casas, R. Figueroa, G. Jorquera, et al., J. Gen. Physiol. **136** (4), 455 (2010).
28. J. M. Eltit, J. Hidalgo, J. L. Liberona, et al., Biophys. J. **86** (5), 3042 (2004).
29. R. Araya, J. L. Liberona, J. C. Cardenas, et al., J. Gen. Physiol. **121** (1), 3 (2003).
30. 30. J. R. Crew, K. Falzari, and J. X. DiMario, Exp. Cell Res. **316** (6), 1039 (2010).
31. F. Hohendanner, S. Walther, J. T. Maxwell, et al., J. Physiol. **593** (6), 1459 (2015).
32. M. A. Carrasco, E. Jaimovich, U. Kemmerling, et al., Biol. Res. **37** (4), 701 (2004).
33. B. Liu, W. Cao, J. Li, et al., Cell Calcium **76**, 62 (2018).
34. D. J. Glass, Curr. Topics Microbiol. Immunol. **346**, 267 (2010).
35. S. Cohen, D. Lee, B. Zhai, et al., J. Cell Biol. **204** (5), 747 (2014).
36. N. Ito, U. T. Ruegg, and S. Takeda, Int. J. Mol. Sci. **19** (9), 2804 (2018).
37. S. P. Belova, N. A. Vilchinskaya, E. P. Mochalova, et al., Arch. Biochem. Biophys. **674**, 108105 (2019).
38. A. V. Chibalin, B. Benziane, G. F. Zakyrjanova, et al., J. Cell. Physiol. **233** (10), 6329 (2018).
39. G. M. Forte, E. Davie, S. Lie, et al., J. Cell Sci. **132** (7), (2019).
40. V. Vanderheyden, B. Devogelaere, L. Missiaen, et al., Biochim. Biophys. Acta **1793** (6), 959 (2009).
41. Q. Duan, P. Song, Y. Ding, et al., Brit. J. Pharmacol. **174** (13), 2140 (2017).
42. M. Komatsu, T. Nakada, H. Kawagishi, et al., J. Muscle Res. Cell Motil. **39** (5–6), 163 (2018).
43. V. A. Fajardo, E. Bombardier, E. McMillan, et al., Disease Models & Mechanisms **8** (8), 999 (2015).
44. D. H. MacLennan, M. Asahi, and A. R. Tupling, Ann. N. Y. Acad. Sci. **986**, 472 (2003).
45. M. Chen, D. Xu, A. Z. Wu, et al., J. Mol. Cell. Cardiol **123**, 185 (2018).
46. M. P. Morissette, S. E. Susser, A. N. Stammers, et al., J. Appl. Physiol. **117** (5), 544 (2014).

ATP-Dependent Pathways Involved in the Regulation of Skeletal Muscle Signaling and the Relationship between These Pathways and Gene Expression during Muscle Unloading: the Role of «Slow» Calcium

T.L. Nemirovskaya

Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia

This review aims to describe the mechanisms by which ATP-dependent pathways involved in the regulation of skeletal muscle signaling act during muscle unloading. Special attention is paid to the description of the role of pannexin channels, purinergic P2Y receptors, and IP3 receptors in the activation of specific transcriptional signaling programs of soleus muscle under unloading conditions. It is known that muscle unloading causes accumulation of high-energy phosphates (ATP, PCr), and Ca ions in muscle fibers. Previously, it was shown that the drug administered during unloading and that able to decrease the level of high-energy phosphates in the muscle, as well as the level of calcium, can prevent the shift of muscle fibers to fast-twitch fibers and reduce the degree of muscle atrophy. This review describes possible mechanisms by which ATP may reach the receptors that perceive this signal, as well as the way of signal transmission to trigger the "slow" Ca^{2+} signal involved in the activation of specific transcriptional programs in the muscle while simulating unloading conditions.

Keywords: ATP-dependent signaling, skeletal muscle, calcium signaling, muscle unloading

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 657–667

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 578/579.6

БИОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

© 2021 г. О.И. Гулий*, **, Б.Д. Зайцев*, А.К.М. Алсовэйди****, О.А. Караваева*, Л.Г. Ловцова**, И.А. Бородина*****

**Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, Саратов, пр. Энтузиастов, 13*

***Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, 410012, Саратов, Театральная пл., 1*

****Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, 410019, Саратов, ул. Зеленая, 38*

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

E-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2021 г.
После доработки 02.06.2021 г.
Принята к публикации 03.06.2021 г.

Антибиотики широко применяются в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Однако активное использование антибактериальных препаратов приводит к загрязнению окружающей среды. В связи с этим существует большая потребность в мониторинге и определении антибиотиков в различных средах, таких как питьевая вода, продукты питания, напитки, сточные воды фармацевтических предприятий и др. Для определения антибиотиков разработано достаточное количество методов, в том числе и на основе биосенсоров. Биосенсорые методы анализа имеют довольно широкое применение и являются неотъемлемой частью при экологическом мониторинге. Наиболее востребованными для анализа антибиотиков являюся электрохимические, оптические, акустические, микробные биосенсоры, иммуно- и аптасенсоры, а также сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров. В статье приводится краткий обзор биосенсорных методов и подходов для определения антибиотиков. Проведен анализ наиболее перспективных биосенсорных систем при определении антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: антибиотики, методы определения, биосенсоры, аптамеры, антитела, микробные клетки.

DOI: 10.31857/S0006302921040050

Антибактериальные препараты являются одной из наиболее широко используемых групп лекарственных средств на фармацевтическом рынке. Антибиотики широко применяются не только в медицине и ветеринарии, но и в пищевой промышленности при консервировании и обработке пищевых продуктов, а также их транспортировке [1].

Антибиотики в субтерапевтических дозах добавляют в корм животным для усиления их роста [2]. Анализ питьевой воды на наличие антибиотиков представляет особый интерес из-за возможности попадания потенциальных загрязнителей в круговорот воды. В связи с этим актуальным является проблема контроля содержания антибиотиков в лекарственных формах, а также их определение в жидкостях, в продуктах питания, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах. Для обнаружения антибиотиков используют микробиологические, спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, различные варианты хроматографических методов, в том числе высокоэффективную жидкостную хроматографию и хромато-масс-спектрометрию, инверсионную вольтамперометрию, электроаналитическое определение с модифицированными электродами [3], а также биосенсорные методы [4, 5]. Биосенсорные методы анализа активно развиваются в последнее время и являются неотъемлемой частью экологического мониторинга окружающей среды. В работе представлен краткий обзор биосенсорных систем для определения антибиотиков.

Сокращение: ППР – поверхностный плазмонный резонанс.

БИОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Несмотря на значительное количество разработанных методов определения антибиотиков,

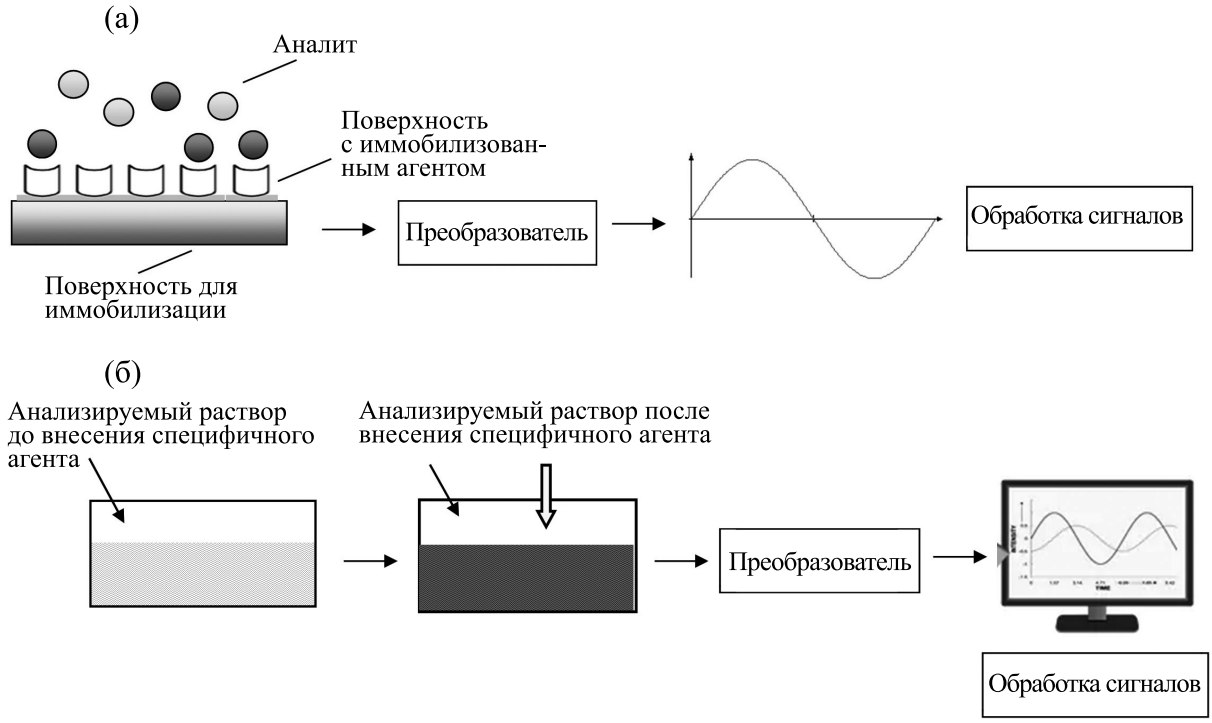


Рис. 1. Общая схема биосенсоров с иммобилизацией (а) и без иммобилизации (б) компонентов анализа.

одной из наиболее перспективных технологий для экспресс-анализа антибактериальных препаратов являются биосенсорные системы. Биосенсоры позволяют проводить качественный и количественный анализ антибиотиков, что делает их очень востребованными при необходимости крупномасштабного анализа антибактериальных препаратов. Однако биосенсоры имеют ряд ограничений, связанных как со стабильностью работы, так и с их стерилизацией после удаления отработанных образцов.

Биосенсоры представляют собой био-химико-физические системы, состоящие из двух компонентов: чувствительного биологического элемента и системы детекции, которые позволяют регистрировать концентрацию или активность различных аналитов, присутствующих в образце. Биологический элемент может быть каталитическим и некаталитическим. К каталитическим элементам можно отнести бактерии, ферменты и ткани. К некаталитическим элементам относятся рецепторы и нуклеиновые кислоты. Система детекции может быть оптической, калориметрической, акустической, электрической и др. Для определения антибиотиков применяются биосенсоры, обладающие различной конструкцией и механизмом действия. Ключевой и решающей задачей при разработке биосенсора является процесс введения и закрепления биорецептора на поверхности носителя (трансдьюсера), т.е. процесс иммобилизации, позволяющий разработать селективный, воспроизводимый, чувствительный, стабильный биосенсор [6, 7]. Поэтому существуют два варианта датчиков – датчики с иммобилизацией компонентов анализа на их поверхности и датчики, с помощью которых возможно проведение исследований непосредственно в жидкости, без иммобилизации компонентов анализа. Общая схема биосенсоров представлена на рис. 1.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

Электрохимические биосенсоры создавались с целью объединения чувствительности электрохимического детектора и специфичности активного слоя. Среди электрохимических биосенсоров можно выделить следующие:

– потенциометрические сенсоры, в которых измеряется потенциал ячейки при нулевом токе [8];

– вольтамперометрические (или амперометрические) сенсоры, в которых измеряется ток окисления или восстановления электроактивных частиц, возникающий при приложении заданной разности потенциалов между электродами [9];

– кондуктометрические сенсоры, в которых измеряется электропроводность содержимого контейнера с помощью моста проводимостей [8, 9].

В биосенсорах электрохимического типа в сочетании с потенциометрическими или ампero-

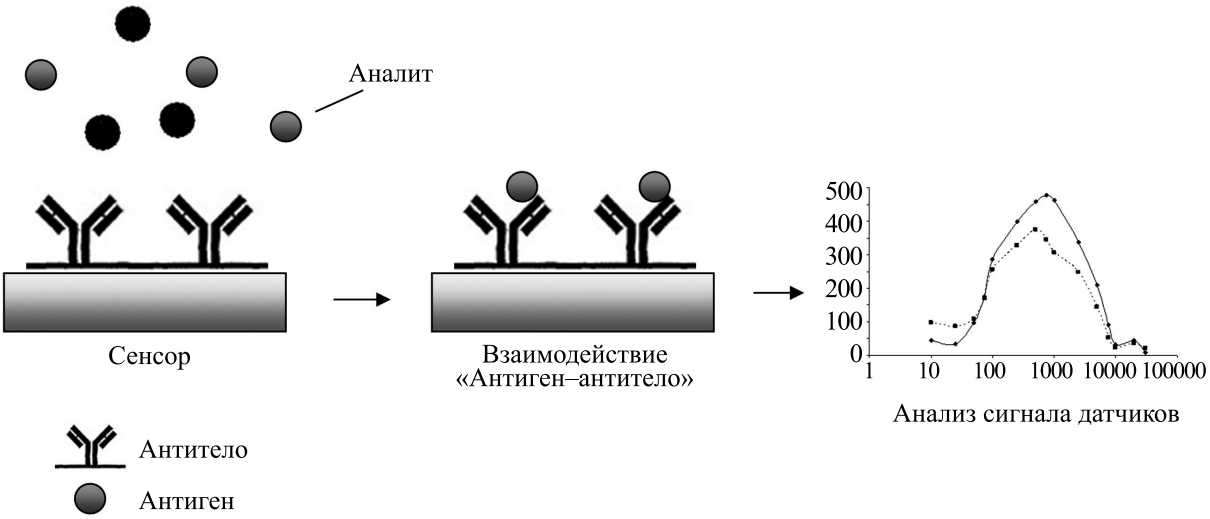


Рис. 2. Общая схема работы иммуносенсора.

метрическими электродами применяют ферменты, рецепторы, клетки микроорганизмов, ткани растений и животных, антитела, меченные ферментами.

Например, в работе [10] описаны возможности сенсоров на основе стеклоуглеродного электрода и пленок хитозана для определения норфлоксацина в присутствии дофамина, кофеина и мочевой кислоты. Морфологические, структурные и электрохимические характеристики наноструктурированного материала оценивали с помощью спектрофотометрии, рентгеновской дифракции, просвечивающей электронной микроскопии и вольтамперометрии.

Другими авторами был разработан [11] электрохимический биосенсор на основе принципа аффинности для обнаружения остатков цефтиофура в образцах мяса с помощью спектроскопии электрохимического импеданса при времени анализа 15 мин.

ИММУНОСЕНСОРЫ

Самая большая группа биосенсоров, используемых для обнаружения антибиотиков, основана на использовании иммунохимических реакций биораспознавания – иммуносенсоры. Иммуносенсоры – это устройства, состоящие из специфичного антигена/антитела, связанного с преобразователем и передатчиком сигнала о связывании соответствующего лиганда. Общая схема иммуносенсора представлена на рис. 2. В работе иммуносенсора в качестве определяемых соединений или распознающих молекул обязательно принимают участие антитела, которые иммобилизуются на сенсоре или вводятся в пробу при выполнении конкурентного формата анализа. Для создания рецепторных покрытий иммуносенсоров используют различные по природе биологически активные вещества: гаптен-белковые конъюгаты (с белковыми молекулами связаны низкомолекулярные вещества, такие как салициловая кислота, сульфаниламиды, атразин, кокаин и др.), белки (антитела и рекомбинантные фрагменты антител); синтетические пептиды (например, HIV-пептид), липополисахариды, вирусы, клетки и т.д.

К наиболее часто применяемым иммуносенсорам относятся электрохимический и оптический. Последним чаще всего является биосенсор с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Хотя иммуносенсоры очень селективны, скорость анализа зависит от времени инкубации, необходимого для образования комплекса антиген/антитело. Кроме того, полная регенерация датчика также может занять довольно много времени [12, 13].

Иммуносенсоры используют для оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов, т.е. для качественного и количественного определения веществ в анализируемой пробе после реакции связывания антигена со специфичными антителами. Детекция может быть как прямой (когда исследуемое вещество само обладает ферментативной активностью либо помечено ферментативной меткой), так и косвенной (когда исследуемое вещество, связавшееся с иммобилизованными на твердой фазе антителами, инкубируется с антителами, меченными ферментативной меткой).

Среди иммуносенсоров выделяют четыре основных типа датчиков: измерители электрохимических процессов (потенциометрия, амперометрия); измерители массы (пьезоэффект); измерите-

ли тепла (калориметрия); измерители оптических свойств. Количественный результат может быть получен в режиме реального времени.

Например, в работе [14] представлен одноразовый амперометрический магнитоиммуносенсор, включающий использование антител, иммобилизованных на поверхности магнитных шариков с белком G (ProtG-MB), и угольных электродов с трафаретной печатью, для количественного и специфичного определения остатков тетрациклинов в молоке.

Для решения проблемы определения остатков антибиотиков в молоке авторы другого исследования [15] предложили объединить иммунофлуоресцентный анализ на основе многоцветных квантовых точек (QD) и метод матричного анализа для одновременного, чувствительного и визуального обнаружения стрептомицина, тетрациклина и пенициллина G в молоке. Антитела, специфичные к данным антибиотикам, конъюгировали с QD на разных длинах волн излучения (QD520 нм, QD565 нм и QD610 нм) и использовались в качестве зондов обнаружения. Детекцию проводили методом прямого конкурентного флуоресцентного иммуноанализа в лунках микротитровального планшета, покрытого антигеном, для одновременного качественного и количественного определения остатков указанных антибиотиков. Метод может обеспечить одновременный анализ нескольких антибиотиков в нескольких образцах за один прогон (высокопроизводительный анализ).

АПТАСЕНСОРЫ

Применение для аффинного взаимодействия аптамеров – молекул некоторых пептидов, коротких полимеров нуклеиновых кислот ДНК или РНК, а также их фрагментов (линейных олигонуклеотидов) – явилось началом разработки аптасенсоров. По специфичности взаимодействий аптамеры подобны антителам, но отличаются большей устойчивостью и способностью к обратимой денатурации, осуществляемой в течение нескольких минут. Развитие аптасенсоров может стать реальной альтернативой высокочувствительным и селективным иммуносенсорам для проведения экологического мониторинга лекарственных препаратов.

Применение иммобилизованных аптамеров в качестве элементов распознавания (аптасенсоры) является весьма перспективным при анализе антибиотиков, поскольку их чувствительность сопоставима с чувствительностью антител. Кроме того, они могут быть химически синтезированы, обладают высокой термической стабильностью, легко модифицируются и иммобилизуются [16].

Возможности применения электрохимического аптасенсора для высокочувствительного обнаружения хлорамфеникола в меде показаны в работе [17]. Полимеразная реакция смещения цепи позволила определить наличие охратоксина в образцах виноградного сока [18]. Возможности применения аптамеров и теоретическое исследование с целью их дизайна и моделирования приведены в работе [19].

Методы комбинирования аптасенсора и флуоресценции являются наиболее распространенными благодаря их превосходной чувствительности и селективности, удовлетворительному пространственному и временному разрешению и экономической эффективности. Например, в работе [20] описан флуоресцентный аптасенсор для обнаружения хлорамфеникола с использованием конъюгированных с аптамером магнитных наночастиц как для индикации, так и для анализа концентрации препарата. Система биоанализа была изготовлена путем иммобилизации аптамера на поверхности магнитных наночастиц, которые использовались для захвата и концентрации хлорамфеникола и приводили к изменению флуоресцентного сигнала на поверхности магнитных наночастиц.

СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

Элементы распознавания, такие как антитела, антигены, иммуноглобулины, ферменты и аптамеры, наиболее часто применяемые при формировании рецепторного слоя сенсоров, характеризуются высокой специфичностью и позволяют получать информацию о протекании биохимической реакции в растворах практически в режиме реального времени. При использовании биологических объектов в качестве рецепторов актуальной является проблема повышения времени функционирование сенсоров на их основе. Сложность получения природных рецепторов, их неустойчивость при хранении, воздействии органических растворителей и высоких концентраций электролитов стимулирует поиски синтетических антител, в качестве которых могут выступать полимеры с молекулярными отпечатками, имеющие ряд несомненных достоинств по сравнению с биомолекулами.

Внимание исследователей к полимерам с молекулярными отпечатками связано с их уникальными свойствами обеспечивать высокую селективность молекулярного распознавания одного вида целевых молекул в присутствии множества других соединений близкого строения. К их несомненным достоинствам относятся методическая простота получения в отличие, например, от выработки антител к низкомолекулярным соединениям, являющейся многостадийным и длительным процессом, и высокая воспроизводимость синтезов. Кроме того, такие полимеры стабильны в агрес-

сивных средах при резком изменении условий эксплуатации и могут быть синтезированы к фактически любому веществу – неорганическим ионам, наркотикам, нуклеиновым кислотам, белкам, клеткам и даже супертоксичным соединениям, для которых, например, поликлональные антитела получены быть не могут.

Одним из важных достижений в области биосенсорного анализа остатков антибактериальных препаратов в пищевых продуктах является применение полимерных сенсоров с молекулярной печатью (англ. molecularly imprinted polymer sensors) [21, 22]. Молекулярный импринтинг – это метод создания синтетических материалов, содержащих специфические рецепторные сайты, обладающие высоким сродством к молекуле-мишени. На сегодняшний день наработан значительный материал по теории функционирования молекулярно импринтированных полимеров и методики их синтеза для широкого круга аналитов, в том числе для лекарственных препаратов. Для получения пленок молекулярно импринтированных полимеров на поверхности электрода сенсора наибольшее распространение получили способ фотополимеризации покрытия при вращении (spin-coating), сэндвич-метод (sandwich-casting), а также способы термоиндуцированного разделения фаз, послойного депонирования (layer-de-layer deposition), электрополимеризации и смешанные подходы, основанные на нанотехнологиях [23, 24].

Формирование распознающего слоя на поверхности полимерного или золь-гель-материала способом поверхностного импринтинга позволяет осуществлять специфическое распознавание макромолекулекул или биоаналитов. Поверхность полимера геометрически и химически подгоняется под структуру аналита, что способствует обратимому и быстрому связыванию и удалению с поверхности «отпечатка» целевой молекулы.

В работе [5] представлен краткий обзор по изготовлению и свойствам электродов на основе трафаретной печати, описаны возможности их применения для обнаружения антибиотиков, бактерий и оценена их чувствительность к антибиотикам. На основе магнитных многостенных углеродных нанотрубок разработан магнитно-импринтированный электрохимический сенсор для чувствительного определения канамицина в реальных образцах [25].

АКУСТИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

Принцип действия электроакустических методов анализа основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрического звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна.

В последнее время для создания акустических сенсоров широко используются пьезоэлектрические резонаторы или линии задержки с распространяющейся поверхностной или пластинчатой акустической волной. Такие биосенсоры чувствительны к изменению механических или электрических свойств биологического объекта, контактирующего с поверхностью звукопровода. Акустические волны, возбуждаемые в пьезоэлектрической среде, позволяют создать целое семейство датчиков, характеризующихся высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа, дешевизной и небольшими размерами [26].

Наиболее часто акустические биологические датчики содержат активный слой с иммобилизованными антителами, которые анализируются на устойчивость к различным антибиотикам. В этом случае причиной изменения выходного аналитического сигнала акустического иммуносенсора является увеличение массы распознающего слоя при взаимодействии с определяемым соединением (прямой формат иммуноанализа) или с антителами к нему (конкурентный формат иммуноанализа). Например, на этом принципе разработан иммуносенсор, включающий пьезоэлектрический резонатор и слой электрогенерированного полимера для определения следовых количеств хлорамфеникола в мясе, молоке, яйцах, меде [27]. Этим же коллективом авторов проведен подбор условий синтеза наночастиц полимеров с молекулярно-импринтированными полимерами для применения в качестве распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора для высокочувствительного определения ractопамина в водных средах [28]. В работе [29] описана возможность применения пьезоэлектрического сенсора на базе магнитных наночастиц для выявления и определения тетрациклина в жидких средах.

Известны также биосенсоры на основе поверхностных акустических волн, которые использовались для быстрого обнаружения пенициллина G в молоке [30]. Это первый случай использования подобного биосенсора для обнаружения антибиотиков.

Весьма перспективным для анализа антибиотиков является акустический биологический датчик на основе двух пьезоэлектрических пластин, разделенных воздушным зазором. В работе [31] показано, что изменение выходного сигнала датчика при добавлении ампициллина к суспензии микробных клеток зависит от концентрации препарата, что открывает возможность не только качественного, но и количественного анализа.

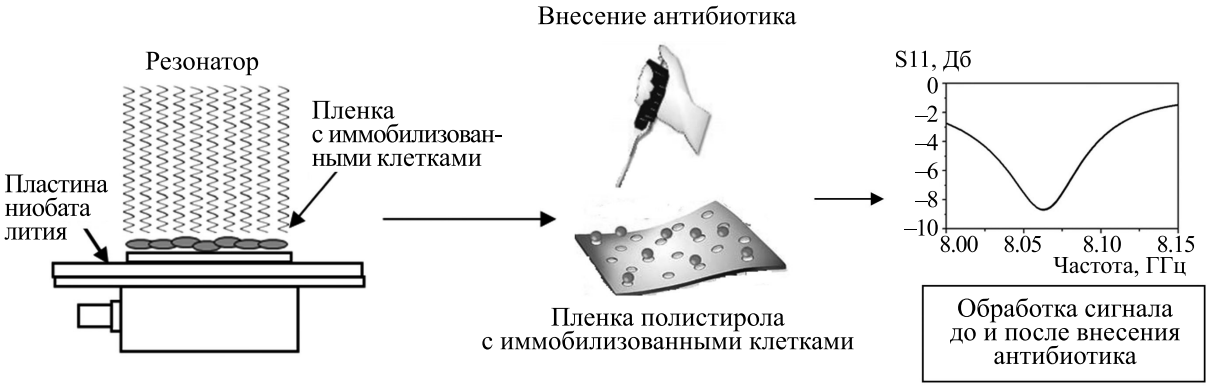


Рис. 3. Общая схема работы датчика на основе сверхвысокочастотного резонатора.

МИКРОБНЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

В последнее время наблюдается повышенный интерес к разработке биосенсоров, биорецептором которых являются живые ткани, бактерии и микроорганизмы. Данный тип биосенсоров имеет множество преимуществ перед ферментными биосенсорами. Прежде всего это связано с тем, что в клетках существует множество ферментов, коферментов и кофакторов, что открывает широкие возможности для определения огромного количества химических веществ. Другим несомненным преимуществом такого вида сенсоров является то, что клетки легче адаптировать к потреблению и разложению нового субстарта. Кроме того, прогресс в молекулярной биологии открыл неограниченные возможности для производства микроорганизмов с заданными свойствами, улучшающими деятельность либо уже существующего в них фермента, либо экспрессии чужеродного фермента в клетку-хозяина.

Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с электрофизическим датчиком, могут представлять простые, чувствительные и быстродействующие сенсоры. Описано несколько биосенсоров для обнаружения остатков антибиотиков, основанных на применении ферментативной активности микроорганизмов [32, 33]. Например, системы мониторинга бета-лактамных антибиотиков основаны на тех же принципах, что и тесты микробиологического ингибирования [34], с той разницей, что сигнал реакции биораспознавания определяется или количественно, или полуколичественно. Микробные биосенсоры основаны на измерении ингибирования роста бактерий из-за присутствия антибиотиков и представлены в работах [35, 36].

Особый интерес представляют микробные датчики, позволяющие проводить исследование без иммобилизации компонентов анализа. Например, в работе [37] описан микроволновый микрожидкий биосенсор для быстрого и бесконтактного тестирования концентрации и роста *Escherichia coli* в среде с различным pH, а также в присутствии антибиотиков.

Авторы работы [38] представили бактериальный штамм *E. coli*, содержащий оперон люциферазы, с помощью которого можно определять тетрациклин биолюминесцентным датчиком. Эти бактерии могут храниться в лиофилизированной форме и производят самобиолюминесценцию при распознавании тетрациклина.

Наномеханические биосенсоры относятся к подсемейству микроэлектромеханических систем, состоящему из подвижных подвешенных микроструктур, способных преобразовывать биологические процессы в измеримое механическое движение. Благодаря своей высокой чувствительности, быстрому отклику и высокой пропускной способности наномеханическая технология обладает большим потенциалом для преодоления некоторых ограничений традиционных методов. Например, в работе [39] представлены возможности наномеханических сенсоров не только для обнаружения бактерий, но и анализа воздействия на них антибиотиков.

Описаны микробные сенсоры, где бактерии используются в качестве чувствительного элемента и иммобилизованы на поверхности датчика. Так, в работе [40] продемонстрирована возможность определения ампициллина с помощью микробной сенсорной системы и датчика на основе свехвысокочастотного резонатора. Общая схема такого датчика представлена на рис. 3. Показано, что воздействие ампициллина приводит к существенному изменению минимального значения коэффициента отражения S_{11} вблизи резонансной частоты и зависит от концентрации антибиотика.

В работе [41] представлен интегрированный биосенсор на базе смартфона LumiCellSense, ко-

торый включает в себя 16-луночный биочип с кислородопроницаемым покрытием с иммобилизованными биолюминесцентными клетками *E. coli* для определения ципрофлоксацина в цельном молоке.

ОПТИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

В оптических биосенсорах аналитический сигнал обусловлен не химическим взаимодействием определяемого компонента с чувствительным элементом, а измеряемыми физическими параметрами – интенсивностью поглощения и отражения света, интенсивностью люминесценции объекта и т.д. Принцип действия оптических биосенсоров основан на регистрации изменений оптических свойств среды: оптической плотности (денситометрические биосенсоры), цвета (колориметрические биосенсоры), мутности (турбидиметрические биосенсоры), показателя преломления среды (рефрактометрические биосенсоры) в результате присутствия биологического агента. В настоящее время наибольшее развитие получили оптические биосенсоры, основанные на изменении направления распространения светового потока, проходящего через оптическое волокно или треугольную призму, покрытую тонкой пленкой металла. Они основаны на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. Оптические биосенсоры, включая планарные волноводные сенсоры, были разработаны одновременно с первыми электрохимическими устройствами, но в течение длительного времени они не получили должного внимания [9].

В конце 60-х годов XX века Е. Кретчманном была показана возможность возбуждения поверхностных плазмонов поляризованным светом, что послужило толчком к развитию метода поверхностного плазмонного резонанса. ППР представляет собой явление, возникающее на границе раздела фаз, например, стеклянная призма – металлическая пленка. Часть луча света, проходящего через призму и падающего под определенным углом на поверхность металла, распространяется в металлической пленке в виде затухающей электромагнитной волны, которая вызывает коллективные колебательные движения свободных электронов. Эти колебательные движения электронов (поверхностные плазмоны) в металлической пленке сопровождаются электрическим полем, которое экспоненциально убывает с увеличением расстояния от поверхности диэлектрика (призмы). Связь изучаемого объекта с поверхностью металлической пленки приводит к изменению скорости распространения плазмонов и, следовательно, к изменению угла пространственного резонанса. Изменение угла пространственного резонанса можно отслеживать в режиме реального времени, получая информацию о кинетике взаимодействий, возникающих на поверхности металлической пленки [42, 43].

В дальнейшем, используя явление плазмонного резонанса, рядом исследователей была показана возможность его применения для анализа антибиотиков. Согласно данным, представленным в работе [4], оптические биосенсоры на основе ППР довольно часто используются для обнаружения или количественного определения остатков антибактериальных или противомикробных препаратов в пищевой промышленности. Использование ППР примерно в два с половиной раза больше, чем у любого другого метода оптического биодатчика, из-за его надежности и высокой экономической эффективности. Возможности применения ППР биосенсоров для определения антибиотиков показаны в работе [44].

Другой важной, но менее изученной областью применения является использование гибридных методов, которые сочетают электрохимию с оптическими методами для определения ампициллина в речной воде [45]. Авторы другого исследования представили экспериментальную гибридную платформу, объединяющую пластиковое оптическое волокно с поверхностным плазмонным резонансом и электрохимический (био)сенсор для анализа ампициллина в воде [46].

Интересный подход к распознаванию аминогликозидов (неомицина, канамицина, стрептомицина) в образцах молока с использованием функционализированных наночастиц золота для усиления сигнала ППР и повышения чувствительности сенсора описан в работе [47].

Одним из новейших методов оценки изменения электрофизических и морфометрических параметров микробных клеток без их иммобилизации под влиянием электрического поля в режиме реального времени без специальной пробоподготовки является электрооптический мониторинг [48]. Общая схема электрооптического датчика представлена на рис. 4. Воздействие антибактериальных препаратов на микробные клетки может быть зафиксировано в жидкой фазе с помощью оптической сенсорной системы, что и показано в работе [49] при определении ампициллина.

Фотонный подход для анализа антибиотиков и мониторинга устойчивости бактерий к ним продемонстрирован в работе [50]. Добавление в среду измерения антибиотиков приводит к изменению оптических свойств и подвижности бактерий, что контролируется с помощью измерения резонансной длины волны. Анализ позволяет параллельно изучать как оптический, так и электрический ответ отдельных бактерий и контролировать скорость их метаболизма после воздействия антибиотиков.

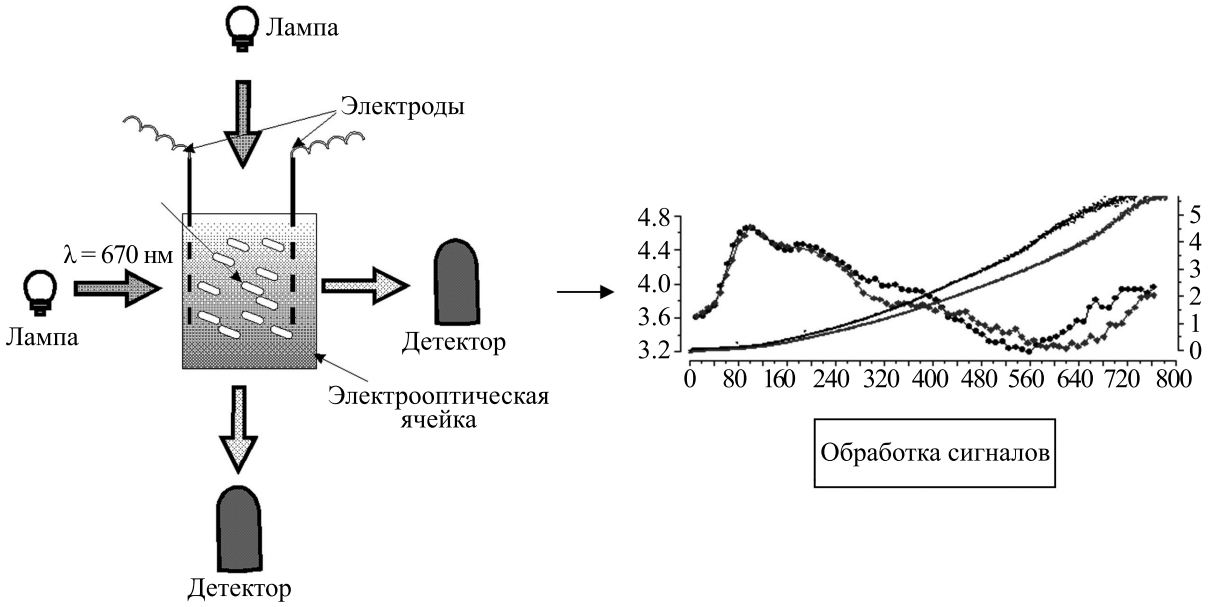


Рис. 4. Общая схема электрооптического датчика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия пенициллина в 1929 г. человечество активно использует этот и другие антибиотики для борьбы с бактериальными заболеваниями. Доступность антибиотиков, низкая стоимость их производства, неправильное и чрезмерное использование приводит к широкому распространению антибиотиков в окружающей среде, в частности, к высокому загрязнению водных ресурсов. Поэтому существует большая потребность в мониторинге и определении антимикробных препаратов в различных средах; продуктах питания, напитках и образцах промышленной и питьевой воды и т. д. Для определения антибиотиков разработано достаточно большое количество методов. Фармакокинетические исследования, проводимые на биологических средах, требуют определения низких концентраций антибиотиков (C_{min} < 10 мкг/мл), следовательно, для данных целей необходимы более чувствительные и быстрые методы. На практике также часто возникает проблема детекции антибиотиков на большом массиве образцов. Перспективными методами анализа противомикробных препаратов являются биосенсорные технологии. Биосенсорные методы имеют довольно широкое применение и постепенно становятся неотъемлемой частью при клинической диагностике и экологическом мониторинге. Биосенсоры позволяют значительно уменьшить время проведения анализа благодаря относительной простоте проведения процедур, обходятся минимальной предварительной обработкой исследуемого материала и, как показывают литературные данные, являются довольно чувствительными. Биосенсорные системы для определения антибиотиков можно условно разделить на две большие группы – сенсоры без иммобилизации и с иммобилизацией компонентов анализа.

В таблице представлены краткие данные о биосенсорных системах для анализа антибиотиков.

С нашей точки зрения наиболее перспективными для анализа антибиотиков являются сенсоры, позволяющие проводить анализ непосредственно в жидкости без предварительной подготовки образца. Немаловажным фактором является возможность многократного использования сенсоров, но в этом случае сразу возникает вопрос о методах очистки датчика от отработанного образца. К сожалению, не во всех работах, описывающих многократное применение датчиков, приводятся данные о способах их очистки. В зависимости от условий, в которых проводится анализ препаратов, иногда проще применять одноразовые системы, но в таком случае возникает другой вопрос, связанный с условиями утилизации отработанных систем. Основываясь только на литературных данных, нельзя сделать объективный вывод о перспективности тех или иных датчиков, относящихся к разным типам.

Тем не менее постоянно возникает необходимость для развития надежных и чувствительных биосенсоров, позволяющих проводить анализ широкого спектра антибиотиков. В идеале хорошо иметь сеть биосенсоров «скоростного типа», которые будут использоваться в качестве первоначального заключения о наличии/отсутствии антибактериального препарата в диагностируе-

Краткие сведения о биосенсорах, разработанных для анализа антибактериальных препаратов

№ п/п	Принцип действия, чувствительный элемент	Определяемый антибиотик	Пределы детекции	Источник
1	Электрохимическое определение проводится с использованием прямоугольной адсорбционной анодной вольтамперометрии с помощью стеклоуглеродного электрода и пленки хитозана	Норфлоксацин	6.6 нмоль/мл	[10]
2	Датчик использует самосборный иммуноанализ для определения биомаркера цефтиофура с помощью спектроскопии электрохимического импеданса путем исследования межфазных емкостных изменений при связывании цефтиофура с поверхностью датчика	Цефтиофур	0.01 нг/мл при анализе в фосфатно-солевом растворе и 10 нг/мл при анализе в образцах фарша из мяса индейки	[11]
	Иммуносенсоры			
3	Амперометрический магнитоиммуносенсор, включающий использование антител, иммобилизованных на поверхности магнитных шариков	Тетрациклин	44 нг/мл в образцах молока	[14]
4	Метод прямого конкурентного флуоресцентного иммуноанализа в лунках микротитровального планшета, покрытого антигеном, для одновременного определения антибиотиков	Стрептомицин, тетрациклин и пенициллин G в молоке	5 нг/мл для всех указанных антибиотиках	[15]
	Аптасенсоры			
5	Электрохимический аптасенсор с применением аптамера, иммобилизованного на электроде	Хлорамфеникол в меде. Охратоксин в виноградном соке	0.29 нМ 5 нМ	[17] [18]
6	Флуоресцентный аптасенсор с применением аптамера, иммобилизованного на поверхности магнитных наночастиц	Хлорамфеникол	0.01 нг/мл	[20]
	Сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров			
7	Магнитно-импринтированный электрохимический сенсор для определения антибиотиков	Канамицин в реальных образцах	$2.3 \cdot 10^{-11}$ моль/мл (отношение сигнал/шум 3 дБ)	[25].
	Акустические биосенсоры			
8	Иммуносенсор, включающий пьезоэлектрический резонатор и слой электрогенерированного полимера Пьезоэлектрический сенсор с молекулярно-импринтированными полимерами в качестве распознающего слоя	Хлорамфеникол в мясе, молоке, яйцах, мед. Рактопамин в водных средах. Тетрациклин в водных растворах	0.2 нг /мл 12 мкг/мл 4.5 мкг/см^3	[27] [28] [29]
9	Сенсор на основе поверхностных акустических волн	Пенициллин G в молоке	2 нг/мл при анализе в буфере и 2.2 нг/мл при анализе в нежирном молоке	[30]
10	Акустический биологический датчик на основе двух пьезоэлектрических пластин, разделенных воздушным зазором	Ампициллин в водных средах	2 мкг/мл	[31]
	Микробные сенсорные системы			
11	Биолюминисцентный датчик на основе штамма *E. coli* K-12, который содержит оперон бактериальной люциферазы *Photorhabdus luminescens*	Тетрациклины	5 нг/г для доксициклина; 7.5 нг/г для хлортетрациклина и 25 нг/г для тетрациклина и окситетрациклина в тканях рыбы	[38]
12	Сенсорная система на основе сверхвысокочастотного резонатора и микробных клеток	Ампициллин	4 мкг/мл	[40]
13	Сенсор на базе смартфона LumiCellSense, состоящий из 16-луночного биочипа с биолюминесцентными клетками	Ципрофлоксацин в цельном молоке	7.2 нг/мл	[41]
	Оптические биосенсоры			
14	Датчик на основе ППР с использованием функционализированных наночастиц золота для усиления сигнала	Аминогликозиды (неомицин, канамицин, стрептомицин) в образцах молока	2.00 ± 0.21 pM, 1.00 ± 0.10 pM, 200 ± 30 fM	[47]
15	Электрооптический сенсор на основе микробных клеток, чувствительных к определяемому антибиотику	Ампициллин	0.5 мкг/мл	[49]

мом образце. Для достижения этой цели желательно использовать портативный биосенсор с высокой чувствительностью и точностью, который может обнаруживать антибиотик в режиме реального времени.

В целом, как представлено в данном материале, область биосенсоров включает широкий спектр с большим потенциалом роста в ближайшем будущем. Дальнейшая стандартизация и автоматизация биосенсорных методов позволит расширить круг их применения и использования в микробиологии, биотехнологии, ветеринарии, медицине и для защиты окружающей среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного задания и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-07-00304).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Ierapetritou, F. Muzzio, and G. Reklaitis. AIChE J. **62**, 1846 (2016).
2. *World Health Organization. Tackling Antibiotic Resistance from a Food Safety Perspective in Europe; World Health Organization Regional Office for Europe* (Copenhagen, Denmark, 2011), pp. 1–88.
3. *Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents Terminology*, EUCAST Definitive Document **4**, 291 (1998).
4. N. A. Mungroo and S. Neethirajan, Biosensors **4**, 472 (2014).
5. F.-D. Munteanu, A. M. Titoiu, J.-L. Marty, and A. Vasilescu, Sensors **18**, 901 (2018).
6. B. Leca–Bouvier and L. Blum, in *Recognition receptors in biosensors*, Ed. by M. Zourob (Springer. New York, 2010), pp. 177–220.
7. F. Moreira, R. Dutra and J. Noronha, and M. G. F. Sales, Biosens. Bioelectron. **56**, 217 (2014).
8. Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин и В. Н. Майстренко, *Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине* (Лаборатория знаний, Москва, 2020).
9. G. Evtugyn, *Biosensors. Essentials* (Springer, 2013).
10. A. M. Santos, A. Wong, F. H. Cincotto, et al., Mikrochim. Acta **186** (3), 148 (2019).
11. H. S. Stevenson, S. S. Shetty, N. J. Thomas, et al., ACS Omega **4**, 6324 (2019).
12. F. Fernandez, K. Hegnerova, M. Piliarik, et al., Biosens. Bioelectron. **26**, 1231 (2010).
13. F. Fernandez, D. G. Pinacho, F. Sanchez-Baeza, and M. P. Marco, J. Agricult. Food Chem. **59**, 5036 (2011).
14. F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, et al., Anal. Chim. Acta **737**, 29 (2012).
15. E. Song, M. Yu, Y. Wang, et al., Biosens. Bioelectron. **72**, 320 (2015).
16. K. Reder-Christ and G. Bendas, Sensors **11**, 9450 (2011).
17. L. Yan, C. Luo, W. Mao, et al., J. Electroanal. Chem. **687**, 89 (2012).
18. S. M. Taghdisi, N. M. Danesh, M. Ramezani, et al., Talanta **223** (Pt. 1), 121705 (2021).
19. A. A. Buglak, A. V. Samokhvalov, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev, Int. J. Mol. Sci. **21**, 8420 (2020).
20. S. Wu, H. Zhang, Z. Shi, et al. Food Control. **50**, 597 (2015).
21. W. Lian, S. Liu, J. Yu, et al., Biosens. Bioelectron. **38**, 163 (2012).
22. M. L. Yola, L. Uzun, N. Özaltin, and A. Denizli, Talanta **120**, 318 (2014).
23. Т. Н. Ермолаева, В. Н. Чернышова, Е. В. Чеснокова и О. И. Бессонов, Сорбционные и хроматографические процессы **15** (2), 151 (2015).
24. G. Vasapollo, R. D. Sole, L. Mergola, et al., Int. J. Mol. Sci. **12** (9), 5908 (2011).
25. F. Long, Z. Zhang, Z. Yang, et al., J. Electroanal. Chem. **755**, 7 (2015).
26. G. N. Durmuşa, R. L. Linb, M. Kozbergc, et al., *Acoustic-Based Biosensors. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* (Springer Science+Business Media, N. Y., 2014).
27. N. A. Karaseva and T. N. Ermolaeva, Talanta **93**, 44 (2012).
28. T. N. Ermolaeva, O. V. Farafonova, V. N. Chernyshova, et al., J. Anal. Chem. **75** (10), 1270 (2020)
29. Е. В.Бизина, О. В. Фарафонова, Н. В. Тарасова и Т. Н. Ермолаева, Сорбционные и хроматографические процессы **21** (2), 177 (2021).
30. F. J. Gruhl and K. Länge. Food Anal. Methods **7**, 430 (2014).
31. O. I. Guliy, B. D. Zaitsev and I. A. Borodina, Appl. Microbiol. Biotechnol. **104** (3), 1283 (2020).
32. A.M. Ferrini, V. Mannoni, G. Carpico et al. J. Agric. Food Chem. **56**, 784 (2008).
33. S. Das, N. Kumar, R. H. Vishweswaraiah, et al., J. Food Sci. Technol. **51**, 1161 (2014).

34. C. Cháfer-Pericás, Á. Maquieira, and R. Puchades, Trends Anal. Chem. **29**, 1038 (2010).

35. R. Babington, S. Matas, M. P. Marco, and R. Galve, Anal. Bioanal. Chem. **403**, 1549 (2012).

36. M. C. Beltran, M. I. Berruga, A. Molina, et al., Int. Dairy J. **41**, 13 (2015).

37. R. Narang, S. Mohammadi, A. M. Mohammadi, et al., Sci. Rep. **8**, 15807 (2018).

38. N. E. Virolainen, M. G. Pikkemaat, J. W. A. Elferink, et al., J. Agric. Food Chem. **56**, 11065 (2008).

39. F. Pujol-Vila, R. Villa, and M. Alvarez, Front. Mech. Eng. **6** (2020). DOI: 10.3389/fmech.2020.00044

40. O. I. Guliy, B. D. Zaitsev, A. V. Smirnov, et al., Biosens. Bioelectron. **130**, 95 (2019).

41. M.-Y. Lu, W.-C. Kao, S. Belkin, and J.-Y. Cheng, Sensors. **19**, 3882 (2019).

42. N. J. De Mol and M. J. E. Fischer, *Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols* (Humana Press, New Jersey, 2010).

43. C. Garcia–Aljaro, X. Munoz–Berbel, A. T. A. Jenkins, et al., Appl. Environ. Microbiol. **74** (13), 4054 (2008).

44. H.-F. Chen, C.-H. Lin, C.-Y. Su, et al., in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity* (2011), Chapt. 21, pp. 453–468.

45. A. Blidar, B. Feier, M. Tertis, et al. Anal. Bioanal. Chem. **411**, 1053 (2019).

46. R. Galatus, B. Feier, C. Cristea, N. Cennamo, and L. Zeni, Proc. SPIE **10405**, id. 104050C (2017).

47. M. Frasconi, R. Tel-Vered, M. Riskin, and I. Willner. Anal. Chem. **82**, 2512 (2010).

48. O. I. Guliy and V. D. Bunin, in *Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery*, Ed. by P. Chandra and L. M. Pandey (Springer, 2020), chapter 11, pp. 233–254.

49. O. I. Guliy, S. S. Evstigneeva, and V. D. Bunin, Talanta **225**, 122007 (2021).

50. D. Conteduca, G. Brunetti, F. Dell'Olio, et al., Biomed. Optics Express **10** (7), 463 (2019).

Biosensor Systems for Antibiotics Detection

O.I. Guliy*, **, B.D. Zaitsev*, A.K.M Alsowaidi****, O.A. Karavaeva*, L.G. Lovtsova**, and I.A. Borodina*****

**Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prosp. Entuziastov 13, Saratov, 410049 Russia*

*** Saratov State Vavilov Agrarian University, Teatralnaya pl. 1, Saratov, 410012 Russia*

****Saratov Branch of Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, ul. Zelenaya 38, Saratov, 410019 Russia*

Antibiotics are widely used in medicine, veterinary and the food industry. However, the active use of antibacterial drugs leads to environmental pollution. In this regard, there is a great need for monitoring and determining antibiotics in various environments such as drinking water, food, beverages, pharmaceutical waste water from pharmaceutical enterprises, etc. A sufficient number of methods have been developed to determine antibiotics, including those which based on biosensors. Biosensor methods of analysis are widely used and are an integral part of environmental monitoring. Electrochemical, optical, acoustic, microbial biosensors, immuno- and aptasensors, as well as sensors based on molecular imprinted polymers are the most popular for the analysis of antibiotics. The article provides a brief overview of biosensor methods and approaches for the antibiotics determination. The analysis of the most promising biosensor systems for antibacterial drugs detection has been carried out.

Keywords: antibiotics, detection methods, biosensors, aptamers, antibodies, microbial cells

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 668–683

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.61.66

НАНОСТРУКТУРНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН

© 2021 г. О.Д. Новикова*, Г.А. Набережных*, А.А. Сергеев**

**Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159*

***Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН 690041, Владивосток, ул. Радио, 5*

E-mail: novolga_05@mail.ru

Поступила в редакцию 26.11.2020 г.
После доработки 22.04.2021 г.
Принята к публикации 26.04.2021 г.

Белковые молекулы обладают уникальным свойством передачи материала и/или информации через непроницаемый барьер, которым является липидный бислой. Эта своеобразная роль клеточных «привратников» особенно интересна для целей нанобиотехнологии, поскольку мембранные белки могут с успехом использоваться для связи между двумя различными средами, разделенными липидным бислоем. В настоящем обзоре описаны структурные особенности и свойства трансмембранных белков как наиболее перспективных компонентов современных биосенсорных устройств. Приведены также методы формирования липидных бислоев, прикрепленных к твердой поверхности, и способы получения жесткой белковой «арматуры», которые позволяют реконструировать и сохранять используемые белки в функционально активной конформации по отношению к широкому спектру определяемых аналитов. Высокая селективность и специфичность белковых молекул в распознавании рецепторов или лигандов делает их незаменимыми для биомедицинского анализа и молекулярной диагностики.

Ключевые слова: наноструктурные биосенсоры, трансмембранные белки, липидный бислой.

DOI: 10.31857/S0006302921040062

Авторы многих обзоров, затрагивающих самые различные аспекты формирования, свойств и применения наноструктурных материалов, всего лишь десятилетие назад считали, что нанотехнологии находятся в начальной стадии развития, поскольку основные открытия, предсказанные в этой области, еще не были сделаны [1, 2]. Однако исследования, проводимые в последние несколько лет, уже дали практические результаты. В настоящее время достижения передовых научных разработок в области нанотехнологий успешно применяются к решению задач медицины, фармацевтической промышленности и военной отрасли, что позволяет отнести их к новым и прогрессивным технологиям современности и самым наукоемким отраслям промышленности [3–7].

Согласно общепринятым определениям к нанотехнологиям относят области науки и техники, которые заняты конструированием, характеристикой, производством и применением структур, приборов и систем, свойства которых определяются их формой и размером на нанометровом уровне. Наиболее интересные эффекты возникают при переходе наночастиц в квантово-размерное состояние, когда величина их радиуса становится меньше 20 нм. При таких размерах происходит существенное изменение физико-химических свойств исходного «объемного» соединения (bulkmaterial), что отражается на обусловленных поведением электронов свойствах материала, в первую очередь оптических, магнитных и электрических [8]. Благодаря такому размерно-зависимому проявлению физических свойств и их нетипичности по сравнению со свойствами атомов, с одной стороны, и макроскопических тел, с другой стороны, наночастицы выделяют в отдельную, промежуточную область и нередко называют «искусственными атомами».

С точки зрения биосенсорики наибольший интерес представляет еще одна отличительная черта наночастиц от объемного материала – значительная доля атомов на поверхности частицы по отношению к объему. Нетрудно посчитать, что при среднем размере атома, равном 0.1 нм (1 ангстрем), у частицы размером 10 нм больше половины атомов от их общего числа будет находиться на поверхности. Это приводит к существенной зависимости физико-химических свойств наночастицы от состояния ее поверхности, что обу-

словливает широкие возможности для создания сенсорных систем различного рода.

Использование белковых структур для создания биосенсоров несет в себе значительные перспективы широкого применения подобных наноконструкций в жизнедеятельности человека, что подтверждается все возрастающим количеством работ в данной области [9–12]. В настоящее время этот класс природных биополимеров наиболее изучен, по этой причине многие исследователи при конструировании биоматриц нанометрового размера отдают предпочтение работе с белками. При создании нанокомпозитных биосенсоров типа «неорганическое ядро/органическая оболочка» на основе белковых молекул наиболее распространенным способом функционализации поверхности наночастиц (неорганического ядра) является использование тиольных и карбоксильных групп белка [13]. С одной стороны, это обеспечивает долговременную стабильность частиц, препятствуя их агрегации, а с другой – позволяет повысить совместимость неорганических частиц с живыми тканями и в перспективе получать *in vivo* биосенсоры для экспресс-анализа крови и других биологических жидкостей. Данные исследования очень актуальны, поскольку проблема совместимости разрабатываемых биосенсоров с живыми организмами до сих пор не решена [14] и большинство биосенсоров типа «неорганическое ядро/органическое оболочка» так и остаются на стадии исследований *in vitro*. В этой связи в настоящее время ведется активный поиск новых типов архитектур биосенсоров, обладающих всеми достоинствами *in vitro* сенсоров, но позволяющих проводить измерения непосредственно в живых системах [15]. В частности, в литературе имеются данные о применении квантовых точек в качестве новых флуоресцентных наноматериалов для биомедицинского зондирования и визуализации [14, 15]. По мнению авторов данного обзора, наиболее перспективным кандидатом для создания сенсорных систем такого рода является один из основных компонентов бактериальных мембран, а именно трансмембранные белки. Чтобы определить активность такого белка в определенных условиях, его нужно интегрировать в искусственные липидные бислои, иммобилизованные на твердой поверхности. Это достигается применением методов структурирования поверхностей в микро- и нанометровом масштабе, химической модификации и анализа, формирования липидного бислоя, экспрессии белков, очистки их и солюбилизации и, что наиболее важно, интеграции белка в сконструированные липидные бислои. Таким образом, изготовление биосенсоров требует комплексного подхода, основанного на знаниях в области материаловедения, поверхностной и аналитической химии, молекулярной биологии и биотехнологии.

БЕЛКИ И ЛИПИДЫ – КОНСТРУКТИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ БИОСЕНСОРОВ

Мембранные белки – перспективные кандидаты для создания биологических нанопор. Белки представляют собой широко распространенный в природе класс высокомолекулярных органических соединений. Они состоят из альфа-аминокислот, соединенных в полипептидную цепь пептидной связью. Эффективность бионанотехнологических разработок на основе белков обусловлена уникальными свойствами этих природных биополимеров, которые способны к самому сложному из известных самопроизвольному фолдингу, могут точно распознавать огромный круг мишеней и взаимодействовать с ними и, наконец, имеют широкий диапазон собственной каталитической активности [16]. Начало новой эры в инженерии мембранных белков произошло благодаря детальному изучению их структуры, лучшему пониманию молекулярных механизмов трансмембранной диффузии, методическим и техническим достижениям в области рефолдинга мембранных белков, а также применению усовершенствованных вычислительных подходов, разработанных для растворимых белков [17]. Решающим фактором в этом процессе стало получение кристаллов различных мембранных белков и расшифровка их атомной структуры, что позволило определить в деталях механизмы передачи сигналов через биологические мембраны.

Исследования биологических мембран дали новый скачок в развитии технологий получения искусственных мембран или, другими словами, нанопор из природных биополимеров. В настоящее время при создании биологических нанопор внимание исследователей в значительной степени сосредоточено на порообразующих токсинах и белках наружной мембраны бактерий, поскольку они имеют прочную β-баррельную структуру, что делает их удобным объектом для нанотехнологии. Белки этого класса, так называемые порины, имеют обширные неполярные взаимодействия с гидрофобным ядром бислоя благодаря тому, что значительная доля их полипептидной цепи погружена в липидный бислой (как минимум, один трансмембранный домен). Они выполняют широкий спектр важных биологических функций, включая специфический и неспецифический транспорт растворенных веществ и ионов (насосы, транспортеры и каналы), выработку энергии (АТФ-синтазы), передачу сигнала (рецепторы), осмотическую регуляцию (порины), мембраносвязанные биохимические процессы (киназы, протеазы). Многие из этих функций включают передачу материала и/или информации через непроницаемый барьер, которым является липидный бислой. Эта уникальная роль клеточных «привратников» особенно интересна для целей

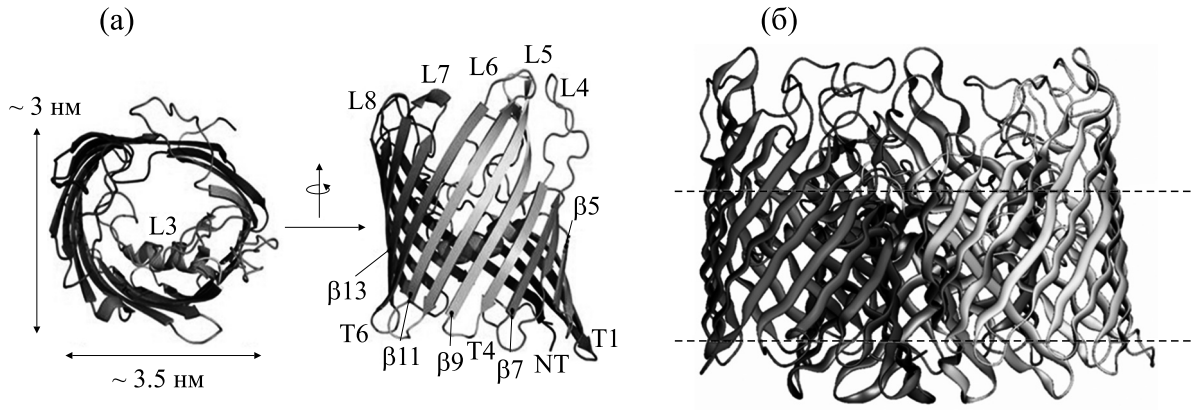


Рис. 1. Пространственная структура OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* в виде ленточной диаграммы ([21], с изменениями). (а) – Мономер порина (вид сверху и вид сбоку); β-стрэнды представлены в виде лент; линиями, соединяющими β-стрэнды показаны внешние петли и изгибы. (б) – Тример порина; двумя параллельными линиями ограничена трансмембранная область барреля.

нанобиотехнологии, поскольку мембранные белки могут с успехом использоваться для связи между двумя различными средами, разделенными липидным бислоем [18].

Особое место среди перспективных кандидатов для конструирования биологических нанопор занимают каналы неспецифических порообразующих белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий, обеспечивающих транспорт низкомолекулярных веществ через бактериальную мембрану [19]. Порины принадлежат к β-баррельным интегральным мембранным белкам, образующим в нативной мембране олигомерные структуры (чаще всего тримеры). Они состоят из антипараллельных амфифильных β-стрэндов (тяжей), гидрофобные остатки аминокислот которых экспонированы в липидный бислой, а гидрофильные – во внутреннюю часть барреля [20]. Ранее методом гомологичного моделирования нами были построены теоретические модели мономера и тримера OmpF порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (рис. 1). Кристаллическая структура PhoE порина из *Escherichia coli* была использована в качестве матрицы [21].

Амфифильная природа молекул поринов позволяет им легко встраиваться в липидный бислой [22]. В присутствии фосфолипидов порины в результате белок-белкового взаимодействия могут самопроизвольно формировать наноструктуры [23]. Выбор детергента и липида имеет большое значение для получения двумерных кристаллов порообразующих белков, при этом химическая структура указанных компонентов определяет параметры упорядоченных белковых структур [24–26]. Нанопоры на основе белков ионных каналов представляют собой новую альтернативу современным аналитическим устройствам [27, 28]. Они могут регулировать поток ионов с помощью различных стробирующих механизмов, представляющих собой переключение между закрытым и открытым состоянием поры в ответ на специфические стимулы, такие как связывание лиганда (ионные каналы, управляемые лигандом), изменение трансмембранного напряжения (управляемые напряжением ионные каналы) или механическая сила (механозависимые ионные каналы). Использование нанопор в биомедицинской молекулярной диагностике предпочтительно из-за их высокой селективности и специфичности белковой молекулы в распознавании рецептора-лиганда. Кроме того, одним из основных преимуществ использования белковых нанопор является знание их точной структуры при атомном разрешении, что предполагает возможность внедрения функциональных групп на стратегических позициях внутри канала.

Технологический потенциал многих мембранных белков можно исследовать только *in vitro*. Это требует высокой концентрации белков, что предполагает получение их при сверхэкспрессии в виде рекомбинантных белков в *E. coli* с использованием векторных плазмид и последующую очистку (например, путем введения гистидиновой метки и использования никель-аффинной хроматографии). Кроме того, учитывая достаточно высокую степень гидрофобности интегральных мембранных белков, для предотвращения их неспецифической агрегации при извлечении из мембраны требуется использование детергентов. Как правило, экспрессия рекомбинантного белка приводит к образованию нерастворимых агрегатов (телец включения) в цитоплазме, где интересующий белок в «правильной» конформации содержится в виде отдельной фракции, небольшой по содержанию. Все эти трудности обычно приводят к низкому выходу целевого белка. Далее, чтобы определить активность

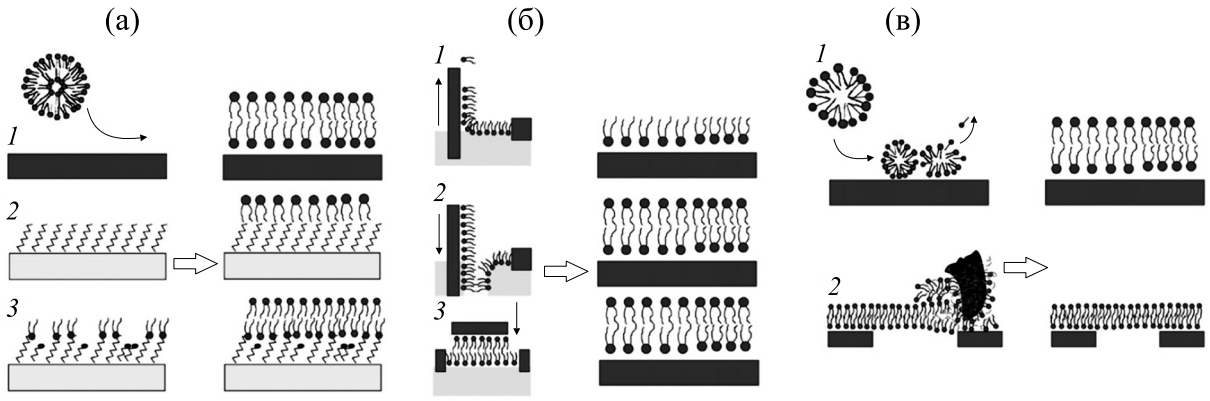


Рис. 2. Методы, используемые для сборки липидных мембран на на твердых носителях: (а) – слияние везикул (*1*–*3*); (б) – метод Ленгмюра–Блоджетт (*1*–*3*); (в) – наслаивание липидов из растворов или из смешанных мицелл липидов с детергентами (*1*, *2*) ([38], с изменениями).

полученного белка при заданных условиях, он должен быть интегрирован в искусственные липидные бислои, в том числе иммобилизованные на твердых носителях. Известно, что в протеолипосомах многие мембранные белки достаточно стабильны и их функциональная активность может быть надежно зафиксирована [29]. Например, активность белка-транспортера при микроскопических исследованиях может быть определена путем измерения поглощения окрашенного транспортируемого вещества (аналита) с помощью спектрометра [30] путем количественного определения переносимого в протеолипосомы красителя [31] или с помощью электрохимических измерений [32]. Обнаружение аналита с помощью электрохимических методов может быть осуществлено относительно просто и с высокой чувствительностью, а электроды могут быть легко интегрированы в датчик устройства. Однако разработка практических методик приготовления планарных липидных бислоев на поверхности остается сложной научно-исследовательской задачей даже после более чем двадцати лет исследований [33]. Для конструирования нанопор необходимы техники структурирования поверхности в микро- и нанометровом масштабе, надежные способы формирования липидного бислоя и интеграции в них белков, а при необходимости химическая модификация встроенных белковых молекул [33].

Значение липидной составляющей биосенсоров. Закрепленные бислои. Липидные бислои являются природными барьерами для биологических клеток и клеточных компартментов. При этом окружающая среда существенно влияет на пространственную структуру и функцию многих трансмембранных белков. Именно это свойство мембран необходимо учитывать при разработке биосенсоров, систем доставки лекарств и наноконтейнеров. В результате многочисленных исследований химические и физические свойства природных фосфолипидных бислоев были оптимизированы для изучения функциональных свойств интегральных белков. Однако подобные мембраны часто неприменимы в технических процессах из-за их высокой текучести и отсутствия долговременной стабильности [34]. Закрепление липидов посредством ковалентной или квазиковалентной связи кажется привлекательным решением проблемы иммобилизации мембраны, однако поддержание латеральной подвижности и достаточного расстояния между твердой подложкой и поверхностью, обращенной к мембране, желательно, если не существенно для функционирования липидного бислоя как матрицы для реконструкции белков. Разрешение этого кажущегося противоречия – одна из ключевых задач при изготовлении мембран.

Предпосылкой для правильного функционирования биосенсоров на основе мембранных белков является формирование прикрепленных к подложке липидных бислоев, которые позволяют реконструировать используемые белки в функционально активной конформации [35]. В зависимости от выбранных липидов и поддерживающих поверхностей плоские липидные бислои на твердых субстратах могут быть получены самыми разнообразными способами и на различных наноструктурированных поверхностях [36]. На рис. 2 схематически показаны различные подходы к формированию липидных бислоев, закрепленных на твердых носителях: образование бислоя может быть достигнуто с помощью хемосорбции, самосборки, метода Ленгмюра–Блоджетт [37].

При самосборке посредством слияния (рис. 2а) однослойные липидные везикулы разрываются при контакте с поверхностью и образуют поддерживаемую липидную мембрану, покрывающую поверхность раздела. На некоторых гидрофильных субстратах (например, оксиде или нитриде кремния) образование плоских бислоев

происходит самопроизвольно в результате слияния везикул. На гидрофобных поверхностях (например, предварительно сформированных тиолалкильных монослоях) вместо бислоев из липидных везикул образуются липидные монослои. Технология Ленгмюра–Блоджетт (рис. 2б) заключается в переносе сформированного на водной поверхности мономолекулярного слоя амфифильного вещества или мультимолекулярных пленок на твердую подложку. Липидный монослой удерживается при определенном натяжении на границе раздела фаз, что обеспечивает плотность упаковки липидов. При формировании плоского липидного бислоя из смешанных мицелл липид-детергент (рис. 2в, *1*) липидный материал перемещается из водного раствора на твердую поверхность раздела. С помощью диализа детергент постепенно удаляется из мицелл, что приводит к разрушению мицелл и образованию бислоя на границе раздела фаз. При образовании бислоя на границе раздела «субстрат–водный раствор» растворенные в органическом растворителе липиды добавляют к поверхности, находящейся в водной фазе. Амфифильные липиды выравниваются на границе раздела фаз, а затем при испарении растворителя сливаются, образуя бислой (рис. 2в, *2*).

В качестве твердых субстратов, поддерживающих липидный бислой, используются различные материалы. Вполне эффективными для этих целей оказались такие носители, как слюда, стекло, полупроводники и диэлектрики (например, оксиды индия, олова или кремния), а также различные металлические поверхности (золото или платина). Следует учитывать, что свойства твердой подложки определяют стратегию формирования бислоев. На практике изготовление бислоев с помощью метода Ленгмюра–Блоджетт проще, а методы самосборки более универсальны [37].

В работе [39] было впервые показано, что адсорбция и распределение везикул на стекле позволяют получать плоские липидные бислои, сохраняющие латеральную подвижность липидов, и формировать иммобилизованные планарные липидные бислои на полимерной основе, образованной 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламинполиэтиленгликольтриэтоксисиланом [40]. Для получения положительно заряженных бислоев были успешно использованы полимеры на основе производных целлюлозы, нанесенные на поверхность полупроводникового материала, оксида индия-олова (indium tin oxide), функционализированного октадецилтрихлорсиланом [41].

Очевидно, что для применения электрохимических методов необходима электропроводность используемой твердой поверхности. Исследования, проведенные различными научными группами по паттернизации и применению так называемых поддерживаемых планарных липидных бислоев (s-BLM) на различных металлических поверхностях, таких как платина, золото или серебро, показали, что золото идеально подходит для формирования высокоориентированных липидных бислоев [42–45].

Прикрепленные (поддерживаемые) мембраны, сформированные на золотых поверхностях, могут быть классифицированы в соответствии с их архитектурой: гибридные бислои, состоящие из липидного монослоя на гидрофобной подложке и второго слоя поверх него (1); липидные бислои на гидрофильной или заряженной поверхности (2); ковалентно заякоренные липидные бислои на гидрофильной поверхности (3).

Помимо золота еще одной часто используемой поверхностью является кремний, так как этот материал совместим с большинством преобразователей поверхности в биосенсорных устройствах. Так, описана подготовка поверхности оксида кремния с помощью модификации декстраном (слой порядка 100 нм), которая может служить основой для нанесения бислоя комбинацией двух методов – ковалентной связи с термически окисленной поверхностью оксида кремния путем эпоксидирования или аминосиланизации [46].

Для получения биомиметических мембран, обеспечивающих естественную биологическую среду для интегрированных в них мембранных белков, разрабатываются и такие подходы, как использование блок-сополимеров [12] или даже полная замена фосфолипидов на амфифильные блочные полимеры. Подобные синтетические мембраны обладают механической прочностью, в десять раз большей, чем фосфолипидные бислои [47].

Примером может служить работа, в которой авторы использовали гибридные мембраны из сополимерных блоков поли(1,4-изопрен-этиленоксида), смешанных с 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолином [12]. Встраивая белок OmpF наружной мембраны *E. coli* в эти мембраны, они продемонстрировали, что функциональность этого порина в биомиметических липополимерных мембранах сохраняется независимо от молекулярной массы блок-сополимеров. Таким образом, авторы показали, что смешивание синтетических полимерных мембран с фосфолипидами, независимо от толщины полученной мембраны, позволяет осуществлять реконструкцию трансмембранных белков с сохранением их функции.

Таким образом, синтетические амфифильные липиды и полимеры самоорганизуются в водном растворе либо в плоские мембраны, либо в везикулы. Усовершенствование методов самосборки липидных мембран и включения в них протеинов привели к значительному повышению стабильности мембраны и упаковки белковых молекул,

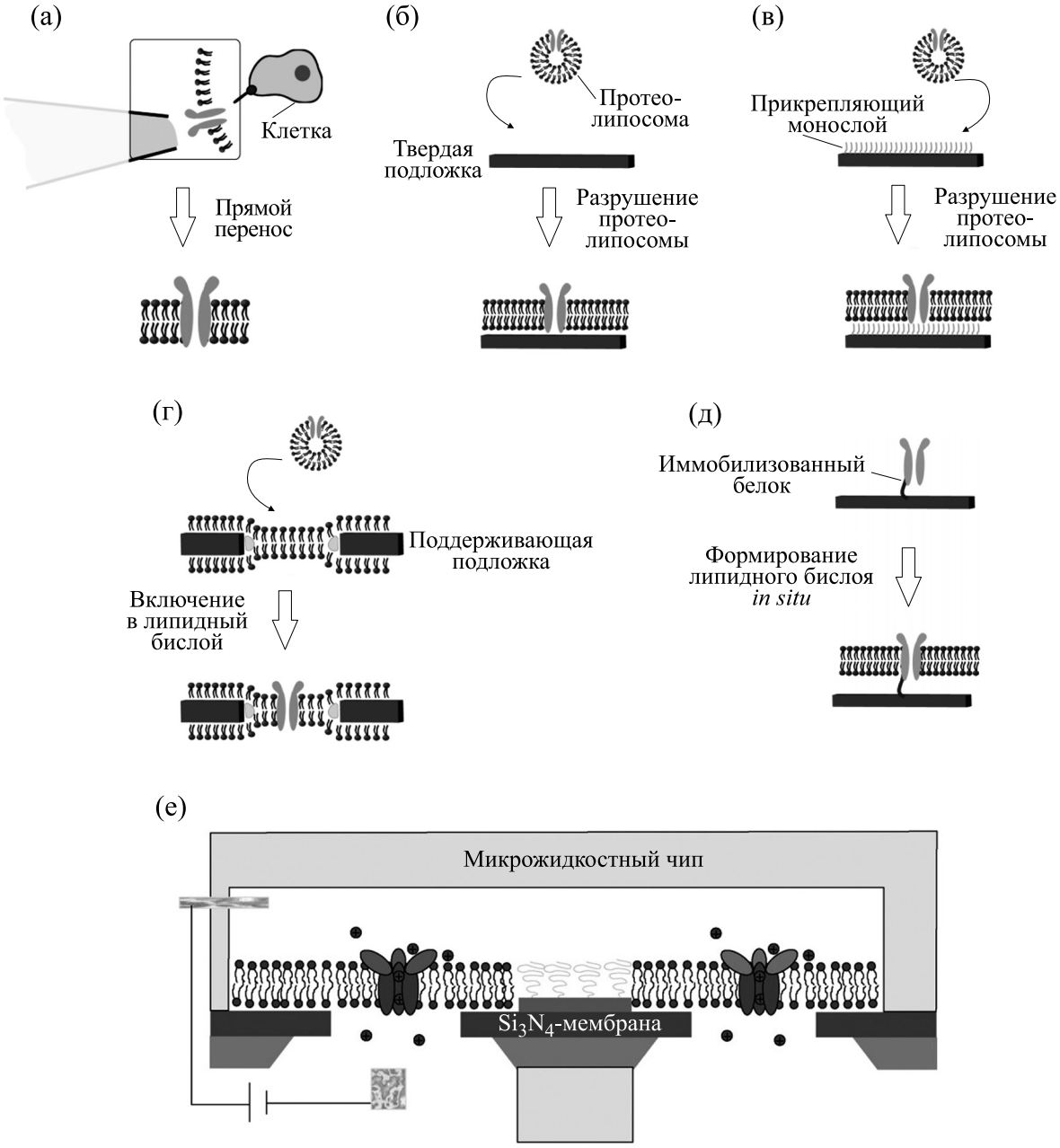


Рис. 3. Методы реконструкции трансмембранных белков в липидные бислои ([33], с изменениями). Описание способов включения исследуемого белка приведено в тексте.

что, соответственно, способствовало улучшению чувствительности измерений. Липидный бислой в виде суспензии (известный также как свободный липидный бислой) разделяет на платформе *цис*- и *транс*-стороны водных растворов электролитов и становится единственным путем для прохождения молекул между двумя водными фазами, разделенными бислоем. Иными словами, двухслойная липидная мембрана образует мост между встроенными белками и компонентами устройства. Поскольку липидный состав определяет не только свойства мембраны, но и взаимодействие с используемым интегральным белком, для конструирования биосенсора требуются экспериментальные установки с различными липидными композициями [48].

Методы иммобилизации белков. Существуют различные способы интеграции мембранных белков в предварительно сформированный липидный бислой [33] (рис. 3).

Белок можно напрямую вносить в липидный бислой в виде участка клеточной мембраны с по-

мощью стеклянной пипетки с маленьким отверстием (рис. 3а). Во многих экспериментах используются протеолипосомы, содержащие исследуемый белок. При соприкосновении с твердой подложкой протеолипосомы могут разрушаться и «растекаться» на чистых твердых поверхностях (рис. 3б) или на химически модифицированных поверхностях (рис. 3в). Другим вариантом реконструкции белка в виде протеолипосом может быть его включение в предварительно сформированный липидный бислой, перекрывающий пору (рис. 3г). Для ориентированной иммобилизации мембранного белка на поверхности используется His-метка, а на следующем этапе формируется липидный бислой (рис. 3д). Гигантские однослойные везикулы, если они расположены над порой, спонтанно разрываются, в результате чего образуются липидные бислои, закрывающие пору (рис. 3е).

Как следует из вариантов реконструкции белка, представленных на рис. 3, он может быть включен в липидный бислой, сформированный не только на твердой поверхности (рис. 3б, в, д), но и в липидный бислой, покрывающий пору (рис. 3а, г, е). В литературе встречается описание формирования двухслойных липидных мембран на небольших отверстиях (диаметром 60 нм) на высокоупорядоченной подложке из пористого оксида алюминия [49]. После нанесения липидных бислоев реконструкцию и ионопроводящие свойства белка наружной мембраны *E. coli* OmpF контролировали с помощью одноканальных записей. Наблюдали характерные состояния проводимости трех мономеров, быструю кинетику и состояния субпроводимости. Блокировка потока ионов в результате взаимодействия просвета поры с антибиотиком ампициллином указывала на полную функциональность белкового канала в двухслойных мембранах нанометрового масштаба.

Авторы настоящего обзора изучили формирование упорядоченных наноструктур порина OmpF из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* двумя методами: из протеолипосом и прямой реконструкцией белка в фосфолипидный бислой, предварительно нанесенный на поверхность слюды [50]. Морфологию полученных структур анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии. Показано, что эффективность формирования, степень однородности и размер доменов порина существенным образом зависят от условий эксперимента. Обнаружено, что полученные из протеолипосом единичные домены агрегированных молекул порина имели неравномерное распределение в бислое и большой разброс в диаметре (20–100 нм). При прямой реконструкции порина показано, что снижение pH солюбилизирующего буфера способствует включению большего количества белка, однако не приводит к формированию достаточно протяженных участков пориновых наночастиц. Наиболее эффективное встраивание порина в липидный бислой было достигнуто при использовании белка в комплексе с пептидогликаном и липополисахаридом, с которыми порин тесно связан в нативной бактериальной мембране [50].

Несмотря на преимущества белковых наноструктур и успешные примеры их создания, одним из постоянных ограничений является отсутствие методологии для получения жесткой белковой «арматуры», которая сохраняет свою функциональность в широком спектре условий окружающей среды. Это требование может быть выполнено путем регулирования с нанометровой точностью взаимодействия реконструируемых в липидный бислой белков с твердым носителем. Успешным подходом в этом контексте может стать использование структурных мотивов молекулы белка в качестве стабильных каркасов для связывания с подложкой, которые путем подходящих мутаций, делеций, вставок или слияний создают белковые структуры с желаемыми новыми функциями [51, 52].

Существуют три основных типа связывания белков с твердой подложкой:

– физическая адсорбция, основанная на электростатических и гидрофобных взаимодействиях [53, 54];

– ковалентное связывание, примером которого может служить взаимодействие поверхности золота, предварительно обработанного соответствующими реагентами, с сульфгидрильными или аминогруппами белка [55, 56];

– биоспецифическое связывание, например, такого рода, как взаимодействие ДНК-белок или антиген-антитело [57].

Физическая адсорбция белка на твердой поверхности, например за счет электростатических взаимодействий, является весьма привлекательным методом из-за простоты исполнения. Такие взаимодействия обычно обратимы, но вполне надежны.

Иммобилизация белков на нанопористых, толстых (8 мкм) пленках диоксида титана (TiO_2) является чрезвычайно стабильной, что объясняется вторичными процессами связывания, происходящими после начальной иммобилизации [58]. Авторы подробно изучили факторы, влияющие на адсорбцию белка на TiO_2: исследовали pH среды, ионную силу раствора, поверхностный заряд белка, размер белка и время иммобилизации.

Многообещающей стратегией для образования гибридных биоконъюгатов является связывание белковых молекул, модифицированных полигистидином, с неорганическими нанокристаллами за счет сродства к металлу. Метод очень

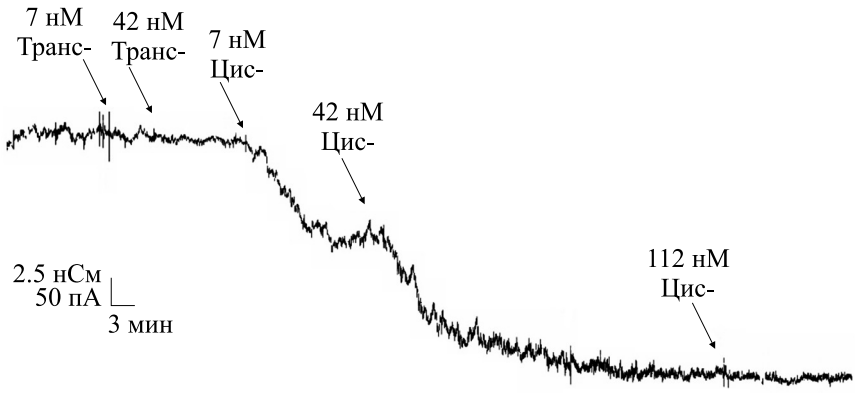


Рис. 4. Типичные записи ионного тока через тримерный трансмембранный белок мальтопорин в присутствии модифицированной мальтогексозы ([61], с изменениями).

прост в реализации, поскольку белки и пептиды, меченные полигистидином, обычно получают с использованием хорошо известных методов молекулярной инженерии. В работе [55] сообщается об использовании мутанта OmpF-E183C, в который был введен единственный цистеин на коротком периплазматическом витке. OmpF-E183C связывается непосредственно с золотыми поверхностями и создает белковые слои высокой плотности путем самосборки из раствора детергента. Когда поверхность золота предварительно обрабатывали β-меркаптоэтанолом и добавляли тиолипиды после стадии иммобилизации белка, по данным ИК-спектроскопии он сохранял свою β-структуру. В работе [56] авторы исследовали самосборку двух сконструированных белков – мальтозосвязывающего белка с присоединенным His7 (MBP-His) и флуоресцентного белка mCherry с концевым His6, осуществляемую за счет сродства к металлу, на золотых наночастицах (AuNP). Для тестирования самосборки AuNP-MPB-His7 использовали аффинную гель-хроматографию, в то время как связывание NP-mCherry-His6 оценивали с помощью измерения флуоресценции.

Таким образом, применяя различные методы, разработанные на сегодняшний день, с помощью плоских мембран и везикул можно создать универсальные биосенсорные платформы для ряда инженерных приложений [38, 59, 60].

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАНАЛООБРАЗУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В БИОСЕНСОРНЫХ УСТРОЙСТВАХ

В литературе описан целый ряд примеров изучения функциональных свойств и создания биосенсоров на основе различных белков [61–69]. Конкретные изменения конформации мембранного белка, существенные или небольшие, происходящие при взаимодействии с аналитом, фиксируются с помощью электрофизиологических методов как активация, ингибирование или модуляция проводимости канала.

На примере одного из специфических поринов наружной мембраны бактерий *E. coli*, мальтопорина (LamB порин), образующего канал для поглощения мальтодекстрина, изучено его специфическое связывание с бактериофагом лямбда (фаг λ, *Escherichia virus Lambda*) [61]. Для выяснения механизма связывания авторы реконструировали мальтопорин в плоские липидные мембраны и исследовали его чувствительность с помощью внешнего трансмембранного потенциала. Вначале авторы реконструировали около 300 каналов мальтопорина в растворителе, содержащем плоский липидный бислой, и наблюдали стабильную проводимость. Введение гибридного белка MBP-gpJ из бактериального вируса лямбда (в концентрации 7 и 42 нМ) в компартмент, соответствующей внутриклеточной стороне канала, не вызвало никакого эффекта. Однако введение белка с противоположной стороны, соответствующей внеклеточной стороне, вызывало значительное снижение ионной проводимости (рис. 4). Поскольку размеры канала не превышают нескольких ангстрем, молекулярные взаимодействия со стенкой канала отражают связывание субстрата, приводящее к конформационным изменениям белка. С помощью этой модели авторы смогли продемонстрировать асимметрию связывания бактериального фага лямбда с его мальтопориновым рецептором [61].

Обнаружено, что канал неспецифического порина OmpF, предназначенный для пассивной диффузии через наружную мембрану *E. coli*, является основным путем проникновения β-лактамных антибиотиков. С помощью записи высокого разрешения проводимости тока через мембрану авторам удалось зафиксировать продвижение от-

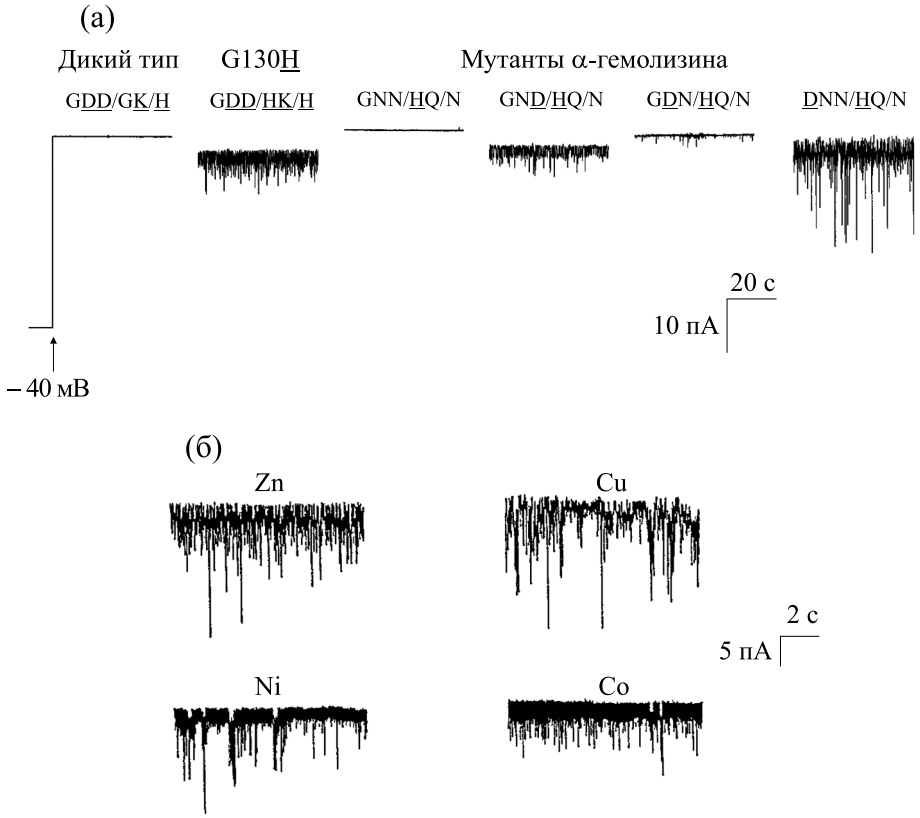


Рис. 5. Записи тока одиночного гетеромерного канала альфа-гемолизина (αHL), содержащего сайт связывания ионов цинка (Zn (ll) ([64], с изменениями). (а) – Одноканальные записи генно-инженерных мутантов αHL. Концентрация Zn (II) в транс-камере равна 1 мМ. (б) – Флуктуации тока одиночных каналов, образованных мутантом αHL (G130H) в зависимости от типа двухвалентного катиона, добавляемого в транс-камеру.

дельных молекул ампициллина. Анализ распределения зарядов внутри канала и на молекуле ампициллина, выполненный методом молекулярного моделирования, показал, что ампициллин и некоторые другие эффективные пенициллины и цефалоспорины взаимодействуют с аминокислотными остатками в зоне сужения канала OmpF [62].

В работе [63] описано важное свойство трансмембранного OmpF-порина как рецептора антибактериального токсина колицина N и показана принципиальная возможность использования его для обнаружения этого аналита. В этом случае плоский липидный бислой с помощью тиолипидов иммобилизовали на золотой подложке с гидрофильными этиленгликолевыми спейсерами и использовали в качестве электрода, что обеспечивало регистрацию лиганд-стробирующей функции канала OmpF. Связывание домена колицина N, наблюдаемое с помощью поверхностного плазмонного резонанса, индуцировало блокирование канала [63].

Отличительной особенностью применения белковых комплексов в биосенсорике является возможность целевой химической модификации исходной молекулы (включая ее структурный дизайн). В качестве примера можно привести способ получения гетеромерной формы альфа-гемолизина (αHL), бактериального порообразующего белка стафилококка, в котором одна из семи субъединиц содержит сайт связывания для двухвалентных металлов, M(II) [64]. Чтобы определить, какие остатки составляют сайт связывания иона металла, авторы изучили влияние катионов двухвалентных металлов на одноканальные токи нескольких точечных мутантов по гистидину, изменив количество и расположение ионизируемых боковых цепей в выбранных местах последовательности белка от 126 до 144 остатка. Таким образом, они определили остатки, входящие в состав сайта связывания двухвалентных ионов металла. Ионы Zn(II) в наномолярной концентрации служили прототипом аналита, модулируя проводимость одиночного канала гетеромера в плоской бислойной мембране (рис. 5а). Обнаружено, что флуктуации тока, для одиночных каналов, образованных мутантом αHL G130H, зависят от типа двухвалентного катиона, добавляемого в транс-камеру (рис. 5б). Например, присутствие ионов цинка вызывает множество быстрых бло-

кирующих событий в единицу времени и характерный кинетический паттерн, в отличие от тех, которые вызваны другими двухвалентными катионами (например, Cu(II), Ni(II) или Co(II)) при этой же концентрации. Иными словами, при такой геометрии сенсорной системы каждому иону соответствует характерный сигнал. Благодаря этому свойству одноканальный сенсорный элемент может быть использован для количественного определения более чем одного аналита.

Важным условием прочных нанобелковых конструкций является сохранение функциональной активности составляющих их белков в широком спектре условий обнаружения аналитов. Это необходимо учитывать, поскольку превращение мембранного белка в биомиметическую полимерную матрицу может изменить его функцию. Для сохранения функциональной активности белка, используемого для формирования биоматрицы, применяются различные генно-инженерные подходы. Так, в результате существенной генно-инженерной реконструкции мембранный белок FhuA (который поглощает гидроксамат железа), был преобразован в FhuA ΔC/Δ4L, который функционировал как надежный канал для отбора проб, позволяя регистрировать биомолекулярные события [65] (рис. 6). Ключевым моментом в данной разработке стало сочетание методов прямой генной инженерии с подбором условий рефолдинга для создания необычно стабильной белковой нанопоры. Для того чтобы проиллюстрировать это кардинальное изменение в свойствах исследуемого белка, авторы сравнили характерные электрические сигналы, называемые сигнатурами (используемые для выявления особенностей той или иной белковой нанопоры) каналов, образуемых FhuA ΔC/Δ4L и стафилококковым αHL при низкой концентрации соли и в сильнокислой среде (при низких значениях pH). Результаты экспериментов свидетельствовали о том, что в отличие от канала, образованного αHL, созданная нанопора белка FhuA ΔC/Δ4L сохраняла свое стабильное открытое состояние в течение длительного периода при температуре до 65°C, а ее проводимость при всех исследуемых условиях оставалась неизменной, т.е. блокировка тока отсутствовала [65].

Возможности применения уникальных характеристик канала сконструированного белка FhuA ΔC/Δ4L авторы продемонстрировали на примерах детектирования биомолекул на основе белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий (рис. 6). В первом примере (рис. 6а, б) показано, что это белковая нанопора функционирует как чувствительный элемент, позволяющий различать похожие полипептиды, состоящие из свернутого домена барназы, PHKазы, состоящей из 110 остатков (Ba), к которому присоединены положительно заряженные неструктурированные полипептиды (pb2), представляющие собой N-концевую часть pb2-прецитохрома. Указанные полипептиды имели различную длину, но одинаковую плотность электрического заряда.

Во втором примере (рис. 6в-д) показано, что сконструированная нанопора FhuA ΔC/Δ4L функционирует как чувствительный элемент для анализа ферментативного расщепления сывороточного иммуноглобулина (IgG) при очень кислом pH. Активность пепсина по расщеплению IgG контролировали во времени (в оптимизированных условиях 1 M NaCl, 10 мМ фосфат-цитрат, pH 3.9) (рис. 6г). Добавление пепсина с транс-стороны камеры не вызвало значительного изменения текущих записей (рис. 6д, кривая *2*), предположительно из-за большого размера фермента по сравнению с диаметром нанопоры. Однако наличие IgG в канале приводило к появлению чередующихся блокировок тока с частотой событий ($f = 30 \pm 8$ Гц) (рис. 6д, кривая *3*). Примечательно, что добавление пепсина ($t = 5$ мин) привело к резкому снижению частоты событий ($f = 5 \pm 2$ Гц, (рис. 6д, кривая *4*)). Полученные в результате переваривания фрагменты IgG вызывали многочисленные кратковременные блокады тока с повышенной частотой ($f = 10 \pm 2$ Гц) при $t = 70$ мин (рис. 6д, кривая *5*). Таким образом, основополагающий принцип обнаружения аналита в данном случае заключался в том, что степень расщепления молекулы IgG коррелировала с изменением тока в нанопоре FhuA ΔC/Δ4L, индуцированного появлением IgG-фрагментов.

По сравнению с мультисубъединичными белками мономерный порин OmpG *E. coli* особенно привлекателен для формирования нанопор, поскольку необходимые модификации канала могут быть легко достигнуты путем мутагенеза. Предыдущие исследования показали, что канал OmpG подвергается pH-зависимому, вольт-зависимому или самопроизвольному закрытию, что может мешать обнаружению аналита. Чтобы устранить эти нежелательные явления, авторы определили участки OmpG, причастные к стробированию, применив для идентификации методы молекулярной динамики. Для обеспечения стабильности открытой конформации белка были использованы два подхода сайт-направленного мутагенеза. Во-первых, подвижность петли 6 была уменьшена введением дисульфидной связи между внеклеточными концами 12-го и 13-го β-тяжей барреля. Во-вторых, водородная связь между 11-м и 12-м β-тяжами была оптимизирована делецией остатка D215. Порин OmpG с обеими стабилизирующими мутациями показал снижение способности к закрытию канала на 95% [66].

Одним из наиболее успешных примеров применения сенсоров на основе липидных бислоев является анализ последовательности нуклеоти-

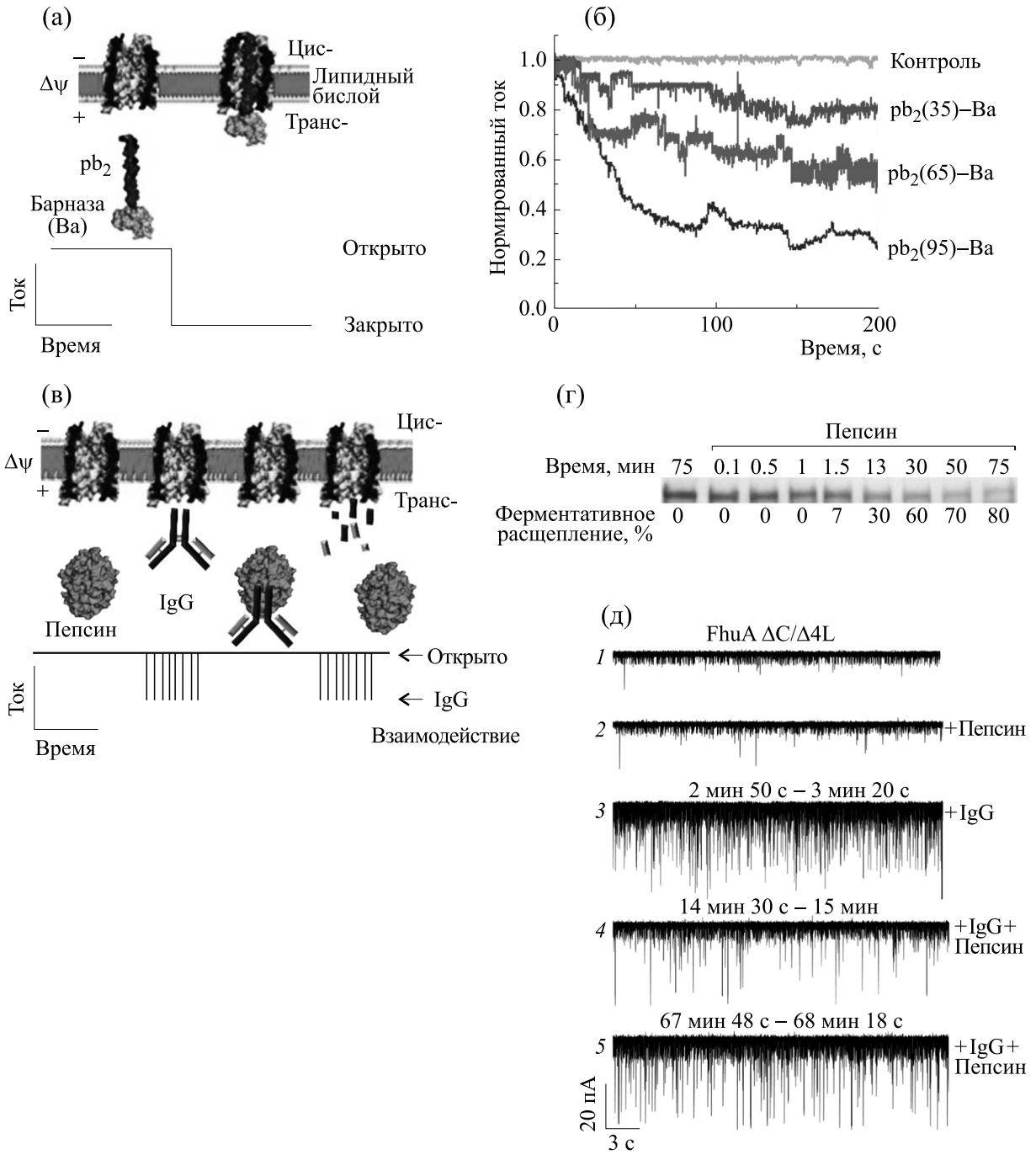


Рис. 6. Использование сконструированной (генно-инженерной) нанопоры на основе белка FhuA ΔC/Δ4L в качестве одномолекулярного зонда для анализа свернутых белковых доменов, содержащих ведущие (лидерные) полипептиды различной длины ((а) и (б)) и анализа ферментативного расщепления в реальном времени (в–д) ([65], с изменениями). (а) – Схема взаимодействия белковых аналитов pb2(35)-Ba, pb2(65)-Ba и pb2(95)-Ba с ведущими положительно заряженными последовательностями длиной 35, 65 и 95 остатков соответственно. (б) – Характерный макроскопический спад тока в сконструированной нанопоре FhuA ΔC/Δ4L. (в) – Схема взаимодействия сывороточного иммуноглобулина (IgG) с пепсином; (г) – ферментативная активность пепсина; (д) – записи тока, индуцированного в нанопоре FhuA ΔC/Δ4L появлением фрагментов IgG.

дов в нуклеиновых кислотах с помощью биологической нанопоры на основе альфа-гемолизина (рис. 7). Эта технология секвенирования ДНК с использованием белковых нанопор была разработана благодаря тому, что четыре азотистых основания в цепочке целевой ДНК по-разному вза-

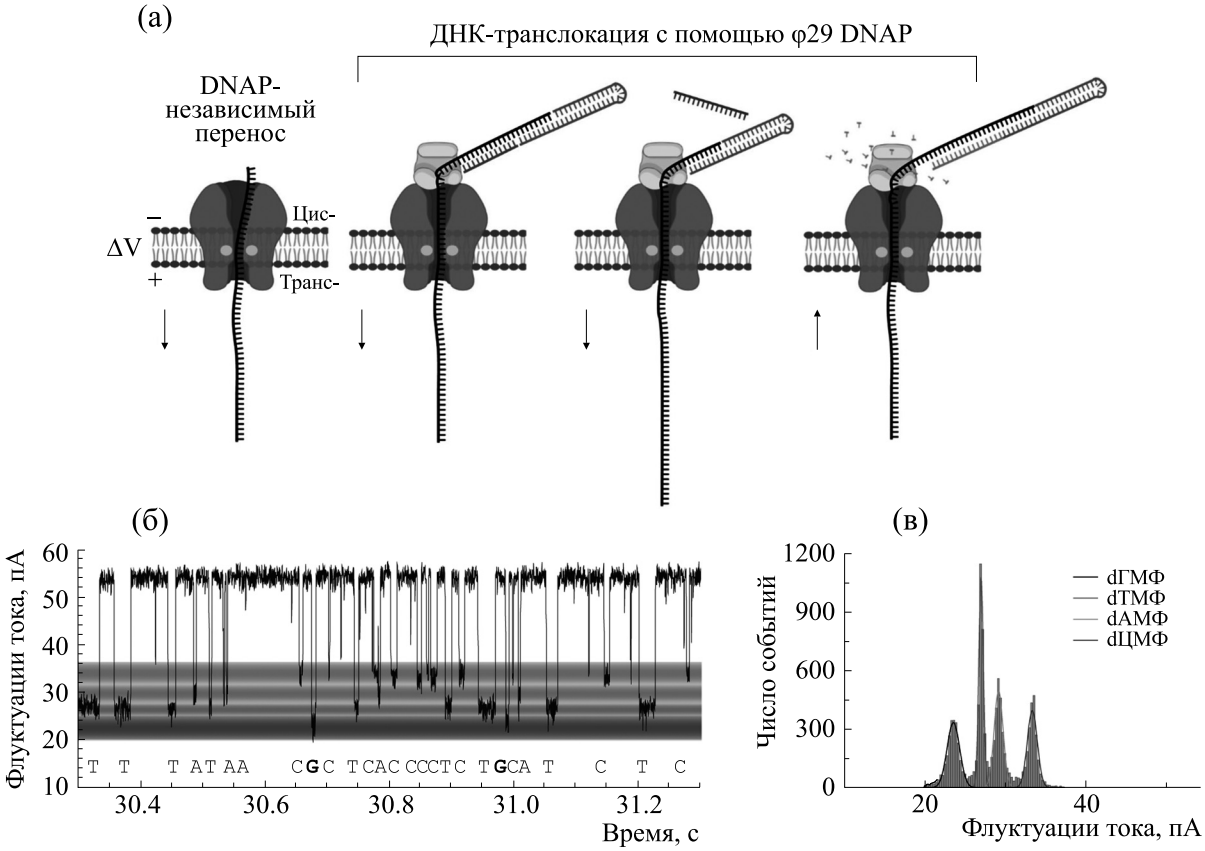


Рис. 7. Детектирование нуклеиновых кислот на основе нанопор ([67, 68], с изменениями). (а) – Модель, иллюстрирующая принцип секвенирования нити нуклеиновой кислоты: нить нуклеиновой кислоты входит в нанопору, вызывая резкое уменьшение ионного тока по сравнению с исходным током открытой поры; проходит через полость нанопоры, что приводит к характерному изменению тока и длительности блокады, и в конечном итоге перемещается через пору, позволяя ионному току вернуться в исходное состояние. (б) – Запись тока единичной поры при прохождении через нее нити нуклеиновой кислоты. (в) – Гистограмма, демонстрирующая различные уровни блокировки тока, генерируемого в результате взаимодействия монофосфатов с порой.

имодействуют с просветом поры α-гемолизина, показывая разные уровни проводимости при блокировке тока [67, 68].

Производительность и селективность биомиметических платформ на основе трансмембранных белков намного превосходят традиционные материальные платформы, но отсутствие стабильности во многом ограничивает их коммерческое использование. К настоящему времени достаточно хорошо разработаны трансмембранные биомиметические платформы на основе белков для четырех основных областей применения: биосенсоры, изучение молекулярных взаимодействий, аккумулирование энергии и очистка воды [69]. Примеры использования биосенсорных систем схематически представлены на рис. 8.

С точки зрения разработки биосенсоров, использующих функциональные свойства мембранных белков, можно выделить биосенсоры, сформированные на двух различных платформах: платформе на основе липидного бислоя и платформе на основе клеток [70]. На липидных двухслойных платформах мембранные белки встроены в липидный бислой, который соединяет белок и сенсорное устройство, а на клеточных платформах мембранные белки экспрессируются в культивируемой клетке, которая затем интегрируется в сенсорное устройство. Исследования, связанные с химическими сенсорами на основе клеток, в основном проводились с конца 1980-х годов [71, 72], однако наибольшим прогрессом в разработке датчиков на основе клеток было ознаменовано начало 2000-х годов [73, 74]. Принципы работы соответствующих систем основаны на реакции клеток на химические стимулы. В основном существуют два типа технологий датчиков-преобразователей на основе клеток, которые основаны на детектировании электрических изменений и флуоресцентного или люминесцентного излучения. Так, в последнее время значительный прогресс наметился в применении полупроводниковых квантовых точек в качестве меток в двух важ-

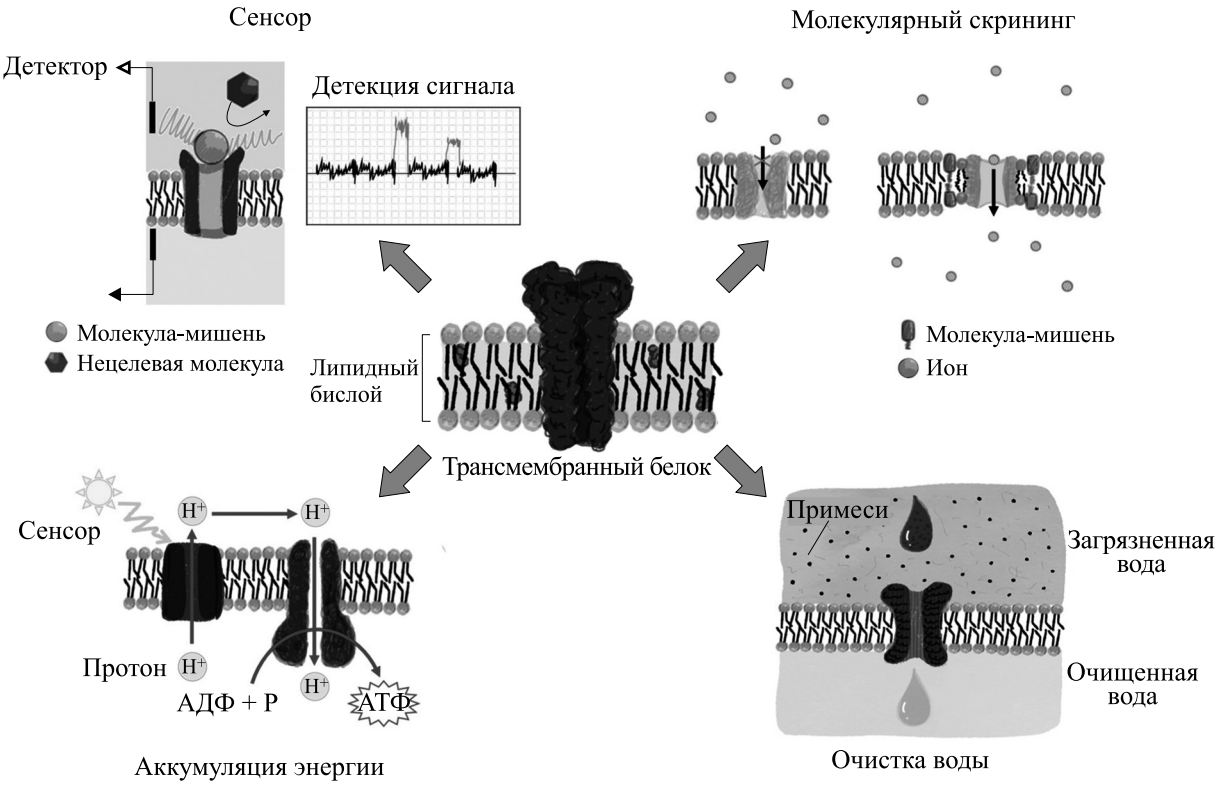


Рис. 8. Потенциально возможные области применения биосенсоров на основе трансмембранных белков: взаимодействие мембран/мембранных белков с лекарственными препаратами, генерация энергии и очистка воды ([69], с изменениями).

ных областях биологии, биовизуализации и биосенсинга [14, 15].

Для дальнейшего развития этой области вместо простых наноструктур (с использованием однокомпонентных наноматериалов и монотонных по композиции) необходимы очень сложные и продуманно созданные ансамбли качественно новых наноматериалов [75, 76]. Многие живые биологические системы являются непревзойденными «природными мастерами» в области био- и химического синтеза, они производят бионеорганические материалы, которые организованы в структуры различного уровня иерархии, от нано- до макромасштабов. Недавние исследования по использованию микроорганизмов в синтезе наночастиц являются относительно новой и захватывающей областью исследований со значительным потенциалом для развития. Микробы, благодаря пористой структуре их клеточной стенки, представляют собой исключительно эффективные шаблоны, которые обеспечивают биомиметический подход к получению упорядоченных нано-, микро- и мезоструктурированных материалов, разнообразных по размерам и форме и наличию на их поверхности множества химических функциональных групп. В качестве биосистем микробы могут быть использованы для синтеза новых бионаноматериалов, микроустройств и микро/нанороботов и т. п. [77].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нативные или искусственно сконструированные биосенсоры с использованием ион-проводящих каналов являются весьма перспективным классом наноструктур: во-первых, из-за возможности фиксирования изменений проводимости единичной поры, так называемый стохастический мониторинг, что повышает степень точности при определении аналита, и, во-вторых, из-за того, что фиксируемый сигнал может быть оцифрован. Подготовка функциональных поверхностей для иммобилизации желаемых биомолекул, так называемая био-нанопаттернизация поверхностей, – это первый шаг в процессе изготовления биодатчиков. От успешного решения методических проблем в области био-нанопаттернизации зависит точное моделирование биомолекул на поверхностях с нанометровым разрешением и,

соответственно, эффективность конструируемой впоследствии биоматрицы, поскольку основополагающим условием для получения разнообразных биоинженерных конструкций, пригодных для создания биосенсоров, является иммобилизация белков в определенном положении, непременно при условии сохранения их биологической активности [78]. За последние несколько лет технология бионанопаттернизации развивается быстрыми темпами, разрабатываются различные методики формирования паттерна для иммобилизации биомолекул, таких как ДНК, пептиды, белки и вирусы в наномасштабе [79]. Диапазон аналитов, определяемых с помощью современных биосенсоров, достаточно широк, среди них инсектициды, пестициды, гербициды, металлы, токсины, антибиотики, микроорганизмы, гормоны и т. д. [80]. Под действием электрофоретической силы молекулы анализируемого вещества переносятся к нанопоре и нарушают протекающий ионный ток через поры. Связывание молекулы-мишени мембранные белки спонтанно преобразуют в электрические сигналы. При этом характер блокировки тока существенно меняется из-за разницы во взаимодействии между просветами пор и аналитом, а также в зависимости от разновидностей нанопор. Соответственно, тот или иной аналит можно определить по динамике изменения ионного тока, характер этих изменений служит своеобразным «отпечатком пальца» аналита.

Таким образом, создание универсальных биодатчиков на основе функционально активных трансмембранных белков, имитирующих клеточную мембрану, не только еще раз подтвердило их биологическую значимость, но и продемонстрировало возможность использования этих белков в качестве эффективных нанотехнологических инструментов. Область применения биологических пор очень широка: она простирается от сверхчувствительных биосенсоров различного назначения до целенаправленного уничтожения злокачественных клеток. К подобным структурам, применяемым в наномедицине, относятся биогенные наночастицы терапевтического назначения, искусственно сконструированные химические и биологические сенсоры [81].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00318).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. В. Медведева, О. М. Ипатова, Ю. Д. Иванов и др., Биомед. химия 52 (6), 529 (2006).
2. А. И. Арчаков, *Нанобиотехнологии в медицине: Нанодиагностика и нанолекарства* (Актовая речь, 13.04.2009).
3. D. C. Kim and D. J. Kang, Appl. Sensors **8**, 6605 (2008).
4. F. Long, A. Zhu, and H. Shi, Sensors (Basel) **13** (10), 13928 (2013).
5. C. G. Palivan, R. Goers, A. Najer, et al., Chem. Soc. Rev. **45**, 377 (2015).
6. I. Y. Hasan and A. Mechler, Analyst **142**, 3062 (2017).
7. A. Krywko-Cendrowska, S. di Leone, M. Bina, et al., Polymers (Basel) **12**(5), 1003 (2020).
8. Y. Yamamoto and H. Hori, Rev. Adv. Mater. Sci. **12,** 23 (2006).
9. I. Kusters, G., van den Bogaart, and A. Kedrov, Structure **19**, 430 (2011).
10. K. Mahendran, R. Romero-Rui, M. Schlösinger, et al., Biophys. J. **102**, 39 (2012).
11. H. Wang, T.-S. Chung, Y. W. Tong, et al., Small **8**, 1185 (2012).
12. M. Bieligmeyer, F. Artukovic, S. Nussberger, et al., Beilstein J. Nanotechnol. **7**, 881 (2016).
13. V. Lesnyak, N. Gaponik, and A. Eychmüller, Chem. Soc. Rev. **42** (7), 2905 (2013).
14. D. Mo, L. Hu, G. Zeng, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. **101** (7), 2713 (2017).
15. I. V. Martynenko, A. P. Litvin, F. Purcell-Milton, et al., J. Mater. Chem. B **5** (33), 6701 (2017).
16. D. S. Shah, M. B. Thomas, S. Phillips, et al., Biochem. Soc. Trans. **35** (3), 522 (2007).
17. B. Hagan and J. Lakma, Molec. Membrane Biol. **21**, 209 (2004).
18. P. Curnow, Biochem, Soc. Trans. **37**, 643 (2009).
19. О. Д. Новикова и Т. Ф. Соловьева, Биол. мембраны **26** (1), 6 (2009).
20. G. E. Schulz, Biochim. Biophys. Acta **1565,** 308 (2002).
21. G. N. Likhatskaya, T. F. Solov'eva, O. D. Novikova, et al., J. Biomol. Struct. Dyn. **23** (2), 163 (2005).
22. A. Wiese, G., Schroder, K. Brandenburg, et al., Biochim. Biophys. Acta **1190**, 231 (1994).
23. D. J. Muller and A. Engel, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **13** (5), 338 (2008).

24. L. Hasler, J. B. Heymann, A. Engel., et al., J. Struct. Biol. **121**, 162 (1998).
25. Б. Глик и Д. Пастернак, *Молекулярная биотехнология: принципы и применение* (Мир, М., 2002).
26. G. A. Signorell, T. Kaufmann, C. W. Kukulski, et al., J. Struct. Biol. **157**, 321 (2007).
27. M. Sheereen, E. Yusko, Y. Billeh, et al., Curr. Opin. Biotechnol. **21** (4), 439 (2010).
28. S. Howorka, Nature Nanotechnol. **12**, 619 (2017).
29. T. L. Williams, M. M. L. Vareiro, and A. T. Jenkins, Langmuir **22**, 6473 (2006**)**.
30. P. H Lu, R. H. Liu, and F. J. Sharom, Eur. J. Biochem. **268**, 1687 (2001)**.**
31. A. J. Heron, J. R. Thompson, B. Cronin, et al., J. Am. Chem. Soc. **131**, 1652 (2009).
32. M. A. Dhoke, P. J. Ladha, F. J. Boerio, et al., Biochim. Biophys. Acta **1716**, 117 (2005).
33. L. Tiefenauer and S. Demarche, Materials **5,** 2205 (2012).
34. H. Ti Tien, S. H. Wurster, and A. L. Ottova, Bioelectrochem. Bioenergetics **42 (**1), 77 (1997).
35. A. Janshoff and C. Steinem, Anal. Bioanal. Chem. **385** (3), 433 (2006).
36. L. X. Tiefenauer and A. Studer, Biointerphases **3** (2), 74 (2008).
37. A. Janshoff and C. Steinem, Anal. Bioanal. Chem. **385**, 433 (2006).
38. E. Reimhult and K. Kumar, Trends Biotechnol. **26** (2), 82 (2008).
39. A. A. Brian and H. M. McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 6159 (1984).
40. L. K. Tamm and H. M. McConnel, Biophys. J. **47** (1), 105, (1985).
41. H. Hillebrandt, G. Wiegand, M. Tanaka, et al., Langmuir **15**, 8451 (1999).
42. A. Ottova, V. Tovarozek, and H. T. Tien, in *Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications*, Ed. by H. Tien and A. Ottova-Leitmannova (Elsevier, New York, 2003), pp. 917–920.
43. E. T. Castellana and P. S. Cremer, Surf. Sci. Rep. **61** (10), 429 (2006).
44. G. D. Bothun, J. Nanobiotechnol. **6**, 13 (2008).
45. A. R. Zolghadr and S. S. Moosavi, RSC Advances **9** (9), 5197 (2019).
46. G. Elender, M. Kühner, E. Sackmann, Biosens. Bioelectronics **11**, 565 (1996).
47. F. Itel, M. Chami, A. Najer, et al., Macromolecules **47**, 21, 7588 (2014).
48. E.-K. Sinner and W. Knoll, Curr. Opin. Chem. Biol. **5**, 705 (2001).
49. K. Eva, M. Schmitt, A. Vrouenraets, et al., Biophys. J. **91**, 2163, (2006).
50. Г. А. Набережных, А. А Карпенко, В. А. Хоменко и др., Биофизика **64** (6), 1107 (2019).
51. A. Skerra, J. Mol. Recognit. **13** (4), 167 (2000).
52. W. Ma, A. Saccardo, D. Roccatano, et al., Nat. Commun. **9**, 1489 (2018).
53. K. Wadu-Mesthrige, N. A. Amro, and J. C. Garno, Biophys. J. **80** (4), 1891 (2001).
54. C. Mathé, S. Devineau, J-C Aude, et al., PLoS One **8** (11), 81346 (2013).
55. F. Aldeek, M. Safi, N. Zhan, et al., ACS Nano **7** (11), 10197 (2013).
56. Z. Jin, Y. Sugiyama, C. Zhang, et al., Chem. Mater. **32** (17), 7469 (2020).
57. D. C. Kim and D. J. Kang, Sensors **8** (10), 6605, (2008).
58. E. Topoglidis, C. J. Campbell, A. E. G. Cass, et al., Langmuir **17** (25), 7899 (2001).
59. J. L. Poulos, T-J. Damoiseaux, E. J. Gillespie, et al., Biosens. Bioelectron. **24**, 1806 (2009).
60. M. A. Czekalska, T. S. Kaminski, S. Jakiela, et al., Lab. Chip **15**, 541 (2015).
61. E. Berkane., F. Orlik., A. Charbit, et al., J. Nanobiotechnol. **3**, 3 (2005).
62. E. M. Nestorovich, C. Danelon, M. Winterhalter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99** (15), 9789 (2002).
63. T. Stora, J. H. Lakey, and H. Vogel, Angew. Chem. Int. Ed. **38**, 389 (1999).
64. O. Braha, S. J. Walker, and A. Cheley, Chemistry Biology **4** (7), 497 (1997).
65. M. M. Mohammad, R. Iyer, K. R. Howard, et al., J. Am. Chem. Soc. **134** (22), 952 (2012).
66. S. Conlan, Y. Zhang, S. Cheley, et al., Biochemistry **39**, 11845 (2000).
67. J. Clarke, H.-C. Wu, L. Jayasinghe, et al., Nat. Nanotechnol. **4**, 265 (2009).
68. A. Crnkovi ć, M. Srnko, and G. Anderluh, Life **11**, 27 (2021).
69. H. Ryu, A. Fuwad, S. Yoon, et al., Int. J. Mol. Sci. **20**, 1437 (2019).
70. N. Misawa, T. Osaki, and S. Takeuchi, J. R. Soc. Interface **15**, 20170952 (2018).
71. D. M. Rawson, A. J. Willmer, and A. P. P. Turner, Biosensors **4**, 299 (1989).
72. L. Bousse and L. Sens, Actuators B Chem. **34**, 270 (1996).
73. D. A. Stenger, G. W. Gross, E. W. Keefer, et al., Trends Biotechnol. **19**, 304 (2001).
74. J. Ko and T. H Park, J. Biol. Eng. **10**, 17 (2016).
75. K. Ariga, M. Li, G. J. Richards, et al., J. Nanosci. Nanotechnol. **11** (1), 1 (2011).
76. M. Ramanathan, K. Hong, Q. Ji, et al., J. Nanosci. Nanotechnol. **14** (1), 390 (2014).
77. D. Mandal, M. E. Bolander, D. Mukhopadhyay, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. **69** (5), 485, (2006).
78. K. L. Christman, V. D. E. Rios, and H. D. Maynard, Soft Matter. **2,** 928 (2006).
79. P. M. Mendes, C. L. Yeung, and J. A. Preece, Res. Lett. **2** (8), 373 (2007).
80. G. P. Nikoleli, D. P. Nikolelis, and C. G. Siontorou, Membranes (Basel) **8** (4), 108 (2018).
81. H. Pradeep and G. K. Rajanikant, Nanobiotechnology **6** (2), 63 (2012).

Nanostructural Biosensors Based on Components of Bacterial Membranes

O.D. Novikova*, G.A. Naberezhnykh*, and A.A. Sergeev**

**G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100 Let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia*

***Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Radio 5, Vladivostok, 690041 Russia*

Protein molecules have the unique property of transferring material and/or information through an impenetrable barrier called lipid bilayer. This peculiar role of cellular "gatekeepers" is especially interesting for the purposes of nanobiotechnology, since membrane proteins can be successfully used for communication between two different media separated by a lipid bilayer. This review describes the structural features and properties of transmembrane proteins as the most promising components of modern biosensor devices. Methods for the formation of lipid bilayers attached to a solid surface as well as methods for obtaining a rigid protein "armature" are also presented. With the use of these techniques it is possible to reconstruct and maintain proteins in a functionally active conformation in regard to a wide range of analytes to be determined. The high selectivity and specificity of protein molecules in recognizing receptors or ligands make them indispensable for biomedical analysis and molecular diagnostics.

Keywords: nanostructured biosensors, transmembrane proteins, lipid bilayer

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 684–695

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 612.822.3 + 612.085.2 + 57.086.83

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ МОДУЛЯЦИИ КОРОТКИМИ ПЕПТИДАМИ МЕДЛЕННЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ МЕМБРАНЫ СЕНСОРНОГО НЕЙРОНА

© 2021 г. И.В. Рогачевский, А.Д. Калинина, В.А. Пенниайнен, С.Г. Терехин, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов, В.Б. Плахова

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

E-mail: verapl@mail.ru

Поступила в редакцию 08.09.2020 г.
После доработки 10.09.2020 г.
Принята к публикации 15.04.2021 г.

Исследованы возможные механизмы лиганд-рецепторного связывания аргининсодержащих тетрапептидов с каналами $Na_V1.8$ первичного сенсорного нейрона. Установлено, что тетрапептид Ac-RERR-NH_2, действующий с наружной стороны нейрональной мембраны, снижает потенциалочувствительность исследуемых каналов. В отличие от этого тетрапептид Ac-REAR-NH_2 не обладает такой способностью. Применение конформационного анализа для объяснения механизма лиганд-рецепторного связывания ряда коротких пептидов, исследованных нами в настоящей работе, позволило предположить, что ключевую роль здесь играют положительно заряженные гуанидиновые группы боковых цепей двух аргинильных остатков. Между этими остатками должен находиться еще один аминокислотный остаток, в нашем случае – глутаминовая кислота. Расчеты показывают, что механизм лиганд-рецепторного связывания не может быть реализован, когда указанные гуанидиновые группы в молекулах коротких пептидов оказываются на расстоянии, меньшем определенного порогового значения. Полученные данные позволяют заключить, что тетрапептид Ac-RERR-NH_2, равно как и ряд других пептидов, способных к связыванию с каналом $Na_V1.8$ по тому же механизму, могут претендовать на роль лекарственных субстанций анальгетиков периферического механизма действия.

Ключевые слова: короткие пептиды, каналы $Na_V1.8$, ноцицептивный нейрон, конформационный анализ.

DOI: 10.31857/S0006302921040074

Медленные натриевые каналы впервые были обнаружены в мембране сенсорного нейрона [1]. Позже, когда были изучены и другие представители суперсемейства натриевых каналов, этим медленным натриевым каналам было присвоено название $Na_V1.8$. В настоящее время очевидно, что физиологическая функция каналов $Na_V1.8$ связана с кодированием периферических ноцицептивных сигналов [1–3].

Ноцицепторы являются полимодальными рецепторами, причем информацию о тактильных, температурных и других воздействиях несет низкочастотная посылка нервных импульсов, а при усилении стимула до повреждающего уровня происходит повышение частоты импульсации, что и является сигналом для активации ноцицептивной системы на супраспинальном уровне. Такая высокочастотная посылка нервных импульсов воспринимается как болевое ощущение [4, 5]. При действии гипералгезических агентов отмечается увеличение функциональной активности каналов $Na_V1.8$. Для получения антиноцицептивного эффекта необходимо снизить функциональную активность этих каналов, что может быть осуществлено двумя способами: или путем уменьшения плотности каналов в мембране ноцицептивного нейрона, или за счет снижения потенциалочувствительности их активационного воротного устройства [3, 6, 7]. Агенты, способные снижать возбудимость ноцицепторов посредством уменьшения потенциалочувствительности активационного воротного устройства медленных натриевых каналов $Na_V1.8$, могут претендовать на роль анальгетических лекарственных субстанций [8].

При изучении низкомолекулярных белков дефенсинов, продуцируемых нейтрофилами и клетками Панета [9, 10], нами было обнаружено, что дефенсины кролика NP-1 и NP-4, действующие в очень низких концентрациях, снижают потенциа-

Сокращение: ИП – индекс площади эксплантатов.

лочувствительность каналов $Na_V1.8$ сенсорного нейрона [11, 12]. Это свидетельствует о потенциальной способности данных молекул выключать ноцицептивную компоненту сенсорного сигнала, передаваемого в центральную нервную систему. Задача разделения противомикробной (антибиотической) и анальгетической функций этих эндогенных молекул не решена до настоящего времени. Для ее решения нами была предпринята попытка выделить из молекул дефенсинов минимальный фрагмент, оказывающий модулирующий эффект на каналы $Na_V1.8$. Выяснилось, что синтетические гексапептиды Ac-PRERRA-NH_2, Ac-PRARRA-NH_2 и Ac-PKEKKA-NH_2 снижают потенциалочувствительность каналов $Na_V1.8$ в концентрациях, примерно равных 100 нмоль/л [13]. Последовательность PRERRA является фрагментом нативной формы молекулы дефенсина NP-1. Замена глутаминовой кислоты на аланин (переход от Ac-PRERRA-NH_2 к Ac-PRARRA-NH_2) не отразилась на оказываемом пептидом эффекте. Исходя из этого, был сделан вывод, что присутствие в атакующей молекуле аминокислотного остатка глутаминовой кислоты не является необходимым условием, определяющим способность пептида к связыванию с каналом [13]. Таким образом, стало понятно, что ключевую роль в механизме лиганд-рецепторного связывания молекулы Ac-PRERRA-NH_2 должны играть аргинильные остатки, поэтому следующей задачей стал поиск максимально короткого пептида, содержащего данную аминокислоту и способного эффективно снижать потенциалочувствительность каналов $Na_V1.8$. Все указанные молекулы объединяет присутствие стерически доступных аргинильных остатков, которые вносят основной вклад во взаимодействие с каналом $Na_V1.8$ за счет образования межмолекулярных ион-ионных связей [14].

Задачей настоящего исследования было изучение механизма лиганд-рецепторного связывания с каналами $Na_V1.8$ вновь синтезированных тетрапептидов Ac-RERR-NH_2 и Ac-REAR-NH_2, которые короче изученных нами ранее гексапептидов и, согласно нашему предположению, могут претендовать на роль безопасной и эффективной субстанции нового анальгетика. При формировании лиганд-рецепторного комплекса указанные тетрапептиды потенциально способны образовывать межмолекулярные ион-ионные связи с участием гуанидиновых функциональных групп аргинильных остатков. Проверке этого предположения посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод локальной фиксации потенциала. Для проведения эксперимента методом локальной фиксации потенциала использовали диссоциированную культуру изолированных нейронов дорзальных ганглиев крыс линии *Wistar*, полученную методом краткосрочного культивирования. Дорзальные ганглии, выделенные из областей $L_5 - S_1$ спинного мозга новорожденных крысят, помещали в раствор Хенкса. Далее осуществляли ферментативную обработку в специальном растворе (см. ниже). Длительность обработки зависела от возраста крыс и составляла от двух до пяти минут при 37°C [1]. Используемый раствор состоял из следующих компонентов: 1 мл раствора Хенкса, 1 мл среды Игла, 1 мг/мл проназы-Е, 2 мг/мл коллагеназы (тип 1А). В качестве буфера применяли 10 ммоль/л HEPES–Na (pH 7.4). По окончании ферментативной обработки ганглии тщательно отмывали путем центрифугирования (1 мин, 900 об/мин) и последующей смены надосадочной жидкости. Отмывку проводили в среде Игла с добавлением глюкозы (0.6%), фетальной сыворотки коровы (10%), гентамицина (40 ед/мл) и глютамина (2 ммоль/л). Далее в этой же среде культивировали изолированные нейроны, полученные после отмывки путем механической диссоциации при помощи пипетирования. Добавление культуральной среды к получаемой клеточной суспензии осуществляли для достижения необходимой плотности нейронов в объеме чашки Петри. При этом шванновские клетки и фибробласты осаждались на дне чашки Петри (90 мм) в течение 25 мин при 37°C. В результате описанных операций была получена культура клеток, состоявшая главным образом из сенсорных нейронов. Затем нейроны культивировали в чашках Петри (40 мм), дно которых было покрыто коллагеном, полученным из хвостов крыс. Спустя один-два часа после завершения культивирования отбирали для проведения опытов визуально неповрежденные клетки. Записи электрической активности нейрональной мембраны проводили на клетках, которые сохраняли жизнеспособность в течение одних суток культивирования.

Для исследования токов каналов $Na_V1.8$ использовали стандартные растворы. Состав внеклеточного раствора (концентрации представлены в ммоль/л): NaCl – 65, тетродотоксин – 0.0001, $MgCl_2$ – 2, $CaCl_2$ – 2, HEPES–Na – 10, Choline–Cl – 70, pH 7.4; состав внутриклеточного раствора: NaCl – 10, $MgCl_2$ – 2, CsF – 100, CsCl – 40, HEPES–Na – 10, pH 7.2. Изменения pH осуществляли с помощью CsOH и HCl. Присутствие ионов фтора во внутриклеточном растворе было необходимо для блокирования кальциевых токов. Также в составе обоих растворов отсутствовали ионы калия, что позволило исключить все компоненты калиевого тока [15, 16]. При этом добавление тетродотоксина во внеклеточный раствор блокировало все тетродотоксинчувствительные натриевые каналы, что делало возможным реги-

стрировать ответы только каналов $Na_V1.8$. Реактивы, использованные в работе, приобретали в фирме Sigma (США).

Исследуемые пептиды были синтезированы фирмой ООО «НПФ Верта» (Россия) методом классического пептидного синтеза, для чего применяли реактивы и производные аминокислот фирм Sigma (США) и Iris Biotech GmbH (Германия). Полученные пептиды характеризовали с помощью аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (чистота > 95%) и масс-спектрометрии.

Для регистрации ионных токов исследуемые нейроны с помощью микропипетки переносили в экспериментальную камеру, объем которой составлял 200 мкл. Полная замена наружного раствора в камере происходила за одну минуту под действием силы тяжести путем пассивного протока.

Эксперименты осуществляли методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp method) в конфигурации «регистрация активности целой клетки» («whole-cell recording») [17]. Для этого использовали аппаратно-программный комплекс, состоящий из усилителя EPC 7 (patch-clamp L/M-EPC 7), цифро-аналогового и аналого-цифрового преобразователей и персонального компьютера. Пакет программ для автоматизации научных исследований был создан в лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН [18].

Микроэлектроды, использованные в работе, изготавливали из мягкого стекла в две стадии в соответствии с описанием, приведенным в работе [17], применяя пуллер для микропипеток P-97 (Sutter Instrument, США). Микроэлектрод заполняли внутриклеточным раствором и с помощью микроманипулятора вводили в экспериментальную камеру с внеклеточным раствором. При этом в микроэлектроде создавали небольшое положительное давление для предотвращения попадания в него наружного раствора. Далее микроэлектрод подводили ко дну экспериментальной камеры так, чтобы он прижимался к поверхности клеточной мембраны находящегося там нейрона для создания плотного (высокоомного) контакта, после чего мембранный фрагмент под микроэлектродом разрушали, прикладывая отрицательное давление. При прорыве мембраны под кончиком микроэлектрода возникали высокоамплитудные емкостные составляющие ионного тока, которые сначала частично компенсировались аппаратным способом, а затем полностью – программным. Таким образом происходила реализация конфигурации «whole-cell». После этого микроэлектрод вместе с нейроном поднимали над дном камеры, что позволяло производить смену внеклеточного раствора в ходе эксперимента без ухудшения условий регистрации натриевых токов. Перед началом записи ионных токов выдерживали паузу в несколько минут для осуществления внутриклеточной перфузии нейрона раствором, заполняющим микроэлектрод. Максимальная длительность эксперимента составляла один час.

При проведении экспериментов постоянно контролировали величину последовательного сопротивления (R_S). Она не должна превышать 3 МОм, иначе стационарные и кинетические характеристики измеряемых токов будут получены с большими ошибками [19]. Отметим, что и значение эффективного заряда активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$ (Z_{eff}) может оказаться некорректным, если величина R_S превышает 3 МОм.

Погрешность метода, которая также определяется величиной R_S, связана с точностью фиксации трансмембранной разности потенциалов. Реальная величина трансмембранной разности потенциалов определяет положение исследуемых стационарных функций каналов $Na_V1.8$ относительно оси E. Стационарная ошибка фиксации потенциала оценивается с помощью формулы:

$$\Delta E \approx I_{Na}^{max} R_S,$$

где I_{Na}^{max} – максимальное амплитудное значение натриевых токов.

На величину ΔE должны сдвигаться вправо «реальные» значения потенциалозависимостей стационарных функций натриевых каналов. Наименьшая ошибка фиксации (менее 1 мВ) бывает в том случае, когда ток I_{Na}^{max} не превышает 1 нА. Тогда ошибкой метода можно пренебречь.

Помимо величины R_S в процессе эксперимента контролировали величину емкости мембраны (C_m). Токи, текущие через емкость мембраны (I_C), и токи утечки (I_L) вычитали из суммарного ионного тока с помощью специальной программной процедуры.

В диапазоне потенциалов от –60 мВ до 45 мВ последовательно подавали ступеньки напряжения с шагом 5 мВ. Длительность каждого из тестирующих импульсов составляла 50 мс. В ответ на каждую ступеньку напряжения регистрировали пиковые (амплитудные) значения токов (I_{peak}), что позволяло построить «пиковую» вольтамперную характеристику исследуемых натриевых каналов, а также зависимость величины «хордовой» проводимости от потенциала $G_{Na}(E)$:

$$G_{Na}(E) = I_{ampl}(E)/(E - E_{Na}),$$

где $I_{ampl}(E)$ – зависимость амплитудных значений натриевого тока от потенциала, E_{Na} – величина потенциала реверсии натриевого тока.

Следующим шагом являлось построение логарифмической потенциалочувствительности $L(E)$ с использованием метода Алмерса [20] для расчета Z_{eff} каналов $Na_V1.8$. Этот метод делает возможным оценить перенос заряда активационной воротной системы каналов $Na_V1.8$ на основании измерения пиковой вольтамперной характеристики канала [20]. Исходя из того, что число открытых каналов (N_o) пропорционально величине хордовой проводимости $G_{Na}(E)$, а число закрытых каналов (N_c) соответствует $\{G_{Na}^{max} - G_{Na}(E)\}$, где G_{Na}^{max} – максимальная величина хордовой проводимости, достигаемая при таких потенциалах, когда все каналы оказываются открытыми (по активационному воротному механизму), можно построить функцию $L(E)$ [20]:

$$L(E) = \ln(G_{Na_s}(E)/(G_{Na_s}^{max} - G_{Na_s}(E))).$$

Приведенная здесь функция $L(E)$ позволяет определить «предельную логарифмическую чувствительность» к потенциалу активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$, поскольку при переходе каналов из открытого в закрытое состояние (при $E \to -\infty$) должно выполняться распределение Больцмана [20]:

$$\lim_{E\to-\infty}(N_o/N_c) = \lim_{E\to-\infty}\{G_{Na}(E)/[G_{Na}^{max} - G_{Na}(E)]\} \to C\cdot\exp[(Z_{eff}eE)/(kT)],$$

где C – константа, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, Z_{eff} – эффективный заряд, выраженный в единицах заряда электрона.

Согласно теории Алмерса, при величине E, стремящейся к $-\infty$, функция $C\cdot\exp[Z_{eff}eE/kT]$ представляет собой одну экспоненту, которую в логарифмическом масштабе можно представить с помощью регрессионной прямой, проходящей через три-пять начальных точек функции $L(E)$. Проведенный нами ранее анализ показывает, что именно каналы $Na_V1.8$ позволяют применить метод Алмерса для оценки Z_{eff} с удовлетворительной точностью, поскольку их инактивационный процесс является достаточно медленным и не вносит дополнительной погрешности в измерения эффективного заряда, переносимого при открывании этих каналов [8].

Метод органотипической культуры ткани. Эксперименты проводили на эксплантатах дорзальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивированных в чашках Петри на подложках из коллагена в CO_2-инкубаторе («Sanyo», Япония) в течение трех суток при 36.5°C и 5% CO_2. Питательная среда содержала 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла с добавлением инсулина (0.5 ед/мл), глюкозы (0.6%), глютамина (2 мкмоль/л), гентамицина (100 ед/мл) и 10% фетальной сыворотки коровы. Контрольными служили эксплантаты, культивированные только в условиях питательной среды. Для количественной оценки роста эксплантатов применяли морфометрический метод [21, 22]. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной центральной площади, где находились немигрирующие клетки. Контрольное значение ИП принимали за 100%. Для визуализации объектов использовали микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения анализировали с использованием программ ImageJ и ZEN_2012.

Конформационный анализ молекул коротких пептидов. Конформационный анализ молекул тетрапептидов Ac-RERR-NH_2 и Ac-REAR-NH_2, а также молекулы трипептида Ac-RER-NH_2 проведен методом Монте-Карло с последующей минимизацией энергии [23] в рамках пакета программ ZMM [24–28]. Поскольку моделировалось состояние пептидных молекул при их лиганд-рецепторном связывании с белковой мишенью, значение диэлектрической проницаемости среды ε было принято постоянным и равным 10. Гуанидиновые группы боковых цепей аргинильных остатков (R) считались положительно заряженными в связи с тем, что указанные группы остаются протонированными даже в толще белка [29]. Карбоксильную группу боковой цепи остатка глутаминовой кислоты (E) рассматривали в двух формах, отрицательно заряженной и электронейтральной, так как трудно предположить однозначно, какой заряд несет указанная функциональная группа в момент образования лиганд-рецепторного комплекса.

Все вычисления проводили с применением силового поля AMBER для расчета ван-дер-ваальсовых взаимодействий [30, 31]. Минимизация энергии молекулярной системы методом Монте-Карло прекращалась, когда 2000 последовательных актов минимизации не приводили к снижению энергии обнаруживаемого в процессе расчетов глобального конформационного минимума. Для дальнейшего анализа были отобраны все устойчивые конформации, обладающие энергией не выше 7 ккал/моль относительно наиболее низкоэнергетической из полученных конформаций.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных экспериментальных данных про-

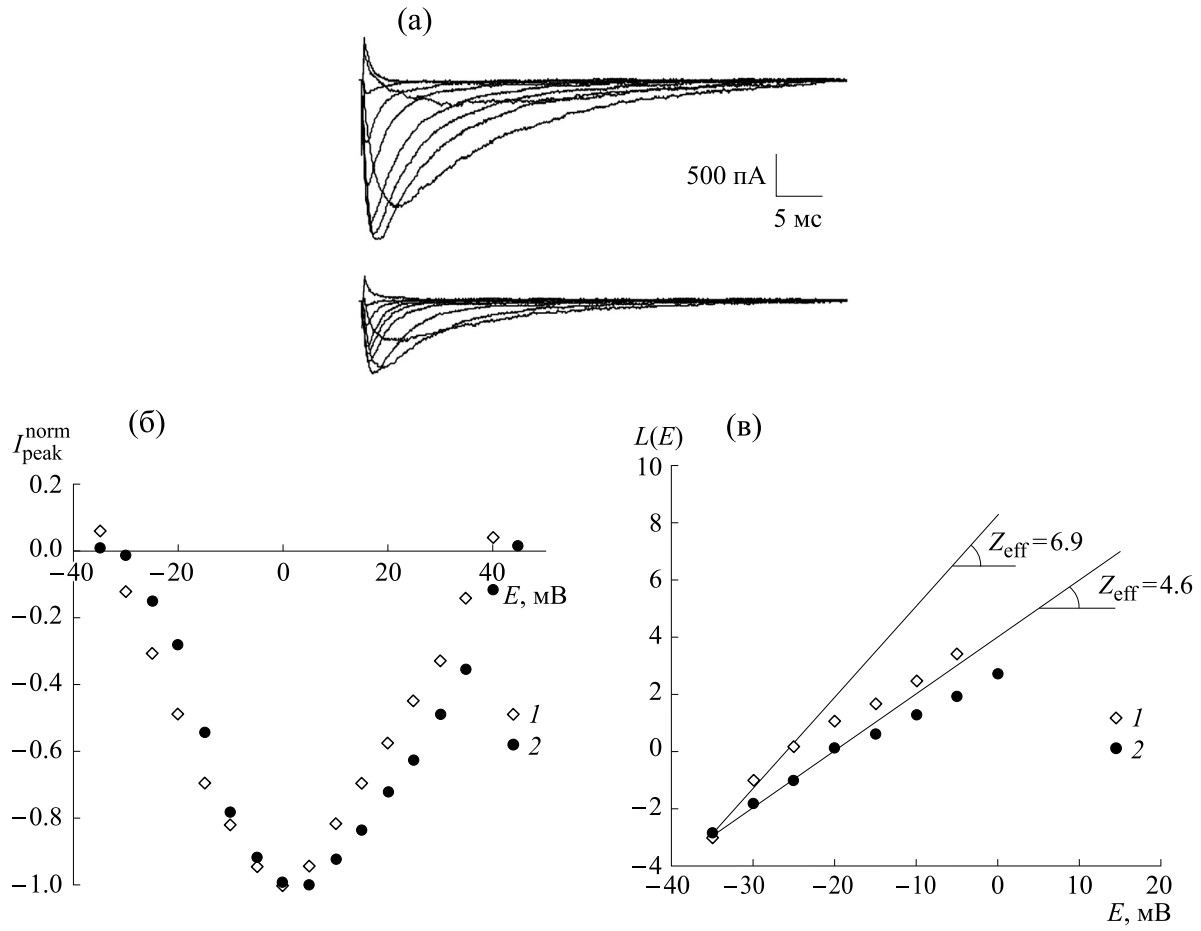


Рис. 1. Исследование влияния тетрапептида Ac-RERR-NH_2 (100 нмоль/л) на функциональную активность каналов $Na_V1.8$. (а) – Семейства натриевых токов, полученные в контрольных условиях (сверху) и после приложения тетрапептида (снизу). Поддерживаемый потенциал –110 мВ, длительность 500 мс; тестирующий потенциал изменяли с шагом 10 мВ. (б) – Нормированные пиковые вольтамперные характеристики медленных натриевых каналов, построенные по данным контрольного эксперимента (квадраты) и после приложения тетрапептида (кружки). Поддерживаемый потенциал –110 мВ, длительность 500 мс; тестирующий потенциал изменяли с шагом 5 мВ. (в) – Логарифмическая потенциалочувствительность $L(E)$ в контрольных условиях (квадраты) и после приложения тетрапептида (кружки). Показано определение величин Z_{eff} по тангенсу углов наклона регрессионных прямых.

водился с помощью программы STATISTICA 10.0 с применением *t*-критерия Стьюдента (уровень статистической значимости различий экспериментальных и контрольных данных $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты, полученные методом локальной фиксации потенциала. Семейства токов каналов $Na_V1.8$ в контрольных условиях и после приложения фрагмента молекулы дефенсина NP-1 (тетрапептид Ac-RERR-NH_2, 100 нмоль/л) представлены на рис. 1а. Небольшое снижение амплитуд токов может быть обусловлено так называемым «run-down» эффектом, который внутренне присущ методу локальной фиксации потенциала и заключается в постепенном снижении плотности исследуемых каналов из-за ухудшения функционального состояния клетки в условиях перфузии в течение эксперимента. Регистрация амплитудных (пиковых) значений токов в ответ на каждую ступеньку напряжения позволила построить «пиковую» вольтамперную характеристику $I_{peak}(E)$ (рис. 1б). Сравнение вольтамперных характеристик демонстрирует изменение крутизны левой ветви указанной функции после воздействия тетрапептида. Этот эффект, наблюдаемый при наиболее отрицательных значениях мембранных потенциалов, при которых еще генерируются исследуемые токи, позволяет с помощью метода Алмерса количественно охарактеризовать процесс лиганд-рецепторного связывания [20]. Функция $L(E)$, описывающая «предельную логарифмическую чувствительность» к потенциалу активационного воротного устройства каналов

$Na_V1.8$, представлена на рис. 1в. Тангенс угла наклона регрессионной прямой, построенной по первым точкам функции $L(E)$, позволяет определить величину эффективного заряда (Z_{eff}) активационного воротного устройства канала $Na_V1.8$. Приложение тетрапептида Ac-RERR-NH_2 в концентрации 100 нмоль/л снижало величину эффективного заряда с контрольного значения $Z_{eff} = 6.9$ до значения 4.6 (рис. 1в).

На рис. 2 представлены обобщенные данные действия на Z_{eff} двух исследованных тетрапептидов. Эффективное связывание с каналом проявляет только тетрапептид Ac-RERR-NH_2. После его воздействия среднее значение Z_{eff} достоверно снижалось от 6.4 ± 0.3 ($n = 17$) в контрольных условиях до 4.6 ± 0.3 ($n = 23$). Этот эффект полностью устранялся при замене одного из аргининов на электронейтральный аланин: при воздействии тетрапептида Ac-REAR-NH_2 (100 нмоль/л) величина Z_{eff} не отличалась от контрольной и составила 6.3 ± 0.3 ($n = 22$) (рис. 2). Полученные результаты указывают на важнейшую роль двух аминокислотных остатков аргинина, которые должны находиться на определенном расстоянии друг от друга в атакующей молекуле. Можно предположить, что именно в этом случае происходит процесс лиганд-рецепторного связывания атакующей молекулы с молекулой канала $Na_V1.8$. Насколько специфичен этот процесс или, другими словами, существует ли другая мишень на мембране сенсорного нейрона, с которой также может происходить связывание тетрапептида Ac-RERR-NH_2, было исследовано нами методом органотипического культивирования.

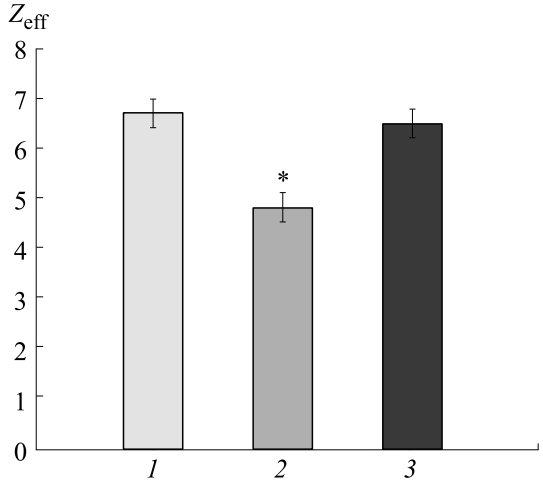


Рис. 2. Значения величины эффективного заряда активационной воротной системы каналов $Na_V1.8$ после приложения тетрапептидов: *1* – контрольное значение эффективного заряда, $Z_{eff} = 6.7 \pm 0.3$ ($n = 17$); *2* – значение эффективного заряда после приложения тетрапептида Ac-RERR-NH_2 (100 нмоль/л), $Z_{eff} = 4.6 \pm 0.3$ ($n = 23$); *3* – значение эффективного заряда после приложения тетрапептида Ac-REAR-NH_2 (100 нмоль/л), $Z_{eff} = 6.5 \pm 0.3$ ($n = 22$). * – Различие между контрольными и экспериментальными данными статистически достоверно.

Результаты, полученные методом органотипической культуры ткани. Тетрапептид Ac-RERR-NH_2 был исследован в концентрациях 0.1 пмоль/л, 10 пмоль/л, 0.1 нмоль/л, 1 нмоль/л, 10 нмоль/л и 100 нмоль/л (рис. 3а). В концентрациях 0.1 пмоль/л и 10 пмоль/л исследуемый агент практически не влиял на рост нейритов. ИП эксплантатов дорзальных ганглиев не отличался от контрольного значения. В концентрации 0.1 нмоль/л указанный тетрапептид проявлял нейрит-стимулирующее действие: его введение в питательную среду вызывало достоверную стимуляцию роста нейритов в среднем на 34%. При добавлении в культуральную среду Ac-RERR-NH_2 в концентрации 1 нмоль/л наблюдали недостоверную стимуляцию роста нейритов. ИП экспериментальных эксплантатов был выше на 20%. В концентрациях 10 нмоль/л и 100 нмоль/л Ac-RERR-NH_2 также практически не влиял на рост нейритов дорзальных ганглиев. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что тетрапептид Ac-RERR-NH_2 обладает выраженными нейритстимулирующими свойствами только в случае его применения в очень низкой концентрации (0.1 нмоль/л). Иными словами, данный тетрапептид может запускать сигнальный каскад, ведущий к росту нейритов эмбриональной нервной ткани. Мембранная мишень, активация которой приводит к запуску этого процесса, остается неизвестной. Тот факт, что действие изучаемого тетрапептида не приводит к ингибированию роста, свидетельствует о вероятной безопасности действия исследуемого агента.

Влияние тетрапептида Ac-REAR-NH_2 на рост нейритов сенсорных нейронов было исследовано также в широком диапазоне концентраций от 10 пмоль/л до 10 мкмоль/л (рис. 3б). Введение в питательную среду указанного агента не влияло на рост нейритов дорзальных ганглиев. Этот результат свидетельствует о том, что данный тетрапептид не имеет специфического действия на мембрану сенсорного нейрона.

Результаты применения конформационного анализа для выяснения механизмов лиганд-рецепторного связывания исследуемых пептидов с медленными натриевыми каналами. Молекулярный механизм лиганд-рецепторного связывания коротких пептидов с медленными натриевыми каналами $Na_V1.8$ может быть объяснен образованием двух ион-ионных связей между положительно заряженными гуанидиновыми группами боковых

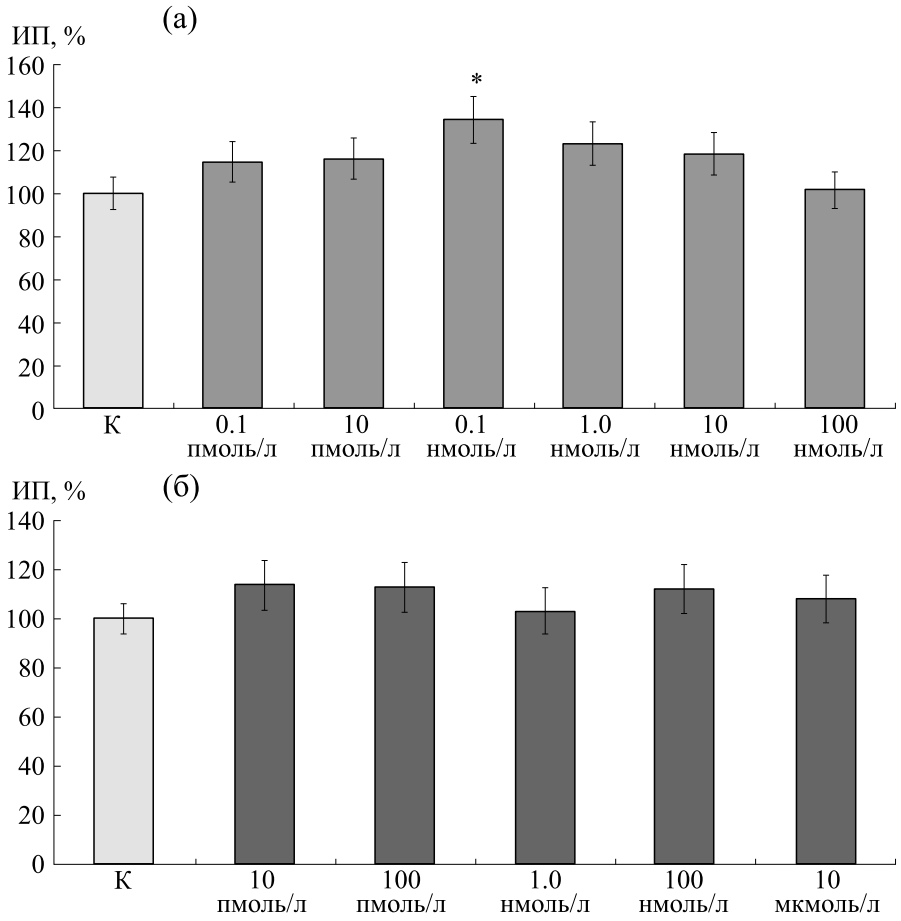


Рис. 3. Влияние тетрапептидов в различных концентрациях на рост нейритов дорзальных ганглиев: (а) – значения ИП после приложения тетрапептида Ac-RERR-NH_2; (б) – значения ИП после приложения тетрапептида Ac-REAR-NH_2. Светлые столбики – контрольные значения; * – различие достоверно относительно контрольных эксплантатов, $p < 0.05$.

цепей аргинильных остатков и отрицательно заряженными функциональными группами, входящими в состав аминокислотной последовательности канала. Дополнительным указанием на это служит тот факт, что молекула трипептида Ac-RER-NH_2, в котором присутствуют два аргинильных остатка, достоверно уменьшает величину эффективного заряда активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$ [32].

Одной из задач проведения конформационного анализа изучаемых пептидов являлась попытка определения оптимального расстояния между гуанидиновыми группами при их связывании с молекулярной мишенью. В качестве параметра, описывающего расстояние между данными группами, было выбрано расстояние между атомами углерода, входящими в состав гуанидиновых групп, поскольку положение этих атомов примерно соответствует геометрическим центрам указанных функциональных групп, положительный заряд которых делокализован по трем атомам азота. Пространственное строение наиболее низкоэнергетических конформаций молекул Ac-REAR-NH_2, Ac-RERR-NH_2 и Ac-RER-NH_2 представлено на рис. 4. Для каждой из молекул приведены две формы: в одной из них карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты несла отрицательный заряд, в другой данная группа считалась электронейтральной.

Для молекулы тетрапептида Ac-REAR-NH_2 получено 126 конформаций, когда боковую цепь остатка глутаминовой кислоты рассматривали в отрицательно заряженной форме (рис. 4а), и 297 конформаций, если она была электронейтральной (рис. 4б). Средние значения расстояний R^1–R^4 между гуанидиновыми группами по обеим полученным выборкам составляют 9.2 ± 1.3 и 10.7 ± 1.4 Å соответственно. Отметим, что в выборках из 50 наиболее низких по энергии конформаций молекулы Ac-REAR-NH_2 вне зависимости от заряда глутаминовой кислоты указанные расстояния не превышают 10 Å в 90% случаев.

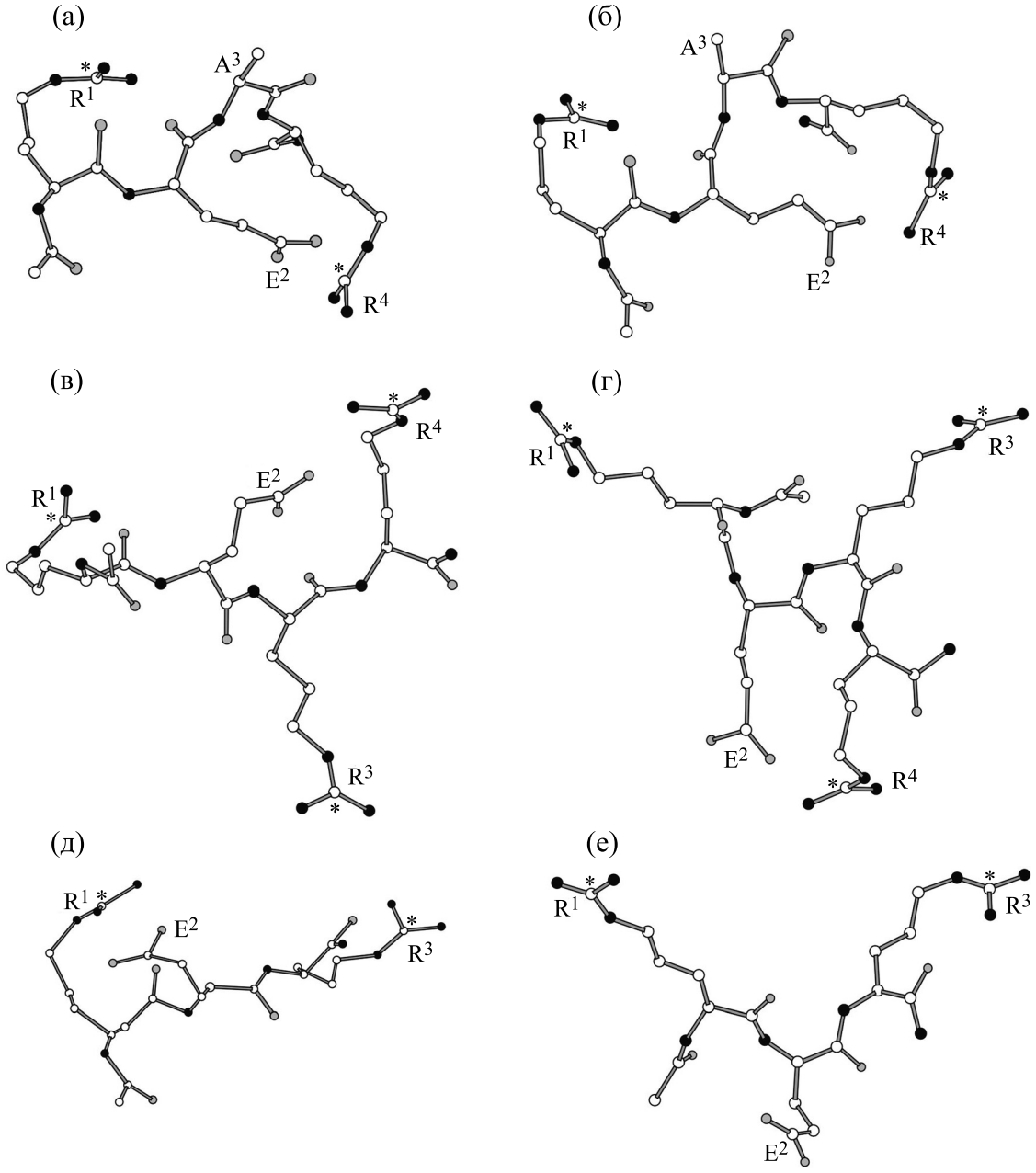


Рис. 4. Пространственное строение наиболее низкоэнергетических конформаций молекул Ac-REAR-NH_2, Ac-RERR-NH_2 и Ac-RER-NH_2: (а) – молекула Ac-REAR-NH_2, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты заряжена отрицательно; (б) – молекула Ac-REAR-NH_2, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты электронейтральна; (в) – молекула Ac-RERR-NH_2, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты заряжена отрицательно; (г) – молекула Ac-RERR-NH_2, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты электронейтральна; (д) – молекула Ac-RER-NH_2, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты заряжена отрицательно; (е) – молекула Ac-RER-NH_2, карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты электронейтральна. Белые кружки – атомы углерода, серые кружки – атомы кислорода, черные кружки – атомы азота. Приведена нумерация аминокислотных остатков. Атомы углерода гуанидиновых групп боковых цепей аргинильных остатков отмечены звездочками, атомы водорода не показаны.

Когда карбоксильная группа остатка глутаминовой кислоты была заряжена отрицательно, для молекулы Ac-RERR-NH_2 обнаружено 92 конформации (рис. 4в); когда данная группа не несла заряда – 183 конформации (рис. 4г). Средние значения расстояний между гуанидиновыми группами R^1–R^3, R^1–R^4 и R^3–R^4 в первом случае равны 12.2 ± 1.9, 11.8 ± 1.7 и 10.9 ± 1.6 Å соответственно,

тогда как во втором – 12.9 ± 1.5, 12.4 ± 1.3 и 12.2 ± 1.6 Å соответственно. При этом в выборках из 50 наиболее низкоэнергетических конформаций молекулы Ac-RERR-NH_2 все описанные расстояния оказываются больше 10 Å в 80% конформаций.

Для получения дополнительных данных о возможных величинах расстояний между гуанидиновыми группами в молекулах коротких пептидов, способных к лиганд-рецепторному связыванию с молекулой канала $Na_V1.8$, нами был также проведен конформационный анализ молекулы трипептида Ac-RER-NH_2. Обнаружено 226 конформаций указанной молекулы при заряженной форме боковой цепи глутаминовой кислоты (рис. 4д) и 340 конформаций, если данная группа считалась электронейтральной (рис. 4е). Средние величины расстояний R^1–R^3 оказались равными 10.1 ± 1.6 и 12.7 ± 1.7 Å соответственно. В 37 из 50 наиболее низких по энергии конформаций молекулы Ac-RER-NH_2 эти расстояния составляют меньше 10 Å, если карбоксильная группа заряжена отрицательно, тогда как в случае ее электронейтральной формы, наоборот, расстояния R^1–R^3 превышают 10 Å в 44 из 50 наиболее низкоэнергетических конформаций.

Депротонирование карбоксильной группы боковой цепи остатка глутаминовой кислоты приводит к заметному уменьшению общего числа конформаций молекул рассматриваемых коротких пептидов. Это можно объяснить образованием внутримолекулярных ион-ионных связей с участием данной отрицательно заряженной группы и одной из положительно заряженных гуанидиновых групп аргинильных остатков, что ограничивает конформационную свободу молекул пептидов. Если глутаминовая кислота является электронейтральной, подобные связи, очевидно, не образуются.

Замена одного из аргинильных остатков на остаток аланина при переходе от молекулы Ac-RERR-NH_2 к молекуле Ac-REAR-NH_2 вызывает уменьшение расстояния между гуанидиновыми группами во всех рассматриваемых формах данных молекул по двум причинам. Во-первых, молекула Ac-RERR-NH_2 содержит три положительно заряженных гуанидиновых группы, которые электростатически отталкиваются друг от друга. Во-вторых, присутствие остатка аланина вместо объемной боковой цепи аргинильного остатка R^3 позволяет гуанидиновой группе аргинильного остатка R^4 в молекуле Ac-REAR-NH_2 подходить на более близкое расстояние к карбоксильной группе боковой цепи глутаминовой кислоты E^2, чем это возможно в молекулах тетрапептида Ac-RERR-NH_2 и трипептида Ac-RER-NH_2.

В подавляющем большинстве низкоэнергетических конформаций молекулы Ac-REAR-NH_2 расстояния между гуанидиновыми группами составляют менее 10 Å, тогда как в аналогичных выборках конформаций молекулы Ac-RERR-NH_2 в обеих рассмотренных формах и молекулы Ac-RER-NH_2 в случае, когда карбоксильная группа боковой цепи глутаминовой кислоты считалась электронейтральной, указанные расстояния превышают 10 Å. Можно предположить, что тетрапептид Ac-REAR-NH_2 не оказывает модулирующего действия на натриевые каналы $Na_V1.8$ в силу того, что расстояние между гуанидиновыми группами, ответственными за образование ион-ионных связей между атакующей молекулой и аминокислотной последовательностью канала, меньше порогового значения, составляющего 10 Å. Также можно высказать предположение о том, что в момент образования лиганд-рецепторного комплекса между молекулами изучаемых коротких пептидов и молекулой канала $Na_V1.8$ карбоксильная группа боковой цепи остатка глутаминовой кислоты является незаряженной, поскольку, несмотря на однозначно проявляемый молекулой трипептида Ac-RER-NH_2 физиологический эффект, расстояния между гуанидиновыми группами в полностью ионизированной форме данной молекулы составляют менее 10 Å в большинстве ее низкоэнергетических конформаций за счет образования внутримолекулярных ион-ионных связей. Дополнительным аргументом в пользу последнего предположения является необходимость разрыва этих внутримолекулярных связей перед образованием межмолекулярных ионионных связей при формировании лиганд-рецепторного комплекса с участием тех же гуанидиновых групп, что не требуется, если карбоксильная группа глутаминовой кислоты является электронейтральной. Итак, в результате проведенных расчетов можно сделать вывод о том, что ключевыми структурами при лиганд-рецепторном связывании исследованных нами аргининсодержащих коротких пептидов являются гуанидиновые группы боковых цепей аргинильных остатков, расстояние между которыми должно быть не менее 10 Å.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основным результатом настоящей работы является обнаружение сильного влияния тетрапептида Ac-RERR-NH_2 на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов $Na_V1.8$. Это позволило предположить, что исследуемый агент в качестве своей специфической мишени имеет определенный сайт, являющийся фрагментом структуры канала $Na_V1.8$, связывание с которым

приводит к снижению переноса эффективного заряда активационной воротной системой указанного канала. Относительно низкая концентрация тетрапептида (100 нмоль/л), вызывающая снижение Z_{eff}, указывает на высокую специфичность его действия на канал, что подтверждается отсутствием ингибирующего влияния данного агента, исследованного в широкой области концентраций, на рост нейритов эмбриональной нервной ткани. Все это делает тетрапептид Ac-RERR-NH_2 весьма перспективным претендентом на роль анальгетической лекарственной субстанции. Ранее нами был обнаружен аналогичный эффект при изучении трипептида Ac-RER-NH_2 [32].

Известно, что ди- и трипептиды могут транспортироваться в клетку с помощью переносчиков Pept1 и Pept2. Pept1 отличается низкой субстратной специфичностью (способен транспортировать 400 различных дипептидов, 8000 трипептидов, лекарственные препараты, имитирующие структуру ди- и трипептидов, – антибиотики, противовирусные препараты) и низким сродством к субстратам [33, 34]. Транспортер Pept2 может использовать в качестве субстратов ди-, три- и тетрапептиды (предпочтительно дипептиды) [35, 36]. Ди- и трипептиды могут взаимодействовать непосредственно с ДНК живой клетки благодаря своим малым размерам [37, 38]. В отличие от этого, данные о механизмах прямой доставки тетрапептидов в ядро нервной клетки в литературе отсутствуют.

Увеличение последовательности атакующего пептида до четырех аминокислот посредством добавления еще одного аргинильного остатка вызвало сильное снижение величины Z_{eff} до 4.6 ± 0.3 ($n = 23$) при концентрации пептида 100 нмоль/л. Подчеркнем, что данная концентрация на порядок ниже, чем концентрация трипептида Ac-RER-NH_2, способная вызвать подобный эффект. Это свидетельствует о более высокой аффинности молекулы Ac-RERR-NH_2 по сравнению с молекулой Ac-RER-NH_2 к соответствующему сайту связывания, принадлежащему аминокислотной последовательности канала $Na_V1.8$.

Полученные результаты указывают на то, что, во-первых, эффективность узнавания атакующей молекулы может определяться ее общим положительным зарядом, поскольку при переходе от молекулы Ac-RER-NH_2 к молекуле Ac-RERR-NH_2 наблюдается снижение действующей концентрации агента. Во-вторых, добавление положительно заряженного аргинильного остатка приводит к уменьшению общего количества конформаций пептидной молекулы за счет электростатического отталкивания между тремя присутствующими в молекуле Ac-RERR-NH_2 гуанидиновыми группами, что ограничивает конформационную свободу указанной молекулы по сравнению с молекулами Ac-RER-NH_2 и Ac-REAR-NH_2. Видимо, это «помогает» атакующей пептидной молекуле принять продуктивную конформацию для формирования лиганд-рецепторного комплекса.

Основываясь на результатах проведенного конформационного анализа, можно предположить, что в образовании лиганд-рецепторного комплекса между молекулой тетрапептида Ac-RERR-NH_2 и молекулой канала $Na_V1.8$ задействованы аргинильные остатки R^1 и R^3, расстояние между гуанидиновыми группами которых в большинстве полученных конформаций указанного тетрапептида превышает пороговое значение, равное 10 Å. Молекула тетрапептида Ac-REAR-NH_2 оказывается неспособной к лиганд-рецепторному связыванию как минимум в силу того, что в большинстве низких по энергии конформаций данной молекулы расстояния между гуанидиновыми группами меньше этого порогового значения. Основной вклад в энергию образования лиганд-рецепторного комплекса, по всей видимости, вносят высокоэнергетические ионионные связи между положительно заряженными гуанидиновыми группами боковых цепей аргинильных остатков молекулы Ac-RERR-NH_2 и отрицательно заряженными нуклеофильными группами в составе молекулы канала $Na_V1.8$. Последний вывод может быть подкреплен тем фактом, что при замене всех аргинильных остатков в молекуле гексапептида Ac-PRERRA-NH_2 на остатки лизина сохранилась способность атакующей молекулы снижать величину Z_{eff} активационного воротного устройства медленного натриевого канала $Na_V1.8$ [13].

Итак, применение метода локальной фиксации потенциала и конформационного анализа для выяснения механизмов лиганд-рецепторного связывания изучаемых молекул с каналами $Na_V1.8$ позволило продемонстрировать, что удлинение аминокислотной последовательности аргининсодержащих коротких пептидов не должно с необходимостью приводить к увеличению расстояния между потенциально участвующими в лиганд-рецепторном связывании гуанидиновыми группами аргинильных остатков. Как показано в настоящей работе, при переходе от молекулы Ac-RER-NH_2 к молекуле Ac-REAR-NH_2 это рас-

стояние, наоборот, уменьшается, что объясняет неспособность связывания последнего агента с исследуемым каналом. Функционально активными оказываются пептиды, в молекулах которых указанное расстояние превышает 10 Å. Предположительно, оптимальным в соответствии с этим критерием является расстояние между гуанидиновыми группами аргинильных остатков R^1 и R^3 в молекуле Ac-RERR-NH_2, что делает данный тетрапептид перспективным претендентом на роль лекарственной субстанции нового анальгетика.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено в рамках реализации Программы НЦМУ и при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020 г.).

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. P. G. Kostyuk, N. S. Veselovsky, and A. Y. Tsyndrenko, Neuroscience **6**, 2423 (1981).
2. Н. С. Веселовский, П. Г. Костюк и А. Я. Цындренко, Докл. АН СССР **249** (60), 1466 (1979).
3. M. S. Gold, D. B. Reichling, M. J. Shuster, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 1108 (1996).
4. С. В. Ревенко и И. Ю. Гаврилов, Биол. мембраны **24** (1), 70 (2007).
5. L. V. Borovikova, D. V Borovikov, V. V. Ermishkin, et al., Prim. Sensory Neuron **2**, 65 (1997).
6. A. N. Akopian, L. Sivilotti, and J. N. Wood, Nature **379**, 257 (1996).
7. J. Lai, F. Porreca, J. C. Hunter, and M. S. Gold, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **44**, 371 (2004).
8. B. V. Krylov, I. V. Rogachevskii, T. N. Shelykh, et al., *Frontiers in pain science. Volume 1. New non-opioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantum-chemical studies* (Bentham Science Publishers Ltd, Sharjah UAE, 2017).
9. R. I. Lehrer and T. Ganz, Blood **76**, 2169 (1990).
10. В. Н. Кокряков, *Биология антибиотиков животного происхождения* (Наука, СПб., 1999).
11. В. Б. Плахова, И. В. Рогачевский, Б. Ф. Щеголев и др., Сенсорные системы **19** (2), 110 (2005).
12. В. Б. Плахова, Б. Ф. Щеголев, И. В. Рогачевский и др., Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова **86** (11), 1471 (2000).
13. В. Б. Плахова, И. В. Рогачевский, Т. Н. Шелых и др., Мед. акад. журн. **13** (3), 78 (2013).
14. В. Б. Плахова, И. В. Рогачевский, Т. Н. Шелых и др., Сенсорные системы **30** (3), 234 (2016).
15. A. A. Elliott and J. R. Elliott, J. Physiol. (Lond.) **463**, 39 (1993).
16. P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal, and V. I. Pidoplichko, Nature **257**, 691 (1975).
17. O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, et al., Pflügers Arch. **391**, 85 (1981).
18. Б. В. Крылов, Ю. Ю. Вилин, С. А. Подзорова и др., Сенсорные системы **10** (4), 52 (1996).
19. Y. V. Osipchuk and E. N. Timin in *Intracellular Perfusion of Excitable Cells*, Ed. by P. G. Kostyuk and O. A. Krishtal (J. Wiley & Sons, Inc., 1984), pp. 103–129.
20. В. Алмерс, *Мембраны: ионные каналы*, под ред. Ю. А. Чизмаджева (Мир, М., 1981), с. 129–236.
21. V. B. Plakhova, V. A. Penniyaynen, I. L. Yachnev, et al., Can. J. Physiol. Pharmacol. **97**, 400 (2019).
22. V. A. Penniyaynen, V. B. Plakhova, I. V. Rogachevsky, et al., Pathophysiology **26**, 245 (2019).
23. Z. Li and H. A. Scheraga, J. Mol. Struct. (THEOCHEM) **179**, 333 (1988).
24. B. S. Zhorov, J. Struct. Chem. **22**, 4 (1981).
25. B. S. Zhorov, J. Struct. Chem. **23**, 649 (1982).
26. B. S. Zhorov and V. S. Ananthanarayanan, J. Biomol. Struct. Dyn. **14**, 173 (1996).
27. B. S. Zhorov and S. X. Lin, Proteins **38,** 414 (2000).
28. http://www.zmmsoft.com
29. C. A. Fitch, G. Platzer, M. Okon, et al., Prot. Sci. **24**, 752 (2015).
30. S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, et al., J. Am. Chem. Soc. **106**, 765 (1984).
31. S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, and D. A. Case, J. Comput. Chem. **7**, 230 (1986).
32. Т. Н. Шелых, И. В. Рогачевский, А. Д. Ноздрачев и др., Докл. РАН **466** (6), 734 (2016).
33. B. Spanier and F. Rohm, Compr. Physiol. **8**, 843 (2018).
34. F. H. Mourad and N. E. Saadé, Prog. Neurobiol. **95**, 149 (2011).
35. X. Chen, R. F. Keep, Y. Liang, et al., Biochem. Pharmacol. **131**, 89 (2017).
36. Y. J. Fei, J. C. Liu, T. Fujita, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **246**, 39 (1998).
37. V. Khavinson, N. Linkova, E. Kukanova, et al., J. Neurol. Neurosci. **8**, 1 (2016)
38. N. Kolchina, V. Khavinson, N. Linkova, et al., Nucl. Acids Res. **47**, 10553 (2019).

A Possible Mechanism of Modulation of Slow Sodium Channels in the Sensory Neuron Membrane by Short Peptides

I.V. Rogachevsky, A.D. Kalinina, V.A. Penniyaynen, S.G. Terekhin, S.A. Podzorova, B.V. Krylov, and V.B. Plakhova

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

Possible mechanisms of ligand-receptor binding of arginine-containing tetrapeptides to the $Na_V1.8$ channels in the primary sensory neuron were investigated. The tetrapeptide Ac-RERR-NH_2, acting outside the neuronal membrane, was found to decrease voltage sensitivity of the channels examined. By contrast, the tetrapeptide Ac-REAR-NH_2 did not exhibit the same effect. Conformational analysis used to elucidate the mechanisms of ligand-receptor binding of a number of short peptides investigated herein suggested that positively charged guanidinium groups at the side chains of two arginine residues play a key role in peptide binding. Another amino acid residue (glutamic acid) should be present between these two arginine residues. Our calculations showed that the mechanism of ligand-receptor binding cannot come into effect, if the value of the distance between the guanidinium groups in short peptides molecules is less than a defined threshold value. From the results obtained it can be concluded that the tetrapeptide Ac-RERR-NH_2 and several other peptides capable to bind to the $Na_V1.8$ channel by the same molecular mechanism have the potential to be the medicinal substances of novel analgesics with peripheral targets.

Keywords: short peptides, NaV1.8 channels, nociceptive neuron, conformational analysis

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 696–703

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 614.485, 579.6

РАДИАЦИОННАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПРИМЕРЕ ВИРУСА ТРАНСМИССИВНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА СВИНЕЙ

© 2021 г. В.Н. Морозов*, А.Н. Мухин, М.А. Колыванова*, ***, А.В. Белоусов***, Ю.А. Бушманов***, Т.В. Гребенникова**, А.С. Самойлов*****

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

***Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18*

****Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182, Москва, ул. Живописная, 46*

E-mail: morozov.v.n@mail.ru

Поступила в редакцию 21.12.2020 г.
После доработки 25.01.2021 г.
Принята к публикации 26.01.2021 г.

В последние годы представители семейства *Coronaviridae* служили причиной вспышек респираторных заболеваний (MERS, SARS, COVID-19). При этом возможности радиационно-индуцированной инактивации данной группы вирусов мало изучены, хотя облучение может широко использоваться как в обработке средств индивидуальной защиты, так и при стерилизации вакцин. В настоящей работе воздействие пучков электронов с энергией 10 МэВ и тормозных фотонов с энергией 7.6 МэВ на возбудитель коронавирусной инфекции (вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней, TGEV) было исследовано *in vitro*. В заданных условиях эксперимента более эффективным оказалось облучение фотонами. Наиболее резистентной к облучению оказалась замороженная при –86°С вируссодержащая суспензия: доза облучения, необходимая для полной инактивации вируса, в этом случае составляла от 15 кГр, в то время как для жидкой суспензии и лиофилизированной формы стерилизующая доза составляла от 10 кГр. При меньших дозах облучения для всех образцов при пассировании в клеточной культуре наблюдалась остаточная инфекционная активность вируса. Обнаруженные различия в эффективности инактивации жидких и замороженных вируссодержащих проб свидетельствуют о значительном вкладе прямого действия излучения.

Ключевые слова: коронавирус, радиационная стерилизация, радиационная обработка, инактивация вирусов, трансмиссивный гастроэнтерит свиней, ионизирующее излучение.

DOI: 10.31857/S0006302921040086

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2 [1–3] продемонстрировала важность оперативной организации системы мероприятий по обеззараживанию бывших в употреблении средств индивидуальной защиты медицинского персонала. С одной стороны, это может способствовать повышению безопасности медицинских отходов, а с другой – предоставить возможность повторного использования некоторых видов средств индивидуальной защиты в случае их острой нехватки [4].

Подходы к стерилизации медицинских изделий от микробиологического загрязнения включают различные химические и физические методы [5]: использование дезинфицирующих средств, газовую стерилизацию, температурную и радиационную обработку. В последнем случае для уничтожения инфекционных агентов могут использоваться ультрафиолетовое (210–400 нм) и ионизирующие излучения (фотоны, электроны, дейтроны и др.). Если применение ультрафиолетового излучения из-за небольшой глубины проникновения в основном ограничивается обработкой поверхностей, то использование источников ионизирующего излучения (например, гамма-установок на основе Co-60 и Cs-137 или ускорителей электронов) предоставляет более широкие возможности.

Ионизирующие излучения нашли применение в радиационной обработке продуктов питания [6], дезинфекции лабораторных и медицинских изделий [7], трансплантатов [8], сте-

Сокращения: TGEV – вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней, ИФА – иммуноферментный анализ.

рилизации фармацевтических и лекарственных препаратов [9, 10], а также вакцин [11]. Радиационная обработка позволяет бороться с бактериями и эндоспорами, грибами, простейшими и вирусами [5]. Радиационная стерилизация является высокопроизводительным, неинвазивным и дешевым методом, не требующим расходных материалов, а существующие технологии позволяют обеспечивать безопасность процесса для персонала и окружающей среды.

Несмотря на то что возможность инактивации вирусов при воздействии ионизирующего излучения хорошо известна [12–16], эта область радиационной биологии представляется недостаточно изученной и несистематизированной. В настоящее время известно более 6500 различных видов вирусов, включенных в 168 семейств. Представители этих семейств различаются по структуре и организации капсида, наличию оболочки, а их геном может быть представлен различными формами нуклеиновых кислот и содержать от ≈2000 до ≈2 млн оснований [17, 18]. Различаются и данные об их радиочувствительности [14, 19].

Одним из семейств вирусов, радиационная устойчивость которых мало изучена, являются коронавирусы. Семейство *Coronaviridae* включает 4 рода (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* и *Deltacoronavirus*) [20], содержащие более 40 видов вирусов [21]. Вирионы коронавирусов имеют сферическую форму и покрыты липидной оболочкой с булавовидными пепломерами, состоящими из S-белка, а нуклеокапсид имеет спиральную форму симметрии и содержит одноцепочечную +РНК длиной около 30000 оснований. В инфекционных заболеваниях человека и животных основную роль играют представители родов *Alpha- и Betacoronavirus*, вызывающие поражения дыхательной и пищеварительной систем [20]. В последние годы представители семейства *Coronaviridae* служили причиной нескольких вспышек заболеваний: 2002–2003 гг. (severe acute respiratory syndrome, SARS), 2004 г. – н.в. (Middle East respiratory syndrome, MERS) и 2019 г. – н.в. (coronavirus disease 2019, COVID-19) [22]. При этом известно лишь несколько работ по радиационной инактивации коронавирусов. Так, показано, что *in vitro* инактивация вируса SARS-CoV достигается при дозах свыше 1 Мрад (≈10 кГр) [19], а для обеззараживания корма, контаминированного вирусом эпидемической диареи свиней (*PEDV*), потребовалось облучение в дозе ≈50 кГр [23]. Недавние исследования также были посвящены изучению радиационной инактивации вируса SARS-CoV-2 [24].

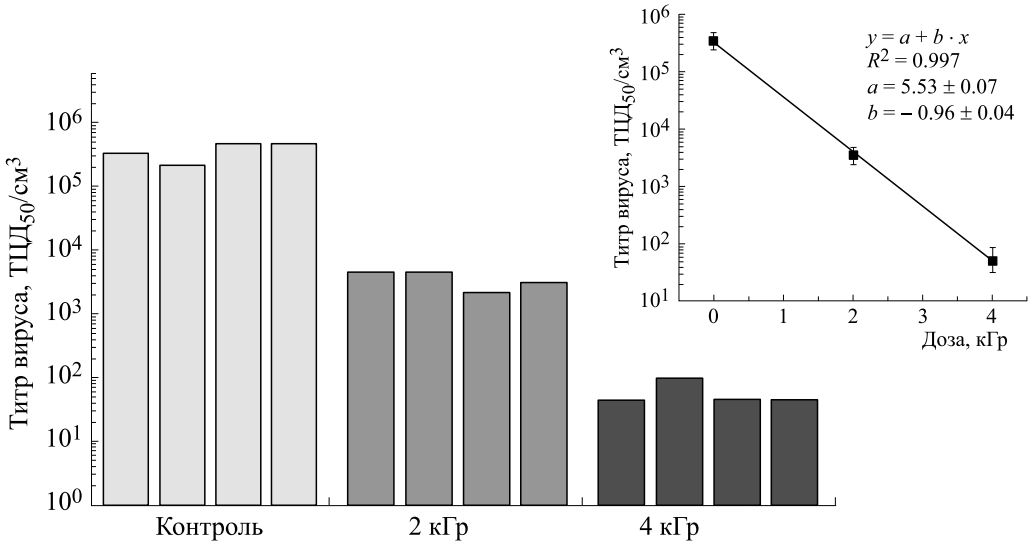
Цель настоящего исследования состояла в изучении возможности инактивации возбудителя коронавирусной инфекции с помощью пучков высокоэнергетичных электронов и тормозных фотонов на примере вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGEV) и исследовании влияния условий облучения на эффективность радиационной обработки. Данный вирус был выбран поскольку, с одной стороны, он является хорошо изученным представителем семейства *Coronaviridae*, а с другой – не представляет угрозы для человека и не требует специфических условий безопасности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использовали штамм TGEV PUR46-MAD (сем. *Coronaviridae,* род *Alphacoronavirus*; п\род *Tegacovirus*) из коллекции Мадридского университета (Department of Molecular and Cell Biology, CNB-CSIC, Испания). Вирус культивировали в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Культивирование проводили роллерным методом с использованием питательной среды DMEM (Sigma, США) с добавлением 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США). Титрование цитопатической активности вируса проводили микрометодом в клеточной культуре. Титр вируса рассчитывали методом Рида и Менча и выражали в $ТЦД_{50}/см^3$.

Жидкие и замороженные пробы готовили из вируссодержащей суспензии с инфекционной активностью $10^{5.66}$ $ТЦД_{50}/см^3$ на основе среды DMEM. Облучение проводили в герметичных полипропиленовых пробирках объемом 15 мл (Greiner Bio-One, Германия). Для приготовления лиофилизированных проб вирусосодержащую суспензию с инфекционной активностью $10^{7.33}$ $ТЦД_{50}/см^3$ смешивали со стабилизатором, расфасовывали по 1 $см^3$ в стеклянные флаконы объемом 3 $см^3$ (Schott, Германия) и подвергали сублимации на установке VirTis AdVantage Pro (SP Scientific, США). Титр TGEV в лиофилизированных пробах составлял $10^{6.66}$ $ТЦД_{50}/см^3$ при остаточной влажности 3%.

Облучение образцов проводили на промышленном линейном ускорителе электронов ИЛУ-14 производства Института ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (Новосибирск) [25]. Радиационную обработку проводили в режимах электронного и фотонного облучения в дозах до 25 кГр. Максимальная энергия частиц в спектре при электронном облучении составляла 10 МэВ, а при тормозном фотонном облучении – 7.6 МэВ. Мощность дозы излучения в обоих случаях составляла 1.0–1.2 кГр/мин. Облучение жидкой и лиофилизированной форм TGEV проводили при температуре 6–8°С, а замороженных проб – в сухом льду при температуре –86°С. Для каждой дозы облучения готовили по четыре независимых



Дозовая зависимость цитопатической активности TGEV в жидкой суспензии при облучении тормозными фотонами. На врезке: дозовая кривая инактивации TGEV (погрешности – стандартные отклонения по четырем независимым измерениям).

образца. Контроль дозы при фотонном и электронном облучении осуществляли с помощью дозиметрических пленок СО ПД(Ф)Р-5/50 (ВНИИФТРИ, Россия). Измерение оптической плотности облученных пленок проводили на длине волны 512 нм с помощью спектрофотометра Specord M40 (Analytik Jena, Германия). Ошибка в определении поглощенной дозы составляла не более 20%.

Через 1–2 ч после радиационной обработки образцов проводили оценку эффективности инактивации TGEV путем титрования цитопатической активности вируса в культуре клеток почки эмбриона свиньи с подтверждением наличия антигенов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Предел чувствительности ИФА составлял 10^2 $ТЦД_{50}/см^3$. В качестве контроля использовали не подвергавшиеся облучению образцы. Для выявления остаточной цитопатической активности вируса для каждой облученной пробы проводили три последовательных пассажа в культуре с интервалом в 96 ч. Наличие антигенов определяли с помощью соответствующего набора производства ООО «Ветбиохим» (Россия) согласно рекомендациям изготовителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены результаты исследования цитопатической активности TGEV, облученного тормозными фотонами в жидкой суспензии. Дозовая кривая инактивации (врезка на рисунке) в логарифмических координатах имела выраженный линейный характер и удовлетворяла установленному для TGEV значению $D_{10} < 2$ кГр [26]. Начальная цитопатическая активность вируса в суспензии составляла $\approx 10^{5.66}$ $ТЦД_{50}/см^3$. После радиационной обработки образцов наблюдалось заметное уменьшение цитопатической активности: уже при дозе облучения 2 кГр титр вируса снизился в ≈100 раз, а при дозе 4 кГр – более чем в 6000 раз. При этом в трех из четырех образцов после облучения в дозе 4 кГр при сохранении цитопатической активности вируса выявить вирусные антигены с помощью ИФА в пределах чувствительности метода не удалось. При дозах свыше 4 кГр цитопатической активности вируса и вирусных антигенов непосредственно после облучения обнаружено не было.

Результаты исследования инфекционной активности TGEV в трех последовательных пассажах после облучения тормозными фотонами представлены в табл. 1. Восстановление исходного уровня цитопатической активности при дозах облучения 2 кГр и 4 кГр наблюдалось на первом и втором пассажах соответственно. Также непосредственно после экспозиции в дозе 6 кГр в образцах жидкой вируссодержащей суспензии не было зарегистрировано инфекционной активности вируса и вирусных антигенов. При этом начиная со второго пассажа отмечались наличие антигенов вируса в культуре и достаточно высокий уровень цитопатического действия. Полное восстановление инфекционной активности вируса при дозе облучения 6 кГр наблюдалось после третьего пассажа. Таким образом, данная дозовая нагрузка недостаточна для эффективной инактивации TGEV в заданных условиях эксперимента.

Таблица 1. Инфекционная активность TGEV в жидкой суспензии после облучения тормозными фотонами

Доза, кГр	После облучения		Первый пассаж		Второй пассаж		Третий пассаж	
	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА
0	$10^{5.5}$	+	Не исследовали					
	$10^{5.33}$	+						
	$10^{5.66}$	+						
	$10^{5.66}$	+						
2	$10^{3.66}$	+	$10^{5.33}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.33}$	+
	$10^{3.66}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.66}$	+
	$10^{3.33}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.66}$	+
	$10^{3.5}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.33}$	+	$10^{5.66}$	+
4	$10^{1.66}$	–	$10^{4.66}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.66}$	+
	10^{2}	+	$10^{4.66}$	+	$10^{5.33}$	+	$10^{5.5}$	+
	$10^{1.66}$	–	$10^{4.5}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.33}$	+
	$10^{1.66}$	–	$10^{5.0}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+
6	н/о	–	н/о	–	$10^{4.66}$	+	$10^{5.5}$	+
	н/о	–	н/о	–	$10^{4.66}$	+	$10^{5.66}$	+
	н/о	–	н/о	–	$10^{4.5}$	+	$10^{5.66}$	+
	н/о	–	н/о	–	$10^{4.0}$	+	$10^{5.5}$	+
8	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–

Примечание. Здесь и далее: н/о – цитопатическое действие вируса не обнаружено; «+» и «–» – наличие/отсутствие в культуре клеток антигенов вируса.

Полное подавление инфекционной активности наблюдалось только при дозах облучения от 8 кГр.

Эффективность радиационной обработки образцов, контаминированных вирусными частицами, может отличаться в зависимости от вида ионизирующего излучения. Так, в работе [14] более высокая эффективность γ-излучения Co-60 (≈1.37 МэВ; до ≈2.6 раз при D_{37}) по сравнению с облучением электронами (10 МэВ) была показана на примере вируса простого герпеса (HSV) и вируса лейкоза Раушера (RLV). Феномен различной биологической эффективности ионизирующих излучений хорошо известен, однако для фотонов и электронов значения относительной биологической эффективности зачастую принимаются равными единице. При этом существуют технологические различия промышленного фотонного и электронного облучения, особенно значимые при масштабной стерилизации на конвейерной линии. Так, фотоны характеризуются более высокой точностью дозового покрытия, а высокие дозы электронного облучения могут приводить к нагреву образцов.

В настоящей работе также проведено сравнение эффективности инактивации TGEV фотонами и электронами в жидкой суспензии. Как видно из табл. 1 и 2, падение титра вируса на три-четыре порядка наблюдалось при близких дозах фотонного и электронного облучения – 4 и 5 кГр соответственно. Если при облучении образцов жидкой вируссодержащей суспензии электронами в дозе 7 кГр остаточная инфекционная активность проявлялась уже при первом пассаже, то при дозах облучения от 10 кГр инфекционной ак-

Таблица 2. Инфекционная активность TGEV в жидкой суспензии после облучения электронами

Доза, кГр	После облучения		Первый пассаж		Второй пассаж		Третий пассаж	
	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА
0	$10^{5.5}$	+	Не исследовали					
	$10^{5.33}$	+						
	$10^{5.66}$	+						
	$10^{5.66}$	+						
5	10^{2}	+	$10^{5.33}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.33}$	+
	10^{2}	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.5}$	+
	10^{2}	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.66}$	+
	10^{2}	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.66}$	+
7	н/о	–	$10^{4.66}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+
	н/о	–	$10^{4.5}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.66}$	+
	н/о	–	$10^{5.0}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.33}$	+
	н/о	–	$10^{4.5}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+
10	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–

тивности вируса и вирусных антигенов при пассировании в культуре клеток не обнаружено.

Для приближения к практическим условиям радиационной обработки были проведены облучения электронами лиофилизированной формы TGEV и замороженной в сухом льду (–86°C) вируссодержащей суспензии. Результаты представлены в табл. 3 и 4. В обоих случаях непосредственно после облучения в дозе 5 кГр наблюдалась инфекционная активность вируса, однако ее уровень в случае облучения лиофилизированной формы был значительно ниже. Также для лиофилизированной формы TGEV отмечено более существенное уменьшение титра вируса (на ≈6 порядков), учитывая более высокий титр вируса в образцах до облучения. Полная инактивация лиофилизированной формы TGEV, так же как и вирусных частиц в жидкой суспензии, обнаружена при дозах облучения от 10 кГр. Для замороженных проб при данной дозе облучения со второго пассажа наблюдалась остаточная цитопатическая активность вируса и присутствие в культуре клеток вирусных антигенов. Полная инактивация TGEV в замороженной суспензии отмечалась лишь при увеличении дозы электронного облучения до 15 кГр. При облучении замороженных проб фотонами инактивация вируса была отмечена при дозе 11 кГр (данные не приведены). Таким образом, в заданных условиях эксперимента облучение фотонами как жидких, так и замороженных вируссодержащих проб оказалось более эффективным.

Данные наблюдения имеют важное значение для понимания механизмов радиационной инактивации вирусов. Радиационно-индуцированные повреждения в биологических системах реализу-

Таблица 3. Инфекционная активность TGEV в лиофилизированной форме после облучения электронами

Доза, кГр	После облучения		Первый пассаж		Второй пассаж		Третий пассаж	
	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА
0	$10^{6.5}$	+	Не исследовали					
	$10^{6.76}$	+						
	$10^{6.66}$	+						
	$10^{6.66}$	+						
5	$10^{0.66}$	–	$10^{4.33}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+
	10^{1}	–	$10^{4.5}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.33}$	+
	$10^{0.66}$	–	$10^{5.0}$	+	$10^{5.33}$	+	$10^{5.5}$	+
	$10^{0.66}$	–	$10^{5.0}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{5.5}$	+
10	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–

Таблица 4. Инфекционная активность TGEV в замороженной суспензии после облучения электронами

Доза, кГр	После облучения		Первый пассаж		Второй пассаж		Третий пассаж	
	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА	Титр вируса, $ТЦД_{50}/см^3$	ИФА
0	$10^{5.5}$	+	Не исследовали					
	$10^{5.33}$	+						
	$10^{5.66}$	+						
	$10^{5.66}$	+						
5	$10^{3.66}$	+	$10^{5.33}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.33}$	+
	$10^{3.5}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.33}$	+
	$10^{3.66}$	+	$10^{5.5}$	+	$10^{5.33}$	+	$10^{5.5}$	+
	$10^{3.66}$	+	$10^{5.66}$	+	$10^{3.66}$	+	$10^{5.5}$	+
10	н/о	–	н/о	–	$10^{3.66}$	+	$10^{5.33}$	+
	н/о	–	н/о	–	$10^{4.0}$	+	$10^{5.66}$	+
	н/о	–	н/о	–	$10^{4.66}$	+	$10^{5.66}$	+
	н/о	–	н/о	–	$10^{3.66}$	+	$10^{5.33}$	+
15	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–
	н/о	–	н/о	–	н/о	–	н/о	–

ются за счет прямого и косвенного действия излучения, т.е. в результате непосредственной ионизации биомакромолекул или их повреждения продуктами радиолиза среды [27]. В биологических системах доминирует вклад именно опосредованных повреждений (до 80–90%) [28]. При этом прямое и косвенное действия ионизирующего излучения могут быть направлены на различные структурные компоненты вирусных частиц [29]. В отсутствие повреждающего действия продуктов радиолиза, например при облучении биомолекул в безводных системах, для их инактивации требуются дозы на порядки большие, чем в присутствии растворителя [30, 31]. В некотором приближении окислительные частицы, образующиеся при радиолизе в достаточно жестком льду (при достаточно низких температурах), можно считать неподвижными, поэтому в замороженных при –86°C образцах вируссодержащей суспензии вероятность радиационного поражения по косвенному механизму значительно уменьшается. Отмеченное в настоящей работе снижение эффективности радиационного воздействия хорошо согласуется с данными работ [32] (вирусы Ласса, Марбург и Эбола) и [33] (парвовирус свиней (PPV), вирус диареи крупного рогатого скота (BVDV), энтеровирус свиней (PEV)): непосредственно после облучения в дозе 5 кГр титр вируса в жидкой суспензии был в ~40 раз меньше, чем в замороженной форме, а доза, необходимая для полной инактивации вируса, повышалась при замораживании с 10 до 15 кГр. Такое уменьшение эффективности облучения до примерно полутора раз позволяет сделать предположение о значительном вкладе прямых повреждений в радиационно-индуцированную инактивацию TGEV. Важно отметить, что замораживание образцов не исключает возможности возникновения повреждений за счет действия гидратированных электронов. Также в пользу высказанного предположения могут выступать близкие значения доз облучения, необходимых для полной инактивации TGEV в жидкой суспензии и в лиофилизированной форме.

Установленные в настоящей работе дозы инактивации TGEV хорошо согласуются с данными о радиочувствительности коронавирусов MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 [19,24,34]. Поскольку контаминация средств индивидуальной защиты может быть существенно меньшей [35], чем исследуемые в настоящей работе количества инфекционных вирусных частиц, высокая эффективность их радиационной обработки может быть достигнута при значительно меньших дозовых нагрузках. Однако все же важно отметить, что используемые в клинической практике полимерные материалы могут быть весьма чувствительными к воздействию высоких доз облучения [36]. С этим связана возможность значительных изменений защитных свойств обрабатываемой ионизирующим излучением медицинской экипировки [37]. Поскольку характеристики установок для радиационной стерилизации могут существенно различаться, детальное воспроизведение условий конкретного опыта может быть затруднительным. Поэтому решение о включении радиационной обработки в протокол дезинфекции необходимо принимать индивидуально для каждого изделия на основе тщательного подбора условий облучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.И. Фельдману за помощь в обсуждении результатов исследования и Ю.В. Морозову за помощь в подготовке стенда для радиационного облучения.

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. Y. R. Guo, Q. D. Cao, Z. S. Hong, et al., Mil. Med. Res. **7** (1), 11 (2020).
2. Y. F. Tu, C. S. Chien, A. A. Yarmishyn, et al., Int. J. Mol. Sci. **21** (7), 2657 (2020).
3. B. Hu, H. Guo, P. Zhou, and Z. L. Shi, Nat. Rev. Microbiol. *In press*.
4. A. J. Jinia, N. B. Sunbul, C. A. Meert, et al., IEEE Access. **8**, 111347 (2020).
5. Z. Dai, J. Ronholm, Y. Tian, et al., J. Tissue Eng. **7**, 2041731416648810 (2016).
6. I. S. Arvanitoyannis, A. C. Stratakos, and P. Tsarouhas, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **49** (5), 427 (2009).
7. A. J. Berejka and I. M. Kaluska, in *Trends in radiation sterilization of health care production* (International Atomic Energy Agency, Vienna, 2008), pp. 159–174.
8. R. Singh, D. Singh, and A. Singh, World J. Radiol. **8** (4), 355 (2016).
9. B. Marciniec and K. Dettlaff, in *Trends in radiation sterilization of health care production* (International Atomic Energy Agency, Vienna, 2008), pp. 187–230.
10. F. Hasanain, K. Guenther, W. M. Mullett, and E. Craven, PDA J. Pharm. Sci. Technol. **68** (2), 113 (2014).
11. H. S. Seo, Clin. Exp. Vaccine Res. **4** (2), 145 (2015).
12. R. Sullivan, A. C. Fassolitis, E. P. Larkin, et al., Appl. Microbiol. **22** (1), 61 (1971).
13. H. Hiemstra, M. Tersmette, A. H. Vos, et al., Transfusion **31** (1), 32 (1991).

14. E. E. Smolko and J. H. Lombardo, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. **236** (1–4), 249 (2005).
15. K. Feng, E. Divers, Y. Ma, and J. Li, Appl. Environ. Microbiol. **77** (10), 3507 (2011).
16. A. J. Hume, J. Ames, L. J. Rennick, et al., Viruses **8** (7), 204 (2016).
17. B. V. V. Prasad and M. F. Schmid, Adv. Exp. Med. Biol. **726**, 17 (2012).
18. J. Cui, T. E. Schlub, and E. C. Holmes, J. Virol. **88** (11), 6403 (2014).
19. F. Feldmann, W. L. Shupert, E. Haddock, et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. **100** (5), 1275 (2019).
20. J. Cui, F. Li, and Z. L. Shi, Nat. Rev. Microbiol. **17** (3), 181 (2019).
21. A. E. Gorbalenya, S. C. Baker, R. S. Baric, et al., Nat. Microbiol. **5**, 536 (2020).
22. Z. Zhu, X. Lian, X. Su, et al., Respir. Res. **21** (1), 224 (2020).
23. M. P. Trudeau, H. Verma, F. Sampedro, et al., PLoS One **11** (6), e0158128 (2016).
24. A. Leung, K. Tran, J. Audet, et al., Appl. Biosafety **25** (3), 157 (2020).
25. A. A. Bryazgin, V. I. Bezuglov, E. N. Kokin, et al., Instrum. Exp. Tech. **54** (3). 295 (2011).
26. F. C. Thomas, A. G. Davies, G. C. Dulac, et al., Can. J. Comp. Med. **45** (4), 397 (1981).
27. Y. B. Kudryashov, *Radiation biophysics (ionizing radiations)* (Nova Science Publishers, N. York, 2008).
28. Y. N. Korystov, Radiat. Res. **129** (2), 228 (1992).
29. R. L. Ward, Radiat. Res. **83** (2), 330 (1980).
30. Ø. Oksmo and T. Brustad, Z. Naturforsch B. **23** (7), 962 (1968).
31. H. Dertinger and H. Jung, *Molecular Radiation Biology* (Springer-Verlag, New York, 1973).
32. L. H. Elliott, J. B. McCormick, and K. M. Johnson, J. Clin. Microbiol. **16** (4), 704 (1982).
33. T. Preuss, S. Kamstrup, N. C. Kyvsgaard, et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. **4** (5), 504 (1997).
34. M. Kumar, S. Mazur, B. L. Ork, et al., J. Virol. Methods. **223**, 13 (2015).
35. J. Jung, J. Y. Kim, S. Bae, et al., J. Infect. **81** (2), e165 (2020).
36. C. R. Harrell, V. Djonov, C. Fellabaum, and V. Volarevic, Int. J. Med. Sci. **15** (3), 274 (2018).
37. T. H. Lin, C. C. Tseng, Y. L. Huang, et al., Aerosol Air Qual. Res. **20**, 833 (2020).

Radiation Inactivation of Coronavirus Infection Pathogen by the Example of Transmissible Gastroenteritis Virus

V.N. Morozov*, A.N. Mukhin, M.A. Kolyvanova*, ***, A.V. Belousov***, Y.A. Bushmanov***, T.V. Grebennikova**, and A.S. Samoylov*****

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

***Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia*

****Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123182 Russia*

In recent years, the members of the *Coronaviridae* family were responsible for outbreaks of respiratory diseases (MERS, SARS, COVID-19). Although, radiation technology can be widely used to sterilize personal protective equipment and vaccines, the possibilities of radiation-induced inactivation of this group of viruses have been little studied. In the present work, the effect of 10 MeV electron and 7.6 MeV bremsstrahlung photon beams on the coronavirus infection pathogen (transmissible gastroenteritis virus) was studied in vitro. Under given experimental conditions, photon irradiation was found more effective. The virus suspension frozen at −86°C was the most radioresistant: in this case the irradiation dose required for complete inactivation of transmissible gastroenteritis virus started at 15 kGy, while for the liquid suspension and the lyophilized form, sterilizing doses started at 10 kGy. At lower doses in all the samples the residual infectious activity of the virus was found during passaging in cell culture. The observed differences in the efficiency of virus inactivation in liquid and frozen virus-containing samples indicate a significant contribution of the direct effect of irradiation.

Keywords: coronavirus, radiation sterilization, radiation processing, virus inactivation, transmissible gastroenteritis virus, ionizing radiation

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 704–710

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.352.4

РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ И ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛАКТАТА

© 2021 г. Т.Г. Дубовская*, С.В. Гриневич, С.В. Федорович*, ****

**Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь*

***Биологический факультет Белорусского государственного университета, 220030, Минск, ул. Курчатова, 10, Беларусь*

E-mail: sergeifedorovich@yahoo.co.uk; fedorovich@bsu.by

Поступила в редакцию 07.12.2020 г.
После доработки 03.03.2021 г.
Принята к публикации 10.03.2021 г.

Различные метаболиты способны модулировать функционирование пресинаптических окончаний нейронов. Мы изучили влияние лактата и агониста его рецептора HCAR1 3,5-дигидроксибензойной кислоты на цикл синаптических везикул и образование активных форм кислорода в синаптосомах мозга крыс. Лактат в концентрации 4 мМ, в отличие от пирувата, фактически не влияет на цикл синаптических везикул. С помощью флуоресцентного зонда акридинового оранжевого продемонстрировано, что 3,5-дигидроксибензоевая кислота в концентрации 500 мкМ активирует эндоцитоз. Эта стимуляция позволяет скомпенсировать его потенциальное ингибирование. Лактат, но не 3,5-дигидроксибензоевая кислота вызывает увеличение флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцина диацетата, свидетельствующее об образовании активных форм кислорода. С помощью флуоресцентного зонда митосокс мы также показали образование супероксид-аниона в митохондриях при действии лактата. Таким образом, лактат способен влиять на работу пресинаптических окончаний нейронов за счет стимуляции образования активных форм кислорода и активации эндоцитоза, опосредованной рецептором лактата HCAR1.

Ключевые слова: синаптосомы, лактат, синаптические везикулы, эндоцитоз, активные формы кислорода, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0006302921040098

Глюкоза является основным, но не единственным энергетическим субстратом для нейронов. Показано, что нейрональные митохондрии также способны усваивать кетоновые тела, пируват, лактат [1–4]. Все эти вещества химически относятся к монокарбоксилатам. Более того, согласно концепции астроцит-нейронального лактатного челнока лактат как минимум в некоторых случаях является основным энергетическим субстратом [5, 6]. Согласно этой гипотезе, глюкоза преимущественно перерабатывается в лактат в астроцитах, молочная кислота в свою очередь транспортируется в нейроны. Синаптические митохондрии по своим свойствам достаточно сильно отличаются от митохондрий из тела нейронов, но в то же время они также могут использовать монокарбоксилаты в качестве источника энергии для поддержания синаптической трансмиссии [7, 8].

В то же время физиологическая роль молочной кислоты не исчерпывается участием в метаболизме. К настоящему времени накоплено довольно много доказательств, что лактат является также сигнальной молекулой [6]. Для нее идентифицирован рецептор гидроксикарбоксиловой кислоты 1 (HCAR1), связанный с G-белком [6], который экспрессируется в том числе и на плазматической мембране нейронов [6, 9].

Нервный импульс переходит от нейрона к нейрону с помощью особых веществ – нейромедиаторов. Нейромедиаторы хранятся в синаптических везикулах. При увеличении цитозольной концентрации кальция в пресинаптическом окончании происходит экзоцитоз, слияние мембран синаптических везикул и плазматической мембраны. Для того чтобы подготовиться к экзоцитозу, синаптическая везикула должна пройти эндоцитоз, докинг, прайминг [10]. Стадия докин-

Сокращения: HCAR1 – рецептор гидроксикарбоксиловой кислоты 1, ДГБК – 3,5-дигидроксибензойная кислота, АФК – активные формы кислорода, DCFDA – 2',7'-дихлорофлуоресцина диацетат.

га включает в себя образование физического контакта между мембранами синаптической везикулы и плазматической мембраны. Но для дальнейшего слияния еще должен пройти этап АТФ-зависимого прайминга, вероятно, заключающийся в разборке белковых комплексов [10]. Многие стадии цикла синаптических везикул являются энергозависимыми процессами [10, 11].

Ранее было показано, что негликолитические энергетические субстраты способны быть источником энергии для поддержания цикла синаптических везикул [3, 12]. В то же время замена глюкозы на пируват или кетоновые тела в инкубационной среде ингибирует эндоцитоз в синаптосомах мозга крыс [3].

Для пирувата рецепторы не известны, для кетоновых тел рецепторы находятся в микроглиальных клетках и их, скорее всего, в отличие от рецепторов для лактата, нет в нейронах [13, 14]. Поэтому в данной работе мы изучили действие лактата и агониста его рецептора 3,5-дигидроксибензойной кислоты (ДГБК) на цикл синаптических везикул. Также мы проверили, что лактат, как и пируват, способен поддерживать потенциал плазматической мембраны синаптосом [1, 3].

Недавно было показано, что сигнальная функция лактата может опосредоваться увеличением образования активных форм кислорода (АФК) [15]. Показано, что пируват ведет к образованию пероксида водорода во внутрисинаптосомальных митохондриях [16]. Поэтому мы изучили образование активных форм кислорода (АФК) в синаптосомах при действии лактата.

В качестве объекта исследования были использованы синаптосомы, изолированные пресинаптические окончания нейронов. Они сохраняют основные свойства интактных нервных терминалей, способны к экзоцитозу и эндоцитозу [3, 17]. Синаптосомы также содержат митохондрии, которые способны метаболизировать как глюкозу, так и негликолитические энергетические субстраты [3, 17].

Экзоцитоз и эндоцитоз изучали с помощью флуоресцентного зонда акридинового оранжевого [18], потенциал плазматической мембраны – с помощью зонда DiSC3(5) [19], митохондриальный потенциал – с помощью флуоресцентного зонда JC-1 [20], образование АФК – с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлорофлуоресцина диацетата (DCFDA) [21], образование супероксидного анион-радикала в митохондриях – с помощью флуоресцентного зонда митосокса [22].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы реактивы: 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота (HEPES) (Merck, Германия), DCFDA, 3,3'-дипропилтиадикарбоцианин (DiSC3(5), 3,5-дигидроксибензойная кислота, пируват натрия, лактат натрия, кетоглутарат натрия, хлорид дифенилйодиния (Sigma, США), 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1'3,3'-тетраэтилбензимидазоло-карбоцианин йодид (JC-1), акридиновый оранжевый (Serva, Германия), митосокс (ThermoFisher Scientific, США) Все остальные реактивы – квалификации не ниже «ос.ч.».

Выделение синаптосом. Синаптосомы изолировали из полушарий мозга крыс по методу Хайоша [23]. Полученный осадок суспендировали в среде А следующего ионного состава (в мМ): NaCl – 132, KCl – 5, $MgCl_2$ – 1.3, NaH_2PO_4 – 1.2, глюкоза – 10, HEPES – 10, pH 7.4. Суспензию синаптосом (10–20 мг/мл белка) преинкубировали 10 мин при 37°C, после чего помещали на лед и использовали в эксперименте в течение 3 ч. В экспериментах с использованием различных энергетических субстратов и изучением мембранного потенциала или цикла синаптических везикул глюкозу замещали 4 мМ пирувата или 4 мМ лактата. Также в экспериментах по изучению образования АФК или митохондриального потенциала эти вещества дополнительно вносили к уже имеющейся в инкубационной среде глюкозе (10 мМ). Их растворяли в инкубационной среде А и вносили в объеме 20 мкл. При регистрации флуоресценции в инкубационную среду добавляли 2 мМ $CaCl_2$.

Определение потенциала плазматической мембраны. Потенциал плазматической мембраны синаптосом определяли с помощью флуоресцентного зонда DiSC3(5) по Waseem and Fedorovich [19] с некоторыми модификациями [24]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{возб}$ = 640 нм, $\lambda_{рег}$ = 688 нм и постоянном перемешивании. После выделения синаптосомы преинкубировали в среде А с соответствующими энергетическими субстратами 30 мин при 37°C. К 1.8 мл инкубационной среды А добавляли 200 мкл суспензии синаптосом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл), после чего в кювету вносили 1 мкМ DiSC3(5). Через одну минуту добавляли 150 мМ KCl. В контрольном эксперименте добавляли 150 мМ NaCl. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Регистрация экзоцитоза и эндоцитоза. Экзоцитоз и эндоцитоз определяли с помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый по Zoccarato et al. [18] с некоторыми модификациями [24]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{возб}$ = 494 нм, $\lambda_{рег}$ = 529 нм и постоянном перемешивании. По-

сле выделения синаптосомы преинкубировали в среде с лактатом или агонистом лактатного рецептора 30 мин при 37°C. К 1,8 мл среды А с 2 мМ $CaCl_2$ добавляли 200 мкл синаптосом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл), после чего в кювету вносили 5 мкМ акридинового оранжевого. Через 10 мин, необходимых для уравновешивания зонда между синаптосомами и инкубационной средой, в кювету добавляли 60 мМ KCl или в качестве контроля делали аналогичную добавку NaCl. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Определение образования АФК. Образование АФК определяли с помощью флуоресцентного зонда DCFDA по LeBel and Bondy [21] с некоторыми модификациями [25]. После дополнительной однократной отмывки в десятикратном объеме стандартной инкубационной среды А осадок синаптосом суспендировали в этой же среде. К суспензии (10–15 мг/мл белка) добавляли зонд DCFDA до конечной концентрации 25 мкМ и 20% (вес/объем) Pluronic F-127/DMSO (конечная концентрация детергента не превышала 0.05%). Инкубировали 60 мин при 30°C. Загруженные синаптосомы однократно отмывали в десятикратном объеме среды А. Осадок суспендировали в 2.0–2.5 мл среды А.

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) при постоянном помешивании в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{возб/рег}$ = 501/525 нм.

К 1.8 мл среды А добавляли 200 мкл суспензии синаптосом до конечной концентрации белка 1 мг/мл. Через 50 с в кювету вносили соответствующий энергетический субстрат. В контрольном эксперименте в кювету добавляли аналогичное количество растворителя. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную кривую.

Определение образования супероксид-аниона во внутрисинаптосомальных митохондриях. Образование супероксид-аниона во внутрисинаптосомальных митохондриях определялось с помощью флуоресцентного зонда митосокса [22]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{возб}$ = 510 нм, $\lambda_{рег}$ = 580 нм и постоянном перемешивании. После выделения синаптосомы инкубировали в среде А 10 мин при 37°C в присутствии 5 мкМ зонда. Избыток экстраклеточного зонда удаляли центрифугированием, а осадок суспендировали в соответствующей инкубационной среде. Далее к 1.8 мл среды А в кювете добавляли 200 мкл синаптосом, предварительно загруженных зондом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл). Через одну минуту добавляли энергетические субстраты. В контрольном эксперименте добавляли аналогичное количество инкубационной среды. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Определение мембранного потенциала митохондрий. Мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi$) определялся с помощью флуоресцентного зонда JC-1 по Chinopoulos et al. [20] с небольшими модификациями [26]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{возб}$ = 490 нм, $\lambda_{рег}$ = = 595 нм и постоянном перемешивании. После выделения синаптосомы (концентрация белка 5 мг/мл) инкубировали в среде А 15 мин при 37°C в присутствии 10 мкг/мл зонда. Избыток экстраклеточного зонда удаляли центрифугированием, а осадок суспендировали в инкубационной среде. Далее к 1.8 мл среды А в кювете добавляли 200 мкл синаптосом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл). Через 50 с добавляли энергетические субстраты. В контрольном эксперименте добавляли аналогичное количество инкубационной среды. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Белок определяли с помощью метода Лоури [27] с использованием бычьего сывороточного альбумина как стандарта. Результаты представляли в виде среднего арифметического индивидуальных измерений и стандартной ошибки среднего арифметического. Для анализа данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с посттестом Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы показали, что лактат может использоваться синаптосомами для поддержания потенциала плазматической мембраны (рис. 1). В то же время мы обнаружили небольшую, но достоверную деполяризацию в экспериментах, где синаптосомы использовали только лактат в качестве источника энергии (рис. 1). Сходный эффект мы в свое время наблюдали и при использовании пирувата [3]. Потенциал плазматической мембраны не изменялся в экспериментах, в которых лактат добавляли к глюкозосодержащей инкубационной среде. Это говорит о том, что рецептор лактата не вносит вклад в деполяризацию пресинаптического окончания. Недавно было показано, что лактат может регулировать возбудимость нейронов как минимум в некоторых областях головного мозга [6, 28]. В то же время наши данные показывают, что подобная регуляция, опосредованная рецепторами молочной кислоты, не распространяется на пресинаптические окончания (рис. 1).

Далее мы изучили действие лактата на цикл синаптических везикул в синаптосомах. Ранее мы

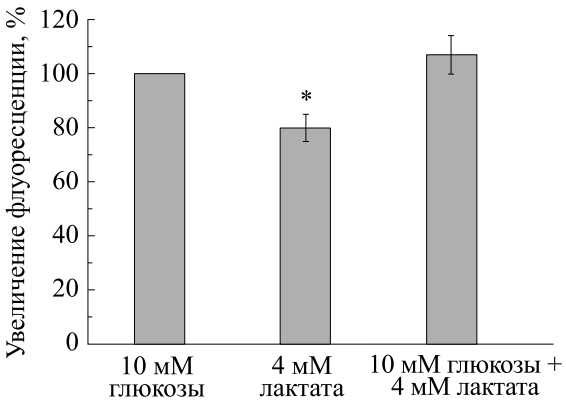


Рис. 1. Влияние лактата на потенциал плазматической мембраны синаптосом. За 100% взято увеличение флуоресценции за 4 мин после добавки 150 мМ KCl в контрольной глюкозосодержащей среде. Представлены средние значения шести экспериментов ± *Sx*.

показали, что замена глюкозы на кетоновые тела приводит к некоторой активации экзоцитоза и ингибированию эндоцитоза, а замена глюкозы на пируват – к ингибированию эндоцитоза [6]. Для изучения цикла синаптических везикул мы использовали флуоресцентный зонд акридиновый оранжевый. Увеличение флуоресценции свидетельствует об экзоцитозе, последующее снижение – о компенсаторном эндоцитозе [18, 24]. Рис. 2 показывает, что замена глюкозы на лактат также приводит к небольшому, но достоверному увеличению экзоцитоза. В то же время полностью отсутствовало ингибирование эндоцитоза (рис. 2), характерное для других негликолитических энергетических субстратов [6]. Мы использовали лактат в концентрации 4 мМ, так как ранее в наших экспериментах была использована такая же концентрация пирувата [6]. Агонист HCAR1 ДГБК не влияет на экзоцитоз, но активирует эндоцитоз (рис. 2). Таким образом, наши результаты позволяют предположить, что актива-

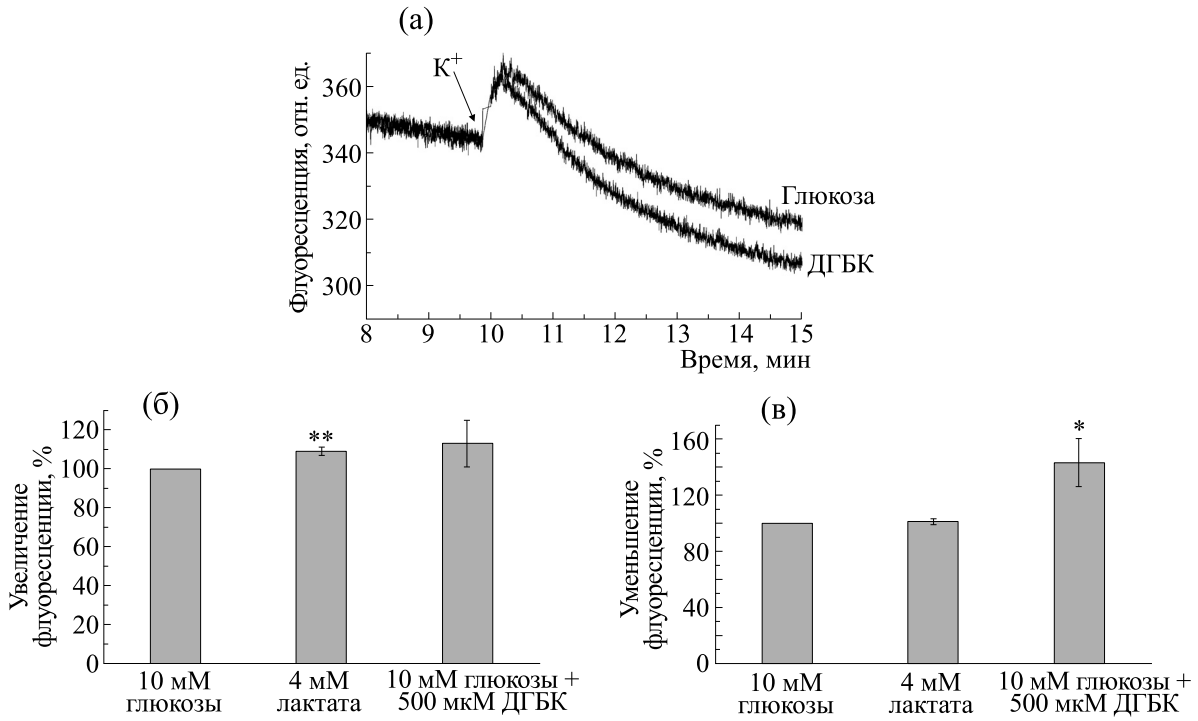


Рис. 2. Влияние лактата на цикл синаптических везикул в синаптосомах. (а) – Ответ флуоресцентного зонда акридинового оранжевого на калиевую деполяризацию в контрольной глюкозосодержащей инкубационной среде и в инкубационной среде, также содержащей 500 мкМ ДГБК. В указанный стрелкой момент времени в кювету вносили 60 мМ KCl. Представленные кривые отражают результаты четырех независимых измерений. (б) – Влияние лактата на экзоцитоз в синаптосомах мозга крыс: Инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы, либо 4 мМ лактата, либо 10 мМ глюкозы + 500 мкМ ДГБК. За 100% взято увеличение флуоресценции после добавки KCl в контрольной глюкозосодержащей среде. **– $P \le 0.01$ по отношению к контролю (ответ в глюкозосодержащей среде). Представлены средние значения четырех экспериментов ± *Sx*. (в) – Влияние лактата на эндоцитоз в синаптосомах мозга крыс. Инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы, либо 4 мМ лактата, либо 10 мМ глюкозы + 500 мкМ ДГБК. За 100% взято уменьшение флуоресценции за 5 мин после добавки KCl в контрольной глюкозосодержащей среде. *– $P \le 0.05$ по отношению к контролю (ответ в глюкозосодержащей среде). Представлены средние значения четырех экспериментов ± *Sx*.

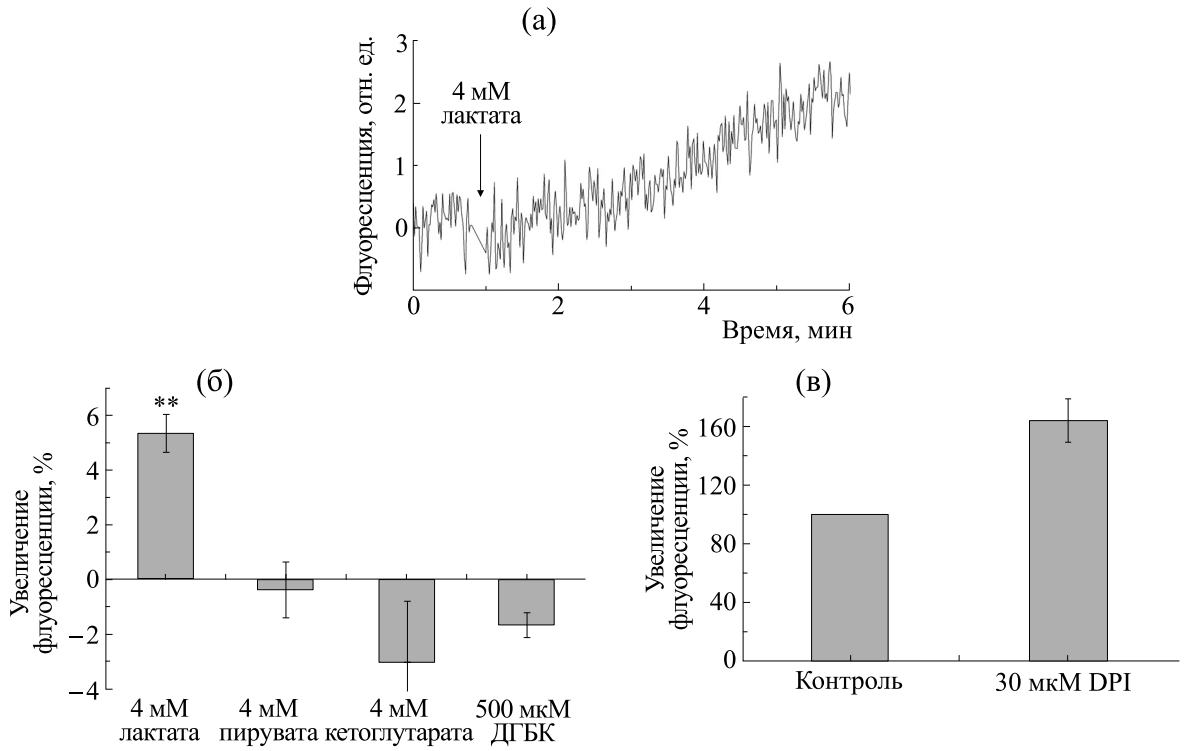


Рис. 3. Влияние монокарбоксилатов на образование АФК в синаптосомах мозга крыс. (а) – Увеличение флуоресценции DCFDA при действии лактата. В указанный стрелкой момент времени в кювету вносили 4 мМ лактата. Представленная кривая отражает результаты одиннадцати независимых измерений. (б) – Влияние монокарбоксилатов на флуоресценцию DCFDA в синаптосомах. В глюкозосодержащую инкубационную среду добавляли 4 мМ либо лактата, либо пирувата, либо кетоглутарата или 500 мкМ ДГБК. За 100% взято увеличение флуоресценции за 5 мин после добавления 1 мМ H_2O_2 в контрольной глюкозосодержащей среде. ** – $P \le 0.01$ по отношению к 0. Представлены средние значения шести экспериментов ± *Sx* для лактата, четырех экспериментов для пирувата, трех экспериментов для кетоглутарата и тринадцати экспериментов – для ДГБК. (в) – Влияние хлорида дифенилйодиния на образование АФК, индуцированное лактатом: синаптосомы были обработаны 30 мкМ хлорида дифенилйодиния, за 100% взято увеличение флуоресценции в контроле после добавления 4 мМ лактата. Представлены средние значения двенадцати экспериментов ± *Sx* .

ция эндоцитоза при помощи HCAR1 позволяет замаскировать его ингибирование, вызванное лактатом как негликолитическим энергетическим субстратом. Так как лактат в физиологических условиях гораздо более важен для питания нейронов, чем пируват или кетоновые тела, мы предполагаем, что обнаруженный нами механизм компенсации обеспечивает стабильность синаптической трансмиссии. В то же время стоит отметить, что лактат, в отличие от пирувата, является формой, которая хорошо проходит через клеточную мембрану, именно поэтому для транспорта из астроцитов в нейрон используется лактат, а не пируват. Однако в нейроне лактат переходит в пируват, который в конечном итоге и является энергетическим субстратом для митохондрий.

Рис. 3а показывает, что добавление 4 мМ лактата к суспензии синаптосом приводит к увеличению флуоресценции DCFDA, свидетельствующее о накоплении АФК. Ранее было показано, что кетоглутарат и пируват вызывают образование пероксида водорода в синаптосомах за счет активации кетоглутаратдегидрогеназы и пируватдегидрогеназы [16]. В то же время рис. 3б показывает, что эти вещества, в отличие от лактата, не ведут к увеличению флуоресценции DCFDA. Флуоресцентный зонд DCFDA реагирует прежде всего на гидроксильный радикал [29]. Гидроксильный радикал в наибольшей степени способен повреждать нейроны по сравнению с другими АФК, но он является вторичным по сравнению с пероксидом водорода или суперкосиданион радикалом [30]. Поэтому наши результаты позволяют предположить, что лактат обладает более сильным прооксидантным действием, чем пируват и кетоглутарат. Видимо, в случае пирувата и кетоглутарата количество образуемого пероксида водорода, являющегося первичной АФК, недостаточно для синтеза гидроксильного радикала.

В синаптосомах различные факторы могут вызывать образование АФК за счет образования супероксидного анион-радикала в электрон-

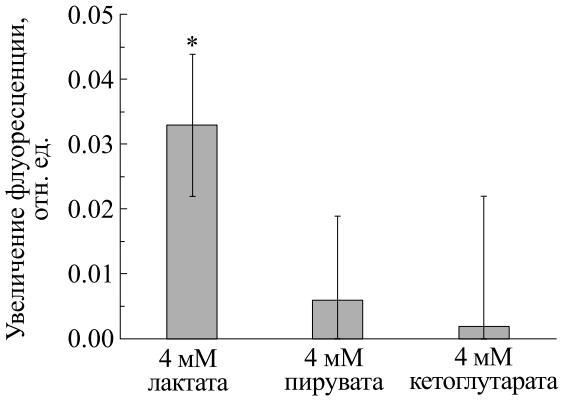


Рис. 4. Влияние монокарбоксилатов на образование супероксид-аниона в митохондриях. В глюкозосодержащую инкубационную среду добавляли 4 мМ лактата, пирувата или кетоглутарата. *– $P \le 0.05$ по отношению к контролю. Представлены средние значения семи экспериментов ± *Sx*.

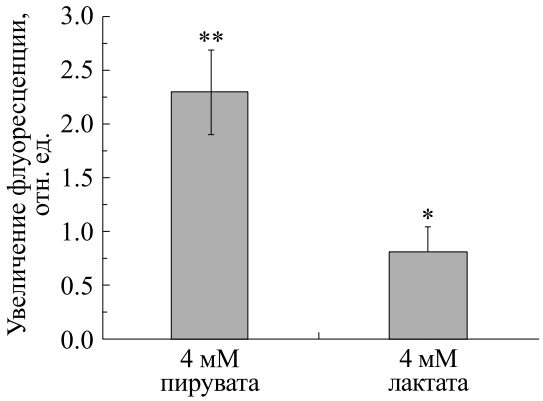


Рис. 5. Влияние монокарбоксилатов на митохондриальный потенциал. В глюкозосодержащую инкубационную среду добавляли 4 мМ лактата или пирувата. * – $P \le 0.05$ по отношению к контролю; ** – $P \le 0.01$ по отношению к контролю. Представлены средние значения четырех экспериментов ± *Sx*.

транспортной цепи митохондрий или NADPH оксидазой [25, 26, 31]. Мы изучили действие специфического ингибитора NADPH-оксидазы хлорида дифенилйодиния [25, 26, 31] на увеличение образования АФК при действии лактата. Рис. 3в показывает, что хлорид дифенилйодиния увеличивает, а не ингибирует влияние молочной кислоты на флуоресценцию DCFDA. Далее мы использовали флуоресцентный зонд митосокс, который специфичен по отношению к супероксид-аниону, образующемуся в митохондриях [22]. Рис. 4 показывает, что лактат, но не пируват или кетоглутарат, вызывает увеличение флуоресценции митосокса, свидетельствующее об образовании супероксид-аниона в электронтранспортной цепи митохондрий.

Ранее было показано, что пируват вызывает гиперполяризацию внутрисинаптосомальных митохондрий [1]. Гиперполяризация митохондрий стимулирует образование АФК в митохондриях [32, 33]. Поэтому мы изучили влияние лактата на потенциал внутрисинаптосомальных митохондрий. Рис. 5 показывает, что и пируват, и лактат вызывают увеличение флуоресценции зонда JC-1 при $\lambda_{рег} = 595$ нм. Это свидетельствует о гиперполяризации [20]. Мы также наблюдали уменьшение флуоресценции при $\lambda_{рег} = 595$ нм (данные не показаны), что подтверждает гиперполяризацию [20]. В то же время эффект пирувата был более выражен, чем эффект лактата (рис. 5), что делает связь между потенциалом митохондрий и образованием АФК не столь однозначной. Более сильная гиперполяризация в случае пирувата скорее всего связана с тем, что, в отличие от лактата, это вещество сразу используется в цикле Кребса. Вероятно, в физиологический процесс регуляции образования супероксид-аниона вмешивается какой-то другой фактор. Этим фактором, видимо, не является рецептор лактата HCAR1, так как его специфический агонист ДГБК не вызвал образования АФК в синаптосомах (рис. 3а). В то же время было предположено, что существуют и другие типы рецепторов лактата в нейронах [6]. Возможно, именно этот до сих пор неидентифицированный рецептор и является стимулом для образования супероксид-аниона в электронтранспортной цепи внутрисинаптосомальных митохондрий.

Наши результаты показывают, что лактат вызывает образование супероксид-аниона в электронтранспортной цепи во внутрисинаптосомальных митохондриях. Этот эффект не связан с активацией HCAR1 (рис. 3). Молочная кислота, в отличие от других негликолитических энергетических субстратов, не ингибирует эндоцитоз. Это связано с активацией эндоцитоза под действием рецептора лактата HCAR1 (рис. 2). Таким образом, лактат способен регулировать функционирование пресинаптических окончаний нейронов за счет стимуляции образования АФК в электронтранспортной цепи митохондрий и активации эндоцитоза, опосредованной HCAR1.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19-001).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. A. Kauppinen and D. G. Nicholls, FEBS Lett. **199**, 222 (1986).
2. M. C. McKenna, J. T. Tildon, J. H. Stevenson, et al., Dev. Neurosci. **15**, 320 (1993).
3. S. V. Hrynevich, T. V. Waseem, A. Hebert, et al., Neurochem. Int. **93**, 73 (2016).
4. Т. Г. Дубовская, С. В. Гриневич и С. В. Федорович, Биофизика **64**, 500 (2019).
5. L. Pellerin and P. J. Magistretti, J. Cereb. Blood Flow Metab. **32**, 1152 (2012).
6. P. J. Magistretti and I. Allaman, Nature Rev. Neurosci. **19**, 235 (2018).
7. S. V. Fedorovich, T. V. Waseem, and L. V. Puchkova, Rev. Neurosci. **28**, 363 (2017).
8. M. J. Devine and J. T. Kittler, Nature Rev. Neurosci. **19**, 63 (2018).
9. H. C. Abrantes, M. Briquet, C. Schmuziger, et al., J. Neurosci. **39**, 4422 (2019).
10. T. C. Sudhof, Neuron **80**, 675 (2013).
11. S. V. Fedorovich and T. V. Waseem, Rev. Neurosci. **29**, 825 (2018).
12. A. S. Tarasenko, M. V. Linetska, L. G. Storchak, et al., J. Neurochem. **99**, 787 (2006).
13. C. C. Blad, C. Tang, and S. Offermans, Nat. Rev. Drug Discov. **11**, 603 (2012).
14. S. P. Fu, J. F. Wang, W. J. Xue, et al., J. Neuroinflammation **12**, 9 (2015)
15. A. Tauffenberger, H. Fiumelli, S. Almustafa, et al., Cell Death Dis. **10**, 653 (2019).
16. L. Tretter, B. Liktor, and V. Adam-Vizi, Neurochem. Res. **30**, 1331 (2005).
17. B. G. Wilhelm, S. Mandad, S. Truckenbrodt, et al., Science **344**, 1023 (2014).
18. F. Zoccarato, L. Cavallini, and A. Alexandre, J. Neurochem. **72**, 625 (1999).
19. T. V. Waseem and S. V. Fedorovich, Neurochem. Res. **35**, 1188 (2010).
20. C. Chinopoulos, L. Tretter, and V. Adam-Vizi, J. Neurochem. **73**, 220 (1999).
21. C. P. LeBel and S. C. Bondy, Neurochem. Int. **17**, 435 (1990).
22. A. Y. Abramov, A. Scorziello, and M. R. Duchen, J. Neurosci. **27**, 1129 (2007).
23. F. Hajos, Brain Res. **93**, 485 (1975).
24. S. V. Hrynevich, T. G. Pekun, T. V. Waseem, et al., Neurochem. Res. **40**, 1188 (2015).
25. A. V. Alekseenko, V. V. Lemeshchenko, T. G. Pekun, et al., Neurosci. Lett. **513**, 238 (2012).
26. T. G. Pekun, V. V. Lemeshchenko, T. I. Lyskova, et al., J. Mol. Neurosci. **49**, 211 (2013).
27. O. Lowry, H. Rosenbrough, H. Farr, et al., J. Biol. Chem. **193,** 265 (1951).
28. N. Sada, S. Lee, T. Katsu, et al., Science **347**, 1362 (2015).
29. T.-I. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, et al., J. Biol. Chem. **278**, 3170 (2003).
30. B. Halliwell, J. Neurochem. **97**, 1634 (2006).
31. A. Tarasenko, O. Krupko, and N. Himmelreich, Neurochem. Int. **61**, 1044 (2012).
32. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, and A.A. Starkov, FEBS Lett **416**, 15 (1997).
33. D. B. Zorov, M. Juhaszova, and S. J. Sollott, Physiol. Rev. **94**, 909 (2014).

Regulation of the Synaptic Vesicle Cycle and Reactive Oxygen Species Generation in Rat Brain Synaptosomes in the Presence of Lactate

T.G. Dubouskaya*, S.V. Hrynevich, and S.V. Fedorovich*, ****

**Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Akademicheskaya 27, Minsk, 220072 Belarus*

***Faculty of Biology, Belarusian State University, ul. Kurchatova 10, Minsk, 220030 Belarus*

Different metabolites are able to modulate function of presynaptic endings of neurons. We investigated the influence of lactate and 3,5-dihydroxybenzoic acid, an agonist for the lactate receptor HCAR1, on the synaptic vesicle cycle and the generation of reactive oxygen species in rat brain synaptosomes. Supplementation of lactate (4 mM) versus pyruvate had no significant effect on the synaptic vesicle cycle. With the help of a fluorescent dye acridine orange we demonstrated that 3,5-dihydroxybenzoic acid in the concentration of 500 μM is amenable for eliciting endocytosis thereby preventing its potential inhibition during this stimulus. In the presence of lactate but not 3,5-dihydroxybenzoic acid there was an increase in 2',7'-dichlorofluorescein diacetate fluorescence, indicating reactive oxygen species generation. Also, using a fluorescent dye MitoSOX, we demonstrated the formation of superoxide anion in mitochondria after the addition of lactate. Therefore, lactate can influence the function of presynaptic endings of neurons through stimulation of reactive oxygen species generation and activation of endocytosis mediated by lactate receptor HCAR1.

Keywords: synaptosomes, lactate, synaptic vesicles, endocytosis, ROS, mitochondria

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 711–719

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЦА И ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА И ФЕРРИТИНА

© 2021 г. В.А. Медведева*, **, М.В. Иванова, К.Б. Шумаев**, ***, А.Л. Дудылина**, Э.К. Рууге*, ****

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

***Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а*

****ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2*

E-mail: ruuge@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2021 г.
После доработки 16.04.2021 г.
Принята к публикации 20.04.2021 г.

Одной из причин риска развития различного рода патологий считаются нарушения в функционировании митохондрий, которые могут быть обусловлены чрезмерным образованием токсичных форм кислорода и азота в состоянии окислительного стресса. Продукция этих активных форм в живых организмах происходит постоянно в результате действия ферментных систем, а также в ходе окислительно-восстановительных реакций, например, таких как катализируемые ионами железа реакции Фентона и Габера–Вейса. В литературе появляется все больше данных о связи метаболизма ферритина, активных форм кислорода, оксида азота и динитрозильных комплексов железа, а также о важной роли динитрозильных комплексов железа в механизмах антиоксидантной защиты. С помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек, спектрофотометрии и полярографии проведено исследование прооксидантных и антиоксидантых свойств динитрозильных комплексов железа и ферритина в супероксидгенерирующих системах: митохондриях сердца и системе «ксантин–ксантиноксидаза». Показано, что динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами перехватывают реакционноспособные свободные радикалы в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы. В этих условиях ферритин стимулировал разрушение динитрозильных комплексов железа. Полученные данные указывают на антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа и, напротив, прооксидантный эффект ферритина.

Ключевые слова: супероксидные радикалы, динитрозильные комплексы железа, ферритин, антиоксиданты, сердце, митохондрии, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302921040104

Образование активных форм кислорода (АФК) постоянно происходит в живых организмах в результате побочных реакций дыхательной цепи митохондрий и других окислительно-восстановительных процессов. Основными мишенями АФК являются органы с интенсивным метаболизмом и высоким энергетическим потреблением: скелетные мышцы, почки, печень и сердце. В кардиомиоцитах при увеличении внутриклеточной концентрации кислорода, в том числе при реоксигенации после гипоксии, и снижении энергетического метаболизма могут происходить значительные изменения редокс-потенциалов переносчиков электронтранспортной цепи митохондрий, что приводит к резкому возрастанию скорости продукции АФК [1].

Существенное значение для энергетического метаболизма и генерации свободных радикалов кислорода в биологических системах имеют ионы железа, их гемовые и негемовые комплексы. Ферритин – гетерополимер, состоящий из двух типов субъединиц-цепей: тяжелой (H) и легкой (L) – является основным депо железа у большинства живых организмов и может проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. В нормальных условиях поддерживается динамическое равновесие между выходом железа и его за-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа .

пасанием в ферритине, что обеспечивает низкий уровень свободного железа, тем самым снижается выход АФК. Железо высвобождается из ферритина в результате восстановления Fe(III) до Fe(II) донорами электронов, и это может происходить в ходе окислительного стресса при взаимодействии ферритина и $O_2^{\bullet -}$ [2]. Также железо высвобождается при протеолизе ферритина, однако эти процессы изучены недостаточно.

Еще одним ключевым участником метаболизма железа и оксида азота, а также антиоксидантной системы клеток могут быть динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), которые также являются одной из основных природных форм депонирования NO в организме животных и человека [3]. Известно, что в образовании нитрозильных комплексов железа способен участвовать ферритин [4, 5]. Включение ионов железа в ДНКЖ может снижать их реактивность как инициаторов реакций с $O_2^{\bullet -}$ и H_2O_2, например, реакций Габера–Вейса и Фентона, а включение NO – ингибировать образование $OONO^-$.

Таким образом, представляется важным дальнейшее исследование взаимодействия ферритина, ДНКЖ и других доноров NO в условиях, моделирующих генерацию АФК в организме человека и животных. В данной работе с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек, спектрофотометрии и полярографии проведено исследование прооксидантных и антиоксидантых свойств ДНКЖ и ферритина в супероксидгенерирующих системах: митохондриях сердца и системе «ксантин–ксантиноксидаза».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение изолированных митохондрий. Митохондрии выделяли из сердца крыс стандартным методом дифференциального центрифугирования [6]. Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре (0–4)°C. Сердце вырезали после анестезии крыс линии Wistar внутрибрюшинным введением уретана (1.8 г анестетика на кг массы животного) и помещали в охлажденную среду выделения (~4°C). Среда выделения содержала 70 мМ сахарозы, 220 мМ маннитола, 50 мМ HEPES, 1 мМ EDTA, pH 7.40–7.42. Предварительно измельченные ножницами и отмытые от крови кусочки сердца пропускали через сито из нержавеющей стали, далее гомогенизировали в течение двух-трех минут при соотношении «среда : ткань», равном 8 : 1. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 700 *g*, супернатант, содержавший митохондрии, фильтровали и центрифугировали 10 мин при 14000 *g* на центрифуге K-24 (ГДР). Осадок митохондрий суспендировали в среде выделения с 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Полученную суспензию митохондрий (30–70 мг белка/мл) хранили во льду.

Определение функциональной активности митохондрий. Скорость потребления кислорода митохондриальной дыхательной цепью определяли с помощью электрода Кларка на полярографе YSI 53 (Yellow Spring Instruments, Inc., США). Среда инкубации митохондрий для полярографических измерений содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 4 мМ KH_2PO_4, 3 мМ $MgCl_2$, pH 7.4; температура 25°C; концентрация белка 0.4–0.7 мг/мл. В качестве субстрата дыхания использовали сукцинат в концентрации 4–5 мМ. При необходимости добавляли ротенон – ингибитор комплекса I дыхательной цепи, в концентрации 2 мкМ. Для определения дыхательного контроля, степени сопряженности электронного транспорта и окислительного фосфорилирования добавляли АДФ в концентрации 200–300 мкМ. Дыхательный контроль рассчитывали как соотношение скоростей поглощения кислорода в состоянии III (+АДФ) и состоянии IV (без АДФ).

Регистрация спектров ЭПР перехватчика супероксида TIRON и динитрозильных комплексов железа. Регистрацию и анализ спектров ЭПР проводили на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП («КБСТ» БГУ, Беларусь). Реакционную смесь вводили в газопроницаемую капиллярную трубку PTFE Sub-Lite-Wall (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Эту капиллярную трубку дважды складывали и вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, открытую с обоих концов, что обеспечивало доступ воздуха (21% O_2) к образцу в резонаторе спектрометра ЭПР.

Генерацию супероксидных радикалов изолированными митохондриями изучали с помощью перехватчика («scavenger») супероксида TIRON (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфоната), переходящего при взаимодействии с $O_2^{\bullet -}$ в семихинонную форму [7]. Ранее нами было показано [8], что регистрация семихинона $TIRON^{\bullet -}$ с помощью ЭПР является удобным методом измерения скорости образования супероксида как модельными ферментативными системами, так и электронными переносчиками митохондрий сердца. При этом скорость генерации $O_2^{\bullet -}$ в реакционной смеси оказалась пропорциональной квадрату интенсивности сигнала ЭПР семихинонов $TIRON^{\bullet -}$. При pH < 9 этот спектр представляет собой квартет, являющийся результатом взаимодействия неспаренного электрона с двумя неэквивалентными протонами с константами СТВ $a(H_2) = 0.331$ мТл и $a(H_6) = 0.178$ мТл (рис. 1а).

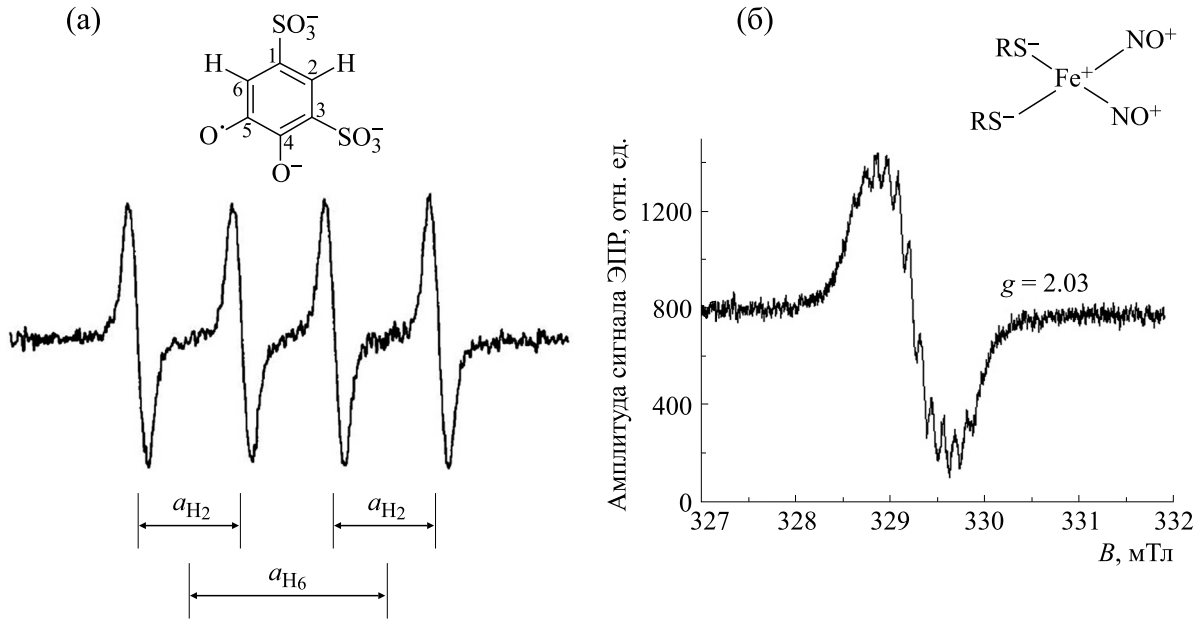


Рис. 1. (а) – Спектр ЭПР семихинонов TIRON в супероксидгенерирующей модельной системе «ксантин–ксантиноксидаза» в условиях, аналогичных условиям регистрации $TIRON^{\bullet -}$ в митохондриальной суспензии (см. раздел «Материалы и методы»). (б) – Сигнал ДНКЖ в среде инкубации в отсутствие генерации АФК. Среда инкубации (в мМ): сахароза – 250, HEPES – 20, EGTA – 1, KH_2PO_4 – 4, $MgCl_2$ – 3, pH 7.4; ДНКЖ – 700 мкМ.

Среда инкубации для измерений на спектрометре ЭПР содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 4 мМ KH_2PO_4, 3 мМ $MgCl_2$, 8 мМ сукцината, 5 мкМ антимицина А и 10 мМ TIRON; pH 7.4. Концентрация митохондрий в среде инкубации составляла ~4 мг/мл. Условия записи спектров ЭПР от $TIRON^{\bullet -}$: ослабление СВЧ-мощности 5–10 дБ, амплитуда ВЧ-модуляции 0.05 мТл, СВ-частота ~9.32 ГГц, коэффициент усиления 500–1000, диапазон развертки 10 мТл. Выбор величины СВЧ-мощности и ВЧ-модуляции определялся требованием достижения максимальной чувствительности при неискаженной форме сигнала.

Запись спектров ДНКЖ производили при комнатной температуре (~25°C) в суспензии митохондрий сердца и системе «ксантин–ксантиноксидаза». Для получения парамагнитных моноядерных ДНКЖ к препарату диамагнитных биядерных комплексов добавляли необходимое количество цистеина (в небольшом избытке) и наблюдали характерный синглетный сигнал ДНКЖ с полушириной 0.7 мТл при g_{iso} = 2.03 (рис. 1б). Под действием $O_2^{\bullet -}$ ДНКЖ разрушались, что вызывало постепенное уменьшение интенсивности сигнала ЭПР. Величину изменения сигнала ДНКЖ выражали отношением I/I_o, где I_o – амплитуда исходного (контрольного) сигнала ДНКЖ данной концентрации без генерации АФК, I – интенсивность сигнала ДНКЖ в ходе эксперимента. Условия записи спектров ЭПР (для ДНКЖ): ослабление СВЧ-мощности 10 дБ, амплитуда ВЧ-модуляции 0.2–0.4 мТл, коэффициент усиления 100–1000, диапазон развертки 5–10 мТл.

Определение скорости генерации супероксидных радикалов. Скорость генерации супероксидных радикалов в модельной системе «ксантин–ксантиноксидаза» измеряли на спектрофотометре Cary 60 (Agilent, Австралия) по реакции восстановления цитохрома *c*. Реакционная смесь содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 0,2 мМ ксантина, 0.1–200 мкг/мл ксантиноксидазы и 27 мкМ цитохрома *c*; pH 7.4. Реакцию запускали добавлением ксантина. В качестве контрольного образца использовали раствор того же состава за исключением ксантиноксидазы. За восстановлением цитохрома *c* следили по изменению разностного оптического поглощения при 550 и 557 нм. Молярный коэффициент экстинкции – 21.1 10^3 M^{-1} $см^{-1}$ [9]. Скорость генерации $O_2^{\bullet -}$ в ксантиноксидазной системе принимали равной чувствительной к SOD скорости восстановления цитохрома *c*.

Регистрацию спектров ЭПР спиновой ловушки TIRON в ксантиноксидазной системе проводили в условиях, аналогичных условиям регистрации в митохондриальной суспензии. Реакцию запускали добавлением ксантиноксидазы

(0.1–200 мкг/мл) в реакционную смесь, содержащую 10 мМ TIRON и основные компоненты среды спектрофотометрических исследований, за исключением цитохрома *c*.

Реактивы. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), ICN (США), Serva (ФРГ), Aldrich (США) и других. Синтез ДНКЖ происходил по способу, разработанному А.Ф. Ваниным [10]. ДНКЖ с глутатионом в диамагнитной димерной форме (5–10 мМ) получали, смешивая растворы $FeSO_4$ и глутатиона в молярном соотношении 1 : 2 сосуде Тунберга в атмосфере NO. Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота (–196°C).

Статистический анализ. Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в трех-пяти повторах. Для экспериментальных групп вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для оценки достоверности отличий между группами, различия между группами считали значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты по исследованию действия ДНКЖ с глутатионовыми лигандами на генерацию $O_2^{\bullet -}$ проводили в модельной системе «ксантин–ксантиноксидаза» и в суспензии изолированных митохондрий из сердца крыс. Условия генерации супероксида в ксантин-ксантиноксидазной системе и в митохондриях были подобраны таким образом, чтобы получить сравнимые скорости генерации супероксида (интенсивность ЭПР сигнала TIRON в ксантин-ксантиноксидазной соответствовала ЭПР сигналу TIRON в суспензии митохондрий) [11]. Скорость генерации $O_2^{\bullet -}$ составляла ~ 0.1 нмоль/мин на 1 мг белка. Использовали концентрацию ДНКЖ от 100 мкМ до 1.4 мМ. При увеличении концентрации ДНКЖ в среде инкубации в этих системах от 100 мкМ до 1.4 мМ наблюдали уменьшение интенсивности сигнала ЭПР TIRON. При концентрациях ДНКЖ меньше 100 мкМ достоверного снижения сигнала ЭПР TIRON не происходило. Добавление 1.4 мМ ДНКЖ вызывало полное исчезновение сигнала ЭПР спиновой ловушки TIRON. Константа взаимодействия TIRON с $O_2^{\bullet -}$ составляет 10^6–10^7 M^{-1} c^{-1} [12]. Так как глутатионовые ДНКЖ эффективно конкурируют с TIRON за супероксид, можно предположить, что эти соединения имеют сопоставимую константу взаимодействия с $O_2^{\bullet -}$. Действительно, константа реакции между $O_2^{\bullet -}$ и связанными с альбумином ДНКЖ составляет около 10^7 $M^{-1}c^{-1}$ [13]. Вместе с тем аналогичная константа для восстановленного глутатиона находится в пределах 10^2–10^3 $M^{-1}c^{-1}$ [14]. Также в работе [5] было показано, что глутатионсодержащие ДНКЖ намного более эффективно защищают эритроциты от гемолиза, вызванного гипохлоритом, чем свободный глутатион. Таким образом, антиоксидантные свойства ДНКЖ полностью не могут быть объяснены действием входящих в них тиолов.

Изменения интенсивности ЭПР сигнала ДНКЖ в супероксидгенерирующих системах представлены на рис. 2–5. При генерации $O_2^{\bullet -}$ как в суспензии митохондрий, так и в ксантин–ксантиноксидазной системе происходило уменьшение величины сигнала парамагнитных ДНКЖ (рис. 2а–в). В митохондриальной суспензии без добавления субстратов электронтранспортной цепи глутатионовые ДНКЖ оставались стабильными в течение 30 мин (данные не представлены). Падение сигнала этих ДНКЖ было на порядок больше в митохондриальной суспензии с сукцинатом и антимицином А, чем в отсутствие последнего. Действительно, известно, что антимицин А ингибирует третий комплекс электронтранспортной цепи (Q_{in}-центр цитохром-bc_1-комплекса), что приводит к многократному увеличению образования $O_2^{\bullet -}$ митохондриями [15]. Как видно из кинетики изменения сигнала ДНКЖ (рис. 2в), в ходе генерации $O_2^{\bullet -}$ как в митохондриальной, так и в ксантин-ксантиноксидазной системах ДНКЖ разрушаются в течение 10–15 мин.

Известно, что в митохондриях содержится митохондриальный ферритин (FtMt), а $O_2^{\bullet -}$ может вызывать высвобождение железа из ферритина [16]. Таким образом нельзя исключить, что цитозольные и митохондриальная изоформы ферритина могут быть источником ионов двухвалентного железа для образования ДНКЖ [4, 5]. Добавление в реакционную среду с митохондриями ферритина в концентрации от 1.14 до 4.54 мкМ приводило к увеличению скорости падения сигнала ДНКЖ (рис. 3). Поскольку ширина сигнала ДНКЖ при этом оставалась постоянной, уменьшение интенсивности сигнала, по-видимому, обусловлено разрушением ДНКЖ. На диаграммах (рис. 4а,б) видно, что увеличение концентрации ферритина приводит к ускорению падения сигнала ДНКЖ. Этот эффект может быть связан с выходом ионов Fe^{2+} из ферритина под действием $O_2^{\bullet -}$, что ведет к увеличению продукции АФК в

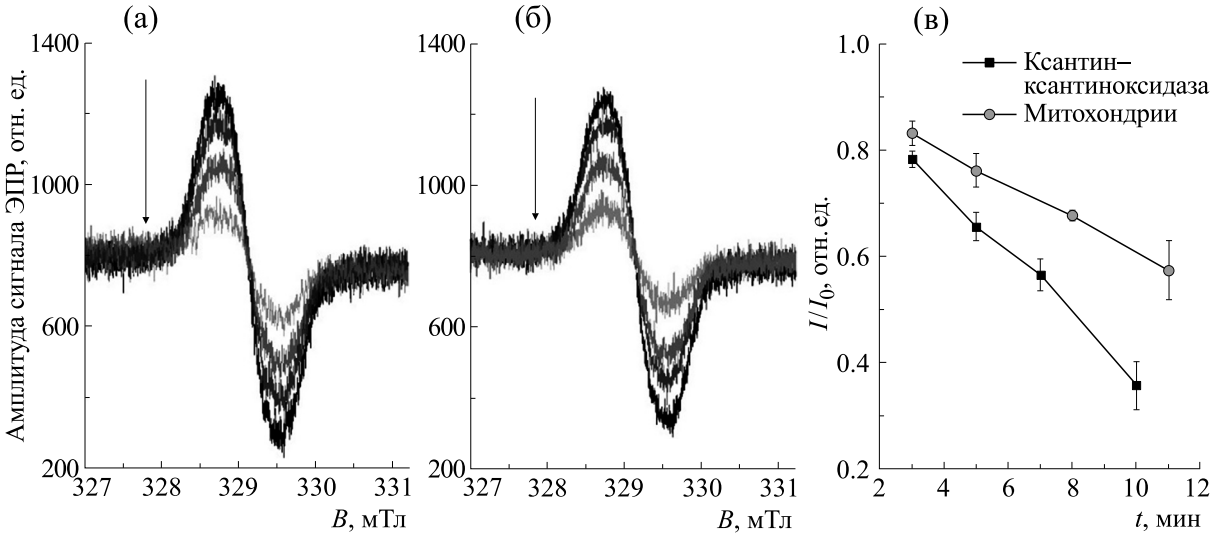


Рис. 2. Сигнал ДНКЖ в двух модельных системах: (а) – митохондрии (время 3, 5, 8, 11 мин); (б) – система «ксантин–ксантиноксидаза» (время 3, 5, 7, 10 мин). Исходная концентрация ДНКЖ – 700 мкМ, стрелкой указано изменение спектров в ходе реакции, время записи спектров с третьей до десятой-одиннадцатой минуты от момента добавления ксантиносидазы. (в) – Кинетика распада ДНКЖ в двух системах.

реакциях Фентона и Габера–Вейса и соответственно разрушению ДНКЖ. Распад ДНКЖ сопровождается высвобождением глутатиона и ионов железа, которые также могут участвовать в процессах свободнорадикального окисления. Так, глутатион, восстанавливая Fe^{3+}, может способствовать как выходу железа из ферритина, так и стимулированию реакции Фентона. Свободный NO также может выделяться при распаде ДНКЖ, причем в реакции оксида азота с супероксидом образуется сильный окислитель пероксинитрит, способный разрушать ДНКЖ. Таким образом, зависимая от $O_2^{\bullet -}$ деструкция ДНКЖ в присутствии ферритина может носить автокаталитический характер.

Сравнение влияние ферритина на деструкцию ДНКЖ в суспензии митохондрий и ксантин-ксантиноксидазной системе представлено на рис. 5. Видно, что в присутствии ферритина в суспензии митохондрий скорость распада ДНКЖ меньше, чем в супероксидгенерирующей системе, содержащей ксантин и ксантиноксидазу. Аналогичный эффект, различие в скоростях рас-

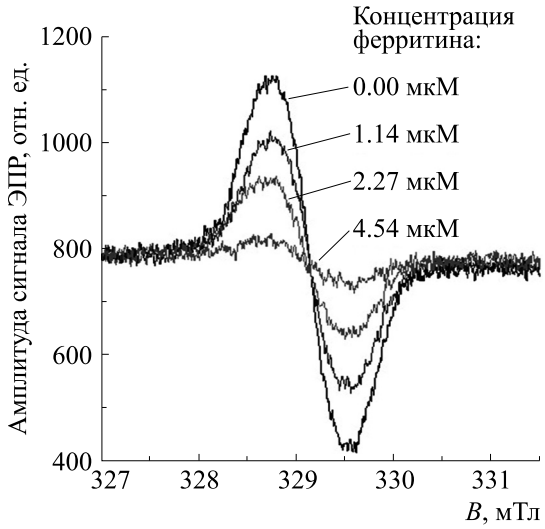


Рис. 3. ЭПР-спектр ДНКЖ (концентрация 700 мкМ) в суспензии митохондрий в присутствии различных концентраций ферритина. Время инкубации – 5 мин.

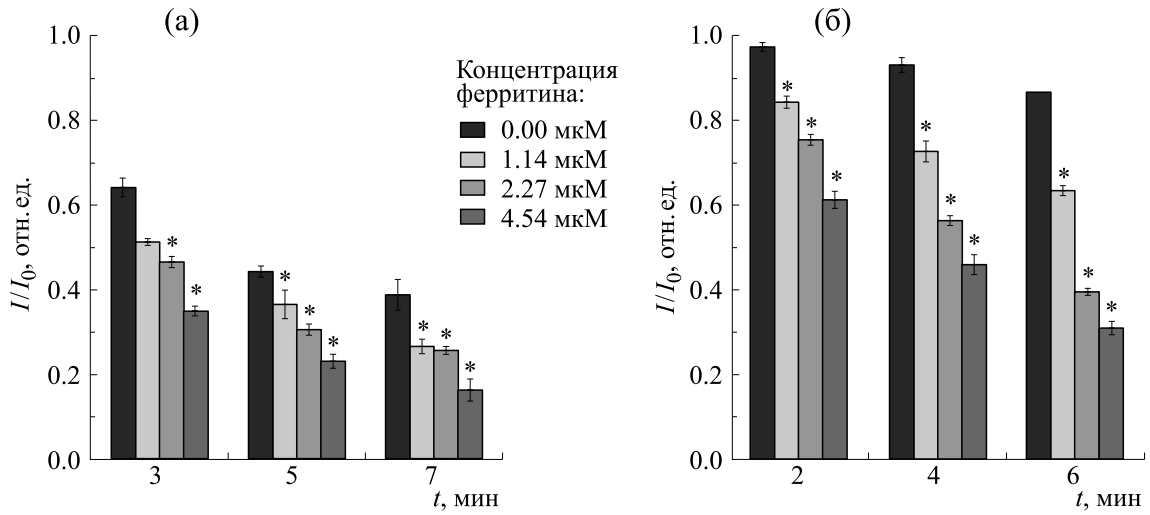


Рис. 4. Изменение относительной интенсивности сигнала ДНКЖ в присутствии разных концентраций ферритина: (а) – исходная концентрация ДНКЖ 350 мкМ, (б) – исходная концентрация ДНКЖ 1.4 мМ. * – Достоверное отличие по отношению к контролю (сигнал ДНКЖ в отсутствие ферритина).

пада ДНКЖ в этих системах, мы наблюдали без ферритина (рис. 2в). Можно предположить, что это замедление связано с ресинтезом ДНКЖ в митохондриях [5].

Для проверки роли $O_2^{\bullet -}$ в деструкции ДНКЖ были поставлены эксперименты с супероксидисмутазой. В ксантин-ксантиоксидазной системе добавление 500 ед./мл супероксидисмутазы приводило к уменьшению скорости разрушения ДНКЖ до скорости самопроизвольного распада ДНКЖ. Добавление супероксидисмутазы в эту систему в присутствии ферритина вызывало снижение скорости разрушения ДНКЖ до значений, полученных в отсутствии ферритина (данные не приведены).

Таким образом, взаимодействия между АФК, ДНКЖ и ферритином можно описать следующим набором реакций:

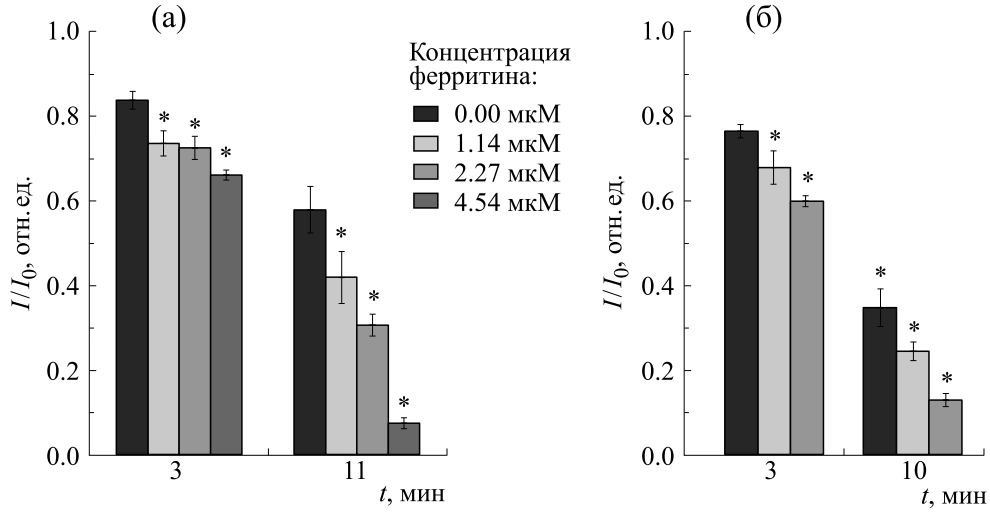


Рис. 5. Уменьшение величины сигнала ДНКЖ в присутствии различных концентраций ферритина в суспензии митохондрий и ксантин-ксантиноксидазной системе: (а) – 4 мг/мл митохондрий, 80 мМ сукцината, 0.2 мМ антимицина А, 700 мкМ ДНКЖ; (б) – 100 мМ ксантина, 0.1 мкМ ксантиноксидазы, 700 мкМ ДНКЖ. * – Достоверное отличие по отношению к контролю (сигнал ДНКЖ в отсутствие ферритина).

$$\text{Митохондрии} \rightarrow O_2^{\cdot -} \text{ / Ксантин-ксантиоксидаза} \rightarrow O_2^{\cdot -} \quad (1)$$

$$O_2^{\cdot -} + \text{ДНКЖ} \rightarrow NO_3^- \text{, NO, GSSG, } Fe^{2+} \quad (2)$$

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \text{ (ферритин)} \rightarrow Fe^{2+} \quad (3)$$

$$NO + O_2^{\cdot -} \rightarrow ONOO^- \quad (4)$$

$$ONOO^- \rightarrow NO_2^{\cdot} + OH^{\cdot} \quad (5)$$

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \quad (6)$$

$$Fe^{2+} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow Fe^{3+} + H_2O_2 \quad (7)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^- \quad (8)$$

$$Fe^{2+} + \text{глутатион} + NO \rightarrow \text{ДНКЖ} \quad (9)$$

На основании литературных данных [17] и проведенных ранее исследований [13] можно заключить, что ДНКЖ при взаимодействии с супероксидом превращается в комплекс, содержащий связанный пероксинитрит (рис. 6). Представляется вероятным, что координированный с железом $ONOO^-$ далее окисляет глутатионовые лиганды, в результате чего комплекс распадается. Тем не менее нельзя исключить, что при избытке свободных тиолов или других доноров электронов комплекс с пероксинитритом может регенерироваться (восстанавливаться) до ДНКЖ.

Действительно, как показывают предыдущие исследования, выполненные в нашей лаборатории [18], в присутствии избытка глутатиона и цистеина пероксинитрит практически не влияет на разрушение ДНКЖ (pH 7.4). Но высокая антирадикальная активность (взаимодействие с супероксидом) ДНКЖ позволяет предположить, что в наших системах, по-видимому, не происходит образования свободного пероксинитрита.

Следует отметить, что в клетках NO, высвобождающийся при разрушении ДНКЖ под действием АФК, может снижать уровень ферритина [19]. Вместе с тем нитрозильный катион (NO^+), по данным работы [20], может стимулировать синтез ферритина в мышиных макрофагах. В связи с тем, что ДНКЖ в зависимости от редокс-условий являются донорами как NO, так и NO^+, влияние этих комплексов на уровень ферритина и свободного или «хелатируемого» железа может быть разнонаправленным.

Полученные данные о влиянии ферритина на кинетику распада ДНКЖ аналогичны описанному нами ранее действию метмиоглобина на деструкцию ДНКЖ в ксантин-ксантиноксидазной системе [21], тогда было показано, что скорость разрушения ДНКЖ увеличивается в присутствии метмиоглобина.

В ряде работ показано, что в условиях гипоксии в митохондриях происходит зависимый от

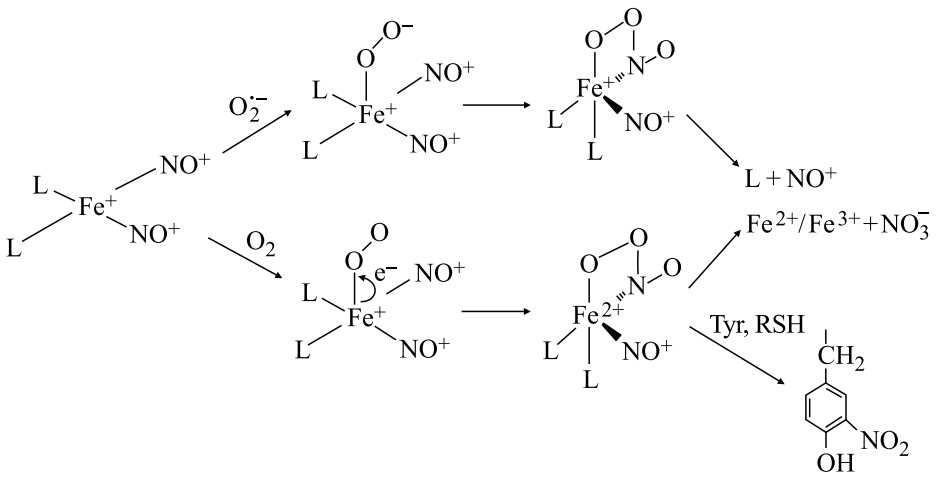


Рис. 6. Возможная схема взаимодействий динитрозильных комплексов железа с молекулярным кислородом и супероксидным радикалом.

нитрита или S-нитрозотиолов синтез ДНКЖ [5, 22, 23]. Считается, что нитрит и S-нитрозотиолы являются источниками NO, при взаимодействии которого с свободными ионами железа образуются ДНКЖ. Полагают, что с формированием ДНКЖ связано цитопротекторное действие нитрита в ходе гипоксии–реоксигенации [21]. С другой стороны, если концентрация NO превышает содержание свободного (хелатируемого) железа, наблюдается дисфункция митохондрий, обусловленная разрушением железосерного кластера аконитазы [23]. Исходя из литературных данных и полученных нами результатов, можно предположить, что синтез ДНКЖ при низком парциальном давлении кислорода позволяет связать NO и ионы железа в митохондриях. При этом поступление железа из ферритина может предотвращать инактивацию аконитазы. Вместе с тем с началом реоксигенации накопленные ДНКЖ функционируют как антиоксиданты, перехватывая образующиеся АФК. Это предположение хорошо объясняет эффективное протекторное действие глутатионсодержащих ДНКЖ при ишемии и последующей реперфузии сердечной мышцы [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНКЖ с тиольными лигандами перехватывают супероксидные анион-радикалы, которые продуцируются митохондриями и в системе ксантин-ксантиноксидаза.

Показано, что в использованном диапазоне концентраций ферритин в этих моделях генерирования $O_2^{\bullet-}$ проявляет прооксидантные свойства, стимулируя разрушение ДНКЖ.

В суспензии митохондрий разрушение ДНКЖ в присутствии ферритина происходит медленнее, чем в ксантин-ксантиноксидазной системе. Этот факт может объясняться тем, что в этих условиях ДНКЖ либо не разрушаются полностью, либо происходит частичная регенерация комплексов.

События, происходящие в клетке при окислительном стрессе, зависят от продукции активных форм кислорода и азота, а также от уровня других редокс-активных соединений, в первую очередь ионов железа и тиолов. Полученные нами данные позволяют заключить, что митохондрии, тиолсодержащие ДНКЖ и ферритин являются ключевыми элементами, регулирующими баланс этих соединений. Прооксидантное действие ферритина в условиях генерации $O_2^{\bullet-}$ митохондриями и в системе ксантин-ксантиноксидаза согласуется с результатами, полученными ранее в других экспериментальных моделях. Подтверждены также антирадикальные свойства ДНКЖ. Нельзя исключить, что свободнорадикальные реакции с участием ДНКЖ и ферритина играют важную роль в таком варианте программируемой гибели клетки, как ферроптоз.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 19-015-00444.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. N. Hughes, Biochim. Biophys. Acta **1411** (2–3), 263 (1999).
2. D. Finazzi and P. Arosio, Arch Toxicol. **88**, 1787 (2014).
3. A. F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. **54**, 15 (2016).
4. R. N. Watts and D. R. Richardson, Eur. J. Biochem. **269**, 3383 (2002).
5. K. B. Shumaev, A. L. Dudylina, M. V. Ivanova, et al., Biofactors **44** (3), 237 (2018).
6. C. Frezza, S. Cipolat, and L. Scorrano. Nat. Protoc. **2**, 287 (2007).
7. И. В. Григолава, М. Ю. Ксензенко, А. А. Константинов и др., Биохимия **45**, 75 (1980).
8. A. N. Ledenev, A. A. Konstantinov, E. Popova, et al., Biochem. Int. **13**, 391 (1986).
9. B. Vangelder, Biochim. Biophys. Acta **58**, 593 (1962).
10. A. F. Vanin, R. R. Borodulin, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide **66**, 1 (2017).
11. А. Л. Дудылина, Дис. ... канд. ф.-м.н. (МГУ, Москва, 2019).
12. W. Bors, Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj. **582** (3), 537 (1979).
13. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide **18** (1), 37 (2008).
14. C. C. Winterbourn and D. Metodiewa, Arch. Biochem. Biophys. **314** (2), 284 (1994).
15. N. Dairaku, K. Kato, K. Honda, et al., J. Lab. Clin. Med. **143** (3), 143 (2014).
16. D. W. Reif, Free Rad. Biol. Med. **12** (5), 417 (1992).
17. N. G. Tran, H. Kalyvas, K. M. Skodjet, et al., J. Am. Chem. Soc. **133**, 1184 (2011).

18. И. В. Заббарова, Дис. ... канд. ф.-м.н. (МГУ, Москва, 2004).
19. D. R. Richardson, V. Neumannova, E. Nagy, et al., Blood **86** (8), 3211 (1995).
20. S. Kim and P. Ponka, Blood Cells Mol. Dis. **29** (3), 400 (2002).
21. И. В. Заббарова, К. Б. Шумаев, А. Ф. Ванин и др., Биофизика **49** (4), 659 (2004).
22. P. Dungel, M. Perlinge, A. Weidinger, et al., Free Rad. Biol. Med. **89**, 300 (2015).
23. D. D. Thomas, C. Corey, J. Hickok, et al., Redox Biol. **15**, 277 (2018).
24. O. Pisarenko, I. Studneva, A. Timoshin, et al., Pflugers Arch. **471** (4), 583 (2019).

Generation of Superoxide Radicals by Heart Mitochondria and the Action of Dinitrosyl Iron Complexes and Ferritin

V.A. Medvedeva*, **, M.V. Ivanova, K.B. Shumaev**, ***, A.L. Dudylina**, and E.K. Ruuge*, ****

***National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

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

One of the causes of the development of a wide range of pathologies is thought to be alterations in mitochondrial function, that may be due to the excessive generation of toxic forms of oxygen and nitrogen cumulating into oxidative stress. These reactive oxygen and nitrogen species in living organisms are generated continuously by enzymes and via oxidation-reduction processes, such as the Fenton reaction and iron-catalyzed Haber–Weiss reaction. In literature, there is much more data available on the relationship between the metabolism of ferritin, reactive oxygen species, nitric oxide and dinitrosyl iron complexes, as well as on the important role of dinitrosyl iron complexes in the antioxidant defense mechanisms. The prooxidant and antioxidant properties of dinitrosyl iron complexes and ferritin in superoxide-generating systems: heart mitochondria and the xanthine-xanthine oxidase system were studied using EPR spin trapping, by spectrophotometry, and polarography. It has been shown that dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands intercept reactive free radicals in systems simulating oxidative stress in cardiac muscle cells. Under these conditions, ferritin stimulated the destruction of dinitrosyl iron complexes. The data obtained indicate the antioxidant and antiradical effects of dinitrosyl iron complexes and, on the contrary, the prooxidant effect of ferritin.

Keywords: superoxide radicals, dinitrosyl iron complexes, ferritin, antioxidants, heart, mitochondria, electron paramagnetic resonance

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 720–723

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 616. 127:599.325

ИЗМЕНЕНИЕ ОСНАЩЕННОСТИ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА КРОЛИКА ЭНДОГЕННЫМИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМИ СУБСТРАТАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧАСТОТЫ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ВИБРАЦИИ

© 2021 г. В.В. Воробьева, П.Д. Шабанов

Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

E-mail: v.v.vorobeva@mail.ru

Поступила в редакцию 29.02.2020 г.
После доработки 29.02.2020 г.
Принята к публикации 14.04.2021 г.

Изучено изменение оснащенности митохондрий миокарда энергетическими субстратами в зависимости от частоты и длительности общей вертикальной вибрации полярографическим методом с помощью закрытого кислородного датчика гальванического типа (электрода Кларка) путем сопоставления скорости эндогенного дыхания на протяжении времени хранения гомогената в аэробных условиях. Наиболее длительное (56 сеансов) вибрационное воздействие с амплитудой 0.5 мм и частотой 44 Гц вызвало падение скорости эндогенного дыхания через 40 мин инкубации гомогената ткани миокарда в 1.4 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контролем, свидетельствуя о развитии угнетения в системе окисления и утилизации янтарной кислоты, снижении доступности эндогенных субстратов к дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов и, косвенно, о нарушении структуры и функции митохондриально-ретикулярной сети.

Ключевые слова: вибрация, митохондрии, энергетический обмен миокарда, янтарная кислота, митохондриально-ретикулярная сеть

DOI: 10.31857/S0006302921040116

Согласно результатам экспериментальных [1, 2] и клинических [3] исследований сердце является одним из наиболее чувствительных к воздействию вибрации органов. Формирующийся на фоне вибрации гипоксический тип клеточного метаболизма [4, 5] и уменьшение синтеза макроэргов влечет за собой развитие миокардиодистрофии. Учитывая высокую медико-социальную значимость вибрационной болезни особое прикладное значение приобретает детальное изучение вибрационной уязвимости системы энергопродукции миокарда [6].

Изучение окислительного метаболизма возможно в переживающих препаратах свежеприготовленных срезов, изолированных митохондрий и гомогенатов тканей [7]. Как известно, митохондрии в клетке объединены в единую митохондриально-ретикулярную сеть, которая благодаря специфическим механизмам подвижности вызывает распад или слияние митохондрий [8]. Пространственная структура, площадь и плотность разветвленной митохондриальной сети определяются типом ткани и ее потребностью в энергии [9] и, в свою очередь, обеспечивают регуляцию физиологического состояния клеток. Клетки сердечной, скелетной мышцы и нейроны характеризуются наиболее высокой плотностью митохондриальной сети, что и определяет их наибольшую чувствительность к нарушениям энергетического обмена различной этиологии. Процесс укрупнения митохондрий, их слияние в комплексы происходит благодаря белкам цитоскелета и имеет адаптационное значение при умеренных по силе стрессовых воздействиях. Если неблагоприятное воздействие выходит за границы физиологической нормы, наблюдается необратимый распад митохондриально-ретикулярной сети [10].

Целью нашего исследования стало изучение динамики скорости эндогенного дыхания в переживающем гомогенате ткани миокарда после вибрационного воздействия различной частоты и продолжительности.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 75 кроликах-самцах породы Шиншилла (*Oristolagus cuniculus, Linnaeus*) массой 2.5–3.0 кг, в возрасте трех-четырех месяцев. Действие общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм осуществляли с помощью промышленной установки УВ 70/200. Ежедневно в течение 7, 21 и 56 суток проводили

сеансы вибрации с частотой 8 Гц (низкочастотная вибрация) и 44 Гц (высокочастотная вибрация) по 60 мин в утренние часы с 9.00 до 11.00 в осенне-зимний период.

Некропсию животных осуществляли на фоне легкого эфирного наркоза методом воздушной эмболии путем введения в ушную артерию 5 мл воздуха. После вскрытия грудной клетки быстро извлекали сердце и помещали в среду выделения фиксированного состава, охлажденную до 0°С. Для имитации состава внутриклеточной среды использовали апробированные в других исследованиях [9] сложные солевые растворы. Концентрация компонентов среды выделения составляла 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-HCl (pH 7.2); концентрация компонентов среды инкубации – 10 мМ трис-HCl (pH 7.2), 20 мМ KH_2PO_4, 10 мМ $MgSO_4$, 150 мМ KCl. Все растворы готовили *ex tempore* на бидистиллированной воде.

После промывания от крови кусочки верхушки сердца массой примерно 250–300 мг помещали в охлажденный стальной пресс с отверстиями 1 мм и продавливали в калиброванный гомогенизатор Даунса из кварцевого стекла с тефлоновым пестиком при соотношении «среда выделения»: «ткань» = 1 : 2. Ткань разрушали мягкими продольными движениями пестика (15 тракций), затем гомогенат процеживали через капроновую сетку в охлажденную пробирку. Через 7–10 мин от момента извлечения тканей из организма животного получали 30%-й гомогенат [10].

Временной режим забора ткани миокарда, гомогенизации и инкубации был стандартизован. С момента забоя животного до окончания полярографического измерения показателей активности митохондрий тканей проходило не более 40 мин, что соответствовало методическим требованиям обеспечения адекватности статуса митохондрий *in vitro* их «нативному» состоянию, максимально приближенному к *in vivo* [10].

Для получения нативных митохондрий исключали этап промывки, использовали высококонцентрированный гомогенат, а из среды выделения и среды инкубации исключали этилендиаминтетрауксусную кислоту [8], тем самым сохраняя пул эндогенных метаболитов и уровни ионов Ca^{2+} и Mg^{+}, характерные для исходного состояния ткани на момент изъятия из организма животного-биомодели. Работа с митохондриями в составе тканевого гомогената обеспечивает их структурно-функциональную сохранность и позволяет дифференцировать экспериментальных животных по биоэнергетическому статусу ткани в зависимости от различных внешних воздействий, направленных на целостный организм [10].

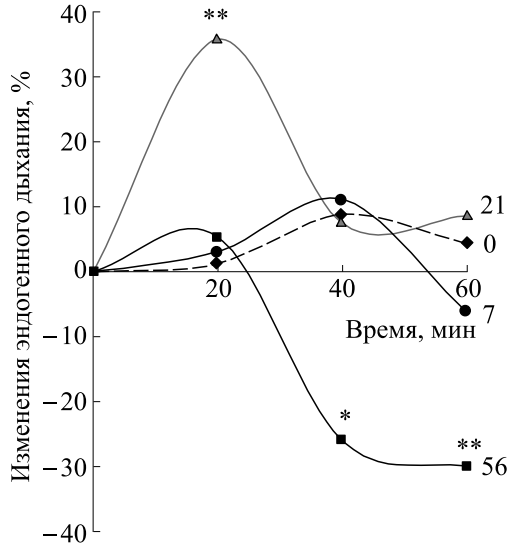
Изучение функционального состояния нативных митохондрий в составе гомогената проводили полярографическим методом с помощью закрытого кислородного датчика гальванического типа [11] в термостатируемой кювете объемом 1 мл при постоянном перемешивании в солевой среде инкубации, уравновешенной по газовому составу с воздухом при температуре 37°С. Полярографическая измерительная установка, в соответствии с требованиями метода, состояла из электрода, ячейки с перемешивающим стержнем, термостатируемого кожуха, водяного термостата I ТЖ-0 03 (Россия), магнитной мешалки ММ-3М (Россия), самописца LKB-2210 2-Channel Recorder (Швеция). Скорость дыхания митохондрий (V) выражали в (нг-атом О) $мин^{-1}$ $мг^{-1}$ белка.

Для оценки динамики истощения эндогенных энергетических субстратов в ткани использовали тест «временной деградации митохондрий» [7], в котором сопоставляли изменчивость скорости эндогенного дыхания ($V_э$) на протяжении 60 мин хранения гомогената в аэробных условиях при комнатной температуре 18–20°С. Каждые 20 мин отбирали пробы для измерения $V_э$ и относили значения к исходной скорости эндогенного дыхания, измеренной тотчас же после получения свежего гомогената.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA for Windows 6.0. Значимость межгрупповых различий оценивали по параметрическому (t-критерий Стьюдента) или непараметрическому (U-тест Вилкоксона–Манна–Уитни) критериям в зависимости от типа распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После семи сеансов вибрации с частотой 8 Гц на 60-й минуте наблюдали снижение скорости эндогенного дыхания относительно исходного уровня в 1.4 раза ($p < 0.01$), но после 56 сеансов вибрации был отмечен рост скорости дыхания гомогената на 40-й и 60-й минутах в 1.2 раза относительно исходного уровня ($p < 0.01$), достоверно превосходящий изменения в ткани интактного контроля. Вероятно, слабый раздражитель в виде низкочастотной непродолжительной (семь сеансов) вибрации, возбуждая ткань, одновременно включает компенсаторные механизмы, направленные на сохранение гомеостаза. Основным механизмом адаптивной компенсации на уровне системы энергопродукции клетки является активизация и регуляция (сдерживание) сукцинатзависимых реакций, в том числе и в переживающей ткани [12], вызывающие эффект «энергетического затормаживания» или «превентивное торможение» [11]. Подобное активное сдерживание сукцинатзависимой системы окисления соответствует отрегулированному состоянию энергетического обмена. Как предполагают, именно это



Влияние вибрации 44 Гц на изменчивость эндогенного дыхания ($V_э$) нативных митохондрий сердца кролика в тесте временной деградации. Ось абсцисс – время инкубации гомогената в минутах; ось ординат – диапазон и направленность изменений эндогенного дыхания в % от исходного уровня ($V_{э1}$). Цифры возле кривых – количество сеансов вибрации; * – статистически значимые различия с исходным показателем ($V_{э1}$); * – $p \le 0.05$, ** – $p \le 0.01$.

явление обеспечивает усиление процессов саногенеза и лечебный эффект вибрации с определенными физическими характеристиками, широко используемый в клинике целого ряда заболеваний [13, 14]. Значительный рост $V_э$ после 56 сеансов низкочастотной вибрации свидетельствует о «возбужденном» состоянии системы энергопродукции. Для подобного состояния ткани характерно преобладание активности сукцинатзависимой системы окисления, что соответствует стадии «резистентности» при формировании адаптивной реакции в системе энергопродукции митохондрий кардиомиоцитов или стадии I биоэнергетической гипоксии [12].

Динамика изменения скорости эндогенного дыхания после семи сеансов вибрации с частотой 44 Гц на 20-й и 40-й минутах переживания гомогената идентична интактному контролю (рис. 1). На 60-й минуте отмечается снижение показателя эндогенного дыхания относительно $V_{э1}$ в 1.1 раза и в 1.4 раза относительно $V_{э1}$ интактной контрольной группы ($p < 0{,}01$). Двадцать один сеанс высокочастотной вибрации вызвал резкий подъем эндогенного дыхания относительно нулевого показателя в 1.4 раза ($p < 0.01$) через 20 мин инкубации гомогената и в 1.1 раза – через 40 мин, оставаясь на данном уровне и через 60 мин переживания ткани в проводимом тесте. Это может свидетельствовать о крайне возбужденном состоянии ткани, когда скорости дыхания достигают максимальных величин, нарастая с 16.5 ± 4.2 у контрольных животных до 25.9 ± 6.6 (нг-атом О) мин$^{-1}$мг$^{-1}$ белка у животных, подвергнутых 21 сеансу вибрации с частотой 44 Гц, и происходит смена метаболических путей субстратного обеспечения миокарда с доминированием метаболизма янтарной кислоты [15].

После пролонгации вибрационного воздействия с частотой 44 Гц до 56 сеансов наблюдали падение скорости $V_э$ через 40 мин инкубации в 1.4 раза ($p < 0.05$) и дальнейшее плавное снижение до уровня 17.7 ± 5.7 (нг-атом О) мин$^{-1}$мг$^{-1}$ белка, что, вероятно, свидетельствует о развитии угнетения в системе окисления и утилизации янтарной кислоты, снижении доступности эндогенных субстратов к дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов, формированию низкоэнергетического сдвига и нарастании дистрофических изменений в ткани миокарда вплоть до развития некротических изменений [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее экспериментальное исследование посвящено изучению влияния общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм, частотой 8 и 44 Гц на протяжении 7, 21 и 56 сеансов по 60 мин на функциональную активность системы энергопродукции миокарда кролика посредством анализа скорости эндогенного дыхания в переживающих гомогенатах ткани сердца (миокарда) кролика.

Измерение дыхания митохондрий в составе тканевых гомогенатов проводилось полярографическим методом согласно методическим рекомендациям М.Н. Кондрашовой (ПНЦБИ РАН, Пущино).

Было обнаружено, что в процессе формирования ответной реакции миокарда на вибрационное воздействие с различной частотой и длительностью его энергетические потребности возрастают и начинают восполняться за счет эндогенных энергетических ресурсов, уровень и доступность которых отражается в скорости эндогенного дыхания ($V_э$) митохондрий в гомогенате ткани и зависит от физических параметров стрессирующего вибрационного фактора. Тест «временной деградации митохондрий», отражая оснащенность митохондрий миокарда эндогенными энергетическими субстратами, может выступать в качестве метаболического критерия функционального состояния ткани и свидетельствовать о силе клеточного ответа на воздействие вибрации.

В эксперименте *in vitro* подтвердили важность сохранения биофизической организации нативных митохондрий в тканевом гомогенате. Работа с концентрированными по белку гомогенатами тканей позволяет информативно выявить силу и

направленность возбуждающих и повреждающих воздействий в организме экспериментальных животных.

Динамика показателя скорости эндогенного дыхания митохондрий в тесте временной деградации на фоне вибрационного воздействия также косвенно свидетельствует о нарушении функции митохондриально-ретикулярной сети, ее распаде и утрате регулирующей функции в адаптации. Можно предположить, что эти процессы протекают параллельно смене «метаболических путей» при стрессирующем воздействии и находят выражение в формировании митохондриальной дисфункции или биоэнергетической гипоксии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№№10-04-00473, №13-04-00186).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики проведения доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009) и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. M. Janssen, A. Schiereck, and H. Honda, Pflugers Arch. **434** (6), 795 (1997).
2. T. A. Shishido, M. Sugimachi, and O. Kawaguchi, Amer. J. Physiol. **274**, 1404 (1998).
3. Е. Л. Потеряева, Е. Л. Амирнова и Н. Г. Никифорова, Медицина труда и промышленная экология, № 6, 19 (2015).
4. V. V. Vorobieva and P. D. Shabanov, Bull. Experim. Biol. Med. **147** (6), 768 (2009).
5. J. M. Saxton, Occup. Med. **50** (2), 121 (2000).
6. В. А. Панков и М. П. Дьякович, Медицина труда и промышленная экология, № 3, 1 (2003).
7. Л. Д. Лукьянова, Дис. ... д-ра биол. наук (Москва, 1971).
8. М. В. Захарченко, Н. В. Хундерякова и М. Н. Кондрашова, Биофизика **56** (5), 840 (2011).
9. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, Обзоры по клинич. фармакологии и лекарственной терапии **14** (1), 46 (2015).
10. М. Н. Кондрашова, Т. В. Сирота, А. В. Темнов и др., Биохимия **62** (2), 154 (1997).
11. *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, под ред. Г. М. Франка и М. Н. Кондрашовой (Наука, М., 1973).
12. Л. Д. Лукьянова, Патологическая физиология и экспериментальная терапия, № 1, 3 (2011).
13. С. А. Лытаев и А. Б. Шангин, Вестн. новых мед. технологий **6** (2), 11 (1999).
14. Д. И. Рощупкин, Е. Е. Фесенко и В. И. Новоселов, *Биофизика органов* (Наука, М., 2000).
15. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, Биофизика **64** (2), 337 (2019).
16. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **95** (8), 857 (2009).

A Change in the Content of Endogenous Energy Substrates in Rabbit Myocardium Mitochondria Depending upon Frequency and Duration of Vibration

V.V. Vorobieva and P.D. Shabanov

Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

A change in the content of energy substrates in myocardial mitochondria depending upon the vibration frequency and the duration of the total vertical vibration exposure was studied polarographically using a closed galvanic oxygen sensor (the Clark electrode) by comparing the endogenous respiration rates over a period when the homogenate was stored under aerobic conditions. After exposure to the longest vibration (56 sessions) with amplitude of 0.5 mm and frequency of 44 Hz, the rate of endogenous respiration after 40-min incubation of myocardial tissue homogenate was 1.4 times slower ($p < 0.05$) than the control. It indicated the development of bottlenecking in the oxidation and utilization pathways of succinic acid, a decrease in the availability of endogenous substrates to the respiratory chain of cardiomyocytes mitochondria and, indirectly mitochondrial-reticular network disruption and dysfunction.

Keywords: vibration, mitochondria, myocardial energy metabolism, succinic acid, mitochondrial-reticular network

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 724–733

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ

© 2021 г. В.В. Новиков*, Е.В. Яблокова*, А.П. Кадырков, Е.Е. Фесенко***

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

***Акционерное общество «Елатомский приборный завод», 391351, Рязанская обл., Касимовский район, раб. пос. Елатьма, ул. Янина, 25*

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 11.05.2021 г.
После доработки 07.06.2021 г.
Принята к публикации 08.06.2021 г.

Показано, что импульсные магнитные поля (первый режим: длительность импульсов 2 мс, частота повторения 6.25 Гц, форма импульсов – колоколообразная; второй режим: длительность импульсов 1 мс, частота повторения 100 Гц, форма импульсов – колоколообразная) влияют на интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов в широком диапазоне величин импульсных магнитных полей (0.0004–10 мТл). Для проявления обнаруженных этим методом эффектов импульсных магнитных полей требуется добавка в суспензию нейтрофилов активатора продукции активных форм кислорода – форбол-12-меристат-13-ацетата. Однако этот механизм действия импульсных магнитных полей на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах не является единственным, так как люцигенин-зависимая хемилюминесценция в системе без активаторов также реагирует на их действие.

Ключевые слова: импульсные магнитные поля, активные формы кислорода, нейтрофилы, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302921040128

В биомедицинских исследованиях установлен факт положительного влияния импульсной магнитной стимуляции при целом ряде патологий [1, 2], особенно при трудно заживающих переломах, на процессы репарации костной ткани [3–5]. Эта область применения магнитного поля (МП) получила поддержку в медицине в связи с ее эффективностью. В этих случаях используются в основном относительно сильные МП с индукцией порядка единиц и десятков мТл. В связи с этим речь может идти об электрохимическом механизме их действия, реализующемся за счет электромагнитной индукции коротких и мощных импульсов МП [6], и о механизме радикальных пар, основанном на реакциях с участием спин-коррелированных пар радикалов [7]. Являются ли эти, относительно хорошо изученные, механизмы единственными для устройств импульсной магнитной стимуляции, могли бы ответить специальные эксперименты по сравнению эффектов биологического действия вблизи индуктора МП (в зоне с миллитесловой индукцией МП) и на различных расстояниях от него, вплоть до зоны с нанотесловой интенсивностью импульсного магнитного поля (ИМП), которые проведены в настоящей работе.

Для проведения такого рода исследования необходимо наличие чувствительного к действию МП биологического объекта, реагирующего на него за короткое время, что позволило бы проводить одновременные сравнительные эксперименты при различных интенсивностях ИМП. В качестве такого объекта нами выбрана суспензия нейтрофилов, а именно процессы продукции свободных радикалов и других активных форм кислорода (АФК) в этой биологической системе. Ранее мы уже сообщали о том, что этот объект чувствителен как к действию комбинированных МП (КМП) с очень слабой переменной компонентой (нанотесловые и микротесловые индукции МП) [8–11], так и к действию гипомагнитного поля [12–15], поэтому представляется вполне обоснованным использовать его и для изучения эффектов ИМП.

Сокращения: МП – магнитные поля, ИМП – импульсные магнитные поля, АФК – активные формы кислорода, fMLF – N-формил-Met-Leu-Phe, ФМА – форбол-12-меристат-13-ацетат.

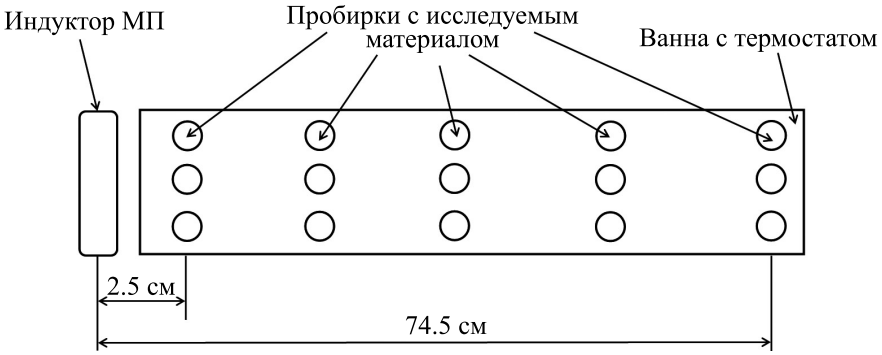


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для воздействия ИМП на суспензию нейтрофилов.

В данной работе мы применили метод клеточной хемилюминесценции для оценки активирующего/подавляющего действия ряда режимов ИМП на продукцию АФК нейтрофилами. В качестве источника ИМП был использован прибор «Алмаг+» (АО «Елатомский приборный завод», Рязанская область).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Установка для воздействия ИМП. Для генерации ИМП использовали стандартный терапевтический прибор «Алмаг+» с одним из индукторов, который представлял собой катушку медного провода (толщиной 0.16 мм, 750 витков). Индуктор крепили к краю ванны, в которой циркулировала подогреваемая жидкость (вода), как это показано на рис. 1. Амплитуда тока в проводе при первом режиме генерации ИМП составляла 1.1 А, во втором режиме генерации (обозначен на приборе цифрой «3») – 0.4 А. Параметры ИМП при режиме 1: амплитудное значение магнитной индукции на рабочей поверхности 20 мТл, длительность импульсов 2 мс, частота повторения импульсов 6.25 Гц, форма импульсов – колоколообразная. Параметры ИМП при режиме 2: амплитудное значение магнитной индукции на рабочей поверхности 6 мТл, длительность импульсов 1 мс, частота повторения импульсов 100 Гц, форма импульсов – колоколообразная.

Исследуемые образцы одновременно находились на разных расстояниях от индуктора: образцы 1 – 2.5 см, образцы 2 – 20.5 см, образцы 3 – 39.5 см, образцы 4 – 57.5 см, образцы 5 – 74.5 см. Измерение амплитуды ИМП производили миллитесламетром ТП-2У с диапазоном измерения 0.1–1999 мТл. При величинах, меньших 0.1 мТл, измеряли ИМП с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Экспериментальные образцы находились на оси катушки. Значения индукции ИМП на различных расстояниях от индуктора представлены в табл. 1.

Контрольные образцы инкубировали одновременно с опытными при такой же температуре. Они находились на расстоянии не менее 2 м от источника ИМП не по оси катушки (приблизительно под углом 90° к этой оси). В этом случае измерения не фиксировали ИМП от прибора, т.е. остаточные ИМП были незначительными (менее 10 нТл). Постоянная составляющая геомагнитного поля в зоне экспериментов, величиной приблизительно 36 мкТл, находилась под углом 68° к горизонтальной плоскости. Магнитный фон на промышленной частоте (50 Гц) не превышал 0.2 мкТл.

Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов. Активность двух режимов воздействия ИМП оценена при помощи метода хемилюминесценции на модели предактивации нейтрофилов. Выбор объекта и метода определялся

Таблица 1. Величина индукции ИМП на различных расстояниях от индуктора

№ образца	Расстояние от индуктора, см	Индукция ИМП, мТл	
		Режим 1	Режим 2
1	2.5	10.0	3.8
2	20.5	0.011	0.004
3	39.5	0.0011	0.0004
4	57.5	0.0007	0.00026
5	74.5	0.0005	0.000225

высокой чувствительностью, относительной простотой и коротким временем измерения функциональной активности фагоцитов. Принцип метода состоит в том, что в процессе стимуляции фагоциты продуцируют большое количество различных прооксидантов (супероксидный радикал, перекись водорода, гипохлорит), способных в процессе взаимодействия с люминолом генерировать мощную люминолзависимую хемилюминесценцию, интенсивность которой пропорциональна функциональной активности клеток [16].

Изученные режимы ИМП проверяли на их способность осуществлять предактивацию (прайминг) нейтрофилов. Для проверки этого действия ИМП суспензия нейтрофилов предварительно инкубировалась на протяжении 40 мин при действии ИМП, генерируемого прибором «Алмаг+».

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для выделения перитонеальных нейтрофилов использованы лабораторные мыши-самцы линии CD-1 массой 24–26 г, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино, Московская область). Для выполнения измерений в рамках одного экспериментального дня использовали суспензию нейтрофилов, полученную из одной мыши. Выделение клеток проводили в день проведения измерений. Для получения клеток 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 3 мл охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 *g*. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 1 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли не менее чем на 40 мин при 4°C (но не более чем на 4 ч, так как более длительное хранение клеток снижало хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на последующую добавку люминола и активаторов продукции АФК). 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%.

Инкубация суспензии нейтрофилов в ИМП. Для выполнения опытов образцы получали путем разведения суспензии нейтрофилов модифицированной средой Хенкса (138 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ $MgSO_4$, 1 мМ Na_2HPO_4, 5 мМ $NaHCO_3$, 5.5 мМ глюкозы, 1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл. Образцы по 0.25 мл находились в круглодонных кюветах из полистирола (d = 1.2 см, l = 5.5 см), в которых в дальнейшем проводили измерение хемилюминесценции. Нейтрофилы инкубировали при 37 ± 0.1°C в течение 40 мин. Заданную температуру поддерживали циркуляционным водным термостатом UH 4 (MLW, Германия).

Регистрация хемилюминесценции суспензии нейтрофилов при различных вариантах ее активации. После инкубации нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции полученных образцов при добавлении в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0.35 мМ. Для этого в пробу объемом 0.25 мл добавляли 0.1 мл водного раствора люминола в концентрации 9.45 мМ при pH 7.6, создаваемым добавкой NaOH, и содержащего диметилсульфоксид в концентрации 140 мМ. В суспензию нейтрофилов помимо люминола был добавлен активатор генерации активных форм кислорода – хемотаксический формилированный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкМ. Для этого в пробу объемом 0.26 мл добавляли 0.1 мл раствора fMLF в среде Хенкса в концентрации 27 мкМ, содержащего диметилсульфоксид в концентрации 33.3 мМ. Для регистрации хемилюминесценции был использован 12-канальный хемилюминометр Lum-1200 (ООО ДИСофт, Россия). Для анализа результатов использовали программу «PowerGraph».

В части опытов была использована схема двойной последовательной стимуляции нейтрофилов [17]. Для этого до начала инкубации в ИМП в суспензию клеток был добавлен другой активатор генерации АФК – форболовый эфир форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) (Sigma, США) в низких концентрациях (1 или 10 нМ), а после окончания инкубации хемилюминесцентный ответ регистрировали, как и ранее, на введение люминола и пептида fMLF. Таким образом, в этом случае на первом этапе опытов нейтрофилы стимулировали с помощью ФМА, агента с внутриклеточным механизмом действия (имитирующим диацилглицерол и напрямую активирующим мембранную протеинкиназу С [18]), а на втором этапе (при регистрации хемилюминесценции) проводили основную стимуляцию fMLF, агентом с внеклеточным механизмом действия (осуществляющим передачу сигнала через рецепторы fMLP [18, 19]). Такая двойная стимуляция приводит к максимально полному ответу нейтрофилов на эти стимулы и, следовательно, к

Таблица 2. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с активатором fMLF после 40 мин действия ИМП в режиме 1 на различных расстояниях от индуктора ИМП (при различной величине ИМП)

№ образца	Интенсивность хемилюминесценции		
	V	%	*p*
Контроль	3.26 ± 0.66	100 ± 20.2	
1	3.35 ± 0.84	102.8 ± 25.2	0.827337
2	3.39 ± 1.11	104.0 ± 32.8	0.815605
3	3.53 ± 0.82	108.3 ± 23.2	0.541369
4	2.81 ± 0.24	86.2 ± 8.4	0.090344

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

Таблица 3. Люминолзависимая хемилюминесценция с активатором fMLF после 40 мин действия ИМП в разных режимах (1 и 2) при различной величине ИМП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	*p*
Контроль	1	1.77 ± 0.21	100 ± 11.9	
1	1	2.20 ± 0.57	124.3 ± 26.1	0.152522
2	1	2.12 ± 0.53	119.8 ± 16.5	0.088948
Контроль	2	1.13 ± 0.15	100 ± 13.3	
1	2	1.51 ± 0.30	133.6 ± 19.9	0.030006
2	2	1.01 ± 0.10	89.4 ± 10.3	0.196490

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

улучшению чувствительности использованного метода [17].

Кроме этого, для детализации механизма действия ИМП проводили отдельную стимуляцию продукции АФК с помощью ФМА (без использования fMLF) в двух вариантах. В первом из них ФМА добавляли в пробу до начала инкубации клеток в ИМП, а затем через 20 мин при регистрации хемилюминесценции использовали добавку люминола. Второй вариант этих опытов – предварительная инкубация в ИМП без активаторов, а затем при регистрации хемилюминесценции добавка люминола и ФМА.

Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов для определения спонтанной продукции активных форм кислорода. 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. Следует отметить, что в этом случае дополнительная стимуляция активаторами продукции АФК (ФМА или fMLF) не проводилась, т.е. в этих опытах определяли фоновую продукцию супероксидного анион-радикала в нейтрофилах [15, 20, 21].

Представление результатов и их статистическая обработка. Значения интенсивности люминесценции соответствовали световому потоку, т.е. количеству фотонов в единицу времени: 1 В соответствует ≈ 1000 фотонов/с. 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

Предварительная обработка нейтрофилов в течение 40 мин при ИМП режима 1 не привела к значимому изменению показателей люминол-зависимой хемилюминесценции в ответ на введение активатора fMLF (табл. 2). Этот результат отмечается на всех исследованных расстояниях (первых четырех) от индуктора ИМП, т.е. в широком диапазоне значений индукции МП (0.0007–10 мТл). В отличие от этого, при использовании ИМП другого режима (режим 2) отмечается некоторое усиление хемилюминесцентного ответа (133.6%, $p = 0.030$) при максимально близком расстоянии от индуктора ИМП (табл. 3).

Таблица 4. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с двойной последовательной стимуляцией при различной величине ИМП МП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	*p*
Контроль*	1	12.19 ± 1.23	100 ± 10.1	
1*	1	15.33 ± 2.75	125.8 ± 17.9	0.044713
2*	1	16.62 ± 1.64	136.3 ± 9.9	0.000912
Контроль**	2	5.65 ± 0.92	100 ± 16.2	
1**	2	10.08 ± 2.43	178.4 ± 24.2	0.004191
2**	2	10.23 ± 2.68	181.1 ± 26.2	0.005645

Примечание. Стимуляция – 40 мин прединкубации в ИМП с ФМА, активация пептидом fMLF после инкубации в ИМП в присутствии люминола при регистрации хемилюминесценции. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; * – концентрация ФМА 10^{-8} М, ** – концентрация ФМА 10^{-9} М; $n = 6$.

При использовании более чувствительного способа двойной последовательной стимуляции (сначала, до инкубации в поле, низкими дозами ФМА, а затем, после 40 мин инкубации, при тестировании хемилюминесценции – активатором fMLF) отмечена более выраженная активация продукции АФК (табл. 4), по сравнению с изолированным использованием fMLF. Данный результат более выражен при обработке клеток параметрами поля второго режима. Следует отметить, что на расстояниях 2.5 и 20.5 см от индуктора при обоих исследованных режимах генерации импульсов (режимы 1 и 2) степень выраженности данного эффекта приблизительно одинакова.

Еще одно отличие в результатах обработки ИМП на различных режимах работы генератора ИМП проявляется при тестировании фоновой продукции супероксида методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции без использования дополнительных активаторов продукции АФК. В этом случае режим 1 приводит к снижению продукции супероксида по сравнению с контрольными образцами, а режим 2, напротив, стимулирует эту продукцию. Последнее особенно заметно на большем расстоянии от индуктора (20.5 см), т.е. при меньшей величине поля (табл. 5).

Учитывая то, что в первых опытах наиболее значительные результаты действия ИМП были отмечены при использовании метода двойной последовательной стимуляции нейтрофилов [17], мы изучили этот вариант опытов более подробно. Как видно из табл. 6 и рис. 2а, в повторных опытах при использовании режима 1 работы генератора ИМП отмечается выраженная стимуляция хемилюминесцентного ответа (до 73%) при максимальной индукции ИМП (на минимальном расстоянии от излучателя в 2.5 см). С увеличением расстояния от индуктора выраженность этого эффекта в этой серии опытов снижается (на расстоянии 20.5 см отмечена лишь стимуляция в 25%) и затухает (на расстоянии 39.5 см – 107%). Некоторое увеличение стимулирующей активности проявляется на максимальном расстоянии от индуктора – 74.5 см (на 14%), но только в виде

Таблица 5. Люцигенинзависимая хемилюминесценция без активаторов после 40 мин действия ИМП разных режимов (1 и 2) при различной величине ИМП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	*p*
Контроль	1	3.11 ± 0.32	100 ± 10.4	
1	1	2.11 ± 0.41	67.9 ± 19.6	0.001758
2	1	2.38 ± 0.23	76.5 ± 9.9	0.002165
Контроль	2	1.71 ± 0.18	100 ± 10.4	
1	2	1.84 ± 0.45	107.6 ± 24.3	0.561070
2	2	2.47 ± 0.40	144.4 ± 16.3	0.003857

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

Таблица 6. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с двойной последовательной стимуляцией при различной величине ИМП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	*p*
Контроль	1	2.38 ± 0.16	100 ± 6.7	
Образец 1	1	4.13 ± 0.95	173.5 ± 23.1	0.001063
Образец 2	1	2.97 ± 0.51	124.8 ± 17.3	0.024185
Образец 3	1	2.54 ± 0.20	106.7 ± 7.9	0.141013
Образец 4	1	2.42 ± 0.39	101.7 ± 16.0	0.824456
Образец 5	1	2.71 ± 0.52	113.9 ± 19.1	0.181259
Контроль	2	3.81 ± 0.37	100 ± 9.6	
Образец 1	2	5.07 ± 1.45	133.1 ± 28.5	0.058094
Образец 2	2	4.71 ± 0.37	123.6 ± 7.9	0.000549
Образец 3	2	4.50 ± 0.50	118.1 ± 11.1	0.011858
Образец 4	2	4.73 ± 1.09	124.1 ± 23.1	0.098439
Образец 5	2	4.90 ± 1.23	128.6 ± 25.2	0.081074

Примечание. Повторная серия опытов. Стимуляция – 40 мин прединкубации в ИМП с ФМА, активация пептидом fMLF после инкубации в ИМП в присутствии люминола при регистрации хемилюминесценции. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

тенденции (табл. 6). Здесь следует отметить, что ранее (в первой серии этих опытов) стимуляция продукции АФК была менее выраженной – до 36% (табл. 4).

При использовании второго режима работы генератора ИМП умеренная (на 18–33%) стимуляция отмечается на всех исследованных расстояниях от индуктора (при этом на расстояниях 20.5 и 39.5 см данные статистически значимы, а на других расстояниях эффект проявляется в виде тенденции) (табл. 6, рис. 2б). В первой серии этих опытов (табл. 4) в этом случае была отмечена более выраженная стимуляция (до 78%), но в ней были использованы более низкие концентрации ФМА (1 нМ), по сравнению с повторной серией опытов, в которой концентрация ФМА составляла 10 нМ.

Учитывая эти данные, мы проверили, как изменяются параметры хемилюминесценции нейтрофилов только при введении форболового эфира и люминола (без использования формилированного пептида). В табл. 7 представлены результаты опытов, когда ФМА вводили, как и ранее, до начала инкубации в ИМП, а люминол и

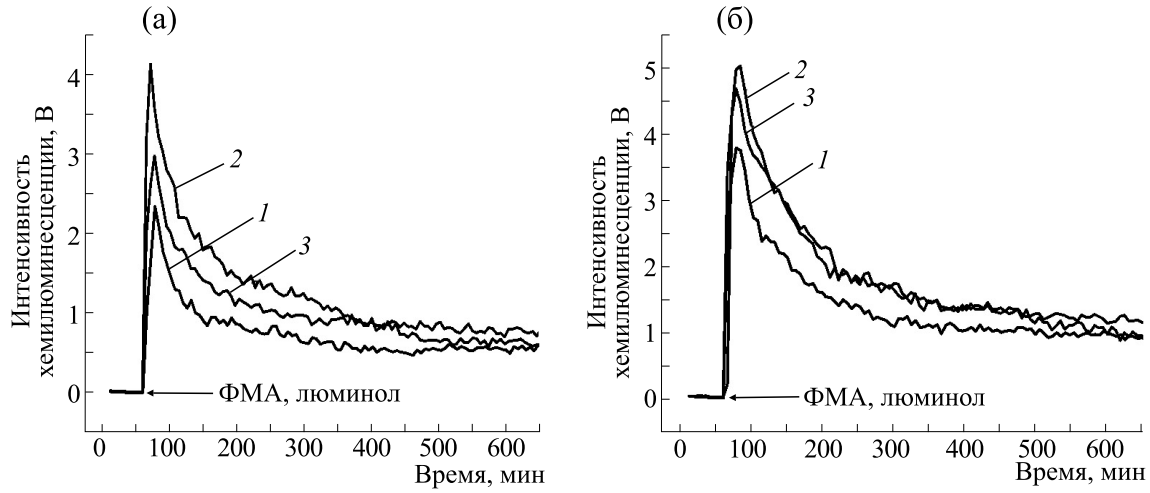


Рис. 2. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люминол и fMLF после 40 мин действия ИМП в присутствии 10 нМ ФМА. (а) – *1* – Контроль; *2* – режим 1 (длительность импульсов 2 мс, частота повторения импульсов 6.25 Гц), образец 1 (ИМП 10 мТл); *3* – режим 1, образец 2 (ИМП 0.011 мТл). (б) – *1* – Контроль; *2* – режим 2 (длительность импульсов 1 мс, частота повторения импульсов 100 Гц), образец 1 (ИМП 3.8 мТл); *3* – режим 2, образец 2 (ИМП 0.004 мТл).

Таблица 7. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с предварительной добавкой 10 нМ ФМА и 20 мин инкубации в ИМП, с последующей добавкой люминола при регистрации хемилюминесценции

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	*p*
Контроль		6.40 ± 0.54	100 ± 8.5	
1	1	7.04 ± 0.49	110.0 ± 7.0	0.203292
2	1	6.69 ± 0.85	104.5 ± 12.8	0.534872
5	1	6.86 ± 0.45	107.2 ± 6.6	0.174993
1	2	7.52 ± 0.26	117.5 ± 3.5	0.002397
2	2	7.01 ± 0.81	109.5 ± 11.5	0.192189
3	2	8.07 ± 0.48	126.1 ± 5.9	0.000537

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

последующий хемилюминесцентный ответ регистрировали через 20 мин (сразу после окончания инкубации в ИМП). Здесь следует отметить, что стимуляция продукции АФК в результате действия активатора ФМА это длительный процесс, развивающийся в течение десятков минут, что значительно превышает продолжительность этого процесса при стимуляции fMLF (минуты) [16].

Из данных, приведенных в табл. 7, следует, что в этом варианте опытов ответ на ФМА усиливается в основном при использовании второго режима ИМП, при этом он проявляется нелинейно на различных расстояниях от индуктора поля: на максимально близком расстоянии (2.5 см) – 117.5% ($p = 0.002$) ; на следующем расстоянии (20.5 см) он практически отсутствует – 109.5% ($p = 0.192$), а на расстоянии 39.5 см значительно выражен – 126.1% ($p = 0.001$).

В опытах с ФМА и люминолом, выполненных в другой последовательности – добавка ФМА после 40 мин инкубации в ИМП – отмечены слабо выраженные (~10%), но достоверные эффекты стимуляции при использовании обоих режимов генерации импульсов и на различных расстояниях от индуктора поля (табл. 8, рис. 3).

В повторных опытах без стимуляции активаторами продукции АФК при регистрации фоновой продукции супероксидного радикала методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции отмечается, как и ранее, снижение продукции супероксида при использовании первого режима работы генератора ИМП и тенденция к повышению его продукции при втором режиме ИМП (табл. 9). При этом эффекты имеют сложную зависимость от расстояния до индуктора ИМП. Например, ингибирующий эффект режима 1 проявляется при малых расстояниях (2.5 см), достигает максимума при его увеличении (20.5 см), затем

Таблица 8. Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов после 40 мин инкубации в ИМП без активаторов, с последующей добавкой 10 нМ ФМА и люминола при регистрации хемилюминесценции

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	*p*
Контроль		3.40 ± 0.11	100 ± 3.3	
1	1	3.73 ± 0.22	109.7 ± 5.8	0.016179
2	1	3.81 ± 0.31	112.1 ± 8.2	0.022186
5	1	3.70 ± 0.58	108.8 ± 15.8	0.286460
1	2	3.95 ± 0.24	116.2 ± 6.1	0.001382
2	2	3.47 ± 0.28	102.1 ± 8.0	0.603319
3	2	3.78 ± 0.25	111.2 ± 6.6	0.011834

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

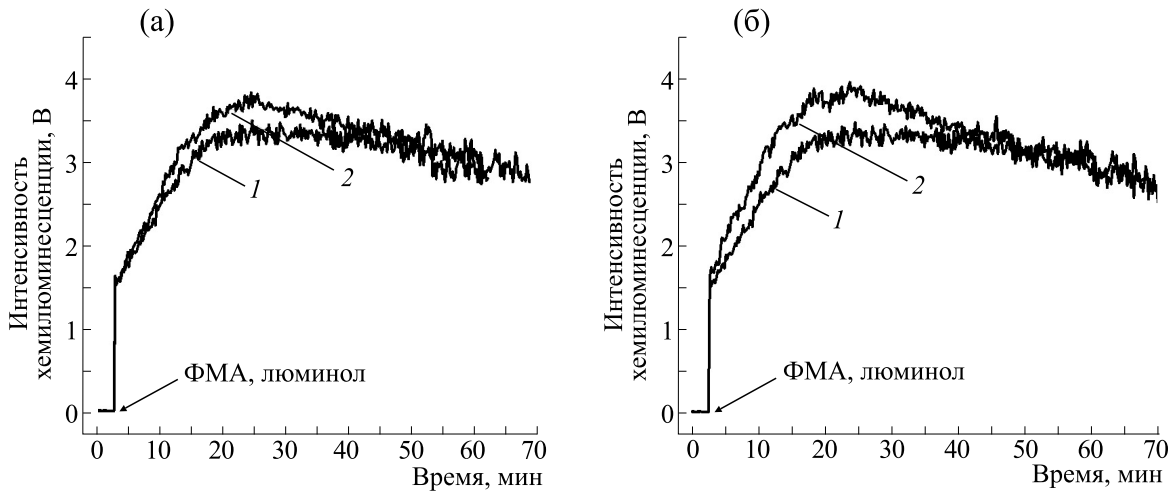


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люминол и ФМА после 40 мин действия ИМП. (а) – *1* – Контроль; *2* – режим 1 (длительность импульсов 2 мс, частота повторения импульсов 6.25 Гц), образец 1 (ИМП 10 мТл). (б) – *1* – Контроль; *2* – режим 2 (длительность импульсов 1 мс, частота повторения импульсов 100 Гц), образец 1 (ИМП 3.8 мТл).

пропадает (39.5 см и 57.5 см) и снова проявляется при увеличении этого расстояния (74.5 см).

В целом проведенное исследование свидетельствует о том, что полученные результаты подтверждают наличие биологической активности у изученных режимов ИМП и демонстрируют возможность с их помощью стимулировать нейтрофилы – одно из неспецифических звеньев системы естественной резистентности. Тем не менее проведенные ранее исследования [8–11, 22] показывают направления для повышения клинической эффективности изделий с использованием ИМП. В работах [8–11] отмечена более эффективная реакция по продукции АФК при воздействии слабых комбинированных МП, настроенных определенным образом на характеристические частоты ряда ионов. Действительно, в случаях с комбинированными МП вы-

Таблица 9. Люцигенин-зависимая хемилюминесценция без активаторов после 40 мин действия ИМП различных режимов (1 и 2) при различной величине ИМП ($n = 6$).

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	*p*
Контроль	1	1.72 ± 0.06	100 ± 3.5	
1	1	1.30 ± 0.14	75.6 ± 10.6	0.016664
2	1	1.13 ± 0.14	65.7 ± 12.8	0.000010
3	1	1.72 ± 0.13	100.0 ± 7.4	1.000000
4	1	1.76 ± 0.21	102.3 ± 11.7	0.683182
5	1	1.27 ± 0.14	73.8 ± 11.4	0.000088
Контроль	2	1.86 ± 0.18	100 ± 9.5	
1	2	2.17 ± 0.31	116.7 ± 14.4	0.073205
2	2	1.98 ± 0.28	106.5 ± 14.4	0.433604
3	2	2.15 ± 0.31	115.6 ± 14.3	0.090918
4	2	1.83 ± 0.23	98.4 ± 12.6	0.810386
5	2	2.15 ± 0.27	115.6 ± 12.8	0.060907

Примечание. Повторная серия опытов. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

раженные и разнонаправленные эффекты регистрируются уже при отдельной стимуляции нейтрофилов пептидом fMLF или форболовым эфиром ФМА, а для выявления эффектов ИМП потребовалось использование более чувствительного метода двойной последовательной стимуляции этими активаторами. Это обстоятельство позволяет предположить, что возможно существенное повышение эффективности работы терапевтических устройств ИМП за счет оптимизации их параметров.

Изученные клеточные механизмы активации нейтрофилов при действии ИМП свидетельствуют о том, что в этих эффектах важную роль играет модуляция активности протеинкиназы С, так как для проявления этих эффектов на уровне суспензии нейтрофилов потребовалось использование ФМА, вещества имитирующего диацилглицерол и напрямую активирующего мембранную протеинкиназу С [18], и усиливающего в связи с этим процессы фосфорилирования компонентов НАДФН оксидазы нейтрофилов. Однако НАДФН оксидаза нейтрофилов, по-видимому, является не единственным источником АФК, реагирующим на действие ИМП, так как люцигенин-зависимая хемилюминесценция без активаторов показывает разнонаправленное действие первого и второго исследованных режимов генерации ИМП на спонтанную продукцию АФК в этих клетках. Таким образом, проведенная нами работа позволила детализировать некоторые молекулярные и клеточные механизмы действия ИМП.

Касательно первичных механизмов биологического действия ИМП следует отметить, что электрохимический механизм их действия, реализующийся за счет электромагнитной индукции коротких и мощных импульсов МП [6], по-видимому, не может в изолированном виде объяснить некоторые выявленные в нашей работе эффекты, так как они наблюдаются и при значительном удалении от индуктора ИМП, т.е. в зоне слабого магнитного поля (менее 1 мкТл).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке АО «Елатомский приборный завод».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

А.П. Кадырков – зам. Директора по научной работе АО «Елатомский приборный завод». Остальные авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. S. Markov, Environmentalist **27**, 465 (2007).
2. M. S. Markov, In *Electromagnetic fields in biology and medicine*, Ed. by M. Markov (CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2015), pp. 15–28.
3. C. Galli, G. Pedrazzi, M. Mattioli-Belmonte, and S. Guizzardi, Int. J. Biomaterials **2018**, Art ID 8935750 (2018). DOI: 10.1155/2018/8935750
4. J Yuan, F Xin, W. Jiang, Cell Physiol. Biochem. **46**, 1581 (2018).
5. E. I. Waldorff, N. Zhang, and J. T. Ryaby, J. Orthopaed. Translation **9**, 60 (2017).
6. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Физматлит, М., 2011).
7. F. Barnes and B. Greenebaum, Bioelectromagnetics **36**, 45 (2015).
8. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **61** (3), 510 (2016).
9. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (1), 97 (2020).
10. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, and E. E. Fesenko, Electromag. Biol. Med. **39**, 364 (2020).
11. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, and E. E. Fesenko, Appl. Sci. **10** (9), 3326 (2020).
12. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **63** (3), 484 (2018).
13. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, Биофизика **64** (4), 720 (2019).
14. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И.А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (3), 524 (2020).
15. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И.А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (4), 735 (2020).
16. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
17. Е. В. Проскурнина, М. М. Созарукова, А. М. Полимова и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **161** (2), 288 (2016).
18. F. Rossi, P. Bellavite, G. Berton, et al., Adv. Exp. Med. Biol. **141**, 283 (1982).
19. В. Г. Сафронова, А. Г. Габдулхакова, А. В. Миллер и др., Биохимия **66**, 840 (2001).
20. T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest. **47**, 673 (1987).
21. А. А. Джатдоева, Е. В. Проскурнина, А. М. Нестерова и др., Биол. мембраны **34** (6), 116 (2017).
22. A. R. Liboff, Electromag. Biol. Med. 39, 45 (2020).

Effects of Pulsed Magnetic Fields on the Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils

V.V. Novikov*, E.V. Yablokova*, A.P. Kadyrkov, and E.E. Fesenko***

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

***Joint Stock Company "Elatomsky Instrument Plant", ul. Yanina 25, Elatma, Kasimovsky district of Ryazan region, 391351 Russia*

The present paper describes the effects of pulsed magnetic fields (mode 1: pulse duration 2 ms, 6.25 Hz repetition rate with bell-shaped pulses; mode 2: pulse duration 1 ms, 100 Hz repetition rate with bell-shaped pulses) on the intensity of luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils in a wide range of pulsed magnetic field amplitudes (0.0004–10 mT). In order to observe pulsed magnetic fields effects with the use of this method, it is necessary to add phorbol 12-meristaty 13-acetate, an activator of the production of reactive oxygen species, to the neutrophil suspension. However, this is not the only one mechanism by which pulsed magnetic fields may have an effect on reactive oxygen species production in neutrophils, since lucigenin-dependent chemiluminescence in the activator-free system is also sensitive to pulsed magnetic field exposure.

Keywords: pulsed magnetic fields, reactive oxygen species, neutrophils, chemiluminescence

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 734–740

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.181

СИНЕРГИЗМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЭКСТРАКТОВ *T. polium*

© 2021 г. Ш.А. Казарян, Л.Р. Рштуни, А.А. Оганесян

Институт биомедицины и фармации Российско-армянского университета, 0051, Ереван, ул. О. Эмина, 123, Армения

E-mail: shushanik.kazaryan@rau.am

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.
После доработки 24.09.2020 г.
Принята к публикации 25.12.2020 г.

Появление антибиотикорезистентных штаммов бактерий приводит к необходимости нахождения новых противобактериальных средств. Благодаря своим свойствам все чаще в качестве таких агентов рассматриваются наночастицы серебра и экстракты растений. Целью данной работы было как исследование антибактериальных свойств наночастиц серебра, так и изучение их совместного действия с экстрактами дубровника беловойлочного (*Teucrium polium*). Исследование антибактериальной активности против дикого штамма *E. coli* K-12 DSM 1116 и *S. aureus* MDC 5233 показало, что наночастицы серебра и 96%-й этанольный экстракт *T. polium* обладали антибактериальными свойствами. 70%-й этанольный экстракт *T. polium* не проявлял антибактериальных свойств, но потенциировал антибактериальную активность наночастиц серебра (в 4.5 раз против *E. coli* K-12, в 2.0 раза против *S. aureus*). 96%-й этанольный экстракт увеличил антибактериальную активность против *E. coli* K-12 в 4.2 раза, а против *S. aureus* – в 6.6 раза. Таким образом, наблюдается синергизм антибактериального действия комплексов экстрактов с наночастицами, который связан с различными механизмами действия составляющих компонентов.

Ключевые слова: наночастицы серебра, антибактериальная активность, экстракт T. polium, флавоноиды, рутин.

DOI: 10.31857/S000630292104013X

В последние годы все более актуальным становится вопрос борьбы с резистентностью бактерий к антибиотикам. Согласно Отчету ВОЗ за 2017 г. уже существует двенадцать классов патогенов с резистентностью к антибиотикам, способных приводить к летальному исходу [1]. Среди 51 клинически испытуемого препарата на данный момент только восемь определяются ВОЗ как инновационные, остальные – модификации уже известных антибиотиков. В связи с этим возникает необходимость нахождения структурно новых веществ с антибактериальными свойствами, из-за чего все большее внимание обращают на наночастицы. Наночастицы – это структуры с одним и более значением размерности, лежащем в нанометрическом диапазоне (1–100 нм), благодаря чему они проявляют свойства, отличные от свойств макроскопических веществ.

Издавна серебро было известно своими антибактериальными свойствами и использовалось в народной медицине, после его начали использовать в фармацевтических препарат, кремах, средствах личной гигиены и др. Благодаря этому, а также другим уникальным свойствам, все чаще в качестве антибактериального агента рассматриваются наночастицы серебра, которые широко используются для упаковки и хранения пищевых продуктов для повышения их срока годности, все чаще используют в различных областях фармацевтики и биомедицины [2].

Наночастицы серебра могут проявлять свою антибактериальную активность посредством множества механизмов, таких как: прямое взаимодействие с бактериальной клеточной стенкой; ингибирование образования биопленки; запуск врожденных, а также приобретенных иммунных реакций хозяина; генерация активных форм кислорода; индукция внутриклеточных эффектов (например, взаимодействие с ДНК и/или белками). Поскольку они не обладают одним и тем же механизмом действия стандартных антибиотиков, они могут быть применены против резистентных бактерий [3–5]. Рассматриваются также

Сокращения: ДФПГ – дифенилпикрилгидразил, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, АБА – антибактериальная активность, ФИК – фракционная ингибирующая концентрация, ОСФ – общее содержание флавоноидов.

другие стратегии, включая комбинированное использование растительных противомикробных препаратов с наночастицами [6]. Для этого целесообразно использовать растительные экстракты, уже содержащие активные компоненты с антимикробными свойствами. Таким растением является *T. polium*, экстракты которого, по литературным данным, содержат рутин, обладающий антибактериальными свойствами [7]. Тщательно изучена антимикробная активность рутина против штаммов различных бактерий: *E. coli, P. vulgaris, S. sonnei*, *Klebsiella sp.*, *P. auruginosa* и *B. subtilis* [8–11]. Показано, что рутин способен синергически усиливать антибактериальную активность других флавоноидов [12].

Таким образом, для того чтобы новый противомикробный препарат был эффективен в борьбе с бактериальной резистентностью, он должен действовать на нескольких клеточных уровнях, а не на один определенный уровень, как традиционные антибиотики. Очевидный перспективный подход в борьбе с резистентностью – это сочетание растительных антимикробных экстрактов с наночастицами серебра.

Целью данной работы было исследование антибактериальных свойств как наночастиц серебра (в работе использован препарат «Биоцидная добавка с наносеребром» производства ЗАО «Концерн «Наноиндустрия», Москва, Россия), так и совместное их действие с водно-этанольными экстрактами *T. polium,* а также с главными компонентами этих экстрактов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение экстрактов. Для получения экстрактов был использован аптечный *T. polium* («Антарам», Армения). Для экстрагирования использовали сухие измельченные растения в соотношении 1 г на 30 мл экстрагента, в качестве которого были использованы вода и этанол в концентрации 25, 50, 70 и 96%. Сухой растительный материал после механической гомогенизации подвергали воздействию ультразвуковом при 75 Вт и времени воздействия 15 мин (ультразвуковой гомогенизатор Sonic-150W, MRC Ltd., Израиль). После 24-часовой инкубации на качалке (60–70 об/мин) экстракты центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин [13].

Определение общего содержания флавоноидов. Общее содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически благодаря способности флавоноидов хелатировать атомы Al^{3+} и образовывать комплексы желтого цвета, детектируемые при 430 нм [14]. Для этого к 0.5 мл экстракта добавляли 0.1 мл 10%-го раствора $AlCl_3$ и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в присутствии 0.1 М раствора ацетата натрия. Оптическую плотность образцов определяли в кювете с рабочей длиной 10 мм на UV/Vis-спектрофотометре JENWAY 6405 (Jenway Bibby Scientific Ltd., Великобритания).

Определение антирадикальной активности. Антирадикальная активность исследуемых экстрактов была измерена с помощью колориметрического метода с использованием стабильного радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ) [15].

Для измерения антирадикальной активности компонентов экстрактов использовали 100 мкМ раствор ДФПГ. Аликвоты от каждого разбавления объемом 40 мкл смешивали с 360 мкл раствора ДФПГ. Полученные образцы инкубировали в течение 15 мин при температуре 30°C, далее оптическую плотность измеряли на спектрофотометре JENWAY 6405 при 517 нм. В качестве негативного контроля использовали этанол, в качестве позитивного контроля – спиртовый раствор кверцетина.

Из дозозависимых кривых антирадикальной активности экстрактов определяли значения IC_{50}, показывающие количество экстракта, необходимое для тушения 50% радикала ДФПГ в 1 мл раствора.

Анализ экстрактов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для определения мажорных компонентов из класса флавоноидов использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, США) со спектрофотометрическим и диодно-матричным детекторами и программным обеспечением обработки данных MassLynx. Разделение проводили на колонке C-18 (250 × 4 мм с размером частиц 4.5 нм) при скорости элюции 1 мл/мин со следующей градиентной элюирующей системой: деионизированная вода с 0.1 мл/л 90%-й ортофосфорной кислотой (раствор А) – ацетонитрил (раствор Б); 0–5 мин линейно раствор А доводили от 10 до 40%, далее до 50% в течение следующих 3 мин, поддерживая изократически данное соотношение растворов на протяжении последних 12 мин. В качестве стандартов использовали этанольные растворы следующих флавоноидов в концентрации 1 мг/мл: кверцетин (Rt = 10.62 мин), рутин (Rt = 6.63 мин), апигенин (Rt = 11.57 мин), кемпферол (Rt = 8.71 мин), генистеин (Rt = 12.88 мин), нарингенин (Rt = 12.78 мин) (все препараты – фирмы Sigma Aldrich, США). Детекцию проводили при 365 нм для кверцетина, рутина, апигенина и кемпферола, 290 нм – для нарингенина, 261 нм – для генистеина.

Определение антибактериальной активности. Исследование антибактериальной активности (АБА) проводили диск-диффузионным методом против штамма дикого типа *Escherichia coli* K-12 DSM 1116 и непатогенного *Staphylococcus aureus* MDC 5233 (любезно предоставлены из коллекции

Площади зон лизиса при воздействии экстрактами и наночастицами серебра на *E. coli* и *S. aureus*

Образец	Площадь зоны лизиса, кв. пиксели	
	E. coli	*S. aureus*
96% $Эт_{T.\ polium}$	13124 ± 29	9269 ± 17
70% $Эт_{T.\ polium}$	–	–
Рутин	109 ± 21	123 ± 7
Наночастицы серебра	7151 ± 76	6319 ± 97
96% $Эт_{T.\ polium}$ + наночастицы серебра	54865 ± 32	61021 ± 35
70% $Эт_{T.\ polium}$ + наночастицы серебра	32066 ± 17	12507 ± 12
Рутин + наночастицы серебра	5714 ± 23	12417 ± 113
Ампициллин	3894 ± 45	5325 ± 24

Примечание. АБА не выявлена, достоверные отличия, $p < 0.05$.

член-корр. НАН РА А.А. Трчуняна). После 24 ч инкубации для *E. coli* и 48 ч инкубации для *S. aureus* при 37°C в CO_2-инкубаторе (MRC Ltd., Израиль) бактерии разводили стерильной дистиллированной водой до опти ческой плотности 0.5 (стандарт МакФарланда), что соответсвует 10^8 бактериальных клеток. Далее проводили высев на чашки Петри с агаризованными питательными средами, в которых проделывали лунки диаметром 8 мм с внесением 0.1 мл исследуемого дисперсного раствора наночастиц серебра (0.105 мг/мл), экстракта, рутина (3.74 мкг/мл), рутина с наночастицами серебра (0.105 мг/мл) или наночастиц серебра (0.105 мг/мл) с экстрактом, стандартизованным по рутину. В качестве положительного контроля использовали раствор ампициллина (1 мг/мл), отрицательного контроля – этанол. Чашки инкубировали в термостате в течение 20–24 ч, после чего путем фотографирования фиксировали результаты эксперимента. Зону лизиса определяли в пикселях с помощью программы Image Repair 3.19 [16].

Спектральный анализ взаимодействия наночастиц серебра со спиртовым раствором рутина и экстрактами *T. polium* проводили на спектрофотометре UV/Vis-18 (MRC, Израиль).

Определение индекса фракционной ингибирующей концентрации. Индекс фракционной ингибирующей концентрации (ФИК) был рассчитан для оценки комбинированного антимикробного эффекта антибиотиков и наночастиц серебра следующим образом [17]:

ФИК = Зона лизиса (кв. пикселей) экстракта/рутина в комбинации с наночастицами/Зона лизиса (кв. пикселей) экстракта/рутина без наночастиц.

Существуют различия в интерпретации индекса ФИК. В настоящем исследовании антибактериальные эффекты экстракта/рутина в комбинации с наночастицами серебра оценивали по индексу ФИК как синергетические (ФИК ≥ 2), аддитивные (1 ≤ ФИК ≤ 2) или индифферентные/антагонистические (ФИК ≤ 0.5).

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали *t*-тест Стьюдента, за статистическую погрешность принимали $p < 0.05$. Биологическая повторяемость опытов – четырех-шестикратная при проведении двух-трех серий в каждом опыте. В таблице и на графике (рис. 1) приведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение общего содержания флавоноидов (ОСФ) показало, что наибольшее их количество содержалось в экстрактах *T. polium*, полученных с помощью 50, 70 и 96%-го этанола и составляло 24.900 ± 0.075 мкг/мл, 26.34 ± 0.11 мкг/мл и 22.110 ± 0.042 мкг/мл соответственно (рис. 1). С учетом выхода ОСФ более активными экстрагентами являются 50%-й и 70%-й этанол. Низкие же значения ОСФ, наблюдаемые у водных экстрактов, можно связать с гидрофобностью большинства флавоноидов, так, в водном экстракте ОСФ составляло 3,8 ± 0,08 мкг/мл, а в 25%-м этанольном экстракте *T. polium* – 9.34 ± 0.054 мкг/мл.

При исследовании антирадикальных свойств полученных экстрактов было обнаружено, что все экстракты проявляют дозозависимый характер антирадикальной активности. При этом максимальной радикалвосстанавливающей/гасящей

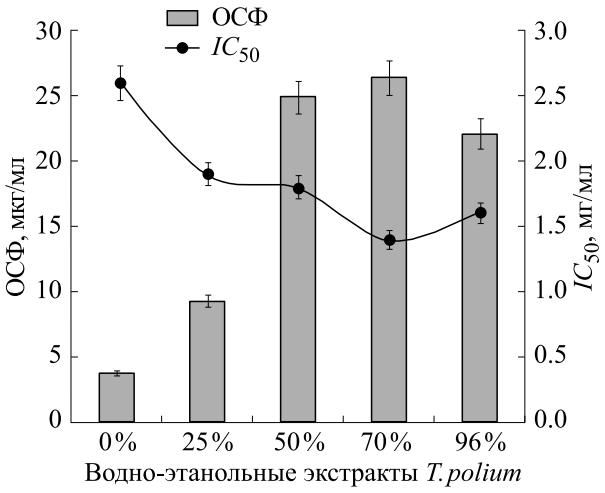


Рис. 1. Значения ОСФ и IC50 водно-этанольных экстрактов *T. polium*.

активностью среди всех экстрактов обладает 70%-й этанольный экстракт *T. polium* (IC_{50} = = 1.400 ± 0.051 мг/мл). Остальные экстракты *T. polium* по убыванию проявляемой антирадикальной активности можно выстроить в ряд: 96%-й этанольный экстракт; 50%-й этанольный экстракт; 25%-й этанольный экстракт и водный экстракт, с соответствующими значениями IC_{50}, равными 1.6 ± 0.020 мг/мл, 1.8 ± 0.026 мг/мл, 1.9 ± 0.017 мг/мл и 2.6 ± 0.032 мг/мл (рис. 1).

Для уточнения флавоноидного профиля экстрактов *T. polium* был проведен ВЭЖХ-анализ на содержание кверцетина, рутина, апигенина, кемпферола, генистеина и нарингенина. По результатам стало ясно, что использование в качестве экстрагента этанола в концентрации меньшей, чем 70%, препятствует экстрагированию исследуемых нами флавоноидов. В экстрактах, полученных с помощью 96%-го и 70%-го этанола, были детектированы рутин и генистеин, в то время как в остальных экстрактах не удалось детектировать вышеупомянутые флавоноиды (рис. 2). В 96%-м этанольном экстракте *T. polium* рутин был детектирован в концентрации 2.1 мкг/мл, генистеин – 0.15 мкг/мл, а в 70%-м этанольном экстракте *T. polium* концентрация рутина составила 3.74 мкг/мл, генистеина – 0.21 мкг/мл. Следует отметить, что использование в качестве экстрагента 70%-го этанола приводит к увеличению не только ОСФ и IC_{50}, но и в 1.78 раза повышает выход рутина и в 1.4 раза – генистеина. В связи с тем, что в остальных экстрактах не удалось детектировать вышеперечисленные флавоноиды, дальнейшие исследования по определению антибактериальной активности были проведены только с 96 и 70%-ми этанольными экстрактами.

Антибактериальную активность определяли по площади зоны лизиса в кв. пикселях, результаты представлены в таблице. Как видно из табличных данных, 70%-й этанольный экстракт *T. polium* не обладал АБА ни в отношении *E. coli,* ни *S. aureus*, однако она появлялась при совместном воздействии с наночастицами серебра. При этом сами наночастицы серебра обладают антибактериальной активностью, однако в разы уступающей таковой при совместном их действии. В отличие от них, 96%-й этанольный экстракт *T. polium* сам обладал выраженной АБА как против *E. coli,* так и против *S. aureus,* при совместном же действии с наночастицами серебра данная активность увеличилась более чем в четыре раза против

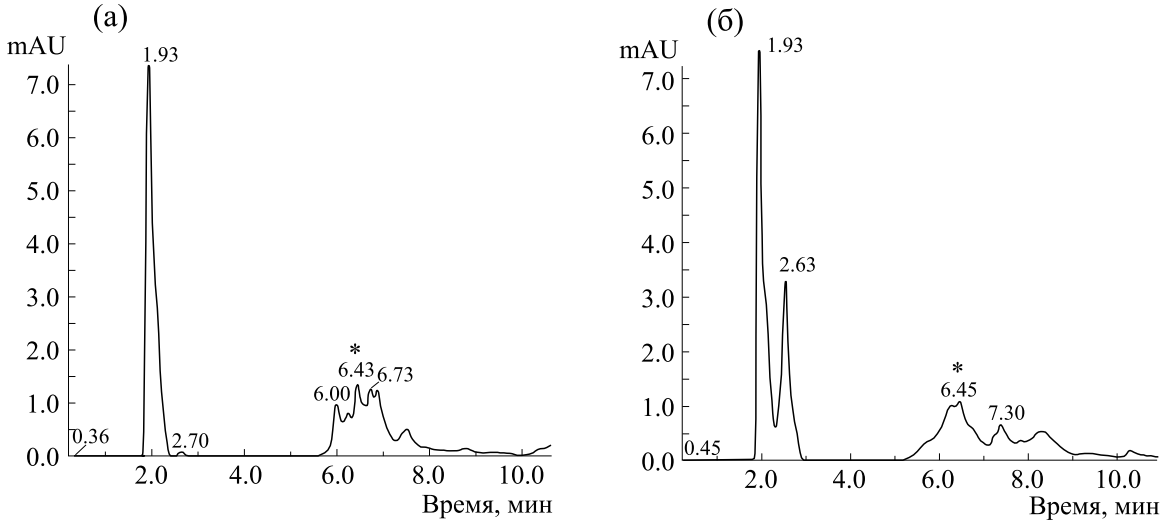


Рис. 2. ВЭЖХ-анализ содержания активных компонентов в 96%-х (а) и 70%-х (б) этанольных экстрактах *T. polium* (* – рутин).

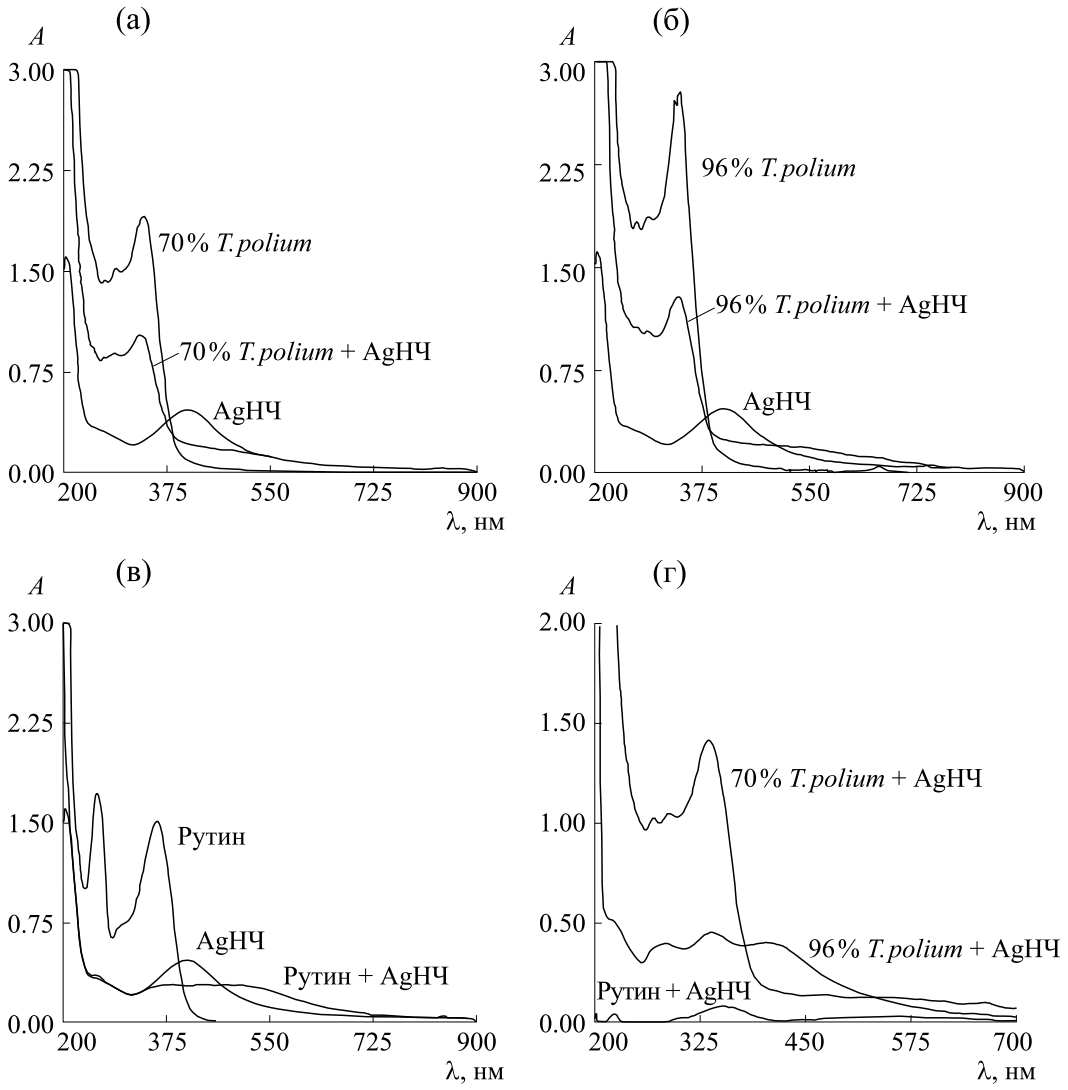


Рис. 3. Спектры поглощения экстрактов *T. polium* и рутина: (а)–(в) – при их непосредственном взаимодействии с наночастицами серебра, (г) – через 24 ч инкубации.

E. coli и более чем в шесть раз против *S. aureus*. Данный эффект не может быть связан только с содержанием рутина, так как в 70%-м этанольном экстракте его концентрация выше, однако проявляемый эффект намного меньше, чем у 96%-го этанольного экстракта, содержащего меньшее количество рутина. Следует отметить, что рутин обладает незначительной АБА, однако при совместном действии с наночастицами серебра появляется АБА, уступающая таковой для наночастиц серебра против *E. coli* и превышающая АБА против *S. aureus*. Помимо этого, при воздействии аналогичных доз «зеленых» наночастиц серебра (т.е. синтезированных с помощью экстракта *O. araratum*), полученных в нашей лаборатории, наблюдается выраженная АБА, в 13.9 раза превышающую таковую для наночастиц серебра против *E. coli* и в 23.8 раза – против *S. aureus* [18].

Для понимания механизма воздействия на рост *E. coli* и *S. aureus* был проведен спектральный анализ взаимодействия наночастиц серебра с 70 и 96%-ми этанольными экстрактами *T. polium*, а также рутином, результаты которого приведены на рис. 3. Как видно из этого рисунка, спектр наночастиц серебра нивелируется при взаимодействии с экстрактами, что характеризует наличие взаимодействия между наночастицами и компонентами экстракта. В случае взаимодействия с рутином аналогичный характер нивелирования спектра поглощения наночастиц говорит о том, что определенный вклад в данное взаимодействие оказывается именно данным компонентом экстрактов. И если в случае взаимодействия с 70%-м этанольным экстрактом *T. polium* спустя 24 ч образовавшийся комплекс остается стабильным (рис. 3г), то при взаимодействии с 96%-м

этанольным экстрактом комплекс частично распадается и происходит наложение спектров поглощения экстракта и наночастиц. При взаимодействии с рутином спектры взаимодействия спустя сутки инкубации не остались прежними, однако и не повторяли спектры отдельных компонентов инкубационной смеси, из чего можно судить об образовании новых комплексов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя механизм антибактериального действия наночастиц серебра до сих пор известен не полностью [19, 20], есть доказательства того, что из структуры наночастиц могут высвобождаться ионы Ag^+, которые, как известно, проявляют антимикробную активность при взаимодействии с тиолсодержащими белками. Главным отличием при использовании наночастиц серебра и Ag^+ как антимикробных веществ является концентрация: для достижения желаемого эффекта достаточно наномолярных концентраций наночастиц и микромолярных концентраций иона серебра.

Антибактериальная активность наночастиц серебра проявляется разносторонними механизмами действия. Наночастицы серебра способны образовать «ямы» в клеточных стенках бактерий, также взаимодействовать с белками электронтранспортной цепи мембран, приводя к понижению содержания АТФ и генерации активных форм кислорода. Интерес к наночастицам серебра повышается в связи с их способностью поливалентного взаимодействия как с поверхностью клеточной стенки, так и внутри цитоплазматических биополимерных цепей, приводя к изменению их конформационной энтропии. Например, цитотоксичность наночастиц серебра проявляется и в связи с взаимодействием со структурными элементами рибосом и ДНК, останавливая трансляцию, репликацию и приводя к гибели клетки [21, 22].

Наночастицы серебра обладают несколькими бактерицидными механизмами действия одновременно, что может объяснить тот факт, почему бактериальная резистентность к серебру редка, однако еще больший антимикробный эффект достигается при их совместном использовании с растительными вторичными метаболитами [23].

Полученные нами результаты показывают, что антибактериальный эффект наночастиц серебра, диспергированных в экстрактах *T. polium*, выше, чем у наночастиц. Это может объясняться тем, что сами экстракты содержат антиоксиданты и мембрано-защитные компоненты, в частности рутин. А одним из механизмов действия наночастиц серебра является ион-опосредованное действие гибели клетки с формированием свободных радикалов: активных форм кислорода и азота.

В настоящем исследовании мы оценивали синергетический эффект экстрактов *T. polium* и наночастиц серебра, вводимых в дозах меньших, чем их минимальная ингибирующая концентрация (данные не приводятся). Потенциальные синергетические антибактериальные эффекты были определены количественно по индексу функциональной ингибирующей концентрации, который был определен с использованием минимальной ингибирующей концентрации, полученных методом микродилюционного контроля [17].

Расчеты значений ФИК показали, что действие 96%-го этанольного экстракта *T. polium* в комплексе с наночастицами против роста *E. coli u S. aureus* имеет синергетическое действие (2.7 и 3.9 соответственно). Аналогичная картина наблюдатся и при действии 70%-го этанольного экстракта *T. polium* в комплексе с наночастицами серебра со значениями ФИК 4.5 и 2.0 соответственно для *E. coli u S. aureus*. В отличие от вышеуказанного, комплекс рутина с наночастицами обладает лишь аддитивными свойствами. Проявляемый синергизм связан с различными механизмами действия компонентов экстрактов и наночастиц, а также их комплексов.

Антибактериальная активность наночастиц серебра неспецифична и зависит от формы, размера, заряда и т. д. Наши эксперименты показали, что наночастицы серебра могут усиливать антибактериальное действие антибиотиков ампициллина как аддитивно, так и синергетически в зависимости от дозы [24]. Важно отметить, что синергетические эффекты комплексов наночастиц серебра с экстрактами *T. polium* против роста *E. coli* и *S. aureus* можно использовать для комплексного подхода в антибиотикотерапии. Наши исследования подтвердили синергетический антимикробный эффект наночастиц серебра в комплексе с экстрактами *T. polium*, что может уменьшить дозу и токсичность этих наночастиц.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Willyard, Nature **15**, 543 (2017). DOI: 10.1038/nature.2017.21550
2. V. Leso, L. Fontana, M. C. Mauriello, et al., Curr. Nanosci. **13**, 55 (2017).

3. M. K. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle, et al., J. Appl. Microbiol. **112** (5), 841 (2012). DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x
4. P. V. Baptista, M. P. McCusker, A. Carvalho, et al., Front. Microbiol. **9**, 1441 (2018). DOI: 10.3389/fmicb.2018.01441
5. C. Bankier, R. K. Matharu, Y. K. Cheong, et al., Sci. Rep. **9**, 16074 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-52473-2
6. 6I. Górniak, R. Bartoszewski, and J. Króliczewski, Phytochem. Rev. **18**, 241 (2019). DOI: 10.1007/s11101-018-9591-z
7. O. Milošević-Djordjević, M. Radović Jakovljević, A. Marković, et al., Turk. J. Biol. **42** (2), 152 (2018). DOI: 10.3906/biy-1707-36
8. A. Ganeshpurkar and A. K. Saluja, Saudi Pharm. J. **25** (2), 149 (2017). DOI: 10.1016/j.jsps.2016.04.025
9. G. C. Chiou and X. R. Xu, J. Ocul. Pharmacol. Ther. **20** (2), 107 (2004).
10. S. Dubey, A. Ganeshpurkar, D. Bansal, et al., Chron. Young Sci. **4**, 153 (2013).
11. S. Dubey, A. Ganeshpurkar, A. Shrivastava, et al., Ind. J. Pharmacol. **45** (4), 415 (2013).
12. A. C. Abreu, A. J. McBain, and M. Simoes, Nat. Prod. Rep. **29** (9), 1007 (2012).
13. Ш. А. Казарян, Л. Р. Рштуни, М. Л. Геворкян и др., Вестн. РАУ **2**, 86 (2016).
14. G. Gasparyan, S. Tiratsuyan, Sh. Kazaryan, et al., J. Exp. Biol. Agricult. Sci. **3** (2), 174 (2015).
15. L. L. Mensor, F. S. Menezes, G. G. Leitão, et al., Phytother Res. **15** (2), 127 (2001). DOI: 10.1002/ptr.687
16. D. G. Asatryan, G. S. Sazhumyan, and H. S. Shahverdyan, Math. Problems Comput. Sci. **28**, 88 (2007).
17. L. V. da Silva, M. T. Araújo, K. R. N. dos Santos, et al., Mem. Inst. Oswaldo Cruz **106** (1), 44 (2011).
18. S. A. Ohanyan, L. R. Rshtuni, H. V. Grabski, et al., Biol. J. of Armenia **71** (3), 89 (2019).
19. G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, et al., Molecules **20** (5), 8856 (2015) DOI: 10.3390/molecules20058856
20. A. Abbas, S. S. Naz, and S. A. Syed, Pak. J. Agri. Sci. **56** (1), 113 (2019).
21. F. Mirzajani, A. Ghassempour, A. Aliahmadi, et al., Res. Microbiol. **162** (5), 542 (2011).
22. I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, et al., Int. J. Nanomed. **15**, 2555-2562 (2020). DOI: 10.2147/IJN.S246764
23. N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, et al., Nanomedicine **12** (3), 789 (2016) DOI: 10.1016/j.nano.2015.11.016
24. M. E. Samberg, P. E. Orndorff, and N. A. Monteiro-Riviere, Nanotoxicology **5**, 244 (2011).

Synergistic Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles and T. polium Extracts

Sh.A. Kazaryan, L.R. Rshtuni, and A.A. Hovhannisyan

Institute of Biomedicine and Pharmacy, Russian-Armenian University, 123 Hovsep Emin str., Yerevan, 0051, Armenia

The emergence of antibiotic-resistant bacterial strains leads to the need to find new antibacterial agents. Due to their properties, silver nanoparticles and plant extracts are more often considered as promising antibacterial agents. The aim of this work was to study the antibacterial properties of silver nanoparticles and evaluate the potential effect from the combination of silver nanoparticles and *Teucrium polium* extract. In this study, we investigated the antibacterial activity of silver nanoparticles and 96% ethanolic extract of *T. polium* against wild strains of *E. coli* K-12 DSM 1116 and *S. aureus* MDC 5233. The results showed that the plant extract and silver nanoparticles have antibacterial effects. 70% ethanol extract of *T. polium* had no antibacterial effect, but provided an increase in the antibacterial activity of silver nanoparticles (by 4.5 times against *E. coli* K-12, by 2 times against *S. aureus*). 96% ethanol extract allowed for increased antibacterial activity of silver nanoparticles against *E. coli* K-12 (by 4.2 times) and *S. aureus* (by 6.6 times). Thus, the synergistic antibacterial effects is observed in the interaction between the extract and nanoparticles that might be due to different mechanisms of action of the constituents.

Keywords: silver nanoparticles, antibacterial activity, T. polium extract, flavonoids, rutin

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 741–749

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3;57.042

РЕГУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В МАЛЫХ ДОЗАХ

© 2021 г. А.Г. Кудяшева*, Н.Г. Загорская*, О.В Раскоша*, Л.Н. Шишкина**

**Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28*

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

E-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.
После доработки 13.04.2021 г.
Принята к публикации 20.04.2021 г.

Изучено влияние раздельного и совместного действия нитрата свинца в широком диапазоне доз, уранилнитрата и хронического γ-излучения в малой дозе на формирование окислительного стресса в печени мышей линии СВА (самцы) и морфофункциональное состояние щитовидной железы в ранние и отдаленные сроки после окончания воздействий. Выявлен сложный и неоднозначный характер изменений параметров системы регуляции окислительных процессов в печени мышей и морфофизиологические перестройки в щитовидной железе. Масштаб и направленность этих изменений зависели от возраста животных, химической природы токсикантов и их концентрации, времени после окончания воздействий. Анализ литературы и полученные данные позволяют сделать заключение о невозможности прогнозирования последствий обитания млекопитающих в неблагоприятных экологических условиях путем экстраполяции результатов из области больших доз к малым дозам полютантов.

Ключевые слова: регуляция, перекисное окисление липидов, нитрат свинца, уранилнитрат, хроническое облучение, малые дозы.

DOI: 10.31857/S0006302921040141

В настоящее время не вызывает сомнения, что воздействие любых повреждающих факторов на биологические объекты вызывает формирование комплекса биохимических реакций, рассматриваемых как окислительный стресс. Это обусловлено нарушением регуляции окислительных процессов в тканях, стационарный уровень которых в норме поддерживается физико-химической системой регуляции, функционирующей как на мембранном, так и органном уровнях [1, 2]. Анализ взаимосвязей между различными показателями данной регуляторной системы позволил предложить новый подход для оценки биологических последствий воздействия повреждающих факторов разной природы и мощности по изменению масштаба и направленности корреляций между тесно взаимосвязанными в норме разными показателями физико-химической системы регуляции в тканях опытных животных [3].

Хозяйственная деятельность человека способствует появлению новых территорий, биота которых подвергается хроническому воздействию факторов разной природы. Среди загрязнителей распространены ионы свинца, уранилнитрат, низкоинтенсивное ионизирующее излучение. Поступление свинца в организм человека в течение длительного времени вызывает повреждение головного мозга и почек, оказывает токсическое воздействие на развитие плода и процесс сперматогенеза [4–6]. Природа токсичности соединений урана при поступлении в организм обусловлена как радиоактивными свойствами изотопов урана, так и их химическим влиянием на обмен веществ [7–9]. Установлено, что при длительном обитании природных популяций мышевидных грызунов на территориях с повышенным радиационным фоном в Республике Коми или загрязненных радионуклидами в зоне аварии на Чернобыльской АЭС процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) участвуют в их адаптации к изменившимся условиям окружающей сре-

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, ПДК – предельно допустимая концентрация, ФЛ – фосфолипиды, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, КЛ – кардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы фосфолипидов, СМ – сфингомиелин.

ды за счет перехода системы регуляции на новый уровень функционирования [10, 11].

Эффективность действия стресс-факторов может быть связана и с изменением состояния щитовидной железы, так как синтезируемые ее фолликулярными клетками тиреоидные гормоны оказывают влияние практически на все виды обмена веществ, усиливают окислительные процессы в организме, стимулируют теплообразование, пролиферацию и дифференцировку клеток [12].

Изучению последствий сочетанного действия факторов разной природы на организм млекопитающих уделяется значительно меньше внимания по сравнению с действием отдельных факторов [13]. Способность токсикантов перемещаться на значительные расстояния от источника загрязнения и непредсказуемость их совместного действия требуют более детального исследования механизма формирования ранних и отдаленных эффектов при хроническом поступлении токсикантов в организм в течение длительного времени.

Целью работы являлось изучение ранних и отдаленных биофизических и биохимических эффектов в тканях мышей линии СВА, подвергавшихся хроническому низкоинтенсивному γ-излучению в малой дозе в сочетании с нитратом свинца в широком диапазоне доз или уранилнитрата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были половозрелые мыши линии СВА (самцы), обычно используемые при оценке токсических свойств разных соединений. Животные были получены из научной коллекции экспериментальных животных ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (http://www.ckp-rf.ru/usu/471933/). В течение одного месяца мышей ежедневно подвергали воздействию хронического γ-излучения с мощностью дозы 2 мР/ч, одновременно с этим животные потребляли с питьевой водой токсиканты. Были проведены две серии экспериментов.

В первой серии с нитратом свинца мыши (возраст два с половиной-три месяца) были разделены на семь групп по семь-десять особей в каждой:

А – контроль;

Б – облучение;

I – облучение + нитрат свинца в дозе 0.003 г/кг;

II – облучение + нитрат свинца в дозе 0.01 г/кг;

III – облучение + нитрат свинца в дозе 0.03 г/кг;

IV – облучение + нитрат свинца в дозе 0.1 г/кг;

V – облучение + нитрат свинца в дозе 0.3 г/кг.

Мыши групп А и Б пили чистую воду, остальные группы мышей с питьевой водой получали растворы нитрата свинца (квалификации «ч.д.а.») в расчетных концентрациях, обеспечивающих поступление в организм ионов Pb^{2+} в указанных выше концентрациях за весь период эксперимента. Предельно допустимая концентрация (ПДК) ионов свинца в питьевой воде для водных объектов бытового пользования составляет 0.03 мг/л, следовательно, общее потребление токсиканта превышает ПДК в 2–200 раз. При этом поступление в организм нитрат-иона за месяц даже при концентрации нитрата свинца 0.3 мг/кг в 75 раз ниже его ПДК.

В экспериментах с уранилнитратом мыши (возраст пять месяцев) были разделены на четыре группы по восемь-десять особей в каждой:

группа 1 –контроль;

группа 2 – облучение;

группа 3 – уранилнитрат ($UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$);

группа 4 – облучение + уранилнитрат;

Удельная активность уранилнитрата составляла 25 Бк/л (0.00428 г/л), что соответствует содержанию солей урана в природных водах на территории с повышенным уровнем естественной радиоактивности в Республике Коми [10]. Каждое животное за 30 суток получало вместе с водой в среднем 0.18 мг уранилнитрата.

γ-Облучение мышей обеспечивали два источника ^{226}Ra с активностью $0.474 \cdot 10^6$ и $0.451 \cdot 10^6$ кБк, разнесенные на расстоянии 2.5 м. Геометрия их расположения обеспечивала сравнительно однородное облучение всех животных (неравномерность облучения не превышала 6%). Данный уровень излучения имитировал условия низкоинтенсивного внешнего γ-излучения на участках с повышенным фоном естественной радиоактивности в Республике Коми [10]. Суммарную поглощенную дозу (1.6 сГр) определяли термолюминесцентными дозиметрами с детекторами ДТГ-4 (LiF) с последующей регистрацией на термолюминесцентной установке ДВГ–02ТМ (НПП «Доза», Россия).

Забой мышей одновременно опытных и контрольных групп осуществляли в первые сутки (ранний период) и спустя 30 суток (отдаленный период) после окончания воздействия при соблюдении принципов биоэтики и гуманного обращения с животными [14] в утренние часы, чтобы избежать влияния суточных колебаний на исследованные показатели. Необходимо также отметить, что эксперименты проводили в весенний сезон (март – май)

Печень сразу после забоя помещали на лед. Липиды из гомогената печени выделяли по методу Блая и Дайера в модификации Кейтса [15]. Качественный и количественный состав фосфолипидов (ФЛ) определяли методом тонкослойной

Состав фосфолипидов печени мышей в опытах с нитратом свинца и уранилнитратом в контрольных группах и спустя сутки после хронического γ-облучения в дозе 1.6 сГр.

Фракции фосфолипидов	Относительное содержание фракции (%Р)			
	Группа 1 (контроль). Возраст 6 месяцев, $n = 12$	Группа 2 (γ-облучение). Опыт с уранилнитратом, $n = 20$	Группа А (контроль). Возраст 3.5–4.0 месяца, $n = 25$	Группа Б (облучение). Опыт с нитратом свинца, $n = 22$
ЛФХ	3.37 ± 0.24	1.65 ± 0.20***	3.90 ± 0.20	7.09 ± 0.31***
СМ	3.34 ± 0.05	2.15 ± 0.22***	4.43 ± 0.39	3.70 ± 0.19
ФХ	52.2 ± 0.9	57.3 ± 0.7***	47.1 ± 0.7	42.50 ± 0.65***
ФИ+ФС	9.57 ± 0.10	6.20 ± 0.17**	10.37 ± 0.50	10.85 ± 0.62
ФЭ	26.9 ± 1.0	28.70 ± 0.19	28.9 ± 0.6	28.84 ± 0.23
КЛ+ФК	4.58 ± 0.45	3.96 ± 0.42	5.30 ± 0.65	7.03 ± 0.59

Примечание. n – Количество хроматографических дорожек; здесь и далее (на рисунках): различия между контролем и вариантом эксперимента достоверны при * – $p < 0.1$, ** – $p < 0.05$ *** – $p < 0.01$.

хроматографии с использованием силикагеля типа G (Sigma, США) [16]. В качестве подвижной фазы использовали смесь «хлороформ–метанол–ледяная уксусная кислота–вода» в соотношении 50 : 30 : 8 : 4. Проявление хроматограмм проводили в парах йода. Количественный анализ отдельных фракций ФЛ проводили на спектрофотометре Спекол-211 (Carl Zeiss Jena, Германия) при длине волны 800 нм по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Оценивали количественные соотношения отдельных фракций ФЛ и обобщенные показатели состава липидов: процентное содержание ФЛ в составе общих липидов и отношение содержания основных фракций ФЛ клеток млекопитающих фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (ФХ/ФЭ), отражающие структурное состояние мембранной системы органа; соотношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ (∑ЛОФЛ/∑ТОФЛ), характеризующее способность липидов к окислению [2]. Последнее соотношение вычисляли по формуле:

$$\sum ЛОФЛ/\sum ТОФЛ = (ФИ + ФС + ФЭ + КЛ + ФК)/(ЛФХ + СМ + ФХ),$$

где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, КЛ – кардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы фосфолипидов, СМ – сфингомиелин. Для определения состава ФЛ для каждой пробы анализировали по четыре-шесть параллельных дорожек. Все измерения проводили для каждого животного индивидуально. Общее количество мышей в экспериментах составило 174 особи.

Щитовидную железу сразу после извлечения помещали в 10%-й формалин с последующей стандартной гистологической обработкой. Парафиновые срезы тиреоидной ткани толщиной 4–5 мкм окрашивали реактивом Шиффа с докраской ядер гематоксилином Карачи. На гистологических препаратах с использованием окулярной линейки измеряли высоту клеток фолликулярного эпителия, а также длинный (L) и короткий (B) поперечники фолликулов (от 50 до 100 замеров). Средний диаметр фолликулов рассчитывали по формуле $D = (L + B)/2$. По отношению среднего диаметра фолликула к высоте фолликулярного эпителия рассчитывали индекс функции железы [17]. Морфометрические параметры анализировали при помощи программы AxioVision LE под микроскопом AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении от 250× до 1250×, осуществляя их измерение в соответствии с имеющимися в литературе методическими рекомендациями, в том числе разработанными для эндокринных органов [18, 19].

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики [20], используя Microsoft Office Excel 2007, программу Statistica 6.0. и пакет программ KINS [21]. Для оценки результатов статистического анализа использовали стандартные параметры: R – коэффициент корреляции, b – коэффициент линейной регрессии, p – уровень достоверности различий (вероятность ошибки) и критерий Стьюдента. В таблице и на рисунках результаты представлены в виде среднеарифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ($M \pm m$).

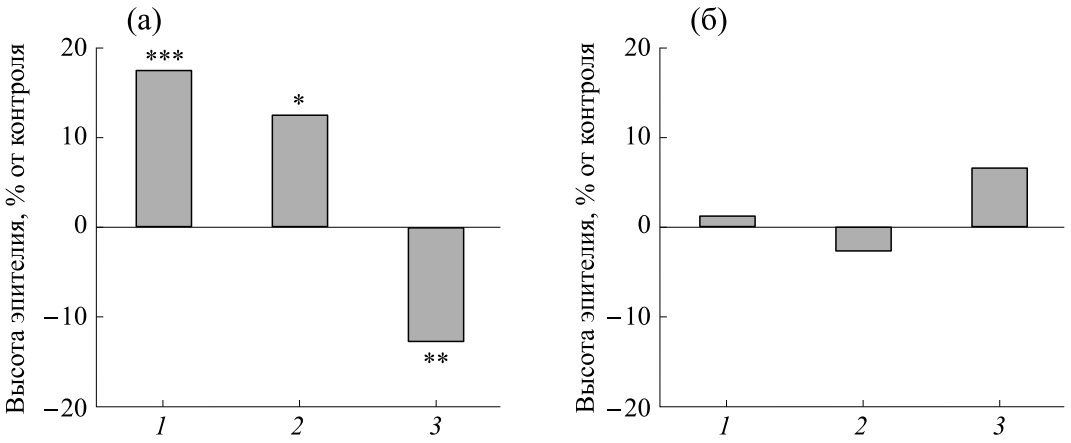


Рис. 1. Высота фолликулярного эпителия (% от контроля) в щитовидной железе мышей линии СВА (самцы) в ранние (а) и отдаленные (б) сроки после воздействия γ-излучения и уранилнитрата: *1* – хроническое γ-облучение в суммарной дозе 1.6 сГр; *2* – потребление с питьевой водой уранилнитрата в течение 30 суток; 3 – совместное действие обоих факторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие на организм любых неблагоприятных факторов вызывает существенные изменения во всех его системах. Так, в работе [22] были выявлены достоверные изменения состояния процессов ПОЛ в головном мозге и крови мышей при совместном действии низкоинтенсивного излучения в малой дозе и наличии нитрата свинца в питьевой воде. Так как интенсивность процессов ПОЛ обусловливает влияние физико-химических свойств липидов на координацию взаимосвязей между различными параметрами системы регуляции и баланс биохимических функций в биологических объектах [23, 24], то необходимо отметить, что липиды головного мозга и эритроцитов крови, в отличие от липидов печени, обладают низким антиоксидантным статусом [25].

Поскольку синтезируемые клетками щитовидной железы тиреоидные гормоны усиливают окислительные процессы в организме, то обнаруженное изменение морфофункциональных параметров тиреоидной ткани мышей в ответ на действие хронического γ-излучения и уранилнитрата также свидетельствует об участии щитовидной железы мышей в формировании последствий действия исследуемых факторов. Результаты, представленные на рис. 1 и 2, позволяют заключить, что выраженность и направленность состояния щитовидной железы зависели от времени, прошедшего после воздействия. Так, в ранний период после окончания облучения животных и/или наличия в питьевой воде уранилнитрата в тиреоидной паренхиме обнаружено статистически значимое увеличение высоты фолликулярного эпителия, в то время как при их совместном действии значения этого показателя были ниже контрольной величины (рис. 1). При этом в отдаленный период во всех вариантах эксперимента наблюдается нормализация данного параметра. Как показано в работах [18, 26], высота фолликулярного эпителия является информативным показателем, отражающим функциональное состояние щитовидной железы. Достоверные различия этого показателя от контрольного значения во всех опытных группах в ранние сроки после окончания воздействий (рис. 1) свидетельствуют о существенных изменениях индекса функции щитовидной железы.

Измерение диаметров фолликулов в тиреоидной паренхиме показало, что у облученных животных средние значения этого показателя были выше нормы как в ранние, так и в отдаленные сроки после радиационного воздействия (рис. 2). При этом в ранние сроки после потребления только уранилнитрата средний диаметр фолликулов достоверно ($p \le 0.001$) увеличивается относительно контрольных значений, а спустя месяц после прекращения его потребления – уменьшается (рис. 2). В щитовидной железе мышей, которые испытывали одновременно воздействие обоих факторов, средний диаметр фолликулов и индекс функции были в пределах контрольных значений независимо от времени, прошедшего после окончания воздействия факторов.

Выбор печени как основного органа для изучения механизма формирования последствий совместного действия повреждающих факторов разной природы на регуляцию процессов ПОЛ не случаен. Именно печень является одним из основных органов как биосинтеза липидов, так и биотрансформации поступающих в организм ксенобиотиков. Известно, что показатели системы регуляции ПОЛ обладают выраженной суточной и сезонной вариабельностью [23, 27]. Чтобы

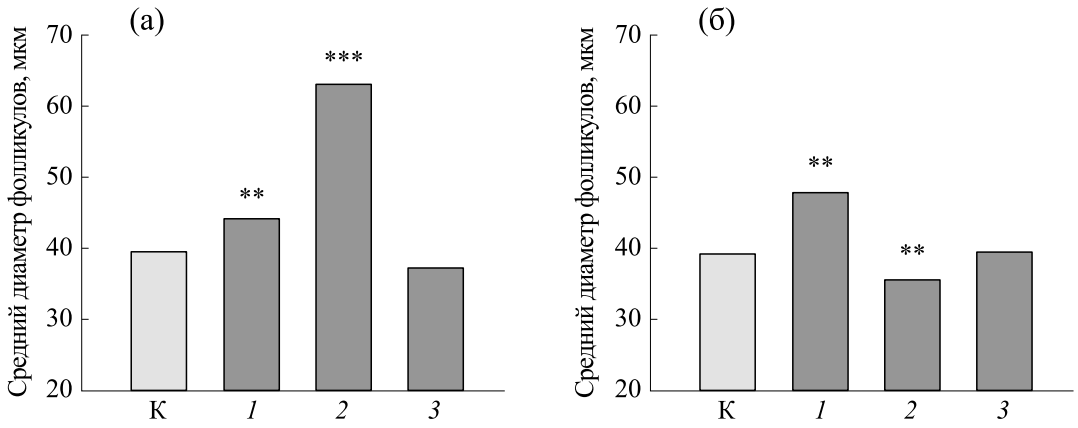


Рис. 2. Средний диаметр фолликулов щитовидной железы мышей линии СВА (самцы) в ранние (а) и отдаленные (б) сроки после воздействия γ-облучения и уранилнитрата: К – контроль; *1* – хроническое γ-облучение в суммарной дозе 1.6 сГр; *2* – потребление с питьевой водой уранилнитрата в течение 30 суток; *3* – совместное действие обоих факторов.

минимизировать влияние сезонных колебаний исходного состояния параметров системы регуляции ПОЛ, обе серии экспериментов проводили в весенний период. Для адекватной оценки механизма формирования последствий воздействий токсикантов разной природы прежде всего было необходимо сопоставить ответ процессов ПОЛ в печени мышей разного возраста на воздействие хронического ионизирующего излучения в малой дозе. Это обусловлено высокой чувствительностью окислительных процессов к низкоинтенсивному облучению млекопитающих в малых дозах, которая была выявлена в лабораторных экспериментах [28] и в исследованиях на природных популяциях грызунов [10, 11]. Состав ФЛ печени интактных мышей СВА в контрольных группах и в ранние сроки после окончания одного облучения в обоих вариантах опытов представлен в таблице.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что мембранная система печени более молодых особей характеризуется достоверно менее жесткой структурированностью (ФХ/ФЭ = $= 1.629 \pm 0.019$) по сравнению с аналогичным показателем для более старых особей (ФХ/ФЭ = $= 1.940 \pm 0.035$, $p < 0.01$). При этом липиды печени являются более окисляемыми (∑ЛОФЛ/∑ТОФЛ $= 0.877 \pm 0.015$) в опыте с нитратом свинца по сравнению со значением 0.697 ± 0.008 в опыте с уранилнитратом ($p < 0.01$). Это обусловлено более высоким содержанием ФЛ в составе общих липидов в печени более молодых мышей ($50.4 \pm 1.4\%$) по сравнению с их долей в составе общих липидов в возрастной группе мышей ($37.7 \pm 1.4\%$), поскольку именно ФЛ являются основными субстратами окисления в биологических мембранах. При этом закономерно, что коэффициент линейной регрессии обратной взаимосвязи между окисляемостью липидов и структурным состоянием мембранной системы печени в 2.65 раза выше в группе более молодых мышей: $b = 0.53 \pm 0.11$ и 0.20 ± 0.05 соответственно.

Различия исходных величин параметров системы регуляции ПОЛ вызывает и неодинаковый характер изменения в соотношении фракций ФЛ в ранние сроки после окончания хронического облучения. Так, в группе более молодых мышей облучение приводит к уменьшению доли ФХ и росту в 1.8 раза доли лизоформ ФЛ, в то время как в группе мышей старшего возраста доля ФХ в составе ФЛ печени достоверно увеличивается при снижении доли лизоформ ФЛ в два раза. Необходимо обратить внимание на практически постоянное относительное содержание и у мышей разных возрастных групп, и в ранние сроки после хронического облучения в малой дозе второй основной фракции ФЛ печени – ФЭ, который локализуется преимущественно на внутренней стороне мембран [29].

Сохранение функционирования системы регуляции ПОЛ в группах животных, подвергнутых различным воздействиям, оценивают, сопоставляя масштаб и характер обратной корреляционной взаимосвязи между соотношением способности липидов к окислению (∑ЛОФЛ/∑ТОФЛ) и структурным состоянием мембранной системы органа (ФХ/ФЭ) в группах контрольных и опытных животных [2]. Данная взаимосвязь выявлена в обеих контрольных группах мышей с коэффициентами корреляции $R = -0.87 \pm 0.10$ ($n = 6$) и $R = -0.83 \pm 0.11$ ($n = 8$) в экспериментах с нитратом свинца и уранилнитратом соответственно. Следовательно, регуляция процессов ПОЛ в группах мышей линии СВА разного возраста относительно стабильна. Однако в ранние сроки после окончания радиационного воздействия более существенные нарушения регуляции ПОЛ наблюдаются в экспериментах с нитратом

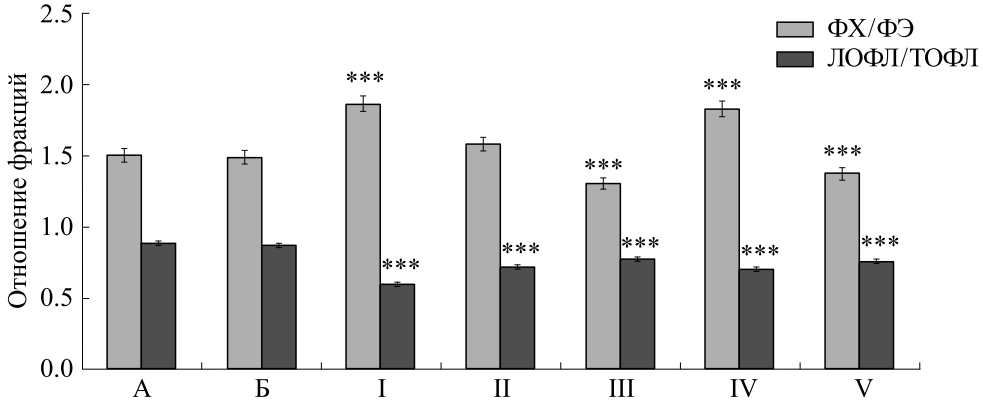


Рис. 3. Отношение основных фракций (ФХ/ФЭ) и соотношение сумм более легко- и трудноокисляемых фосфолипидов в печени мышей линии СВА (самцы) спустя 30 суток после окончания воздействия γ-излучения и нитрата свинца: А – возрастной контроль; Б – хроническое γ-облучение в суммарной дозе 1.6 сГр; совместное действие облучения и нитрата свинца в дозах 0.003 г/кг (I), 0.01 г/кг (II), 0.03 г/кг (III), 0.1 г/кг (IV) и 0.3 г/кг (V).

свинца (аналогичная корреляции отсутствует, $R = -0.54$), в то время как для более возрастной группы мышей в экспериментах с уранилнитратом обнаружено только уменьшение взаимосвязанности между данными показателями ($R = -0.75 \pm 0.19$) относительно контроля. Тем не менее ответ процессов ПОЛ в печени мышей разных возрастных групп на хроническое облучение в малой дозе имеет однотипный характер.

Как известно, среди органов интактных лабораторных грызунов печень характеризуется самой низкой интенсивностью процессов ПОЛ и наиболее высокой обеспеченностью липидов антиоксидантами [25, 28]. Это приводит к тому, что нарушения взаимосвязей между каталазной активностью печени и интенсивностью процессов ПОЛ в ранние сроки и после раздельного действия облучения, и при его совместном действии с нитратом свинца не столь значительны [22].

В отдаленные сроки после хронического облучения в малой дозе незначительные изменения в относительном содержании некоторых минорных фракций ФЛ выявлены в обоих экспериментах, что обусловливает поддержание обобщенных показателей состава ФЛ на близких к контрольным значениям величинах. В серии эксперимента с уранилнитратом самые существенные изменения в составе ФЛ печени спустя месяц после окончания воздействий выявлены только при наличии в питьевой воде мышей уранилнитрата (группа 3). Интересно отметить, что достоверные различия в составе ФЛ в этой группе мышей обнаружены именно для более легкоокисляемых ФЛ: уменьшение доли ФЭ на 5.7% ($p < 0.01$) и снижение в 1.9 раза доли суммарной фракции ФИ + ФС при росте относительного содержания КЛ + ФК в 2.5 раза.

Существенные различия как в соотношении фракций ФЛ, так и обобщенных показателей состава ФЛ в печени мышей выявлены спустя 30 суток после окончания совместного действия факторов в экспериментах со свинцом, что следует из данных, представленных на рис. 3 и 4. Спустя месяц после прекращения воздействий наличие в питьевой воде мышей нитрата свинца при одновременном действии облучения вызывает достоверное уменьшение окисляемости липидов печени по сравнению с аналогичным показателем в контроле при всех исследованных дозах токсиканта. Отношение же ФХ/ФЭ возрастает при дозах нитрата свинца 0.003 и 0.1 г/кг, снижается при 0.03 и 0.3 г/кг при сохранении приблизительно на уровне контрольных значений при дозе 0.01 г/кг (рис. 3).

Среди продуктов деградации ФЛ важную роль играют лизоформы ФЛ, обладающие детергентными свойствами [29]. В отдаленные сроки после окончания воздействий достоверный рост относительного содержания лизоформ ФЛ наблюдается как после хронического облучения, так и при совместном действии облучения и нитрата свинца, кроме мышей группы IV, получивших токсикант в дозе 0.1 г/кг (рис. 4).

В группах мышей более старшего возраста (эксперименты с уранилнитратом) хроническое облучение в малой дозе вызывает достоверный рост отношения ФХ/ФЭ и доли лизоформ в ФЛ печени, а также уменьшение способности липидов к окислению в отдаленные сроки после воздействия (рис. 5 и 6). Спустя 30 суток после окончания воздействий выявлено уменьшение отношения ФХ/ФЭ после совместное действие низкоинтенсивного облучения и уранилнитрата (рис. 5) и доли лизоформ ФЛ при потреблении мышами только уранилнитрата (рис. 6).

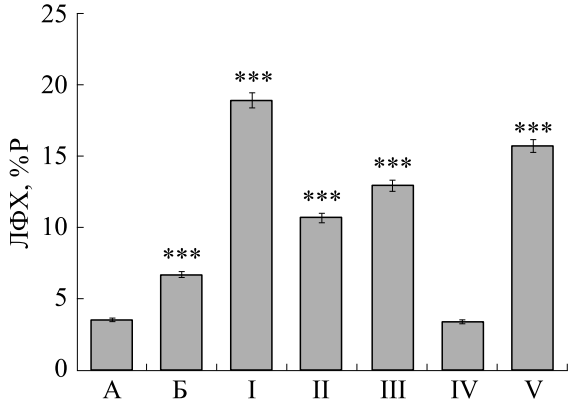


Рис. 4. Доля лизоформ в составе фосфолипидов в печени мышей линии СВА (самцы) спустя 30 суток после окончания воздействия γ-излучения и нитрата свинца: А – возрастной контроль; Б – хроническое γ-облучение в суммарной дозе 1.6 сГр; совместное действие облучения и нитрата свинца в дозах 0.003 г/кг (I), 0.01 г/кг (II), 0.03 г/кг (III), 0.1 г/кг (IV) и 0.3 г/кг (V).

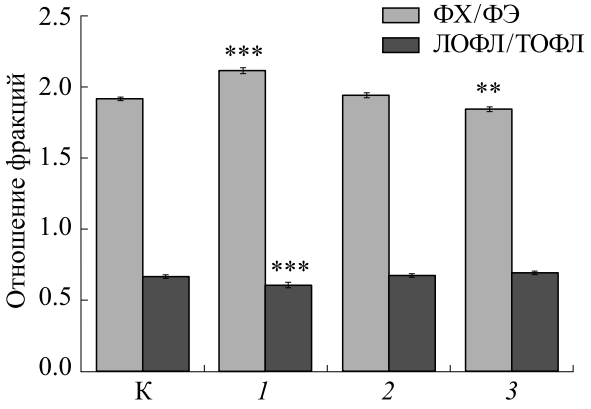


Рис. 5. Отношение основных фракций (ФХ/ФЭ) и соотношение сумм более легко- и более трудноокисляемых фосфолипидов в печени мышей линии СВА (самцы) спустя 30 суток после окончания воздействия γ-излучения и уранилнитрата: К – контроль; *1* – потребление с питьевой водой уранилнитрата в течение 30 суток; *2* –хроническое γ-облучение в суммарной дозе 1.6 сГр; *3* – совместное действие обоих факторов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ представленных выше данных свидетельствует о том, что исходное состояние параметров системы регуляции ПОЛ оказывает существенное влияние на механизм формирования последствий воздействия хронического γ-излучения в малой дозе. Так, более существенные изменения структурного состояния мембранной системы печени и способности липидов к окислению в ранние сроки после облучения выявлены в печени более молодых мышей по сравнению с животными старшей возрастной группы.

В печени в отдаленные сроки после совместного действия облучения и нитрата свинца выявлен нелинейный (полимодальный) характер изменения доли лизоформ ФЛ (рис. 4) и обобщенных показателей состава ФЛ (рис. 3) в зависимости от концентрации нитрата свинца: максимальный эффект проявляется при минимальной из исследованных доз токсиканта (0.003 г/кг). Ранее нелинейный характер аналогичных показателей состава ФЛ был обнаружен в головном мозге и эритроцитах крови мышей в ранние сроки после совместного действия данных факторов [22].

Формирование последствий зависит и от природы токсиканта. Так, структурно-функциональные изменения тиреоидной ткани в ранние сроки после окончания воздействия более выражены в группах мышей при раздельном действии изученных факторов (рис. 1 и 2). Совместное действие облучения и уранилнитрата вызвало достоверное изменения только одного из изученных показателей (рис. 1). Необходимо отметить, что в отдаленные сроки после изученных воздействий изменения показателей состава ФЛ в печени мышей более выражены при раздельном действии облучения или уранилнитрата (рис. 5 и 6), в то время как при их совместном действии достоверные изменения обнаружены лишь для отношения основных фракций ФЛ (рис. 5). Это может быть обусловлено как разной чувствительностью показателей и их нормализацией в зависимости от природы повреждающего воздействия, так и неодинаковой способностью хронического излучения в малых дозах и уранилнитрата влиять на процессы гемодинамики и микроциркуляции в

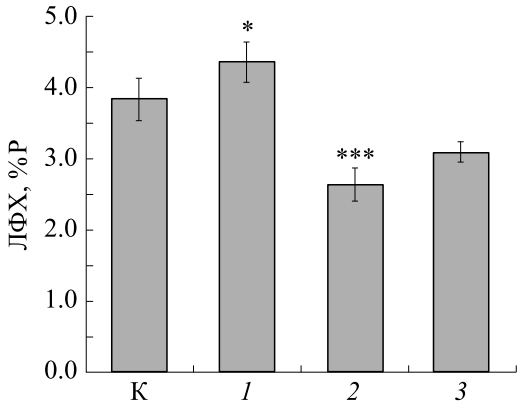


Рис. 6. Доля лизоформ в составе фосфолипидов печени мышей линии СВА (самцы) спустя 30 суток после окончания воздействия γ-излучения и уранилнитрата: К – контроль; *1* – потребление с питьевой водой уранилнитрата в течение 30 суток; *2* – хроническое γ-облучение в суммарной дозе 1.6 сГр; *3* – совместное действие обоих факторов.

тканях, взаимосвязанных с процессами инактивации токсикантов в печени и их экскреции с мочой.

Существенные изменения количественных соотношений среди минорных фракций ФЛ при действии хронического облучения и химических токсикантов могут оказывать влияние и на их функционирование как сигнальных молекул, поскольку наличие сигнальных функций у минорных фракций ФЛ и продуктов их окисления показано во многих исследованиях [30–34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, действие хронического низкоинтенсивного излучения в малых дозах и химических токсикантов разной природы приводит к возникновению нарушений в органах лабораторных животных, что характерно для формирования окислительного стресса, обусловленного нарушениями в физико-химической системе регуляции ПОЛ. Масштаб и направленность изменений показателей морфофункционального состояния щитовидной железы и параметров системы регуляции ПОЛ в печени мышей линии СВА зависят от времени после окончания воздействия, природы токсиканта и его концентрации в питьевой воде, возраста мышей. Выявление более выраженных изменений морфофизиологических параметров в щитовидной железе в ранние сроки после воздействий облучения и уранилнитрата свидетельствует о высокой чувствительности ее функционального состояния к неблагоприятным экологическим факторам.

Сложный и неоднозначный характер ответных реакций органов млекопитающих на воздействие факторов разной природы в малых дозах, нелинейный характер изменения структурного состояния мембранной системы тканей и способности их липидов к окислению, зависимость эффекта от исходного состояния параметров системы регуляции ПОЛ свидетельствуют о невозможности прогнозирования последствий обитания млекопитающих в неблагоприятных экологических условиях путем экстраполяции результатов из области высоких доз к малым дозам поллютантов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках государственных заданий Института Биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (№ гос. регистрации АААА-А18-118011190102-7) и Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (№ 44.4, гос. № темы: 0084-2019-0014).

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. Ye. B. Burlakova, N. P. Pal'mina, and Ye. L. Mal'tseva, *Membrane Lipid Oxidation* (CRC Press, 1991).
2. Л. Н. Шишкина, Е. В. Кушнирева и М. А. Смотряева, Радиац. биология. Радиоэкология **44** (3), 289 (2004).
3. Л. Н. Шишкина, М. А. Климович и М. В. Козлов, Биофизика **59** (2), 380 (2014).
4. Ф. С. Дзугкоева, Р. Л. Беликова и С. Г. Дзугкоев, Нефрология и диализ **5** (3), 18 (2003).
5. S.E. Martin, W. Griswold, in *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens* (Kansas State University, USA, 2009), No 15, pp. 1–6.
6. A. Agrawal, Adv. Life Sci. **2** (2), 29 **(**2012).
7. Ю. И. Москалев, *Радиобиология инкорпорированных радионуклидов* (Энергоатомиздат, М., 1989).
8. M. D. Sztajnkrycer and E. J. Otten, Mil. Med. **169** (3), 212 (2004).
9. S. V. Gudkov, A. V. Chernikov, and V. I. Bruskov, Rus. J. Gen. Chem. **86** (6), 1531 (2016).
10. A. G. Kudyasheva, L. N. Shishkina, O. G. Shevchenko, et al., J. Environ. Radioactivity **97**, 39 (2007).
11. L. N. Shishkina, A. G. Kudyasheva, and N. G. Zagorskaya, *The Lessons of Chernobyl: 25 Years Later* (Nova Science Publ., New York, 2012).
12. Л. К. Жункейра и Ж. Карнейро, *Гистология: атлас: учеб. пособие* (ГЭОТАР-Медиа, М., 2009).
13. В. Г. Петин и Б. И. Сынзыныс, *Комбинированное воздействие факторов окружающей среды на биологические системы* (ИА-ТЭ, Обнинск, 1998).
14. О. В. Раскоша и А. И. Кичигин, Вестн. Института биологии Коми НЦ УрО РАН, № 3, 19 (2016).
15. М. Кейтс, *Техника липидологии* (Мир, М., 1975).
16. *Биологические мембраны: Методы* (Мир, М., 1990).
17. В. Л. Быков, *Частная гистология человека (краткий обзорный курс)* (СОТИС, М., 2002).
18. Г. Г. Автандилов, *Медицинская морфометрия* (Медицина, М., 1990).
19. О. К. Хмельницкий, *Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы* (СОТИС, М., 2002).
20. Г. Ф. Лакин, *Биометрия* (Высш. шк., М., 1990).
21. Э. Ф. Брин и С. О. Травин, Хим. физика **10** (6), 830 (1991).
22. L. N. Shishkina, A. G. Kudyasheva, O. G. Shevchenko, et al., *Heavy Metals and Other Pollutants in the Environment: Biological Aspects* (Apple Acad. Press, Toronto, 2017).
23. М. В. Козлов, В. В. Урнышева, Е. В. Кушнирева и др., Биофизика **52** (4), 693 (2007).

24. Н. В. Хрустова, М. В. Козлов и Л. Н. Шишкина, Биофизика **56** (4), 668 (2011).
25. Л. Н. Шишкина и Н. В. Хрустова, Биофизика **51** (2), 340 (2006).
26. О. В. Раскоша и О. В. Ермакова, Теоретическая и прикладная экология, № 2, 55 (2013).
27. L. N. Shishkina and E. B. Burlakova, in *Chemical and Biochemical Kinetics. New Hotizons. Vol II: Biological Kinetics*, Ed. by E. B. Burlakova and S. D. Varfolomeev (VSP, Leden, Boston, 2005), pp. 334–364.
28. М. А. Климович, К. Ф. Сергейчев, Д. М. Карфидов, и др., Технологии живых систем **7** (8), 17 (2010).
29. Р. Геннис, *Биомембраны: Молекулярная структура и функции* (Мир, М., 1997).
30. G. Leonarduzzi, M. C. Arkan, H. Başağa, et al., Free Radic. Biol. Med. **28** (9), 1370 (2000).
31. V. E. Kagan, G. G. Boriscnko, Y. Y. Tyirina, et al., Free Radic. Biol. Med. **37** (12), 11 (2004).
32. X. Wang, S. P. Devaiah, and W. Zhang, Prog. Lipid Res. **45**, 250 (2006).
33. Т. И. Торховская, О. М. Ипатова, Т. С. Захарова и др., Биохимия **72** (2), 149 (2007).
34. J. P. Slotte and B. Ramstedt, Eur. J. Lipid Sci. Technol. **109**, 977 (2007).

Regulation of the Oxidative Processes in Organs of Mice under Action of the Chemical and Physical Factors at Low Doses

A.G. Kudyasheva*, N.G. Zagorskaya*, O.V. Raskosha*, and L.N. Shishkina**

**Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Kommunisticheskaya ul. 28, Syktyvkar, Republic of Komi, 167982 Russia*

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

Influence of the separate and combined action of the lead nitrate at the wild range of doses, uranyl nitrate and the chronic γ-irradiation at the low dose on the development of the oxidative stress in organ of mice CBA (males) and morphophysiological state of thyroid gland was studied at the early and remote periods after action. Complex and significant different character of changes of parameters of the oxidation process regulation in liver of mace (males) and the morphological parameters in its thyroid gland is revealed. The scale and direction of these changes depend on the age of animals, the nature of toxicants and their concentrations, and also period after actions. Analysis of literature and the data obtained allow us to make it a conclusion that the development of consequences for animals living under unfavorable ecological conditions may not predict using the extrapolation of data which were obtained at large doses to sphere of low doses.

Keywords: regulation, lipid peroxidation, lead nitrate, uranyl nitrate, chronic irradiation, low doses

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 750–755

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

РОЛЬ КВАНТОВОГО ТУННЕЛИРОВАНИЯ ИОНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРДЕЧНЫХ АРИТМИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ КАНАЛОПАТИЯМИ, ИШЕМИЕЙ И МЕХАНИЧЕСКИМ РАСТЯЖЕНИЕМ

© 2021 г. А.Б. Касвал

Медицинский факультет Иорданского университета, Амман 11942, Иордания

E-mail: qaswalabdullah@gmail.com

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.
После доработки 06.08.2020 г.
Принята к публикации 14.08.2020 г.

Сердечные аритмии вызывают значительную заболеваемость и смертность среди пациентов. Было выявлено, что с сердечными аритмиями связаны многие патологические нарушения. Понимание того, как такие нарушения способствуют патогенезу сердечной аритмии, важно для улучшения терапевтических результатов. В данном исследовании для изучения влияния некоторых патологических процессов, таких как каналопатии, ишемия и механическое растяжение, на патогенез сердечных аритмий была использована модель квантового туннелирования ионов через закрытые каналы. Было обнаружено, что в случае, когда эти патологии уменьшают пороговую свободную энергию натриевых потенциалзависимых каналов, происходит существенная деполяризация мембранного потенциала, указывающая на значительную квантовую проводимость, обусловленную значительной вероятностью туннелирования ионов натрия через закрытые каналы. Эта деполяризация предрасполагает сердечную мышцу к повышенной возбудимости и, как следствие, к аритмиям. Такая модель может быть применена к другим типам ионов, таким как ионы калия и кальция, другим типам каналов, другим возбудимым тканям, таким как нейроны и волокна скелетных мышц, а также к другим патологическим состояниям, которые влияют на целостность клеточной мембраны. Она может облегчить понимание ряда расстройств, связанных с патологической возбудимостью.

Ключевые слова: квантовое туннелирование, потенциалзависимый канал, аритмия, каналопатия, растяжение, ишемия.

DOI: 10.31857/S0006302921040153

Сердечная аритмия является серьезной проблемой для здоровья, вызывающей значительную заболеваемость и смертность. Многие этиологии вовлечены в патогенез сердечных аритмий, в частности каналопатии [1], ишемическая болезнь сердца [2], механическое растяжение ткани миокарда [3], перегрузка по объему крови, вызванная застойной сердечной недостаточностью [4], клапанные болезни сердца, такие как митральный стеноз клапана [5], а также многих другие патологии, при которых расширяется или растягивается сердечная мышца [6]. Было обнаружено, что каналопатия и механическое растяжение могут уменьшить пороговую свободную энергию [7–12], необходимую для открытия закрытых каналов. Ишемия также вызывает деформации и пузыри в клеточной мембране, которые могут сдвигать влево равновесие в натриевых каналах, влияя на пороговую свободную энергию, аналогично эффектам, вызываемым механически индуцированными деформациями мембраны [11]. Более того, уменьшение пороговой свободной энергии означает, что канал с большей вероятностью откроется, однако это будет вероятностное открытие, что означает только наличие вероятности того, что канал откроется, сама же вероятность будет зависеть от многих факторов. Одним из таких факторов, который будет рассмотрен в настоящей работе, является квантовое туннелирование ионов через закрытые каналы [13]. Вероятность такого туннелирования зависит от пороговой свободной энергии, кинетической энергии иона, длины гидрофобного затвора и массы ионов. По мере уменьшения пороговой свободной энергии вероятность туннелирования увеличивается. Следовательно, принимая во внимание влияние патологических состояний на пороговую свободную энергию, вероятность туннелирования ионов будет увеличиваться в этих условиях, поскольку они уменьшают эту энергию. По мере увеличения вероятности туннелирования увеличивается квантовая проводимость мембраны, и, следовательно, это может повлиять на мембранный потенциал и возбудимость клетки. Кроме то-

го, в настоящем исследовании основное внимание уделяется закрытым потенциалзависимым каналам, а не катионным каналам, активируемым растяжением, поскольку такие каналы в желудочках сердца и синоатриальном узле отсутствуют [11]. Однако в них присутствуют потенциалзависимые каналы, и это исключает возможность того, что активируемые растяжением каналы ответственны за вызванные растяжением аритмии в желудочках, но может быть отнесено к току утечки, создаваемому негерметичными закрытыми электрическими каналами. В дополнение к этому было обнаружено, что закрытые потенциалзависимые каналы реагируют на растяжение, поэтому предположение о том, что они не подвержены механическому растяжению, маловероятно [11]. По этим причинам разумно выбрать эти закрытые каналы в качестве объекта исследования для изучения эффектов квантового туннелирования при изменении пороговой свободной энергии.

Таким образом, цель настоящего исследования состоит в том, чтобы определить влияние уменьшения пороговой свободной энергии закрытых потенциалзависимых каналов на мембранный потенциал и, как следствие, на возбудимость клеток и сердечный ритм. Эта цель достигается за счет использования модели квантового туннелирования ионов через закрытые каналы [13] и интеграции квантовой проводимости в уравнение Гольдмана–Ходжкина–Каца.

МЕТОДЫ

Модель квантового туннелирования ионов через закрытые каналы была предложена и использована для объяснения выраженной боли [14], механизма действия лития [15], функции миелина в ограничении гипервозбудимости [16], деполяризующего действия ионов магния [17].

Эта модель описывает внутриклеточные гидрофобные ворота потенциалзависимых каналов как энергетический барьер. Сам барьер представлен как электрическое поле в пространстве параллельного конденсатора, такое представление было сделано для отслеживания изменений энергии барьера в зависимости от положения иона вдоль затвора [13].

Вероятность туннелирования ионов через закрытый затвор рассчитывается по следующему уравнению [13]:

$$T_Q = e^{\frac{-\sqrt{8m}}{\hbar}\int_{X_1}^{X_2}\sqrt{(qEx)-KE}dx}, \quad (1)$$

где m – масса иона, $\hbar$ – приведенная постоянная Планка ($1.05 \cdot 10^{-34}$ Дж с), q – заряд иона, E – электрическое поле в пространстве параллельного конденсатора, которое эквивалентно внутриклеточному гидрофобному затвору, x – положение иона через затвор, KE – кинетическая энергия иона, а X_1–X_2 – запрещенная область, в которой энергия барьера (qEx) равна или превышает кинетическую энергию иона.

Электрическое поле E рассчитывается по следующему уравнению [13]:

$$E = U/qL, \quad (2)$$

где U – энергия свободного затвора (энергия, необходимая для открытия закрытого канала), q – заряд иона, а L – длина затвора.

Путем подстановки уравнения (2) в уравнение (1) получаем:

$$T_Q = e^{\frac{-\sqrt{8m}}{\hbar}\int_{X_1}^{X_2}\sqrt{\left(\frac{U}{L}x\right)-KE}dx}. \quad (3)$$

Интеграл в уравнении (3) может быть решен следующим образом:

$$\int_{X_1}^{X_2}\sqrt{\left(\frac{U}{L}x\right)-KE}dx = \frac{2L}{3U}\sqrt{\left(\frac{U}{L}x_2-KE\right)^3}-\frac{2L}{3U}\sqrt{\left(\frac{U}{L}x_1-KE\right)^3}, \quad (4)$$

где X_1 – положение иона, при котором кинетическая энергия равна энергии барьера $\left(\frac{U}{L}x_1 = KE\right)$, а X_2 – положение иона на конце затвора ($x_2 = L$). Таким образом, уравнение (4) принимает следующий вид:

$$\int_{X_1}^{X_2}\sqrt{\left(\frac{U}{L}x\right)-KE}dx = \frac{2L}{3U}\sqrt{(U-KE)^3}. \quad (5)$$

В конечном итоге вероятность туннелирования можно рассчитать по следующему уравнению:

$$T_Q = e^{\frac{-\sqrt{8m}}{\hbar}\times\frac{2L}{3U}\sqrt{(U-KE)^3}}. \quad (6)$$

Кинетическая энергия ионов обусловлена мембранным потенциалом и тепловым источником температуры тела. Следовательно, внеклеточные катионы получают кинетическую энергию при прохождении через мембранный потен-

циал, который отрицателен внутри мембраны по сравнению с ее внешней стороной, пока не достигнут внутриклеточных гидрофобных ворот. Кроме того, они получают кинетическую энергию от источника тепла. Однако внутриклеточные катионы попадают во внутриклеточные гидрофобные ворота прежде, чем пройти через мембранный потенциал, следовательно, в этом случае он не будет вносить вклад в их кинетическую энергию. В результате кинетическая энергия катионов в основном происходит от источника тепла. Таким образом, кинетическая энергия внеклеточных и внутриклеточных катионов может быть рассчитана соответственно по следующим уравнениям:

$$KE_o = qV_m + \frac{1}{2}K_{\text{B}}T, \tag{7}$$

$$KE_i = \frac{1}{2}K_{\text{B}}T, \tag{8}$$

где q – заряд иона, $V_{\text{м}}$ – напряжение (потенциал) мембраны, K_{B} – постоянная Больцмана ($1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К), а T – температура тела (310 К).

В результате квантовую проводимость одиночного канала $C_{Q\text{ion}}$ можно рассчитать по следующему уравнению [13, 18, 19]:

$$C_{Qion} = \frac{q^2}{h}T_Q, \tag{9}$$

где q – заряд иона, h – постоянная Планка ($6.6 \cdot 10^{-34}$ Дж с) и T_Q – вероятность туннелирования.

Уравнение (9) вычисляет квантовую проводимость закрытого затвора, которая представляет собой полную проводимость одного закрытого канала, в предположении, что другие части канала, такие как фильтр селективности, имеют более низкое сопротивление, которое не влияет на более высокое квантовое сопротивление.

Более того, квантовую проводимость мембраны C_{QM} можно рассчитать по следующему уравнению [13]:

$$C_{QM} = 10^3 \cdot \text{D}C_{Q\text{ion}}, \tag{10}$$

где D – плотность каналов в биологической мембране (число каналов/см^2). Множитель 10^3 вводится для преобразования единицы проводимости мембраны из См/см^2 в мСм/см^2.

Чтобы определить влияние квантовой проводимости на потенциал покоя мембраны, ее необходимо интегрировать в уравнение Гольдмана–Ходжкина–Каца следующим образом:

$$[\text{Na}]_o (C_{\text{Na}} + C_{QM\text{Na}(o)}) + [\text{K}]_o (C_{\text{K}} + C_{QM\text{K}(o)}) = e^{\frac{FV_m}{RT}}[[\text{Na}]_i (C_{\text{Na}} + C_{QM\text{Na}(i)}) + [\text{K}]_i (C_{\text{K}} + C_{QM\text{K}(i)})], \tag{11}$$

где индексом «*i*» обозначены внутриклеточные и индексом «*o*» – внеклеточные параметры, [Na] – концентрация натрия, C_{Na} – натриевая проводимость вследствие утечки в каналах, $C_{QM\text{Na}}$ –квантовая мембранная натриевая проводимость, [K] – концентрация калия, C_{K} – калиевая проводимость вследствие утечки в каналах, $C_{QM\text{K}}$ – квантовая проводимость калия мембраны, F – постоянная Фарадея (96485.33 Кл/моль), R – газовая постоянная (8.31 Дж/кмоль), а T – абсолютная температура тела (310 К).

Сосредоточившись на квантовой проводимости натриевых каналов и пренебрегая таковой для калиевых каналов, подставляем уравнения (6)–(10) в уравнение (11):

$$\begin{aligned}&[\text{Na}]_o\left(C_{\text{Na}} + \left(10^3 D\frac{q^2}{h}e^{\frac{-\sqrt{8m}}{\hbar}\times\frac{2L}{3U}\sqrt{(U-(qV_m+\frac{1}{2}K_BT))^3}}\right)\right) + [\text{K}]_o C_{\text{K}} = \\ &= e^{\frac{-FV_m}{RT}}\left([\text{Na}]_i (C_{\text{Na}} + \left(10^3 D\frac{q^2}{h}e^{\frac{-\sqrt{8m}}{\hbar}\times\frac{2L}{3U}\sqrt{(U-(\frac{1}{2}K_BT))^3}}\right)\right) + [\text{K}]_i C_{\text{K}}).\end{aligned} \tag{12}$$

Мембранный потенциал V_{m}, который является отрицательным внутри по сравнению с внешней стороной мембраны, в уравнении (12) представляет собой абсолютное значение, поэтому в выражение $e^{\frac{-FV_m}{RT}}$ добавлен знак минус. Уравнение (12) вычисляет мембранный потенциал покоя с учетом квантовой проводимости ионов натрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Квантовое туннелирование ионов натрия и калия не влияет на мембранный потенциал на физиологических уровнях, потому что они имеют низкую вероятность туннелирования и, следовательно, низкую проводимость, которая не изменяет мембранный потенциал [13]. Это можно доказать, подставив в уравнение (12) следующие значения: 142 ммоль/л [20], 14 ммоль/л [20], 4 ммоль/л [20], 140 ммоль/л [20], 0.005 мСм/см^2 [20], 0.5 мСм/см^2 [20], $2\cdot10^{10}$ каналов/см^2 [21], $1.6\cdot10^{-19}$ С, $3.8\cdot10^{-26}$ кг, $5.4\cdot10^{-11}$ м [13], $6.33\cdot10^{-20}$ Дж [17] соответственно для переменных $[Na]_o$, $[Na]_i$, $[K]_o$, $[K]_i$, C_{Na}, C_K, плотность каналов D, заряд иона натрия q, масса иона натрия m, длина затвора L и свободная энергия стробирования U. В результате получаем следующее уравнение:

$$2.71+1.1\times10^{11}e^{-2.99\sqrt{(6.12-16V_m)^3}}=70.07e^{-37.45V_m}. \quad (13)$$

Используя программное обеспечение MATLAB, получаем значение мембранного потенциала $V_м = 86$ мВ, которое совпадает с величиной потенциала без учета квантовых эффектов ионов натрия. Это указывает на то, что квантовая проводимость незначительна в том смысле, что она не влияет на мембранный потенциал. Используя уравнения (6)–(10), получаем вероятность квантового туннелирования и проводимость квантовой мембраны для внеклеточных ионов натрия при мембранном потенциале –86 мВ, равные $4.4\cdot10^{-14}$ и $3.1\cdot10^{-5}$ мСм/см^2 соответственно. С другой стороны, вероятность квантового туннелирования и квантовая мембранная проводимость для внутриклеточных ионов натрия при одном и том же напряжении на мембране составляют $2.54\cdot10^{-20}$ и $1.97\cdot10^{-11}$ мСм/см^2.

Однако под влиянием определенных патологических состояний, таких как каналопатии, ишемия и механическое растяжение, энергия, необходимая для открытия закрытого канала (энергия свободного затвора), изменяется. Чтобы исследовать влияние такого изменения пороговой свободной энергии на мембранный потенциал, используется уравнение (12), но с $U = 4.75\cdot10^{-20}$ Дж (предполагая, что эти патологические состояния уменьшили пороговую свободную энергию на 25%). Соответственно получаем следующее уравнение:

$$2.71+1.1\times10^{11}e^{-3.98\sqrt{(4.54-16V_m)^3}}=70.07e^{-37.45V_m}. \quad (14)$$

Используя программное обеспечение MATLAB, получаем значение мембранного потенциала $V_м = 72$ мВ.

Видим, что уменьшение пороговой свободной энергии из-за патологических состояний сдвинуло мембранный потенциал с –86 мВ до –72 мВ, что указывает на эффект деполяризации. В результате деполяризованная мембрана становится гипервозбудимой и с большей вероятностью индуцирует потенциал действия. Соответственно, при напряжении на мембране –72 мВ вероятность квантового туннелирования и квантовая проводимость мембраны внеклеточных ионов натрия составляют $1.75\cdot10^{-11}$ и 0.014 мСм/см^2. С другой стороны, вероятность квантового туннелирования и квантовая мембранная проводимость внутриклеточных ионов натрия равны $2.13\cdot10^{-17}$ и $1.65\cdot10^{-8}$ мСм/см^2.

На основании полученных значений вероятности квантового туннелирования и квантовой проводимости мембраны при мембранном потенциале, равном –86 мВ и –72 мВ, очевидно, что внеклеточный ионы натрия имеют более высокую вероятность туннелирования и более высокую квантовую проводимость по сравнению с внутриклеточными ионами натрия. Причина такого несоответствия между внеклеточными и внутриклеточными ионами натрия заключается в неравенстве их кинетической энергии: внеклеточные ионы имеют более высокую кинетическую энергию, как показано в уравнениях (7) и (8). В результате внеклеточные ионы натрия имеют более высокую вероятность туннелирования и более высокую квантовую проводимость, как следует из уравнений (6), (9) и (10). Кроме того, когда пороговая свободная энергия уменьшается на 25%, происходит деполяризация мембранного потенциала с –86 мВ до –72 мВ. Этот деполяризующий сдвиг в мембранном потенциале можно объяснить квантовой проводимостью внеклеточных ионов натрия (0.014 мСм/см^2), которая выше, чем остаточная проводимость мембраны для ионов натрия из «дырявых» каналов (0.005 мСм/см^2), и выше, чем квантовая проводимость внутриклеточных ионов натрия ($1.65\cdot10^{-8}$ мСм/см^2).

Следовательно, ишемические изменения, каналопатии, механическое растяжение и другие ситуации, при которых уменьшается свободная энергия затвора, значительно увеличивают вероятность туннелирования ионов через закрытый затвор, так что значительная квантовая проводимость мембраны может влиять на мембранный потенциал в состоянии покоя. За счет внеклеточных ионов натрия достигается значительная квантовая проводимость мембраны, что приводит к деполяризации мембраны и делает ее более возбудимой, предрасполагая сердечную ткань к аритмиям.

Степень сдвига мембранного потенциала зависит от степени уменьшения пороговой свобод-

ной энергии. По мере ее уменьшения вероятность туннелирования и, следовательно, квантовая проводимость увеличиваются, и наоборот. Предположение о 25%-м уменьшении в данной работе было сделано только для того, чтобы показать, насколько квантовая проводимость чувствительна к изменению пороговой свободной энергии и как эта чувствительность наглядно проявляется в смещении мембранного потенциала.

Значения мембранной проводимости натрия и калия были использованы нами согласно работе [20], хотя эти значения относятся к нейронам, а не к сердечным клеткам, это не имеет значения, потому что все возбудимые ткани имеют один и тот же принцип формирования мембранного потенциала покоя, при котором проводимость калия выше, чем проводимость натрия в состоянии покоя. Кроме того, значение пороговой свободной энергии *U,* использованное в этом исследовании, предназначено для каналов Nav1.2, а не для каналов Nav1.5, которые присутствуют в мембране сердечной клетки, из-за отсутствия данных, относящихся к каналам Nav1.5. Однако основное внимание в этом исследовании уделяется тому, чтобы показать, как такое уменьшение свободной энергии затвора каналов может повлиять на мембранный потенциал, поскольку экспоненциальная функция вероятности туннелирования чувствительна к небольшим изменениям значений. Более того, эта модель может быть применена к другим возбудимым клеткам, таким как нейроны и клетки скелетных мышц, что делает выбор точного типа каналов необязательным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модель квантового туннелирования ионов натрия через закрытые каналы использована в нашем исследовании, чтобы показать эффект уменьшения пороговой свободной энергии при значительном увеличении вероятности туннелирования, так что мембрана становится деполяризованной.

Эта модель может применяться также к ионам калия и другим ионам и под влиянием других заболеваний, которые могут повлиять на свободную пороговую энергию каналов. В дополнение к этому модель может быть применена к другим возбудимым клеткам, таким как нейроны и клетки скелетных мышц, чтобы исследовать влияние определенных патологических явлений на возбудимость этих клеток.

Понимание и доказательство квантового поведения ионов в биологических системах может предложить лучшие диагностические и прогностические инструменты и, следовательно, лучшие терапевтические результаты для широкого спектра заболеваний, включая сердечную аритмию, эпилепсию и расстройства скелетных мышц.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выполненное исследование не имело финансирования из сторонних источников.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Marbán, Nature **415** (6868), 213 (2002).
2. J. T. Bigger Jr, R. J. Dresdale, R. H. Heissenbuttel, et al., Progr. Cardiovasc. Dis. **19** (4), 300 (1977).
3. M. R. Franz, R. Cima, D. Wang, et al., Circulation **86** (3), 968 (1992).
4. J. J. Bigger, Circulation **75** (5, Pt 2), 28 (1987).
5. D. Horstkotte, Acta Cardiol. **47** (2), 105 (1992).
6. M. Scardigli, S. Cannazzaro, R. Coppini, et al., Progr. Biophys. Mol. Biol. **154**, 21 (2020).
7. A. Sula, J. Booker, L. C. Ng, et al., Nature Commun. **8** (1), 1 (2017).
8. O. Yifrach and R. MacKinnon, Cell **111** (2), 231 (2002).
9. J. Huang, M. R. Estacion, P. Zhao, et al., Front. Neurosci. **13**, 918 (2019).
10. A. Chamberlin, F. Qiu, S. Rebolledo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111** (2), E273 (2014).
11. C. E. Morris, Front. Physiol. **2**, 25 (2011).
12. D. Reeves, T. Ursell, P. Sens, et al., Phys. Rev. E **78** (4), 041901 (2008).
13. A. B. Qaswal, Quantum Rep. **1** (2), 219 (2019).
14. A. B. Qaswal, NeuroQuantology, **17** (3), 43 (2019).
15. A. B. Qaswal, Clin. Psychopharmacol. Neurosci. **18** (2), 214 (2020).
16. A. B. Qaswal, Quantum Rep. **1** (2), 287 (2019).
17. A. B. Qaswal, Quantum Rep. **2** (1), 57 (2020).
18. F. Chen, J. Hihath, Z. Huang, et al., Annu. Rev. Phys. Chem. **58**, 535 (2007).
19. R.A. Serway, C. J. Moses, and C. A. Moyer, *Modern Physics; Thomson Learning* (Boston, MA, USA, 2005).
20. J.E. Hall, *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book* (Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2015).
21. A. R. Pérez-Riera, R. D. Raimundo, R. A. Watanabe, et al., J. Human Growth Devel **26** (3), 281 (2016).

The Role of Quantum Tunneling of Ions in the Pathogenesis of the Cardiac Arrhythmias due to Channelopathies, Ischemia, and Mechanical Stretch

A.B. Qaswal

School of Medicine, University of Jordan, Amman 11942, Jordan

Cardiac arrhythmias cause considerable morbidity and mortality among patients and many pathological disorders have been identified to be related to the cardiac arrhythmias. Understating of how such disorders contribute to the pathogenesis of the cardiac arrhythmia is important to improve the therapeutic outcomes. In this study, the model of quantum tunneling of ions through the closed channels was used to investigate the influence of certain pathological entities such as channelopathies, ischemia and mechanical stretch in the pathogenesis of cardiac arrhythmias. It was found that when these pathologies decrease the free gating energy of the sodium voltage-gated channels, significant depolarization of membrane potential occurs demonstrating significant quantum conductance made by significant tunneling probability of sodium ions through closed channels. This depolarization predisposes cardiac muscle to hyperexcitability and consequently arrhythmias. This model can be applied to other types of ions such as potassium and calcium ions, other types of channels, other excitable tissues such as neurons and skeletal muscle fibers, and other pathological conditions that affect the integrity of the cell membrane and this concept may be used to understand several pathological excitability-related disorders.

Keywords: quantum tunneling, voltage-gated channel, arrhythmia, channelopathy, stretch, ischemia

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 756–773

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 591.543.42+577.352.5+57.086

АКТИВНАЯ И ПАССИВНАЯ СОСТАВЛЯЮЩИЕ НЕЙРОНАЛЬНОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ И ЕГО ГЛИАЛЬНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ

© 2021 г. Ю.С. Медникова*, Д.Н. Воронков, Р.М. Худоерков**, Н.В. Пасикова*, Н.М. Захарова*****

**Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а*

***Научный центр неврологии РАН, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80*

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

**E-mail: zubkov@mi-ras.ru*

Поступила в редакцию 18.04.2021 г.
После доработки 27.04.2021 г.
Принята к публикации 29.04.2021 г.

На основе литературных и собственных данных описаны механизмы возбуждения в нервной системе и нейроглиальные отношения, участвующие в этом процессе. Возбуждение в нервной системе формируется двумя процессами – пассивным и активным. Активный тип возбуждения, требующий энергетических затрат, связан с регулированием мембранных свойств нейронов, что приводит к формированию изменчивой спонтанной импульсации. Порождаемая пассивным процессом спайковая активность очень стабильна и является следствием трансмембранного перемещения ионов Na^+ и K^+ по градиентам концентраций. Пассивный тип возбуждения обеспечивается глутаматергическими контактами, активный – диффузным выбросом ацетилхолина из холинергических ядер мозга и блокированием K^+-проницаемости. Энергетическое снабжение активного процесса возбуждения происходит с участием глии при непосредственной связи глиальных клеток с сосудами мозга, аккумулировании глюкозы в виде гликогена, осуществлении первого этапа энергетического метаболизма – гликолиза и регулирования локального мозгового кровотока, сопряженного с М-холинергическим возбуждением нейронов. При устойчивом снижении скорости М-холинергического процесса (концентрационного, температурного или энергетического) происходит стремительный отток ионов K^+ из нейронов, удаление которых из межклеточной среды также является функцией глии.

Ключевые слова: спонтанная активность, ацетилхолин, дендриты, глиальные сателлиты, общая глия, ионный гомеостаз.

DOI: 10.31857/S0006302921040165

Нейроны и глия являются партнерами для обеспечения разнообразных проявлений мозговой деятельности. Существует мнение, что без выявления механизмов взаимодействия нейрональной и глиальной сетей (рис. 1) невозможно установить основы функционирования нервной системы и определить причины нейродегенеративных отклонений [1, 2].

Эта задача трудно выполнима, поскольку как нейроны, так и глиальные клетки отличаются большим разнообразием, а процессы, которые в них протекают, часто очень быстротечны и для своего анализа требуют использования разных методических приемов. Возникшие трудности не позволяют ответить на многие вопросы уже в течение десятков лет: например, почему нейроны значительно более, чем клетки глии, уязвимы для травматических и гипоксических воздействий; какие функциональные события в нервной системе требуют значительных энергетических затрат; почему в электрически невозбудимых астроцитах регистрируемая с помощью флуоресцентного анализа Ca^{2+} волна совпадает с повышением импульсной активности в расположенных поблизости нейронах, если эти процессы пространственно разнесены и осуществляются разными механизмами.

Возникающие вопросы обусловлены особенностями функционирования глобального механизма, каждая деталь которого исполняет конкретную роль при взаимодействии с остальными элементами, требует своего энергетического обеспечения и своей морфологической организа-

Сокращение: ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал.

ции. В связи с этим мы провели анализ особенности возникновения активационных реакций отдельных нейронов V слоя сенсомоторной коры мозга морских свинок и сусликов в сравнении с локализацией глиальных элементов по отношению к нейронной сети в той же области мозга. Картирование функциональных характеристик нейронов и морфологического устройства глиальной сети одного и того же образования может способствовать дальнейшему развитию принципа нейроглиальных отношений.

I. СПОСОБЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИМПУЛЬСНОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ

Неравновесное содержание неорганических ионов по обе стороны клеточных мембран у организмов разного уровня развития – от простейших до высокоорганизованных – по мнению Ю.В. Наточина является обязательным условием поддержания жизни [3]. Это касается не только необходимых составляющих для осуществления синтетической функции клетки, но и используется в качестве электрофизиологической основы для формирования возбуждения в нервной системе. Так, в мозге экстраклеточное содержание ионов K^+ составляет 3.5 мМ, тогда как его внутриклеточная концентрация поддерживается на уровне 100 мМ. Соотношение концентраций ионов Na^+ имеет противоположную направленность [3, 4]. При наличии полупроницаемой клеточной мембраны такое распределение ионов могло бы сохраняться практически неизменно в течение длительного времени, но функционирование нейронов постоянно нарушает это неравновесное состояние, переводя его в сторону термодинамического выравнивания ионных концентрций.

Со времен А. Ходжкина и А. Хаксли [5] хорошо известно, что деполяризация нервного волокна, приводящая к формированию возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) и нервного импульса, осуществляется за счет раскрытия Na^+-каналов и возникновения Na^+-тока, приводящего при достижении критического уровня деполяризации к спайковому процессу. По мере развития деполяризации происходит нарастающее раскрытие потенциалзависимых K^+-каналов и выход K^+ из клетки, что наряду с инактивацией Na^+-каналов восстанавливает исходный уровень мембранного потенциала [5]. Этот тип возбуждения возникает при активации Н-холинорецепторов в ганглионарных нейронах вегетативной нервной системы в ответ на выброс ацетилхолина из преганглионарных волокон [6, 7]; в центральной нервной системе это осуществляется посредством глутаматных рецепторов при выбросе глутамата из специфических сенсорных афферентов и в глутаматергических контактах между нейронами [8], а также как ответ на возбуждающие токи при распространении ВПСП и спайков по нейрональным отросткам. Поскольку во всех этих случаях направления Na^+- и K^+-токов осуществляются по градиентам концентраций, развитие деполяризации не требует энергетического сопровождения, т.е. является пассивным процессом, а само возбуждение характеризуется коротким временем формирования (от нескольких мс) и сопровождается падением мембранного сопротивления [7, 9]. Важной характеристикой возникающих таким образом спайковых разрядов является ограничение их длительности продолжительностью возбуждающих токов (рис. 2) и высоким постоянством.

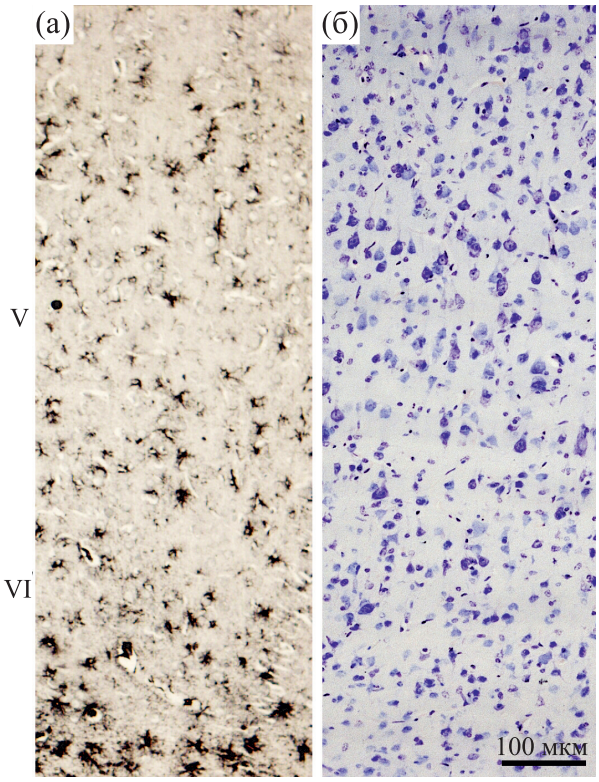


Рис. 1. Морфологическая организация глиальной и нейрональной сети сенсомоторной области коры головного мозга. Изображения выполнены на фронтальных срезах толщиной 18 мкм сенсомоторной области коры мозга суслика. (а) – Астроциты выявляли иммуногистохимическим авидин-пероксидазным методом по локализации кислого глиофибриллярного белка. Использовали поликлональные кроличьи антитела и систему детекции EXTRA-3 KIT (Sigma, США); в качестве хромогена применяли 3,3-диаминобензидин с усилением хлоридом никеля (набор SigmaFast, Sigma, США). (б) – Окраска нейронов методом Ниссля.

Вместе с тем этот тип возбуждения нарушает ионный гомеостаз как внутренней, так и внешней

Рис. 2. Примеры активационных реакций на микроионофоретическое подведение глутамата к нейронам разных корковых областей морских свинок (Пассивное возбуждение). Нейроны зарегистрированы на переживающих срезах сенсомоторной и фронтальной коры. Ионофоретическое подведение глутамата к отдельным нервным клеткам осуществляли из 1 М раствора глутамата натрия (Sigma, США) из одного из каналов трехствольного стеклянного микроэлектрода. Сила тока электрофореза – 80 нА (отрицательный полюс внутри электрода). Второй канал электрода, заполненный 3 М раствором NaCl, использовали для экстраклеточной регистрации импульсной активности; третий канал – для контроля токового эффекта. Представлены примеры импульсных реакций на локальное подведение глутамата к нейронам V слоя сенсомоторной и фронтальной коры. Время действия тока электрофореза отмечено чертой под записью активности нейронов. Длительность активационного последействия в ответах нейронов сенсомоторной коры ($N = 132$) достоверно короче, чем в ответах нейронов фронтальной коры ($N = 110$; $\chi^2 = 86.80$, $\alpha < 0.00001$.

среды, поэтому должен сопровождаться его коррекцией с помощью Na^+,K^+-АТФазы, активность которой по мнению большинства исследователей является основным потребителем энергии при создании активного состояния в нервной системе [10–13]. Но дело в том, что повышение частоты импульсации при возбуждении в большинстве случаев непосредственно не связано с приходом специфической афферентации, не является прямым следствием быстрого доведения мембранного потенциала до критического уровня, а зависит от другого механизма, возникающего за счет изменения мембранных свойств нервных клеток.

В основе этого механизма лежит деполяризация, возникающая под каждым глутаматергическим (в центральной нервной системе) или холинергическим (в автономной нервной системе) синапсом из многих тысяч, расположенных на дендритах. Дендритные контакты на 80% формируются аксонными коллатералями, диаметр которых (0.1–0.3 мкм) примерно в 10 раз меньше, чем диаметр аксона, от которого они отходят [14]. Следовательно, каждый продвигающийся по аксону спайк создаст в коллатерали в месте ее ответвления от аксона лишь слабый локальный потенциал, который погаснет при распространении по мембране довольно протяженных аксонных коллатералей. Поэтому в аксо-дендритном синапсе возможен лишь один вид деятельности: один раз в секунду происходит выброс одного кванта медиатора стандартной величины. При постоянном срабатывании многочисленных контактов на дендритах формируется стационарный поток синаптических ВПСП, который можно зарегистрировать от мембраны дендритов [15]. Регулирование этого потока за счет влияния на мембранные свойства нейронов приводит к управляемому росту частоты спонтанной импульсации, возникающей в соме. Так формируется основа для активного механизма возбуждения, поскольку регулирование мембранных свойств является очень энергоемким процессом.

Дендриты как дренажная труба. Чем тоньше дендритные веточки, тем выше их входное сопротивление ($R_{вх}$), тем больше амплитуда ВПСП, возникающих при локальном выбросе глутамата в аксо-дендритном контакте. Это обстоятельство дало основание постулировать, что амплитуда ВПСП в дендритах может достигать нескольких десятков мВ [16]. Но на пути к соме происходит ее ослабление, что и приводит к снижению синаптического потока [15]. Авторы, используя методику Patch-clamp при одновременной регистрации от дендритных локусов и от сомы, обнаружили, что максимальное ослабление может доходить до 40 раз [15]. Поэтому в срезах сенсомоторной коры при экстраклеточной регистрации от нейронов V слоя примерно у 40% нервных клеток не обнаружено спонтанной активности [17]. Однако даже в срезах, почти лишенных каких-либо возбуждающих влияний, кроме внутрикорковых, возможно зарегистрировать нейроны с разным уровнем спонтанной активности [17]. Следовательно, степень затухания амплитуды ВПСП, проходящих по дендритам, различна у разных нейронов даже в пределах небольшого мозгового образования.

В 60-х годах прошлого века были сформулированы условия, от которых зависит поведение ВПСП в дендритах [18]. Его можно сравнить с поведением жидкости в трубе с мелкими отверстиями в стенках, через которые часть жидкости постоянно вытекает наружу. С другого конца трубы вытечет тем меньше жидкости, чем длиннее труба, чем меньше ее диаметр и чем больше плотность отверстий в стенках. В случае с дендритами добавляется еще объем сомы, от которого зависит, как быстро будет достигнут критический уровень деполяризации. Вместо отверстий в стенках – плотность K^+-каналов на мембране,

которая определяет мембранное сопротивление (R_m), вместо ширины трубы (d) – диаметр дендрита на каждом компатменте, где его величина постоянна; l – длина соответствующего компатмента, R_i – удельное сопротивление внутренней среды. L – электротоническая протяженность дендрита, которая с учетом всех приведенных параметров определит степень ослабления ВПСП. Ниже приведены результирующие выражения [19]:

$$\lambda = (R_m \cdot d/4R_i)^{1/2},\ L = \sum_j \frac{l_j}{\lambda_j},$$

где λ – константа длины; j – индекс, соответствующий определенному компатменту.

Обычно электротоническую протяженность дендритов выражают числом констант длины (λ). Максимальная электротоническая длина для дендритов моторной коры кошки составила 4.9λ [20], тогда как для мотонейронов спинного мозга этот показатель меньше единицы [21]. Следовательно, в отличие от электротонически очень компактных дендритов мотонейронов спинного мозга, корковые дендриты проводят возбуждение с большим декрементом, что совпадает с преобладанием спонтанно неактивных нейронов в слое V сенсомоторной коры морских свинок [17].

Нетрудно видеть, что нервные клетки во всем их разнообразии различаются именно по тем параметрам, которые определяют степень ослабления стационарного возбуждения при его распространении по дендритам. Так, нейроны одного и того же образования различаются размерами клеточных тел [22, 23], протяженностью и степенью разветвленности дендритов [24–27]. Они также характеризуются разными мембранными свойствами, например, разной плотностью K^+-каналов на мембране, измеренной либо непосредственно [28, 29], либо по установленной выраженности постактивационной гиперполяризации [25, 30, 31].

Усилительный механизм мозга. Рост спонтанной активности нейронов, определяемый тремя перечисленными параметрами (диаметром клеточных тел, структурой и протяженностью дендритов; плотностью K^+-каналов на мембране), собственно и является проявлением активного типа возбуждения (рис. 3), который протекает за счет блокирования K^+-проницаемости специальной реакцией, требующей больших энергозатрат, но не нарушающей при этом ионного гомеостаза внутри и вне нейрональной мембраны. Она лишь выполняет разрешающую функцию – позволяет пассивно возникающему возбуждению в дендритах трансформироваться в спайковую последовательность, регистрируемую в соме. Этой реакцией является М-холинергическая реакция мозга [32, 33].

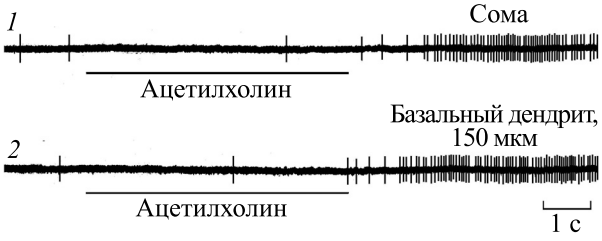


Рис. 3. Сравнительные реакции нейрона сенсомоторной коры на микроионофоретическое подведение ацетилхолина к соме и к базальному дендриту. Представлены записи нейрона, зарегистрированного в переживающем срезе в V слое сенсомоторной коры морской свинки. Ионофоретическое подведение ацетилхолина осуществляли из двух отдельных трехканальных микропипеток, одну из которых, спаянную с регистрирующим каналом, подводили к соме, а вторая, предназначенная только для электрофореза, была локализована в области дендритов. Подведение ацетилхолина к соме и дендритам производили из 2 М раствора ацетилхолина хлорида (Sigma, США) током 80 нА (положительный полюс внутри электрода). С помощью соматического микроэлектрода регистрировали импульсные реакции при локальном подведении ацетилхолина как к соме, так и к дендриту (расстояние до сомы – 150 мкм). Детали указаны в подписи к рис. 2.

Необходимо отметить, что блокирование K^+-проницаемости мембраны может быть осуществлено помимо ацетилхолина другими медиаторами (норадреналин, серотонин, дофамин), некоторыми гормонами и пептидами [34–36]. М-холинергические рецепторы прямо не связаны с K^+-каналами, эта связь опосредована вторичными посредниками: через G-белки взаимодействие ацетилхолина с М-холинорецепторами запускает многоступенчатый метаболический процесс, в котором участвуют циклические нуклеотиды, Ca^{2+}, арахидоновая кислота; усиливается обмен фосфоинозитидов. Сложность этой реакции [34, 37, 38] обусловливает ее относительно медленное (несколько сотен мс) развитие и распространение по обширной мембранной поверхности, в каждой точке которой последовательно и быстро закрываются K^+-каналы независимо от пункта воздействия ацетилхолина. Это означает, что ацетилхолин, выделившийся в любом количестве в любой точке на мембране нейрона, меняет мембранные свойства одновременно практически по всей поверхности (рис. 3). Поэтому глутамат, выброшенный из глутаматергических контактов на дендритах под влиянием ацетилхолина, воздействует на мембрану с более высоким входным сопротивлением, что обеспечивает приращение амплитуды ВПСП в месте возникновения на небольшую величину (не более нескольких %), но значительно увеличивает (в 1.5–5.6 раза) ее при продвижении ВПСП по длинному дендриту до сомы [39]. Та-

ким образом, с помощью регулирования эффективности дендро-соматического проведения в мозге был создан универсальный усилительный механизм. Его преимущество состоит в том, что при изменении мембранных свойств не более чем на 10% [40] импульсация нейронов может возрасти в десятки раз в результате трансформации синаптического дендритного потока в спайковую последовательность.

При внутриклеточной регистрации от нейронов разных структур эффект блокирования K^+-токов ацетилхолином или его аналогом карбахолом был неоднократно продемонстрирован как в отношении стационарного М-тока, так и при блокировании потенциал- и Ca^{2+}-зависимых калиевых токов, дающих вклад в постактивационную гиперполяризацию [32–34, 38]. Кроме того, блокирование М-тока создает деполяризацию внутри клетки, так как уменьшается отток позитивных ионов наружу [36]. Но деполяризация, возникшая таким образом, вряд ли сможет вызвать импульсный ответ, так как для достижения критического уровня пришлось бы закрыть 80% $M(K^+)$-каналов [36]. Таким образом, активация, возникающая при действии ацетилхолина, может быть объяснена только за счет повышения мембранного сопротивления и создания условий для глутаматергических ВПСП в дендритах более бездекрементного продвижения к соме. Этот эффект можно зарегистрировать внутриклеточно по росту амплитуды и частоты потока миниатюрных ВПСП через 1.5–4.2 с после аппликации ацетилхолина [33]. Тот же эффект, обнаруженный экстраклеточно, демонстрирует мощный рост частоты импульсации в спайковой последовательности в ответ на ионофоретическое подведение ацетилхолина, причем как к соме, так и к дендриту (рис. 3). Однотипность возникающего возбуждения при воздействии ацетилхолина на разные точки на мембране достигается за счет метаболической и очень энергоемкой внутриклеточно протекающей реакции [38]. Зависимость этой реакции от энергетического обеспечения была обнаружена почти сразу, как только были выявлены различия между глутаматергическим и М-холинергическим возбуждением. Применение блокаторов энергетического метаболизма при экстраклеточной регистрации от нейронов коры, а также создание гипоксических условий при замене кислорода во вдыхаемом воздухе на смесь NO_2 и N_2 приводило к блокированию роста импульсной активности в ответ на микроионофоретическое подведение ацетилхолина и к падению частоты спонтанной активности нейронов. Те же условия не вызывали изменений активационной реакции на локальное воздействие глутамата [41]. При внутриклеточной регистрации оказалось, что применение динитрофенола резко снижает мембранное сопротивление [41]. В дальнейшем выяснилось, что гипоксемическая гипоксия вызывала снижение процессов внутриклеточной сигнализации, в частности замедляла оборот фосфоинозитидов [42], участвующих в М-холинергическом регулировании ионной проницаемости нейрональных мембран [34, 38]. Центральный анестетик тиопентал натрия, введенный внутривенно кроликам в наркотической дозе, через минуту после начала его применения одновременно блокировал реакцию нейронов на ацетилхолин, электромиографическую реакцию на электрокожное раздражение конечности и достоверно снижал частоту спонтанной активности нейронов [43]. Таким образом, действие тиопентала, блокирующего энергетический метаболизм [44], свидетельствует не только о высокой энергозависимости М-холинергической реакции, но также о роли этого процесса в организации приспособительного поведения. Полученные данные подтверждают широко распространенное мнение о связи холинергического выброса в коре с процессами, регулирующими сенсорное восприятие, внимание и память [45, 46].

Холинергические структуры контролируют деятельность мозга повсеместно. В симпатических ганглиях ацетилхолин при его выбросе из преганглионарных волокон вызывает длительный активационный ответ (как на рис. 3) при взаимодействии с М-холинорецепторами и формирует вторую фазу активации, возникающую в ганглионарных нейронах по активному типу. Первая фаза, за счет того же холинергического выброса возникает посредством Н-холинергических рецепторов вследствие переноса ионов по градиенту концентраций, т.е. по пассивному механизму. В центральной нервной системе при сенсорной стимуляции также возникает двухкомпонентный ответ. Только первая фаза ответа связана с выбросом глутамата из окончаний специфических афферентов (как на рис. 2), а вторая – за счет диффузного выброса ацетилхолина из холинергических ядер мозга, центрально-детерминированной М-холинергической реакции. На основе очень подробного описания холинергических структур [47], с тщательным подсчетом числа холинергических и нехолинергических нейронов в каждом из них, а также содержания энзимов синтеза и распада ацетилхолина [47] можно заключить, что развитие холинергической системы мозга происходило совместно с эволюционным развитием нервной системы. Самые мощные холинергические ядра – базальные ядра переднего мозга, в своем составе содержат до 90% холинергических нейронов и иннервируют кору головного мозга – его высший интегративный центр [47].

Таким образом, структура возбуждения, формируемая в нервных клетках на всех уровнях мозга, развертывается в соответствии с одним и тем

же принципом, который предполагает согласование двух компонентов – пассивного и активного. Пассивный компонент связан с асимметрией ионов Na^+ и K^+ по обе стороны полупроницаемой мембраны и возникает за счет возбуждения токов, текущих по градиентам концентраций. Активный компонент, регулируя мембранные характеристики нейронов, управляет стационарным потоком ВПСП, непрерывно возникающих по пассивному механизму и распространяющихся по дендритам.

Как пассивный, так и активный процессы при своей реализации регулярно хотя бы частично нарушают установленное неравновесное содержание ионов с внутренней и внешней стороны нейрональных мембран. Первый – за счет хоть и кратковременных, но регулярно протекающих актов, направленных на выравнивание концентрационных градиентов при спайковой и ВПСП активности, а второй – в силу самого механизма регулирования K^+-проницаемости, который в случае недостаточного энергетическогог снабжения, а также концентрационных и температурных причин, влияющих на скорость М-холинергической реакции, может привести к устойчивому накоплению ионов K^+ с внешней стороны мембраны и, следовательно, к нарушению ионного гомеостаза. Таким образом, в процессе функционирования мозга постоянно должны решаться как минимум две проблемы – создание энергетического обеспечения активного механизма возбуждения и условий для безопасной работы нервной системы. Обе эти проблемы решаются при постоянном участии глиальной сети мозга совместно с усилиями нейрональной Na^+,K^+-АТФазы. Поэтому глия неразрывно связана с нейронами (рис. 1), и, более того, наличие глии может указать на функциональные особенности отдельных нервных клеток.

II. НЕЙРОГЛИАЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ

По количеству и массе глия и нейроны образуют примерно равное процентное соотношение в нервной системе млекопитающих [1, 48]. Глию обычно подразделяют на три функционально различные группы: астроциты, олигодендроциты и микроглию [2, 49–53]. У них различная специализация и различная представленность на корковых срезах. На 4 продемонстрированы разные типы глиальных элементов и их взаимная локализация по отношению к нейронам. Обращает на себя внимание приуроченность астроцитов к нейрональным телам, тогда как у олигодендроцитов более случайное расположение. Предполагается, что олигодендроциты преимущественно участвуют в выработке миелина, а микроглия (не показана на рисунке) обеспечивает иммунные процессы [2, 49, 50, 52, 53].

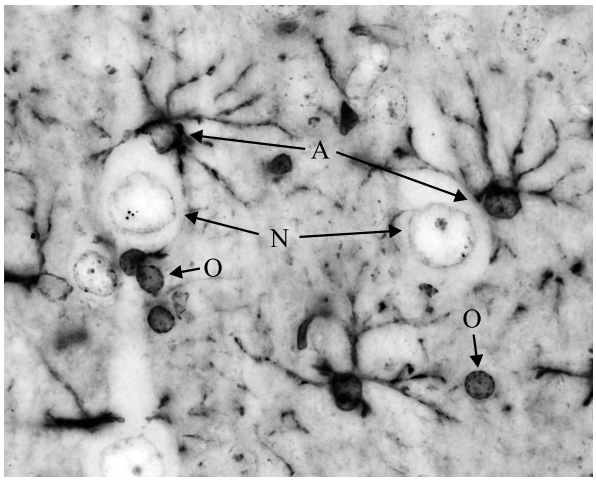


Рис. 4. Глио-нейрональная организация слоя V сенсомоторной коры головного мозга суслика. Окрашивание на кислый глиофибриллярный белок и крезиловым фиолетовым. Обозначены: А – астроцит; N – нейрон; О – олигодендроцит. Подробности приготовления препаратов срезов и их окраски указаны в подписи к рис. 1.

Астроциты представляют наиболее многочисленную группу нейроглиальных клеток. Они имеют множественные и широко разветвленные отростки (рис. 4). Структура этих отростков позволяет им пронизывать все межклеточное пространство. Кроме того, самые тонкие веточки астроцитарных ножек контактируют с синапсами, обволакивая синаптические структуры и предотвращая распространение глутамата из синаптической щели [1, 53, 54]. Взаимодействие глии с медиатором обеспечивает его элиминацию за счет активности глутаминсинтетазы в астроцитах. Поглощая глутамат с помощью транспортеров, глия превращает его в глутамин и возвращает в нейрон, где он снова трансформируется в глутамат [55]. Один астроцит может устанавливать контакты с тысячами синапсов [2, 51, 56]. Такая организация создает условия для постоянного контроля за состоянием межклеточной среды и предотвращения глутаматной нейротоксичности [10].

Энергетическая стоимость блокирования K^+-каналов. С помощью отростков астроциты оплетают также кровеносные сосуды (рис. 5). Несмотря на то что потребности мозга в энергии превышают потребности всех других тканей организма, в том числе и потребности скелетной мускулатуры [11], нейроны не имеют контактов с сосудами. Основной энергетический субстрат мозга – глюкоза – поступает преимущественно в астроциты [11] с помощью транспортеров глюкозы. В астро-

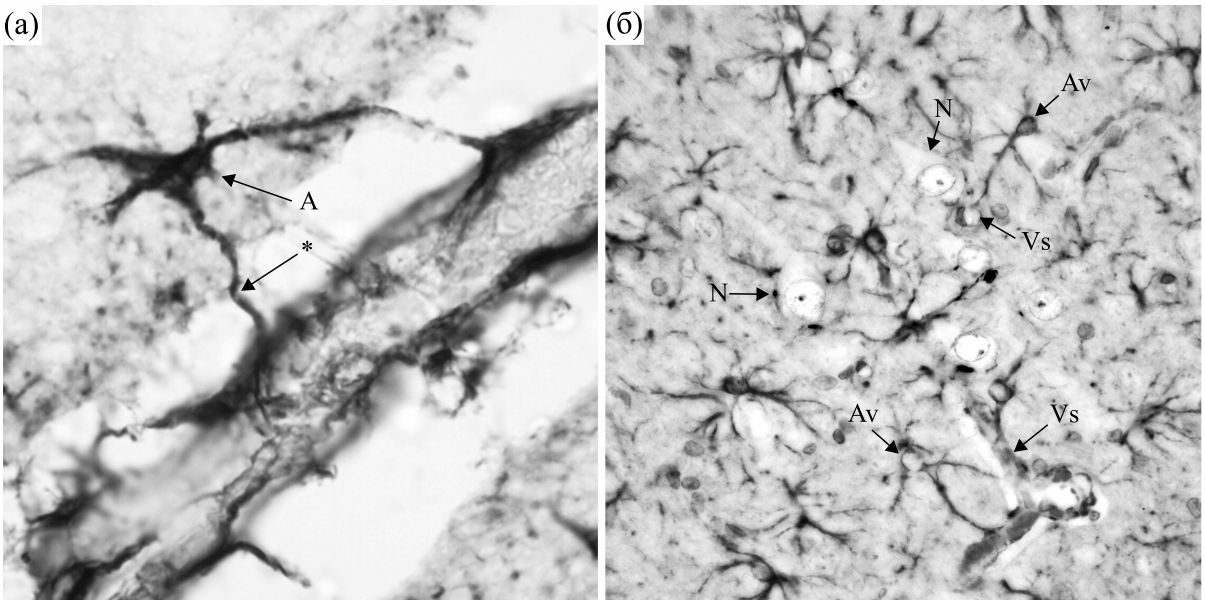


Рис. 5. (а) – Пространственные взаимоотношения нейроглии и элементов нервной ткани: A – астроцит; * – концевые ножки астроцита, оплетающие кровеносный сосуд. (б) – Глиоваскулярные отношения: N – тела нейронов; Vs – сосуды; Av – астроцит, контактирующий с сосудом. Окрашивание на кислый глиофибриллярный белок и крезиловым фиолетовым. Подробности приготовления препаратов и их окраски указаны в подписи к рис. 1.

цитах происходит первый этап энергетического метаболизма – анаэробный гликолиз, конечным продуктом которого является лактат и две молекулы АТФ. Первые данные по активному метаболизму глюкозы в глие были получены на ретине медоносной пчелы, где с помощью подведения глюкозы, имеющей радиоактивную метку [^{3}H]2-[ДГ], было обнаружено, что аккумуляция меченой глюкозы происходит почти исключительно в глиальных клетках, там же осуществляется ее фосфорилирование. В фоторецепторных нейронах в тех же условиях радиоактивной метки практически не было выявлено [57, 58]. Поскольку в глие почти отсутствуют митохондрии [58], лактат, производимый в результате гликолиза, выбрасывается из глиальных клеток, захватывается нейронами, трансформируется в пируват и в нейрональных митохондриях вступает в цикл Кребса. Таким образом, преимущественным субстратом для цикла трикарбоновых кислот в нейронах является именно лактат. Энергетический метаболизм в фоторецепторах исключительно аэробный, поскольку аноксия блокирует вызванную светом активность через несколько секунд [58]. Аналогичные глио-нейрональные отношения характерны и для других отделов мозга. Так, в культуре нервной ткани, полученной из мозга грызунов, скорость утилизации глюкозы выше для астроцитов, чем для нейронов. Следовательно, астроциты осуществляют взаимодействие с глюкозой в первую очередь. Продуктивность окислительного фосфорилирования, происходящего в нейронах, составляет 36 молекул АТФ на одну молекулу глюкозы, т.е. в 18 раз выше продуктивности гликолиза, осуществляемого в астроцитах. Следовательно, основное количество энергии, производимой мозгом, потребляется в нейронах.

В результате глионейронального взаимодействия энергетический метаболизм пространственно разнесен на анаэробную (астроцитарную) и аэробную (нейрональную) составляющие [58–62]. Кроме того, в глие не только формируется метаболический предшественник для энергетических процессов в нейронах, но создаются условия для формирования резерва энергетического субстрата в виде гликогена – полимера глюкозы. В случае снижения импульсной активности в нейронах и, следовательно, ограничения потребления лактата, гликолиз в астроцитах затормаживается, а поступающая из кровеносных сосудов глюкоза полимеризуется с помощью гликоген синтазы [57, 60, 63]. Гликоген – это стратегический запас энергетического субстрата на случай энергозависимого роста нейрональной активности, когда в ответ на сенсорную стимуляцию формируется неспецифический компонент возбуждения [64], происходит переход от сна к бодрствованию [63] или возрастает длительность периодов бодрствования [65]. Запускаемый в этих и многих аналогичных случаях гликогенолиз [66] быстро расщепляет гликоген с образованием глюкоза-6-фосфата и инициирует процесс анаэробного гликолиза. Таким образом функционирует хорошо известный в настоящее время чел-

ночный (shuttle) механизм оборота лактата в мозге, в круг которого вовлечены нейроны, сосуды и астроциты [1, 52, 54, 58]. Одним из эпизодов этого процесса является зарегистрированная связь между капиллярами и отростками астроцитов в V слое сенсомоторной коры (рис. 5). При постоянной связи с капиллярами энергетический субстрат (глюкоза) поступает в астроциты непрерывно, и по мере необходимости за счет гликолиза формируется пул лактата возле ближайших нейронов или происходит передача лактата через щелевые контакты между глиальными клетками [66]. Содержание лактата в мозге контролируется также за счет его поступления в кровь при расщеплении гликогена в печени или при интенсивных двигательных упражнениях [60, 63]. Поэтому пул лактата в межклеточном пространстве поддерживается на постоянно высоком уровне, что, как полагают авторы, в период мозговой активности способствует поддержанию сознания. Лактат с помощью астроцитов создает возобновляемый энергетический субстрат, который при поступлении в нейроны окисляется в цикле Кребса. Энергия, получаемая при аэробном окислении, составляет 95% энергетического бюджета мозга [11] и является необходимым условием для обеспечения сознания и активного восприятия [11, 67]. Многочисленные глутаматергические контакты – от 6 до 60 тысяч на один нейрон, несмотря на их постоянное функционирование, не требуют для своей активации энергетического сопровождения, поскольку возбуждаемые ими ВПСП возникают при перемещении ионов по градиенту концентраций. Значит, основным потребителем энергии при увеличении импульсной активности следует считать регулирование мембранных свойств нейронов – блокирование K^+-каналов [32, 33] при диффузионном и не обязательно синаптическом выбросе ацетилхолина (см. раздел I). Этот тип возбуждения, осуществляемый за счет М-холинергической реакции мозга, обеспечивает более эффективное проведение по дендритам глутаматергического синаптического потока – его трансформация в импульсную последовательность и формирует сознание [45, 46].

Еще одним потребителем энергии в нейронах является активирование Na^+,K^+-АТФазы, восстанавливающей ионный гомеостаз, нарушенный в результате срабатывания глутаматергических синапсов. Какой бы ни была частота импульсации в нейронах, зарегистрированных в мозге при его функционировании в нормальных условиях, амплитуда спайков остается практически неизменной. Никто из исследователей почему-то не сомневается, что именно восстановление исходных концентраций ионов Na^+ и K^+ по обе стороны мембраны после активации нейронов требует такого огромного количества АТФ, которое формируется в результате аэробного окисления глюкозы [10, 11, 13]. Но это мнение высказывается достаточно осторожно, для чего существуют серьезные основания [68]. Во-первых, чтобы встать со стула, нужно произвести работу против силы тяжести, а чтобы мозг смог направить в мышцы команду, эквивалентную этой работе, он должен затратить энергию. Значит, чтобы встать со стула, сначала должна быть затрачена энергия для преодоления силы тяготения, а уже потом для восстановления мембранного потенциала. Во вторых, несмотря на декларирование энергетического приоритета для активности Na^+,K^+-АТФазы, выясняется, что трансмембранное восстановление содержания ионов, протекающее против градиента концентраций при нормальном функционировании вполне удовлетворительно осуществляется за счет энергии, получаемой от гликолиза (5% от энергетического бюджета мозга) [11, 69]. И в-третьих, в условиях энергетического дефицита, например, при работе на переживающих срезах, значительное температурное повышение скорости М-холинергической реакции выше 36°C сразу приводит к резкому снижению амплитуды спайков регистрируемых нейронов [70]. Следовательно, М-холинергический процесс у теплокровных протекает при энергетических затратах, значительно превышающих потребности Na^+,K^+-АТФазы.

Поскольку энергетическое обеспечение нейронов непосредственно связано с глией, становится понятным, почему еще одной функцией астроцитов является регулирование локального мозгового кровотока, причем синхронно с изменением уровня спонтанной активности нейронов [1, 2, 54, 67].

Нейроны и макроглия в процессе эмбриогенеза происходят из одних и тех же предшественников – радиальной глии [2, 71], из которой в первую очередь формируются нейроны. После завершения нейрогенеза происходит глиогенетическое переключение, и радиальная глия начинает дифференцироваться в астроциты или прекурсорные клетки для олигодендроцитов. В связи с этим, естественно, что на мембранах нейронов и астроцитов экспрессируются одни и те же ионные каналы и рецепторы [1, 52, 72]. Несмотря на то что глиальные клетки электрически невозбудимы [60, 72, 73], наличие одинакового набора ионных каналов и рецепторов позволяет нейронам и астроцитам осуществлять совместное реагирование в случае общего воздействия, каким является, например, диффузионный выброс ацетилхолина. Блокирование K^+-каналов на нейрональной мембране при взаимодействии ацетилхолина с М-холинорецепторами вызывает рост спонтанной активности (см. раздел I), а рядом расположенные астроциты за счет той же самой

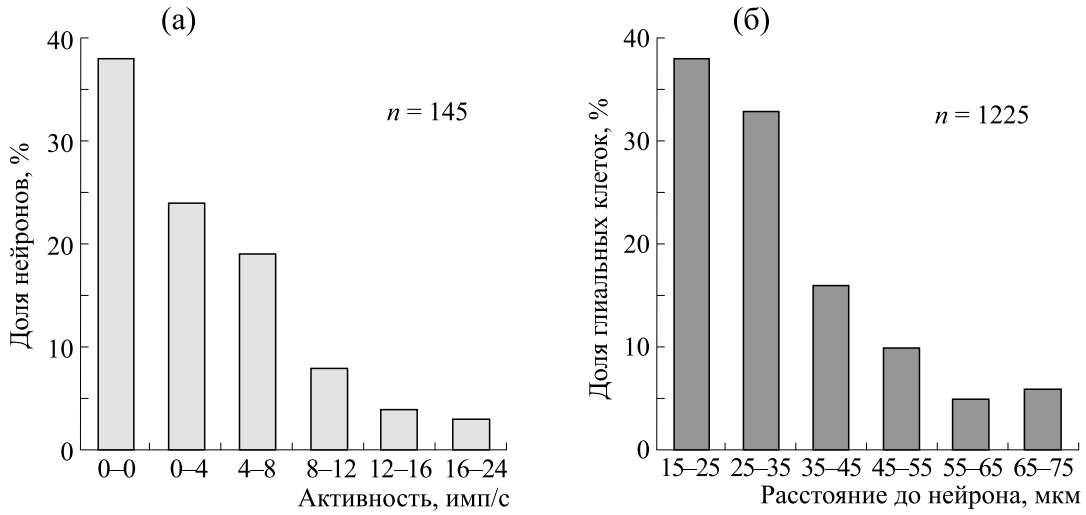


Рис. 6. Распределение нейронов V слоя сенсомоторной коры по уровню спонтанной активности в сравнении с локализацией глии по отношению к нейронам. (а) – Распределение нейронов V слоя сенсомоторной коры мозга морских свинок по уровню спонтанной активности (n = 145). По оси абсцисс – уровень спонтанной активности (имп/с); по оси ординат – доля нейронов (в %) с данным уровнем активности. (б) – Распределение глиальных клеток V слоя сенсомоторной коры по расстоянию до ближайшего нейрона (n = 1225). По оси абсцисс – расстояние до нейрона (мкм), по оси ординат – доля глиальных клеток на данном расстоянии от нейрона (%). Морфометрический анализ препаратов, окрашенных по методу Ниссля, выполняли на микроскопе Leica DMLB (Германия), оснащенным камерой Leica DC 300 и системой анализа изображений Leica Qwin. На изображении, выводимом на экран монитора, вручную при помощи графического планшета Wacon на тела нейронов центрального сечения накладывали маску, создавая замкнутый контур по периметру клетки; маски накладывали и на все ядра глиальных клеток (астроцитов и олигодендроцитов), видимых в поле зрения. Пространство между нейронами заполняли окраской серого тона с непрерывным падением градиента от максимальной окраски по периметру каждого нейрона. Расстояние между нейронами и глиоцитами определяли по интенсивности окрашивания фона.

реакции могут сформировать другой конечный эффект – выброс ионов Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, известный из литературы как Ca^{2+}-волна [2, 49, 54, 74]. Возникающая при этом реакция вазодилатации и гиперемии сосудов, как считают многие авторы [67, 74–76], является функцией астроцитов по регулированию мозгового кровотока как ответ на Ca^{2+}-волну, которая сосредотачивается именно в астроцитарных отростках [74]. Сходство процессов, происходящих в нейронах и в астроцитах при выбросе ацетилхолина, прослеживается на биохимическом уровне: активация в нейронах [34, 37] и Ca^{2+}-волна в астроцитах [74, 77, 78] протекают при участии одних и тех же вторичных посредников, в частности Ca^{2+} и инозитол-1,4,5-трифосфата.

Таким образом, можно сделать вывод, что ацетилхолин приводит к энергозависимому росту спонтанной активности в нейронах, а астроциты с помощью Ca^{2+}-волны, регулирующей локальный мозговой кровоток, снабжают эту реакцию энергией. Поэтому рост потребления O_2 при сенсорной стимуляции [79], гиперемия в сосудах [54] и М-холинергическая реакция в нейронах [33] имеют очень близкие величины латентных периодов (от нескольких сотен миллисекунд до нескольких секунд).

Индивидуальные нейроглиальные контакты. Несмотря на то что глия и нейроны функционируют совместно, расположение глии по отношению к нейронам может иметь индивидуальные черты, в соответствии с особенностями нервных клеток. Хорошо известно, например, что нейроны по-разному чувствительны к гипоксическим воздействиям [11, 80], а при морфометрическом анализе обнаруживается разное сопутствующее глиальное сопровождение у разных нервных клеток, в том числе при выпадении некоторых сенсорных функций (например, при глухоте) [81]. Разнообразие свойств нейронов характерно не только при сравнении разных структур мозга, но и в пределах одного мозгового образования. Так, на рис. 6 для V слоя сенсомоторной коры морских свинок представлено распределение нейронов по уровню спонтанной активности и распределение числа глиальных элементов, находящихся на разном расстоянии от нейронов. В V слое среди нейронов, зарегистрированных в срезах, преобладали нервные клетки, не имеющие спонтанной активности (37.2%), а глиальные клетки в наибольшем числе были расположены в непосредственной близости от нейронов (38%) (рис. 6а,б). Поскольку форма распределений для

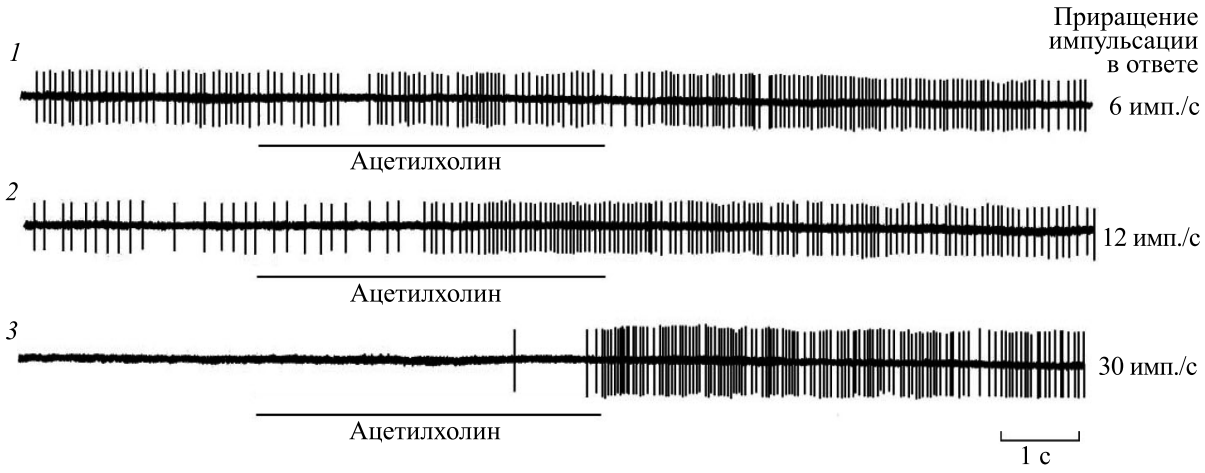


Рис. 7. Примеры реагирования нейронов V слоя сенсомоторной коры мозга морских свинок на микроионофоретическое подведение ацетилхолина. Представлены реакции нейронов, имеющих разный уровень спонтанной активности. Микроионофоретическую аппликацию ацетилхолина проводили к соме нейронов из 2 М раствора ацетилхолина хлорида (положительный полюс внутри электрода), ток электрофореза всюду 80 нА. Длительность действия тока электрофореза отмечена чертой под каждой записью. Справа указаны максимальные значения приращения импульсации в ответ на ацетилхолин у нейронов, имеющих разный уровень спонтанной активности. Детали указаны в подписи к рис. 3.

всех зарегистрированных нейронов и подсчитанных глиоцитов одинакова, это может означать, что для спонтанно неактивных нейронов характерно близкое расположение клеток глии, а для высокочастотных нервных клеток наличие глии не так существенно.

Уровень спонтанной активности у каждого нейрона зависит от степени ослабления стационарного синаптического потока при его прохождении по дендритам [15] и определяется морфологическими и мембранными свойствами нейронов (см. раздел I), из которых мембранное сопротивление является единственным регулируемым параметром. Наличие значительного числа спонтанно неактивных нейронов в V слое сенсомоторной коры свидетельствует, в частности, о высокой плотности K^+-каналов на их мембранах, что тестируется по малой выраженности постактивационного последействия в ответах на глутамат (рис. 2). Значит, если непосредственно к таким нервным клеткам подводить ацетилхолин, можно расчитывать на возникновение очень высокочастотного ответа, в отличие от спонтанно активных нейронов. На рис. 7 представлены реакции нейронов сенсомоторной коры, имеющих разный уровень спонтанной активности в ответ на микроионофоретическое подведение ацетилхолина. Во всех случаях ацетилхолин вызывал типичную активационную реакцию мускаринового типа с латентным периодом 2–4 с и длительным последействием. Самый значительный рост импульсации зарегистрирован для спонтанно неактивного нейрона – 30 имп/с (рис. 3 и 7). У нейрона с частотой импульсации 5 имп/с приращение активности в ответ на ацетилхолин составило 12 имп/с, а у самого активного в фоне нейрона – всего 5 имп/с (рис. 1, 2 и 7). Следовательно, чем выше исходная частота импульсации, тем меньше растет активность при подведении ацетилхолина, тем меньше потребуется энергии для ее развития. Поэтому глиальные клетки располагаются все дальше и дальше от нейронов (рис. 6).

Способность нейронов отвечать реакциями разной интенсивности на подведение ацетилхолина, по-видимому, является одним из принципов работы мозга по организации приспособительного поведения. По результатам регистрации импульсной активности прецентральных нейронов коры обезьян [82] были представлены спайковые последовательности у нервных клеток с разным уровнем спонтанной активности в ответ на условный световой стимул. Была выявлена та же закономерность – чем ниже исходный уровень импульсации, тем выше приращение активности в ответ на условный раздражитель. Динамика развертывающегося ответа во всех нейронах соответствовала динамике М-холинергической реакции (рис. 7), а их суммарная реакция приводила к формированию условнорефлекторного движения. Поскольку латентные периоды во всех активационных нейрональных реакциях составляли не менее 150–200 мс, был сделан вывод, что приспособительное повышение импульсной активности происходит по неспецифическому типу [82], т.е. за счет активного типа возбуждения.

Морфометрический анализ нейроглиальных соотношений в речедвигательной зоне у нормальных и глухонемых детей четырехлетнего воз-

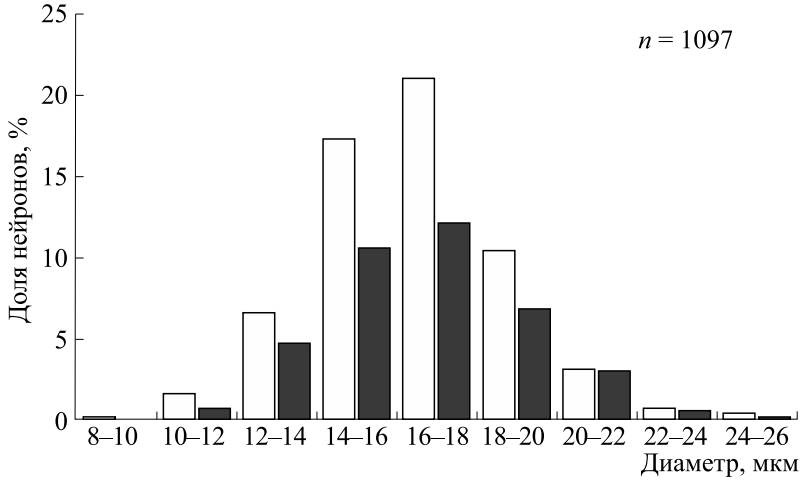


Рис. 8. Соотношение числа нейронов, имеющих и не имеющих сателлитную глию, в зависимости от размеров клеточных тел нейронов в слое V сенсомоторной коры морских свинок. По оси абсцисс – величина эквивалентного диаметра (мкм); по оси ординат – доля нейронов (в %) с соответствующим признаком: доля нейронов, не имеющих глиальных сателлитов, обозначена светлыми столбиками; доля нейронов, имеющих сателлитную глию, – темными столбиками. Сателлитные глиоциты определяли по методике, аналогичной описанной в подписи к рис. 6. Сателлитными глиоцитами считали глию, располагающуюся на расстоянии от нейронов в пределах полутора средних диаметров ядра глиальных клеток.

раста показал, что при слуховой патологии снижаются показатели нейроглиальных отношений: в полтора-два раза падает плотность общей глии и уменьшается число нейронов, окруженных глиальными сателлитами [81]. Авторы полагают, что с помощью глии при нормальном функционировании удовлетворяются энергетические потребности нейронов. Так как при выпадении функции необходимость в энергии снижается, следовательно, падает и роль глии [81].

Астроциты в разных областях мозга обладают различными генетически-детерминированными особенностями [56], но даже в пределах корковых структур их обычно подразделяют на свободную и сателлитную глию. Сателлитная глия располагается в непосредственной близости от нейронов на расстоянии как правило не превышающем полутора средних диаметров ядер глиальных клеток. Ее присутствие возле нейронов видоспецифично и вариабельно в пределах конкретной мозговой структуры. Так, максимальное число глиальных сателлитов в корковых полях у человека достигает шести глиоцитов на один нейрон [81], тогда как у морских свинок в сенсомоторной коре обнаружено не больше трех сателлитов [17]. На рис. 8 представлено распределение глиальных сателлитов в зависимости от диаметра нейронов в V слое сенсомоторной коры морских свинок. Нейронов без перинейрональной глии в каждой группе с конкретным нейрональным диаметром было больше, чем окруженных глиальными сателлитами (светлые столбики – 60% и темные столбики – 40% на рис. 8). Хорошая повторяемость этих соотношений свидетельствует о том, что наличие глиальных сателлитов кодирует еще один признак, кроме размера сомы, по которому нейроны отличаются друг от друга. Принимая во внимание участие глии в энергетическом обслуживании нейронов, можно полагать, что чем больше сателлитов, тем выше на мембране нейрона плотность K^+-каналов, которые должны закрываться при работе мозга посредством энергоемкой М-холинергической реакции. А то обстоятельство, что максимальное число глиальных сателлитов у корковых нейронов человека значительно больше [81], чем у морской свинки [17], может свидетельствовать о возможности высокочастотного реагирования наших нейронов и о нашем серьезном эволюционном преимуществе.

III. ЗАЩИТНАЯ ФУНКЦИЯ ГЛИИ

Функционирование нервной системы в связи с изменчивостью ионной проницаемости, использованием большого числа медиаторных и модуляторных воздействий, сопряженных с действием температурных и энергетических факторов регулирования, приводит к тому, что экстранейрональная среда постоянно меняется. Трансмиттерный и ионный гомеостаз обеспечивается работой нейрональной Na^+,K^+-АТФазы, но основная нагрузка приходится на глиальную сеть с использованием множественных механизмов: глиальной изоформы Na^+,K^+-АТФазы, активного удаления трансмиттеров из околосинаптического пространства, восстановления ионного состава среды, перераспределения продуктов энер-

гетического обмена, синтеза нейроактивных и трофических факторов. Специализированная функция нейропротекции, выполняемая глией, обеспечивает поддержание адаптивных физиологических процессов, нарушение которых приводит к патологическим отклонениям в деятельности мозга.

Глиальный контроль за состоянием экстраклеточной среды. Глия по отношению к нейронам занимает подчиненное положение. Глиальная сеть формируется уже после того, как выстроен нейрональный каркас [2, 71], и ее элементы устанавливаются в соответствии с функциональными особенностями индивидуальных нейронов (рис. 8) или сформированных мозговых структур [1].

Типичный астроцит состоит из сомы, четырех-десяти крупных ветвей и тысяч веточек и листочков, которые формируют около 90–95% поверхности астроцита [48]. Богатое ветвление астроцитарных отростков, направление которых не повторяет ход нейрональных дендритов, где астроциты контактируют с синаптическими образованиями [1, 49, 53], а формируют похожую на облако структуру, позволяет считать одной из основных функций астроцитов взаимодействие с межклеточным пространством и установление связей друг с другом с помощью щелевых контактов [1, 49, 54]. Исследования, проведенные с использованием прижизненной визуализации, показали, что свободные окончания астроцитарных ножек могут быть подвижны [48, 71], как бы осуществляя «сканирование» ближайших областей окружающего пространства. Это позволяет предполагать, что кроме создания фиксированных контактов с сосудами (рис. 5) и глиальных чехлов для синапсов с целью поглощения выделяемого глутамата [52, 54, 55] большое количество астроцитарных отростков свободно локализованы в межклеточном пространстве. Возможно, что для контроля за состоянием окружающей среды и удаления глутамата из возбуждающих контактов существуют разные типы глиальных элементов [1, 48, 56, 77].

В нервной системе возникает ряд состояний, связанных с устойчивым повышением наружного содержания ионов K^+. И если выброс K^+ из нейронов при возникновении спайковой активности в ответ на сенсорную стимуляцию составляет всего 1.0–1.7 мМ дополнительно к исходному уровню в 3.5 мМ [83], он может быть возвращен обратно в результате активности нейрональной Na^+,K^+-АТФазы [84]. Но в случае распространяющейся депрессии подъем $[K^+]_o$ может составить 30–45 мМ и выше [4, 84]. Невозможность быстрого удаления такого большого количества калия из межклеточного пространства собственно и является причиной распространения этого явления по мозговой ткани, так же как и причина распространения пенумбры вокруг ядерной зоны мозгового инсульта.

В экспериментах, проведенных *in vivo*, в области CA1 гиппокампа крыс с использованием специализированного для глии яда флуороцитрата было обнаружено, что, начиная с двухчасового микродиализного применения флуороцитрата, наружная концентрация K^+ постепенно повышалась, достигая 10–15 мМ через 4–6 ч [84]. При умеренном микродиализном применении KCl (50 мМ), моделирующем эффект распространяющейся депрессии, в контрольных условиях не было выявлено роста $[K^+]_o$, тогда как на фоне воздействия глиотоксина флуороцитрата уже через 2 часа замечено еще более значительное повышение наружного содержания калия в ответ на распространяющуюся депрессию с последующим его суммарным подъемом до 20–25 мМ [84]. Видимо, значительному росту концентрации калия в межклеточном пространстве препятствует глия, устраняющая его избыток при наступлении экстремальных условий.

Ионы K^+ попадают в астроциты либо пассивно через калиевые каналы, с высокой плотностью представленные на мембране глиальных клеток [72], либо с помощью астроцитарной Na^+,K^+-АТФазы, активность которой выше, чем у ее нейрональной изоформы [4, 49]. Выпрямляющие K^+_{ir}-каналы, представленные на глиальных мембранах, имеют особенность увеличивать проницаемость в квадратичной зависимости с ростом $[K^+]_o$ [4, 49, 83]. Калий, поглощенный астроцитами, в дальнейшем перетекает через щелевые контакты в те области астроцитарного синцитиума, где его концентрация ниже, или через филоподии попадает в сосуды [4]. Существуют данные, согласно которым высокая концентрация K^+ в межклеточной среде запускает Ca^{2+}-ответ в астроцитах [85], что может способствовать регулированию сосудистого русла для более эффективного глио-васкулярного взаимодействия [1, 2, 67, 75, 76].

Глия более устойчива к повреждающим факторам, чем нейроны [1, 53]. Общей чертой и определяющим признаком различных нарушений в центральной нервной системе является реактивный глиолиз – гиперэкспрессия кислого глиофибриллярного белка, в результате чего происходит набухание отростков и клеточных тел астроцитов [1, 48, 86]. Назначение этой глиальной реакции до сих пор еще недостаточно определено, но известно, что она обратима, и форма и функция астроцитов могут быть восстановлены, если неблагоприятное воздействие прекращается [1, 84]. Иное дело нейроны – под влиянием не-

скольких волн распростаняющейся депрессии даже кратковременное отключение глиального обеспечения приводит к гибели нервных клеток [84]. Кроме контроля за параметрами, обеспечивающими функциональную среду для нейронов, глия синтезирует нейроактивные вещества пептидной природы: трофические факторы и факторы роста (цитокины, TNF_{α}, BDNF, TSP-1 и др.), при выбросе которых нервные клетки приобретают способность к дополнительному синаптогенезу возбуждающих контактов и устойчивость к повреждающим факторам [1, 2, 48, 53, 56].

Основным неблагоприятным воздействием, с которым наиболее часто сталкивается нервная система в процессе функционирования, является недостаток энергетического снабжения в связи с полным отсутствием в мозге запасов энергетического субстрата [68]. Существует мнение, что любое патологическое состояние связано прямо или косвенно с нарушением кислородного гомеостаза организма [87]. По мере старения, начиная с 50-летнего возраста, проблема отягощается существенными изменениями сосудов головного мозга. В пожилом возрасте стенки сосудов обычно утолщены и менее эластичны [88, 89]. Это является причиной нарушения транспортной функции гемато-энцефалического барьера. Поэтому сосудистые изменения с возрастом очень часто приводят к недостаточности мозгового кровоснабжения и к гипоксии мозга [89]. Стойкие гипоксические явления сопряжены с нарушением продукции энергии как на этапе гликолиза, так и вследствие нарушения окислительного фосфорилирования. Борьба за выживание нервной системы в этом, казалось бы, безнадежном случае ведется сразу по нескольким направлениям. Так, снижаются энергетические потребности мозга за счет ослабления активного механизма возбуждения: регулирование мембранных свойств дендритов падает в результате замедления синтеза ацетилхолина и его выделения из холинергических ядер мозга [90]. Но это помогает лишь частично, поскольку приводит к раскрытию K^+-каналов нейрональных мембран и постепенному накоплению калия во внеклеточной среде. То же самое происходит за счет гипоксического ограничения активности Na^+,K^+-АТФазы. Таким образом, в результате постоянной возрастной гипоксии калиевое внутриклеточное содержимое постепенно перетекает из нейронов по градиенту концентраций в межклеточную среду, создавая предпосылки для устранения неравновесного распределения ионов по обе стороны мембраны, стойкой деполяризации и последующей гибели нейронов.

В нервной ткани кроме трех основных глиальных клеток: астроцитов, олигодендрицитов и микроглиальных элементов существует четвертый тип – полидендроциты, которые являются недифференцированными предшественниками макроглии [48, 51, 91]. Их существование создает возможности для формирования дополнительных глиальных клеток в случае их травматической потери или наступления патологических состояний.

Цитоархитектонические исследования, проведенные в разных областях коры мозга (речедвигательная и верхнетеменная), у людей разных возрастных групп показали, что по мере старения происходит рост общей глии: у женщин в старческом возрасте (свыше 80 лет) в III слое речедвигательной области этот показатель увеличился в разных полушариях на 9.5–16.0% по сравнению с женщинами зрелого возраста; у пожилых женщин (65–75 лет) увеличение составило 2.4–4.7%. Аналогичная возрастная динамика была характерна также для верхнетеменной области и распространялась на людей обоего пола [91]. Принимая во внимание меньшую уязвимость глии по сравнению с нейронами при существовании в гипоксических условиях, можно полагать, что повсеместный рост плотности общей глии в коре мозга при старении означает ее дополнительную дифференциацию из полидендроцитов для устранения неизбежного роста содержания экстраклеточного калия при функционировании в условиях старческой гипоксии. Вряд ли без этой глиальной реакции человеческая жизнь была бы возможна старше 55–60 лет

Но потеря нейронов все равно происходит при старении и в основном за счет нервных клеток, имеющих сателлитную глию [91]. Глиальные сателлиты исчезают вместе с нейронами, которые они окружают. Из-за отсутствия необходимого энергетического субстрата активность глиальных сателлитов неспособна обеспечить выживаемость нейронов одновременно с удовлетворением высоких энергетических требований, необходимых для выполнения функции. Из этого следует общий вывод, что в условиях глобального энергетического дефицита гибнут прежде всего те нейроны, которые требуют максимальных энергетических затрат для своей деятельности.

Из представленных на рис. 7 трех нервных клеток, реагирующих на ацетилхолин, максимальное приращение частоты импульсации в ответе показано для нейрона *3*. Реакция активного возбуждения, связанная с блокированием K^+-каналов на мембране [32, 33], именно для этого нейрона окажется энергетически самой затратной. Трудно сказать, как глиоциты находят нейроны, с которыми требуется создать тесное энергетическое сотрудничество, но они не ошибаются (рис. 8).

Глиальная защита при недостаточности активного типа возбуждения. Стойкое повышение наружного содержания ионов K^+ сопровождает все случаи снижения скорости М-холинергической

реакции и в большинстве случаев приводит к серьезным неврологическим нарушениям. Поскольку холинергический процесс является метаболической реакцией, зависимой от энергетического обеспечения и температуры, поддержание температурного и энергетического гомеостаза является обязательным условием выживания теплокровного организма. Кроме того, снижение скорости холинергической реакции происходит в мозге на стадии медленноволнового сна. С помощью микродиализных измерений в коре мозга кошек было обнаружено, что в период спокойного бодрствования содержание ацетилхолина более чем в два раза больше, чем во время глубокого сна [92]. Это создает опасность накопления $[K^+]_o$ в периоды сна, поэтому глубина сна изменчива и каждые полтора часа глубокий сон перемежается краткими эпизодами с более значительным выбросом ацетилхолина [92], а глиальным клеткам постоянно приходится откачивать экстраклеточно собравшийся во сне калий, чтобы не допустить нарушения ионного гомеостаза.

У М-холинергической реакции мозга существуют две температурные точки, где возникает рост скорости, с которой происходит ограничение K^+-проницаемости нейрональных мембран – при 28ºС и 36ºС [93]. Это означает, что ниже 28ºС наступает максимальное температурное раскрытие K^+-каналов. При работе со срезами корковых нейронов можно заметить, как ниже этой температуры разворачиваются явления, обусловленные массовым выбросом ионов K^+ из нервных клеток. На рис. 9 представлен нейрон V слоя сенсомоторной коры суслика, который при 33.4ºС не имел спонтанной активности. Рисунок демонстрирует, как при температуре ниже 28ºС появляется и растет фоновая импульсация (рис. 9а, *1*–*3*), что сопровождается снижением амплитуды спайков. Рост спонтанной активности при охлаждении не может быть связан с ее активным регулированием, так как ниже 28ºС скорость М-холинергической реакции падает. А снижение амплитуды спайков свидетельствует о том, что начинает развиваться патологический процесс и также ниже 28ºС, т.е. именно тогда, когда калий стремительно накапливается с внешней стороны мембраны. Этот же патологический процесс приводит к пассивному росту спонтанной активности, так как концентрационное соотношение ионов K^+ по обе стороны мембраны снижается, падает калиевый М-ток, растет мембранное сопротивление, что и обеспечивает более эффективное продвижение по дендритам стационарного потока глутаматергических ВПСП. Поэтому спонтанная активность при охлаждении быстро растет и преимущественно у спонтанно неактивных нейронов (рис. 9а, *1*–*3*) [94].

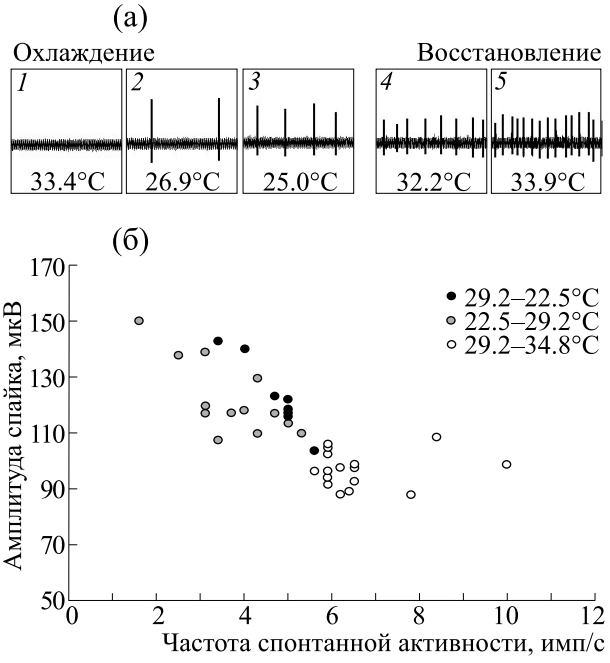


Рис. 9. Индуцируемое гипотермией возникновение импульсации у исходно неактивного нейрона и дальнейший ее рост при восстановлении температуры. Представлен нейрон V слоя сенсомоторной коры суслика. (а) – Фрагменты записи активности нейрона при охлаждении от 33.4 до 25°С и при восстановлении температуры от 32.2°С до 33.9°С. (б) – Взаимосвязь между уровнем спонтанной активности и амплитудой спайков в период гипотермии и при дальнейшем восстановлении температуры. Черные кружки обозначают последовательные измерения в интервале температур 29.2–22.5°С и 22.5–29°С; светлые кружки – в интервале 29.2–34.8°С.

Пассивный рост спонтанной активности при охлаждении аналогичен ее активному регулированию и происходит по механизму ограничения K^+-проницаемости мембран, но без участия внутриклеточного активного процесса, каким является М-холинергическая реакция, а в силу концентрационного ограничения перемещения K^+-ионов. В данном случае это означает, что гипотермическое снижение скорости М-холинергической реакции происходит не так стремительно, как быстрота накопления калия с наружной стороны мембраны, вызванное раскрытием K^+-каналов ниже 28ºС. Высокая плотность K^+-каналов на мембране может способствовать такому течению событий именно у спонтанно неактивных нейронов.

Восстановление температуры к исходным значениям (32–34ºС) не только не восстанавливает первоначальное отсутствие импульсной активности (рис. 9а, *1*), но усугубляет процесс, вызван-

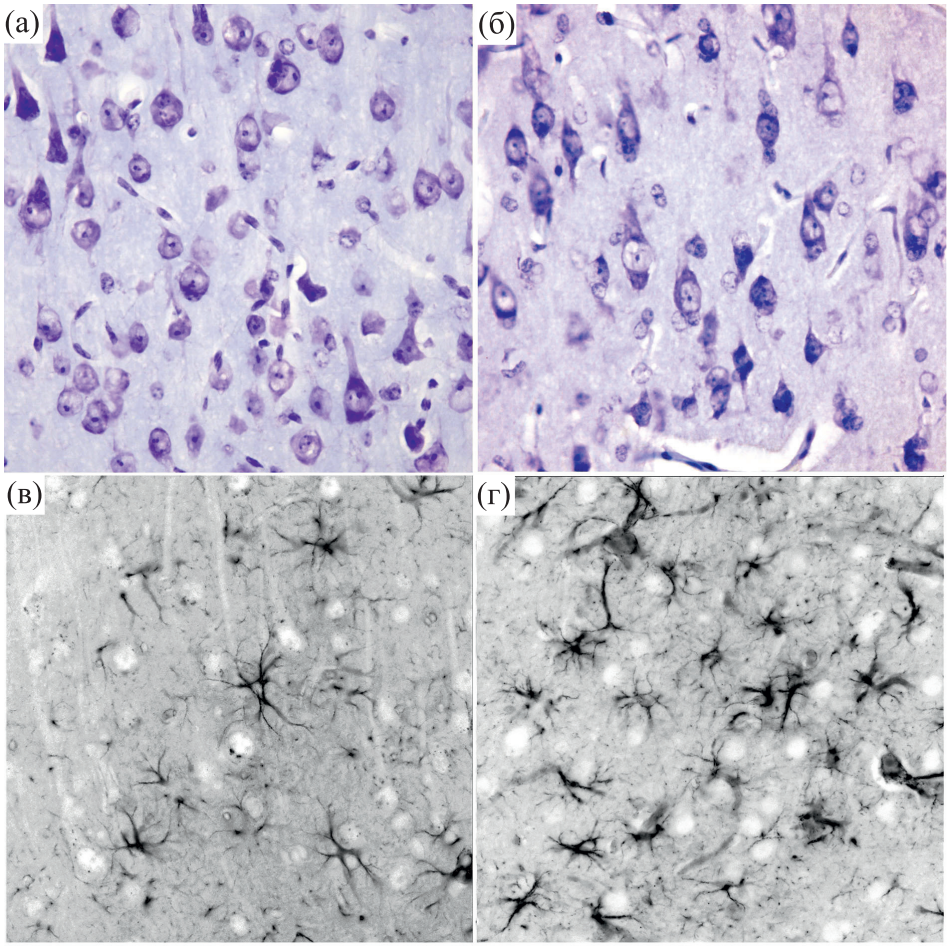


Рис. 10. Глионейрональная организация слоя V сенсомоторной коры мозга морских свинок и сусликов: (а) и (в) – срезы мозга морских свинок; (б) и (г) – срезы мозга сусликов. На (а) и (б) – окрашивание нейронов методом Ниссля (число нейронов в поле зрения (на (а) – 15.7 ± 0.11, на (б) – 15.3 ± 0.6); на (в) и (г) – иммуногистохимическое выявление астроглии по реакции на кислый глиофибриллярный белок. Плотность глиоцитов в поле зрения: на (в) – 11.87 ± 0.11, на (г) – 38.3 ± 0.8.

ный гипотермией, что характеризуется дальнейшим ростом спонтанной активности и падением амплитуды спайков (рис. 9а, *4* и *5*). Смысл этого явления связан с высоким и устойчивым повышением наружного содержания калия, что смещает мембранный потенциал в сторону деполяризации. В ответ на это потенциалзависимые K^+-каналы открываются на длительное время, в течение которого ионы K^+ продолжают вытекать из клетки, обеспечивая еще большее увеличение его наружного содержания и еще большее падение мембранного потенциала. Возникает самоподдерживающийся процесс очень продолжительного сохранения все нарастающего нарушения калиевого гомеостаза – процесс возвращения неравновесного распределения неорганических ионов к его равновесному состоянию Если этот процесс не остановить, клетка неминуемо погибнет – начало его развития представлено на рис. 9а (*4* и *5*) и рис. 9б, а для его предотвращения существует глиальная сеть, освобождающая экстраклеточную среду от избыточного содержания ионов калия.

Суслики – это гибернирующие животные, значительную часть жизни проводящие при температуре всего на несколько градусов превышающей нулевую отметку. Нахождение в таких условиях невозможно для облигатных теплокровных. Но у сусликов плотность глии в V слое сенсомоторной коры в три раза выше аналогичного показателя для морских свинок (рис. 10), т.е. используется тот же протекторный механизм, как и для стареющего мозга. И если для защиты ионного гомеостаза в условиях старческой гипоксии плотность глии растет на несколько десятков процентов по сравнению с условиями для зрелого возраста [91], то у сусликов высокая плотность глии

в мозге существует постоянно, превышая ее количество у морских свинок более чем на 200%. Таким образом, мозг сусликов защищен генетически от периодического, но очень значительного выброса калия из нервных клеток, когда скорость М-холинергической реакции падает из-за ее температурного ограничения в периоды гибернации, что является причиной значительного раскрытия K^+-каналов на мембране нейронов. Это означает, что механизм защиты ионного гомеостаза нейронов универсален – он связан с функционированием глиальной сети мозга и обеспечивает постоянство мембранного потенциала нейронов. Поэтому представление Ю.В. Наточина [3] справедливо – даже очень небольшое, но устойчивое снижение мембранного потенциала создает предпосылки для выравнивания концентраций неорганических ионов с обеих сторон нейрональной мембраны, что несовместимо с поддержанием жизни. Сохранение их неравновесного состояния зависит от функции глии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено при многолетней финансовой поддержке Российской Академии Наук.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. A. Barres, Neuron **60** (6), 430 (2008).
2. J. B. Zuchero and B. A. Barres, Development **142**, 3805 (2015).
3. Ю. В. Наточин, Вестн. РАН **77** (11), 999 (2007).
4. P. Kofuji and E. A. Newman, Neuroscience **129**, 1045 (2004).
5. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, J. Physiol. **117** (3), 500 (1952).
6. D. A. Brown, Trends Neurosci. **6** (8), 302 (1983).
7. F. F. Weight, J. A. Schulman, P. A. Smith, et al., Fed. Proc. **38** (7), 2084 (1979).
8. L. Kaczmarek, M. Kossut, and J. Skangiel-Kramska, Physiol. Rev. **77** (1), 217 (1997).
9. N. Hori, T. Galeno, and D. O. Carpenter, Cell. Mol. Neurobiol. **7** (1), 73 (1987).
10. В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Е. Г. Сорокина, Биофизика **64** (2), 316 (2019).
11. A. Ames III, Brain Res. Rev. **34**, 42 (2000).
12. S. B. Laughlin and D. Attwell, in *Brain Energetics and Neuronal Activity: Applications to fMRI and Medicine*, Ed. by R. G. Shulman and D. L. Rothman (John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2004), pp. 111–124.
13. M. T. T. Wong-Riley, Trends Neurosci. **12**, 94 (1989).
14. Дж. Экклс, *Физиология синапсов* (Мир, М., 1966).
15. S. R. Williams and G. J. Stuart, Science **295**, 1907 (2002).
16. R. J. MacGregor, Biophys. J. **8** (3), 305 (1968).
17. Н. В. Пасикова, Ю. С. Медникова, Д. Н. Воронков и др., Морфология **141** (1), 33 (2012)
18. W. Rall, in *Excitatory Synaptic Mechanisms*, Ed. by P. Andersen and J. K. S. Jansen (Universitetsforlaget, Oslo-Bergen-Tronso, 1970), pp. 175–187.
19. W. Rall, R. E. Burke, W.R. Holmes et al. Physiol. Rev. 72(Suppl), S159 (1992).
20. В. В. Шульговский, А. А. Москвитин и Б. И. Котляр, Нейрофизиология **7** (5), 468 (1975).
21. R. Iansek and S.J. Redman, J. Physiol. **234**, 665 (1973).
22. Ю. С. Медникова, Н. М. Захарова, Н. В. Пасикова и др., Журн. эволюц. биохимии и физиологии **33** (4), 295 (2017).
23. E. Henneman, Science **126**, 1345 (1957).
24. J. Bastian and J. Nguyenkim, J. Neurophysiol. **85**, 10 (2001).
25. A. M. Hattox and S. B. Nelson, J. Neurophysiol. **98**, 3300 (2007).
26. Ya. Kawaguchi, J. Neurophysiol. **69** (2), 416 (1993).
27. P. Medini, Neuroscience **190**, 112 (2011).
28. J. Kang, J. R. Huguenard, and D. A. Price, J. Neurophysiol. **76**, 188 (1996).
29. K.-R. Kim, S. Y. Lee, S. H. Yoon, et al., J. Neurosci. **40** (11), 2200 (2020).
30. R. M. Leao, L. Shuang, B. Doiron, et al., J. Neurophysiol. **107**, 3008 (2012).
31. D. A. McCormick, B. W. Connors, W. Lighthall, et al., J. Neurophysiol. **54** (4), 782 (1985).
32. K. Krnjević, R. Pumain, and L. Renaud, J. Physiol. **215** (1), 247 (1971).
33. D. A. McCormick and D. A. Prince, J. Physiol. **375**, 169 (1986).
34. Э. В. Зеймаль и С. А. Шелковников, *Мускариновые холинорецепторы* (Наука, Л.,1989).
35. P. R. Adams, D. A. Brown, and A Constanti, J. Physiol. **332**, 223 (1982).
36. D. A. Brown, in *Fast and Slow Chemical Signaling in the Nervous System*, Ed. by L. L. Iversen and E. Goodman (Oxford Univ. Press, Oxford, New York, Tokio, 1986), pp. 130–150.

37. М. О. Самойлов, Журн. эволюц.биохимии и физиологии **28** (2), 156 (1992).

38. D. A. Brown, F. C Abogadie, T. G. J. Allen, et al., Life Sci. **60** (13–14), 1137 (1997).

39. 39. Б. В. Чернышев, В. И. Майоров и А. А. Москвитин, Журн. высш. нерв. деятельности **48** (1), 99 (1998).

40. J. M. H. ffrench-Mullen, N. Hori, H. Nakanishi, et al., Cell. Mol. Neurobiol. **3** (2), 163 (1983).

41. J. M. Godfraind, H. Kawamura, K. Krnjević, et al., J. Physiol. **215**, 199 (1971).

42. T. G. Borda, A. M. Genaro, and G. Mremaschi, Cell. Mol. Neurobiol. **20** (3), 255 (2000).

43. Y. S. Mednikova, M. K. Kozlov, and A. N. Makarenko, J. Behav. Brain Sci. **9**, 33 (2019).

44. L. Sokoloff, in *Brain Energetics and Neuronal Activity. Applications to FMRI and Medicine*, Ed. by R. G. Shulman and D. L. Rothman (J. Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2004), pp. 11–30.

45. Г. Мэгун, *Бодрствующий мозг* (Иностранная литература, М., 1961).

46. P. Bentley, J. Driver, and R. Dolan, Progr. Neurobiol. **94** (4), 360 (2011).

47. M.-M. Mesulam, E. J. Mufson, B. H. Wainer, et al., Neuroscience **10** (4), 1185 (1983).

48. О. А. Гомазков, *Астроциты – звезды, которые управляют мозгом* (ИКАР, М., 2018).

49. В. Н. Мац, *Нейроглиальные соотношения в нейрокортексе при обучении* (Наука, М., 1994).

50. M. Hanani and D. C. Spray, Nature Rev. **21**, 485 (2020).

51. K. Meyer and B. K. Kaspar, Brain Res. **1656**, 27 (2017).

52. . N. Rouach and C. Giaume, Prog. Brain Res. **132**, 203 (2001).

53. A. Verkhratsky, J. J. Rodriguez, and V. Parpura, Future Neurol. **8** (2), 149 (2013).

54. E. E. Benarroch, Mayo Clin. Proc. **80** (10), 1326 (2005).

55. A. Rodriguez and A. Ortega, Am. J. Neurosci. **3** (3), 32 (2012).

56. A. S. Buosi, I. Matias, A. P. B. Araujo, et al., Mol. Neurobiol. **55** (1), 751 (2018).

57. M. Tsacopoulos, J. A. Coles, and G. Van der Werve, J. Physiol. (Paris) **82**, 279 (1987).

58. M. Tsacopoulos and P. F. Magistretti, J. Neurosci. **16** (3), 877 (1996).

59. L. H. Bergersen, Neuroscience **145**, 11 (2007).

60. A. Falkowska, I. Gutowska, M. Goschorska, et al., Int. J. Mol.Sci. **16**, 25959 (2015).

61. K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, P. J. Fisher, et al., Science **305**, 99 (2004).

62. L. Pellerin and P. J. Magistretti, Science **305** (5680), 50 (2004).

63. G. A. Dienel and N. F. Cruz, Metab. Brain Dis. **30** (1), 281 (2015).

64. R. A. Swanson, M. M. Morton, S. R. Sagar et al., Neuroscience **51** (2), 451 (1992).

65. J. Kong, P. N. Shepel, C. P. Holden et al., J. Neurosci. **22** (13), 5581 (2002).

66. G. A. Dienel, Neurosci.Letters **637**, 18 (2017).

67. P. G. Haydon and G. Carmignoto, Physiol. Rev. 86 (3), 1009 (2006).

68. К. П. Иванов, *Основы энергетики организма. Теоретические и практические аспекты*. Т.4. Энергоресурсы организма и физиология выживания (Наука, С.-Пб., 2004).

69. R. Jolivet, P. J. Magistretti, and B. Weber, Front. Neuroenergetics **1**, Art. 4 (2009).

70. Ю. С. Медникова, Н. В. Пасикова, А. В. Исакова и др., Нейрохимия **25** (1–2), 132 (2008).

71. M. Sild, M. R. Van Horn, A. Schohl, et al., J. Neurosci. **36** (19), 5279 (2016).

72. A. Verkhratsky and Ch. Steinhäuser, Brain Res. Rev. **32**, 380 (2000).

73. G. Perea and A. Araque, Brain Res. Rev. **63**, 93 (2010).

74. Yu-Wei Wu, S. Gordleeva, X. Tang, et al., Glia **67**, 246 (2019).

75. N. Bazargani and D. Attwell, Nature Neurosci. **19**, 182 (2016).

76. I. Patrushev, N. Gavrilov, V. Turlapov, et al., Cell Calcium **54**, 343 (2013).

77. J. W. Deitmer, K. Singaravelu and Ch. Lohr, *in Astrocytes in(Patho)Physiology of the Nervous System*, Ed. by V. Parpura and P. G. Haydon (Springer Science+Business Media, LLC, 2009), Chapt. 8, pp. 201–224.

78. G. Dupont and A. Goldbeter, Cell Calcium **14**, 311 (1993).

79. I. Vansetta and A. Grinvald, Science **286**, 1555 (1999).

80. P. Lipton, Physiol. Rev. **79**, 1431 (1999).

81. И. Н. Боголепова и Л. И. Малофеева, *Структурная асимметрия корковых формаций мозга человека* (Изд-во РУДН, М., 2003).

82. Ed. V. Evarts, J. Neurophysiol. **29** (6), 1011 (1966).

83. P. Kofuji and E. A. Newman, in *Astrocytes in(Patho)Physiology of the Nervous System*, Ed. by V. Parpura and P. G. Haydon (Springer Science+Business Media, LLC, 2009), p. 151.

84. C. Largo, P. Cuevas, G. G. Somjen, et al., J. Neurosci. **16** (3), 1219 (1996).

85. S. Duffy and B. A. MacVicar, Neuroscience **61** (1), 51 (1994).

86. E. Dossi, F. Vasile, and N. Rouach, Brain Res. Bull. **136**, 139 (2018).

87. Л. Д. Лукьянова, *Сигнальные механизмы гипоксии* (РАН, М., 2019).

88. В. Ф. Фокин и Н. В. Пономарева, *Энергетическая физиология мозга* (Антидор, М., 2003).

89. Дж. Шаде и Д. Форд, *Основы неврологии* (Мир, М., 1976).

90. J. T. Coyle, D. L. Price, and M. R. Delong, Science **219** (4589), 1184 (1983).

91. И. Н. Боголепова, Л. И. Малофеева и П. А. Агапов, *Старение мозга мужчин и женщин* (РАН, М., 2019).
92. F. Marrozu, Ch. Portas, M. S. Mascia, et al., Brain Res. **671** (2), 329 (1995).
93. Ю. С. Медникова и Н. В. Пасикова, Росс. физиол. журн. **90** (2), 193 (2004).
94. Ю. С. Медникова, Н. В. Пасикова, Н. М. Захарова и др., Росс. физиол. журн. **100** (9), 1008 (2014).

Active and Passive Components of Neuronal Excitation and Its Glial Support

Yu.S. Mednikova*, D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov**, N.V. Pasikova*, and N.M. Zakharova*****

**Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

***Research Center of Neurology, Russian Academy of Sciences, Volokolamskoye shosse 80, Moscow, 125367 Russia*

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

Based on publications of different authors and results of own investigations the object of this article is to describe the excitation mechanisms in the nervous system and neuron-glial interactions involved in this process. Excitation in the nervous system is formed by two processes: passive and active. The active type of excitation, requiring energy support, is associated with the regulation of the membrane properties of neurons, which leads to the formation of altered spontaneous impulses. The spike activity generated by the passive process is very stable and is a consequence of the transmembrane movement of Na^+ and K^+ ions towards concentration gradients. The passive type of excitation is developed due to glutamatergic contacts; the active type of excitation is a diffuse release of acetylcholine from the cholinergic nuclei of the brain and attenuation of K^+ membrane permeability. The energetic supply of the active process of excitation occurs with the participation of glia via the direct interaction of glial cells with the brain vessels, accumulation of glucose as a glycogen, realization of the first stage of energetic metabolism – glycolysis, and regulation of local cerebral blood flow, coupled to M-cholinergic excitation of neurons. With a steady decrease in the rate of the M-cholinergic process: concentration, temperature or energetic, there is a rapid outflow of K^+ ions from neurons, the removal of which from the intercellular environment is also a function of glia.

Keywords: spontaneous activity, acetylcholine, dendrites, glial satellites, total glia, ion homeostasis

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 774–783

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.35 57.043 579

ФЕТАЛЬНАЯ СЫВОРОТКА В СОЧЕТАНИИ С 5% ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА ЭФФЕКТИВНО ЗАЩИЩАЕТ МИКРОБИОТУ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

© 2021 г. Л.В. Заломова*, Д.А. Решетников*, С.В. Уграицкая*, Л.М. Межевикина*, А.В. Загайнова, В.В. Макаров**, С.М. Юдин**, Е.Е Фесенко (мл)***

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

***Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью МЗ РФ, 119435, Москва, Погодинская ул., 10/1*

E-mail: zalomova.91@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2021 г.
После доработки 10.03.2021 г.
Принята к публикации 18.03.2021 г.

В связи с развитием медицинских технологий все большую актуальность приобретает разработка методов длительной консервации цельной микробиоты кишечника человека, которые бы обеспечивали высокую сохранность, как в отношении видового состава, так и в отношении количественного паритета составляющих микробиоценоз бактерий. Исследовано влияние 5- и 10%-х растворов диметилсульфоксида, глицерина, этиленгликоля, желатина, полиэтиленгликоля, поливинилового спирта, фетальной сыворотки коров, а также фетальной сыворотки в комбинации с 5% диметилсульфоксида на выживаемость кишечной микробиоты человека в процессе криоконсервации в жидком азоте (минус 196°С, хранение до 7 суток). Наиболее высокие показатели выживаемости бактерий при криоконсервации достигнуты при использовании криозащитной смеси на основе фетальной сыворотки коров и 5%-го диметилсульфоксида: от 81 до 87% жизнеспособных клеток по данным флуоресцентного теста LIVE/DEAD при показателе интактной микробиоты, равном 88–90%. Эффективность выбранного криозащитного состава подтверждена также методом микробиологического культивирования в экспериментах по криоконсервации отдельных штаммов – характерных представителей микробиоты кишечника человека.

Ключевые слова: криоконсервация, флуоресцентный анализ, фетальная сыворотка коров, культивирование бактерий.

DOI: 10.31857/S0006302921040177

Микрофлора, населяющая желудочно-кишечный тракт человека, является ценным биологическим ресурсом, так как играет важную роль в жизнеобеспечении и поддержании здоровья человека. Нарушение баланса видового состава кишечной микрофлоры, наблюдаемое в последние годы в результате неконтролируемого приема антибиотиков, искусственного пищевого рациона и общего ухудшения экологической обстановки, приводит к возникновению таких заболеваний, как диабет, ожирение, гипертония, психические расстройства [1–3]. Лечение традиционными методами патологий, связанных с дисбалансом кишечной микрофлоры, не всегда дает быстрые и позитивные результаты. Одним из направлений современной медицины является интродукция кишечных микроорганизмов от здорового донора к реципиенту для восстановления основных функций микробиоты [4–6]. Рассматривается также возможность аутологичной интродукции собственных микроорганизмов, сохраненных в период жизни человека до развития заболевания (например, в молодом возрасте) [7, 8]. В этой связи все большую актуальность приобретает развитие технологий длительной консервации микробиоты кишечника человека, которые бы обеспечивали высокую сохранность микробиоты как в отношении видового состава, так и в отношении количественного паритета составляющих микробиоценоз бактерий [9, 10].

Сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид, ФСК – фетальная сыворотка коров, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ПВС – поливиниловый спирт, КОЕ – колониеобразующие единицы.

По данным современных молекулярно-генетических исследований в состав микробиоты кишечника человека входят от 500 до 1000 различных видов бактерий [11]. Основными ее представителями являются анаэробные грамположительные бифидобактерии, лактобактерии и энтерококки, а также грамотрицательные факультативные анаэробные бактероиды и кишечная палочка. Основным методом длительной консервации микробиоты является криоконсервация – низкотемпературное хранение при температуре от –80°C и ниже, до температуры жидкого азота (–196°C). Для криоконсервации существенное значение имеют внутривидовые характеристики, присущие разным бактериям, прежде всего, структурные и функциональные особенности клеточных мембран [12, 13]. Так, считается, что энтерококки и представители кишечной палочки, являясь факультативными анаэробами, имеют повышенную устойчивость к низкотемпературным воздействиям [14]. Методы низкотемпературной консервации бактерий разработаны и успешно используются для сохранения отдельных монокультур. Проблема долгосрочной низкотемпературной консервации целых микробиоценозов пока не решена. Анализ относительно немногочисленных исследований по криоконсервации микробиоты представлен в нашей обзорной статье [15]. Для сохранения микробиоты в основном пытаются использовать те же протоколы консервации, которые используются для отдельных монокультур. В качестве криопротекторов чаще всего фигурируют диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин в концентрациях от 10 до 15% [14, 16–19], реже используются дисахариды [20]. Однако в наших экспериментах было показано, что глицерин в концентрации 10–15% и ДМСО оказывают токсическое действие на клетки бактерий и что такие концентрации являются избыточными для целей криоконсервации [21]. Достаточно использовать их в 5%-й концентрации. При этом можно прогнозировать, что использование сред на основе единственного криопротектора, будь то ДСМО или глицерин, не будет обеспечивать равно эффективную защиту для всех бактерий, составляющих сообщество. В этой связи актуален поиск многокомпонентных сред, обеспечивающих синергические защитные эффекты в процессе криоконсервации.

Потенциальным компонентом для такой среды является фетальная сыворотка коров (ФСК). Согласно литературным данным, фетальная сыворотка часто используется в составе сред замораживания эукариотических клеток [22–27]. Как правило, ее концентрация в криозащитной смеси составляет 10–30%. В отдельных исследованиях успешно применяли ФСК в концентрации 90–100% [28, 29]. В работе [30] описано усиление криозащитных свойств ФСК в отношении клеточной культуры гепатоцитов в зависимости от увеличения ее содержания в среде вплоть до 90%. Ряд других экспериментов показывает, что фетальная сыворотка коров не всегда эффективно защищает клетки эукариот после криоконсервации независимо от ее концентрации [31, 32]. Очевидно, что это связано с особенностями проницаемости мембран различных типов клеток. Мы не нашли работ, в которых были бы исследованы криозащитные эффекты ФСК в отношении консервации отдельных культур бактерий или микробных сообществ.

Целью нашего исследования была оценка эффективности сохранения микробиоты кишечника человека и отдельных ее представителей, факультативных анаэробов: *Escherichia coli* (грамотрицательные бактерии), *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* (грамположительные бактерии) в процессе криоконсервации в жидком азоте под защитой ФСК, широкого спектра известных криопротекторов, а также сочетания данных агентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Микробиота кишечника человека в виде бактериальной суспензии, полученной от взрослых доноров, а также готовые коллекционные культуры кишечных микроорганизмов: семейства *Enterobacteriaceae* – *Escherichia coli* (лактозопозитивный и лактозонегативный штаммы), бактерии семейства *Enterococcaceae* (*E. faecium, E. faecalis*). Культуры кишечных микроорганизмов были взяты из индивидуальных коллекций Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Минздрава России.

Выделение бактериальных клеток. Бактериальные суспензии готовили из расчета 0.1 г фекальной массы в 0.9 мл стерильного изотонического раствора 0.9% NaCl, тщательно перемешивали до образования гомогенной консистенции. Для отделения бактерий от посторонних примесей использовали центрифугирование: сначала в 0.9% NaCl при 1200 об/мин в течение 5 мин, затем двукратное центрифугирование в 0.9% NaCl при 10000 об/мин 10 мин. Далее работали с образовавшимся осадком, который ресуспендировали в 1 мл изотонического раствора. После этого подсчитывали общее количество бактериальных клеток в суспензии по методу Виноградского–Брида [21, 33]. В результате определения числа клеток в 1 мл суспензии вычисляли объем суспензии бактерий, который будет давать конечную концентрацию микробов до величины $(1–2) \cdot 10^8$ клеток/мл криозащитной среды во всех образцах.

Монокультуры кишечных бактерий разных видов/штаммов доводили до рабочей концентра-

ции 10^7 клеток/мл криозащитной среды с помощью готовых образцов стандарта мутности.

Криоконсервация бактериальных суспензий. Замораживание суспензий кишечных бактерий (чистые культуры и микробиота) проводили в стандартных криопробирках объемом 1 мл (CRYO S, Greiner, Германия). Бактериальные суспензии в объеме 0.5 мл переносили в криопробирки, содержащие 0.5 мл криозащитной среды, 0.9% NaCl (контроль) или ФСК. Концентрация микроорганизмов в каждой криопробирке составляла $(1–2)\cdot10^8$ клеток/мл. Затем образцы замораживали путем прямого погружения криопробирок в жидкий азот со средней скоростью 90 ± 1.5°C/мин. Время между добавлением бактериальных суспензий в пробирки с протекторами и их погружением в жидкий азот не превышало 5 мин. Длительность хранения образцов в жидком азоте составляла от двух до семи суток. По истечении этого времени образцы размораживали на водяной бане при 37°C. После размораживания клетки бактерий осаждали путем центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин, затем их ресуспендировали в 0.9% NaCl для определения жизнеспособности.

Криопротекторы. В экспериментах использовали 5%-е и 10%-е растворы ДМСО (Sigma, Aldrich, США), глицерина (Sigma Aldrich, США), этиленгликоля (PanReac AppliChem, Германия), желатина (PanReac AppliChem, Германия), полиэтиленгликоля ПЭГ-600 Да (Sigma Aldrich, США), поливинилового спирта (ПВС) с молекулярной массой 72 кДа (Sigma Aldrich, США); бычий сывороточный альбумин (Biosera, Франция) и фетальную сыворотку коров (ПанЭКО, Россия). Криозащитные среды готовили на 0.9% NaCl или ФСК в весовых долях.

Оценка жизнеспособности кишечных бактерий после криоконсервации. *Метод флуоресцентного анализа.* Сравнительный анализ жизнеспособности цельной микробиоты кишечника человека до и после криоконсервации проводили флуоресцентным методом с помощью тест-набора LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 7012 (Molecular Probe, США). Жизнеспособность оценивали по соотношению интенсивности флуоресцентных красителей SITO9 и пропидиум йодида (PI), дающих зеленый (живые клетки) и красный (мертвые клетки) спектры при длине волны 480–500 и 500–635 нм соответственно.

Перед проведением флуоресцентного анализа снимали контрольные показатели интенсивности флуоресценции при разных разведениях бактериальных суспензий по соотношению живых и мертвых бактерий (0:100, 10:90, 50:50, 90:10, 100:0) для построения калибровочной кривой. Суспензию мертвых клеток получали с помощью 96%-го этилового спирта (1 ч экспозиции при комнатной температуре).

Опытные бактериальные суспензии после размораживания центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин для удаления криопротектора. После центрифугирования супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в 1 мл 0.9% NaCl. Далее образцы переносили на 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия) с добавлением в каждую лунку по 100 мкл готовой смеси флуоресцентных красителей LIVE/DEAD BacLight. Спустя 15 мин измеряли интенсивность флуоресценции на планшетном фотометре (FilterMax F5, США).

Метод микробиологического культивирования. Чистые коллекционные культуры кишечных бактерий *E. coli* (лактозопозитивный и лактозонегативный штаммы) и видов семейства *Enterococcaceae* (*E. faecium, E. faecalis)* культивировали на плотных дифференциально-диагностических средах. Для *E. coli* использовали среду Эндо агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и/или хромогенную среду HiChrom (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Энтерококки культивировали на хромогенном энтерококковом агаре (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Культивирование кишечных бактерий проводили на чашках Петри диаметром 10 см (Thermo Scientific, США) при постоянной температуре (37°C) в сухо-жаровом шкафу Heratherm IMC 18 (Thermo Scientific, США) в течение 24 ч до образования колоний на поверхности сред. Жизнеспособность бактерий оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) в серии последовательных разведениях исходной суспензии (10^7 клеток/мл). Указанная концентрация является оптимальной для высева бактерий. На чашки Петри сеяли по 0.1 мл суспензии в разведениях 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}. Для каждого разведения использовали по три чашки Петри ($n = 3$). Каждый эксперимент повторяли трижды.

Статистическая обработка результатов. Показатели жизнеспособности бактериальных клеток выражали как среднее значение ± стандартное отклонение независимых n повторов в каждом эксперименте. Статистическую значимость различий между группами проверяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $P \le 0.05$. Для построения диаграмм использовали программное обеспечение Sigma Plot 14.0 (Systat Software, Inc, Канада).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены результаты флуоресцентного анализа жизнеспособности микробиоты человека после криоконсервации под защитой различных протекторов при их сравнении с ДМСО, акцент на исследовании которого был

сделан в нашей предыдущей публикации [21]. В число исследуемых криопротекторов вошли также полимеры ПВС и ПЭГ, положительный эффект которых в процессе консервации микробиоты описан в работе [19].

Как видно из таблицы, максимальную жизнеспособность бактерий на уровне 86.0 ± 4.0 обеспечивал 5%-й раствор ДМСО. Близкие результаты по выживаемости кишечных микроорганизмов достигались при использовании 5%-х растворов глицерина, этиленгликоля и ПВС – в среднем 79–82% живых клеток. Желатин при такой же концентрации оказывал менее выраженный криозащитный эффект – 62.0 ± 2.0% жизнеспособных клеток. ПЭГ обеспечивал низкий уровень сохранности клеток – менее 40%. В работе [19] для 10%-го ПЭГ и 10%-го ПЭГ с 1%-м ПВС был показан сильный криозащитный эффект в отношении отдельных видов кишечных бактерий, однако в наших экспериментах в отношении целого микробиоценоза он не подтвердился. Важно отметить, что при переходе от 5%-й концентрации к 10%-й снижение сохранности кишечных бактерий показано для всех криопротекторов кроме желатина. Снижение показателей жизнеспособности, как мы полагаем, объясняются токсичностью этих протекторов.

Из приведенных выше результатов следует, что для низкотемпературной консервации микробиоты кишечника лучше всего подходит ДМСО в низкой концентрации – 5%. Данная концентрация является оптимальный по критерию соотношения криозащита/токсическое действие в однокомпонентной криозащитной среде, однако использование нескольких компонентов потенциально способно улучшить данный критерий, а также повысить надежность консервации в отношении бактериального микробиоценоза. В этой связи в следующем эксперименте был применен подход, основанный на совместном использовании ДМСО с фетальной сывороткой коров. Такой прием часто применяется при низкотемпературном замораживании криочувствительных эукариотических клеток.

Результаты анализа жизнеспособности микробиоты (LIVE/DEAD тест) в криозащитных средах, содержавших 5% ДМСО, 10% ДМСО, 100% ФСК, 95% ФСК + 5% ДМСО и 90% ФСК + 10% ДМСО, представлены на рис. 1. Было показано, что микробиота кишечника человека хорошо сохранялась под защитой 5%-го ДМСО, приготовленного как на основе 0.9% NaCl, так и на основе ФСК, после низкотемпературной консервации в жидком азоте – 86.0 ± 2.0% и 84.0 ± 3.0% живых клеток соответственно. 10%-е модификации сред показали более низкие результаты, что наводит на предположение о том, что сыворотка не способна нивелировать токсическое действие ДМСО. В чистой ФСК без добавления ДМСО уровень жизнеспособных бактериальных клеток также был высок и составил 82.0 ± 4.0%.

Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте с проникающими и непроникающими протекторами

Криозащитная среда	Процент жизнеспособных клеток
Интактная микробиота	89.0 ±1.0
0.9% NaCl (отрицательный контроль)	50.0 ± 1.0 [21]
ДМСО, 5%	86.0 ± 4.0 [21]
Глицерин, 5%	81.0 ± 2.0
Этиленгликоль, 5%	82.0 ± 5.0
Полиэтиленгликоль, 5%	37.0 ± 4.0
Поливиниловый спирт, 5%	79.0 ± 2.0
Желатин, 5%	62.0 ± 2.0
ДМСО, 10%	76.0 ± 5.0 [21]
Глицерин, 10%	61.0 ± 3.0
Этиленгликоль, 10%	78.0 ± 3.0
Полиэтиленгликоль, 10%	35.0 ± 2.0
Поливиниловый спирт, 10%	74.0 ± 4.0
Желатин, 10%	77.0 ± 4.0

Примечание. Тест LIVE/DEAD BacLight. Условия криоконсервации: температура –196°C, срок хранения – 72 ч. Растворы протекторов приготовлены на основе 0.9% NaCl (n = 20).

Фетальная сыворотка может выполнять роль криопротектора для кишечных микроорганизмов за счет биологических активных веществ, различных ростовых факторов и цитокинов, влияющих на свойства и сохранность клеточных мембран, а также на процессы восстановления после криоконсервации. В частности, альбумин – основной компонент сыворотки – способствует восстановлению барьерных свойств плазматической мембраны и усиливает сигнальные пути бактериальных клеток во время роста. Для того чтобы оценить его вклад в криозащиту в составе ФСК (содержание альбумина в ФСК составляет 40–50 мг/мл), был проведен эксперимент по криоконсервации микробиоты в средах с различным

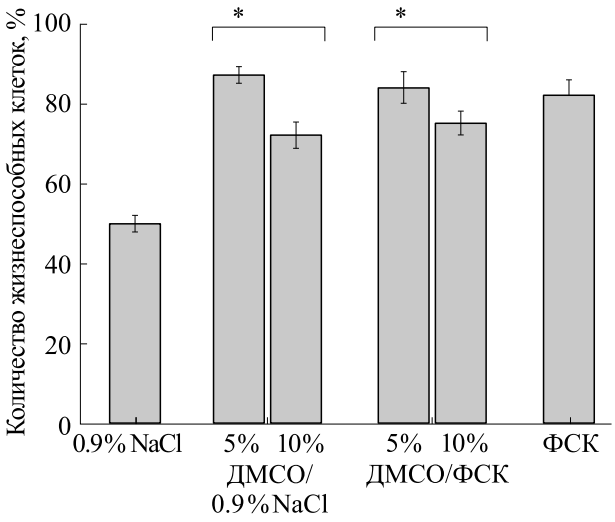


Рис. 1. Жизнеспособность (метод LIVE/DEAD BacLight) смеси кишечных микроорганизмов после криоконсервации в жидком азоте (температура –196°C, срок хранения 72 ч) в 5- и 10%-х растворах ДМСО, приготовленных на основе 0.9% NaCl и ФСК ($n = 25$). * – Достоверность различий жизнеспособности микробиоты кишечника при использовании смесей ДМСО/0.9% NaCl и ДМСО/ФСК с различной концентрацией ДМСО ($P < 0.05$), согласно критерию оценки достоверности результатов Манна–Уитни.

содержанием альбумина. В результате эксперимента показано, что чистый альбумин, взятый в концентрациях 10, 30 и 50 мг/мл, менее эффективно по сравнению с ФСК защищает микробиоту кишечника, снижая общее количество живых клеток в процессе криоконсервации до 61–73% выживших бактерий (рис. 2).

Таким образом, показано, что криозащитное действие ФСК нельзя в полной мере заместить использованием альбумина. Другие компоненты ФСК также необходимы для того, чтобы в полном объеме обеспечивать сохранность и восстановление клеток микроорганизмов желудочно-кишечного тракта.

Полученные нами результаты сохранности микробиоты показали, что добавление 5% ДМСО в ФСК дает незначительное увеличение защитных свойств среды замораживания, по сравнению с чистой сывороткой (рис. 1). Однако учитывая большое разнообразие микроорганизмов кишечной микрофлоры, обоснованно предположить, что одни фракции бактерий будут лучше сохраняться под защитой ФСК, а другие – под защитой ДМСО, что повысит надежность криоконсервации микробного сообщества.

Для подтверждения этого предположения были проведены эксперименты по криоконсервации нескольких наиболее распространенных видов/штаммов микрофлоры кишечника человека (кишечная палочка, энтерококки), различающихся между собой по строению и свойствам плазматических мембран (грамотрицательные и грамположительные бактерии). В этих экспериментах жизнеспособность клеток до и после криоконсервации оценивали по их способности образовывать колонии на плотных питательных дифференциально-диагностических средах методом посева. В роли криозащитных агентов использовали чистую ФСК, а также ФСК в сочетании с 5% ДМСО и как отрицательный контроль – 0.9% NaCl.

В ходе культивирования в течение 24 ч при температуре 37°C на питательных средах Эндо агар и HiChrom лактозопозитивный штамм *E. coli* продемонстрировал высокий рост колоний (на уровне $(12–14)\cdot10^5$ КОЕ/мл) после криоконсерва-

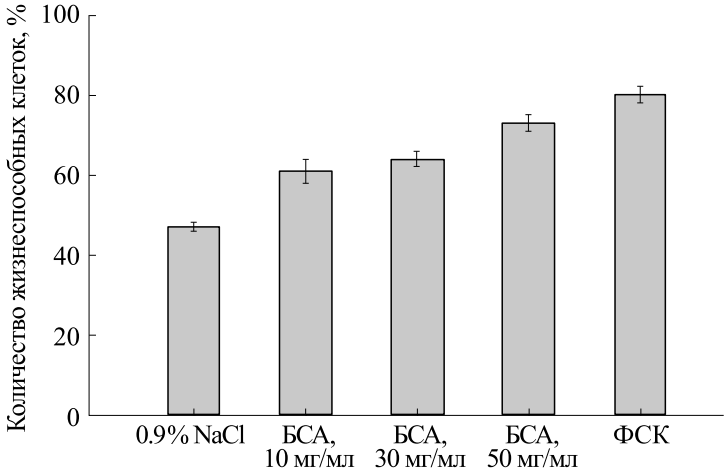


Рис. 2. Жизнеспособность (метод LIVE/DEAD BacLight) микробиоты кишечника человека после криоконсервации (температура –196°C, срок хранения 72 ч) в 0.9% NaCl, ФСК и в средах с различным содержанием альбумина, приготовленного на основе 0.9% NaCl ($n = 6$).

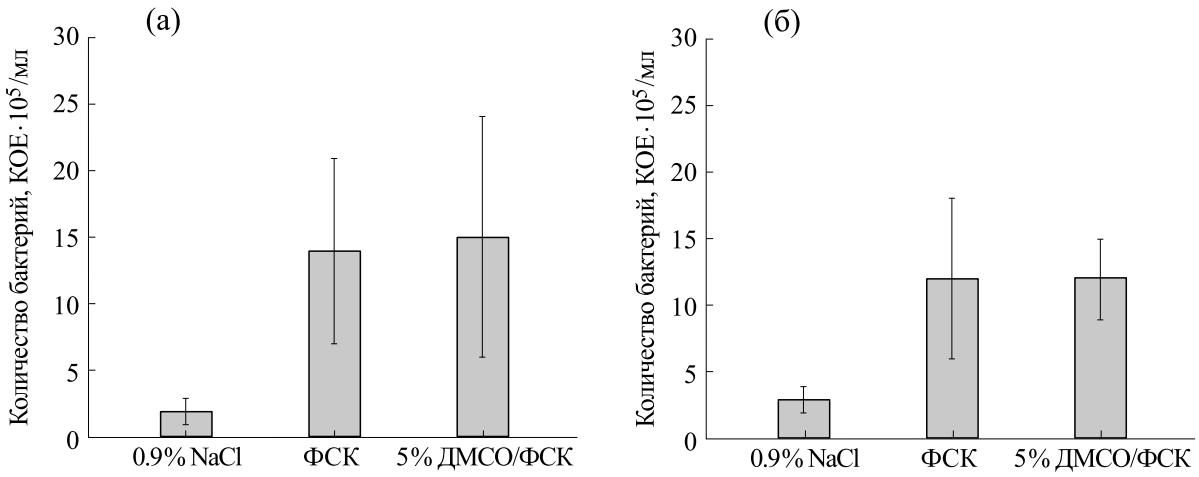


Рис. 3. Выживаемость лактозопозитивного штамма *Escherihia coli* в результате культивирования на средах Эндо агар (а) и HiChrom (б) после криоконсервации (температура –196°С, срок хранения 96 ч) в ФСК и в ее сочетании с 5% ДМСО. По стандарту мутности титр *E. coli Lac*$^+$ до криоконсервации составил 107 кл/мл.

ции в жидком азоте под защитой ФСК и ФСК с добавлением 5% ДМСО по отношению к контролю ((2–5) · 10^5 КОЕ/мл) (рис. 3).

В данном эксперименте результаты бактериального роста оказались близкими в средах ФСК и ФСК с 5% ДМСО для *E. coli Lac*$^+$. Из рис. 3 следует, что использование двухкомпонентной защитной среды для данного штамма не предоставило преимуществ по сравнению с чистой ФСК.

Помимо способности к росту колоний после криоконсервации важной оценкой также считается сохранение штаммами ферментативной активности. Особенностью лактозопозитивного штамма *E. coli* является наличие β-галактозидазной и β-глюкоронидазной ферментативной активности, обусловливающей красно-малиновый цвет колоний с металлическим блеском в среде Эндо агар и синий цвет колоний в среде HiChrom соответственно. Результаты культивирования после криоконсервации демонстрировали наличие данных цветовых показателей для позитивного штамма, что свидетельствовало о сохранности этих систем.

На рис. 4 продемонстрированы результаты культивирования лактозонегативного штамма *E. coli* после криоконсервации. Этот штамм также культивировали на чашках Петри в течение 24 ч при

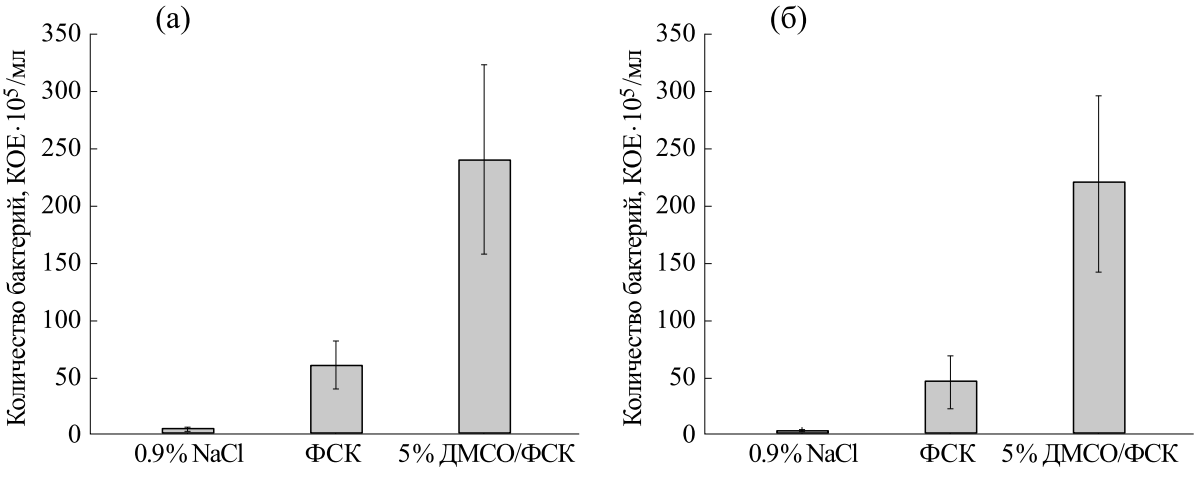


Рис. 4. Выживаемость лактозонегативного штамма *Escherihia coli* в результате культивирования на средах Эндо агар (а) и HiChrom (б) после криоконсервации (температура –196°С, срок хранения 96 ч) в ФСК и в ее сочетании с 5% ДМСО. По стандарту мутности титр *E. coli Lac*$^-$ до криоконсервации составил 107 кл/мл.

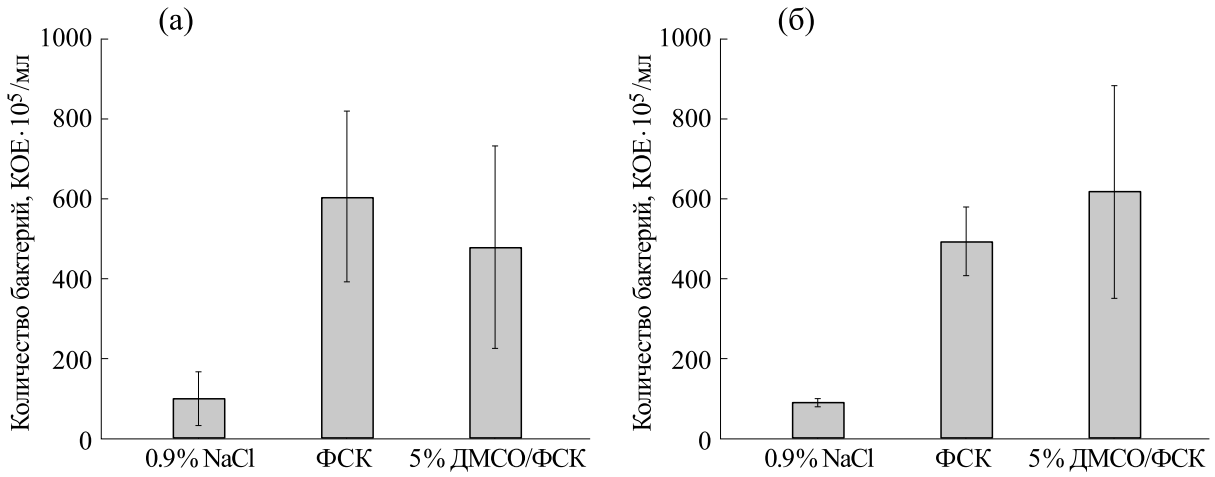


Рис. 5. Выживаемость кишечных бактерий *Enterococcus faecium* (а) и *Enterococcus faecalis* (б) в результате культивирования на энтерококковом агаре после криоконсервации (температура –196°С, срок хранения 96 ч) в ФСК и в ее сочетании с 5% ДМСО. По стандарту мутности титр *E. faecium* и *E. faecalis* до криоконсервации составил 107 кл/мл.

температуре 37°С на средах Эндо агар и HiChrom. На гистограмме видно, что интенсивный рост клеток штамма обнаруживался под защитой ФСК с добавлением 5% ДМСО – $240 \cdot 10^5$ КОЕ/мл на Эндо агаре и $218 \cdot 10^5$ КОЕ/мл на HiChrom. В 100%-й сыворотке после криоконсервации в среднем наблюдалось в четыре раза меньше восстановленных колоний *E. coli Lac*$^-$. В контрольных образцах значение КОЕ не превышало $3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В этом эксперименте двухкомпонентная криозащитная смесь продемонстрировала явное преимущество по сравнению с чистой ФСК, что подтверждает правильность выбранного подхода к криоконсервации микробиоты. Ввиду того, что в эксперименте не рассматривали чистый 5%-й ДМСО, нельзя оценить, присутствует ли синергический эффект при использовании ФСК и ДМСО. Однако подтвердилось предположение, что некоторые штаммы бактерий, в частности *E. coli Lac*$^-$, лучше сохраняются под защитой ДМСО, нежели ФСК. Можно предположить, что для ряда других бактерий сообщества будет наблюдаться обратная картина.

На рис. 5 приведены результаты выживаемости двух культур кишечных энтерококков после криоконсервации в жидком азоте. Штаммы выращивали на селективной среде – энтерококковом агаре. Данная среда позволяет идентифицировать *E. faecium* (в норме клетки имеют розовый цвет) и *E. faecalis* (в норме клетки имеют лиловый цвет) за счет различий на биохимическом уровне.

На гистограмме видно, что ФСК и ФСК в сочетании с 5% ДМСО демонстрировали высокий рост колоний *E. faecium* и *E. faecalis* до $700 \cdot 10^5$ КОЕ/мл по отношению к контролю ($(92–100) \cdot 10^5$ КОЕ/мл). Для обеих культур энтерококков не было выявлено статистически достоверных различий в результатах культивирования при сравнении сред ФСК и ФСК в комбинации с ДМСО (рис. 5). В целом представители семейства *Enterococcaceae* сохранялись примерно на том же уровне, что и *Enterobacteriaceae* при криоконсервации в жидком азоте.

Основной целью наших экспериментов было исследование сохранности микробиоты кишечника человека как целой общности. На сегодняшний день относительно мало исследований посвящено этой проблеме, несмотря на ее все возрастающую актуальность. Литературные данные показывают, что для консервации бактерий используется широкий спектр различных криопротекторов, исчерпывающий список которых можно найти в обзоре [14]. При этом самыми распространенными протоколами криоконсервации бактерий являются протоколы, основанные на использовании глицерина и ДМСО. Для консервации цельной микробиоты кишечника (бактериальные суспензии, фекальные инокуляты, цельные фекалии) преимущественно пытаются адаптировать те же самые протоколы, что и для монокультур микроорганизмов с использованием композиций 10–20%-х растворов глицерина (не менее половины всех исследований), реже ДМСО (около 20% исследований), еще реже трегалозы, инулина, ПЭГ, сахарозы, желирующих

агентов [15, 17, 35]. Для криоконсервации фекальных трансплантатов почти исключительно использовался 10%-й глицерин (10 из 11 работ, опубликованных с 2012 г.), а замораживание осуществляли при −80°C [15].

Глицерин можно рассматривать в качестве «золотого стандарта» консервации цельной микробиоты, однако его преимущества с нашей точки зрения не являются неоспоримыми. Так, в недавнем исследовании [19] показано, что 15–25%-е растворы глицерина значительно снижали выживаемость микроорганизмов. По нашим экспериментальным данным по показателю выживаемости микробиоты после консервации глицерин продемонстрировал высокую эффективность на уровне 80%, однако уступил в этом отношении ДМСО. Кроме того, отмечалось значительное снижение выживаемости микробиоты при повышении концентрации с 5% до 10%.

В работе [19], основываясь на идее о необходимости подавления в первую очередь роста кристаллов льда, вместо глицерина авторы предложили использовать полимерные непроникающие молекулы ПЭГ и ПВС по отдельности или в комбинации. При этом полимерные молекулы были призваны оказывать эффекты, аналогичные действию антифризных белков, вырабатываемых некоторыми экстремофильными бактериями [36]. Мы изучили сохранность кишечной микробиоты под защитой непроникающих протекторов ПВС и ПЭГ, которые упоминаются в работе [19]. Если в отношении ПВС был показан заметный, хотя и уступающий показателям глицерина и ДМСО, криозащитный эффект, то ПЭГ, наоборот, продемонстрировал высокую токсичность по отношению к клеткам бактерий.

Лидерами по эффективности криозащиты в нашем исследовании выступили ДМСО и ФСК. При этом их совместное использование не ухудшало показатели выживаемости микробиоты, составившие 80–90%, что сопоставимо с данными анализа незамороженной микробиоты (≈90%). Очевидно, что криозащитный состав, основанный на монокриопротекторе, не будет равноэффективно защищать всех представителей микробного сообщества. С этой точки зрения многокомпонентные составы будут иметь преимущество в надежности криоконсервации. Наши экспериментальные данные по консервации ряда выбранных представителей микробиоты подтверждают правильность такого подхода.

Основными режимами криоконсервации, используемыми для хранения микробных сообществ, являются быстрый способ замораживания с погружением образца в жидкий азот (−196°C) с последующим переносом в низкотемпературный морозильник (−80°C) (порядка 50% всех исследований) и медленный способ замораживания с помещением образца сразу на −80°C [15]. Мы использовали первый способ (со скоростью охлаждения 90°C/мин), поскольку с нашей точки зрения он обеспечивает большую гибкость при выборе температуры дальнейшего хранения: −196°C при необходимости длительного хранения, например в криобанке, или перенос на −80°C. Хранение в низкотемпературном морозильнике обычно более удобно для последующего медицинского применения.

Какие недостатки можно выделить в предлагаемом методе консервации микробиоты? Фетальная сыворотка коров является достаточно дорогостоящим биоматериалом. В этой связи использование 100%-й сыворотки может снизить экономическую эффективность предлагаемого технического решения. Поэтому актуально рассмотреть использование криозащитных сред с уменьшенным содержанием сыворотки в целях экономии для криоконсервации микробиоты кишечника человека. В дальнейшем мы планируем оценить, насколько эффективность криоконсервации зависит от содержания сыворотки в среде замораживания.

Сроки хранения материала в жидком азоте в проведенных нами экспериментах находились в интервале от двух до семи суток. Поскольку конечной целью исследования является решение проблемы долговременной консервации микробиоты, то для окончательного подтверждения полученных данных необходим анализ выживаемости бактериальных сообществ после длительных сроков хранения. В связи с этим в рамках работы были сделаны закладки кишечной микробиоты на долговременное хранение. Результаты данных экспериментов будут отражены в последующих публикациях.

ВЫВОДЫ

Представлена концепция криоконсервации микробиоты кишечника человека, используемой для биомедицинских приложений, основанная на применении многокомпонентной криозащитной среды, призванной повысить надежность консервации различных представителей микробного сообщества. Показана высокая эффективность криозащиты двухкомпонентного состава, включающего фетальную сыворотку коров и 5% ДМСО, при криоконсервации бактериальных суспензий донорской микробиоты по протоколу

быстрого замораживания в жидком азоте при −196°C.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90187, а также договора №0373100122118000037.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. L. Kau, P. P. Ahern, W. N Griffin, et al., Nature **474**, 327 (2011).
2. A. T. Vieira, M. M. Teixeira, and F. S. Martins, Front. Immunol. 4, 445 (2013).
3. L. E. Botero, L. Delgado-Serrano, M. L. Hernadez, et al., Acta Biol. Colomb. 21 (1), 5 (2016). DOI: 10.15446/abc.v21n1.49761
4. E. B. M. Daliri, C. N. Tango, B. H. Lee, and D. H. Oh, Int. J. Med. Microbiol. 308, 487 (2018).
5. D. P. Bojanova and S. R. Bordenstein, PLoS Biol. 14, e1002503 (2016).
6. E. M. Terveer, Y. H. van Beurden, A. Goorhuis, et al., Microbiology and Infection 23, 924 (2017).
7. J. Suez, N. Zmora, G. Zilberman-Schapira, U. Mor, et al., Cell **174**, 1406 (2018).
8. E. I. Ermolenko, A. N. Suvorov, V. I. Simanenkov, et al., Patent No RUS 2460778 (2010).
9. A. Barzegari, N. Saeedi, and A. A. Saei, Future Microbiol. **9** (5), 639 (2014).
10. O. Plakash, Y. Nimonkar, and Y. S. Shouche, FEMS Microbiol. Lett. **339**, 1 (2013).
11. A. V. Chaplin, A. G. Brzhozovsky, T. V. Parfenova, et al., Actual. Microbiol. **70,** 56 (2015).
12. H. T. Meryman, Transfusion **47**, 935 (2007).
13. D. Smith and M. Ryan, Sci. World J. ID 805659, 9 (2012). DOI: 10.1100/2012/805659
14. Z. Hubalek, Cryobiology **46**, 205 (2003).
15. D. V. Smirnova, L. V. Zalomova, A. V. Zagainova, et al., Int. J. Med. Microbiol. **309**, 259 (2019).
16. A. L. Bryukhanov and A. I. Netrusov, J. Appl. Biochem. Microbiol. **42**, 177 (2006).
17. L. Bircher, A. Geirnaert, F. Hammes, et al., Microb. Biotechnol. **11** (1), 163 (2018). DOI: 10.1111/1751-7915.13265
18. A. Criste, M. Giuburuncă, O. Negrea, et al., Animal Sci. and Biotechnol. **47** (2), 73 (2014).
19. M. Hasan, A. E. R. Fayter, and M. I. Gibson, Biomacromolecules **19** (8), 3371 (2018). DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00660.
20. M. Abadias, N. Teixido, J. Usall, et al., J. Food Protection **64** (6), 856 (2001).
21. Л. В. Заломова, Д. А. Решетников, С. В. Уграицкая и др., Биофизика **65** (5), 1 (2020).
22. 22. E. Müller-Schweinitzer and P. Ellis, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. **345** (5), 594 (1992). DOI: 10.1007/BF00168954
23. S.-J. Ha, B.-G. Kim, Y.-A. Lee, et al., PLoS One **11** (8), e0161372 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0161372
24. X. Fu, B. Xu, J. Jiang, et al., J. Clin. Proteomics **17,** 15 (2020). DOI: 10.1186/s12014-020-09279-6
25. D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Pogozhykh, et al., PLoS One **10** (10), e0139834 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0139834
26. Y. Yuan, Y. Yang, Y. Tian, et al., Sci. Rep. **6**, 34476 (2016). DOI: 10.1038/srep34476
27. M. Verdanova, R. Pytlik, and M. Hubalek Kalbacova, Biopreservation and Biobanking **12**, 2 (2014). DOI: 10.1089/bio.2013.0078
28. R. Fujisawa, M. Mizuno, H. Katano, et al., BMC Musculoskelet. Disord. **20**, 316 (2019). DOI: 10.1186/s12891-019-2700-3
29. K. M. Preininger, M. Singh, and C. Xu, Adv. Exp. Med. Biol. **951**, 123 (2016). DOI: 10.1007/978-3-319-45457-3_10
30. D. J. Stevenson, C. Morgan, E. Goldie, et al., Cryobiology **49** (2), 97 (2004). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.05.006
31. A. Mitchell, K. A. Rivas, R. Smith, and A. E. Watts, Stem Cell Res. Therapy **6** (1), 231 (2015). DOI: 10.1186/s13287-015-0230-y
32. C. H. Escobar and O. Chaparro, STEM Cells Translat. Med. **5** (358), (2016). DOI: 10.5966/sctm.2015-0094
33. А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др., *Практикум по микробиологии* (Академия, М., 2005), сс. 103–104.
34. T. Nei, T. Araki, and T. Matsusaka, in *Freezing and Drying of Microorganisms*, Ed. by T. Nei (Tokyo: University of Tokyo Press, 1969).
35. N. Gaci, P. P. Chaudhary, W. Tottey, et al., Microb. Ecol. Health and Disease **28**, 1308070 (2017). DOI: 10.1080/16512235.2017.1308070
36. B. Graham, A. E. R. Fayter, J. E. Houston, et al., J. Am. Chem. Soc. **140**, 17 (2018).

Fetal Serum in Combination with 5% Dimethyl Sulfoxide Effectively Protects the Human Gut Microbiota during Cryopreservation in Liquid Nitrogen

L.V. Zalomova*, D.A. Reshetnikov*, S.V. Ugraitskaya*, L.M. Mezhevikina*, A.V. Zagainova, V.V. Makarov**, S.M. Yudin**, and E.E. Fesenko (Jr)***

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

***Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Ministry of Health of the Russian Federation, Pogodinskaya ul. 10/1, Moscow, 119435 Russia*

Due to advances in medical technologies, the need for the development of methods for long-term human gut microbiota safe and efficient preservation that would retain species richness in microbial community and ensure quantitative parameters of the bacterial content of the microbiocenosis is paramount. In this study, we evaluated the effects of 5% and 10% solutions of dimethyl sulfoxide, glycerol, ethylene glycol, gelatin, polyethylene glycol, polyvinyl alcohol, fetal bovine serum, as well as fetal bovine serum in combination with 5% dimethyl sulfoxide on survival rates of human gut microbiota during cryopreservation in liquid nitrogen (–196°C, storage up to 7 days). The highest survival rates of bacteria during cryopreservation were obtained with a cryoprotective agent mixture based on fetal bovine serum and 5% dimethyl sulfoxide: the LIVE/DEAD bacterial viability kit was applied, and the detection efficiency of viable cells was 81 to 87%, along with an intact microbiota index of 88–90%. The effectiveness of the selected cryoprotectant composition was also confirmed by the method of microbiological cultivation in experiments on the cryopreservation of individual strains that were common to the human gut microbiota.

Keywords: cryopreservation, fluorescence analysis, fetal bovine serum, bacterial cultivation

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 784–790

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3:612.8

МОДЕЛЬ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНОСТИ В ЭПИЛЕПТИЧЕСКОМ ФОКУСЕ

© 2021 г. Е.Л. Машеров

Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко МЗ РФ, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., 16
E-mail: EMasherow@nsi.ru

Поступила в редакцию 29.07.2020 г.
После доработки 20.08.2020 г.
Принята к публикации 21.08.2020 г.

Предложена модель генерации активности в эпилептическом фокусе, основанная на предположении о синхронизации колебаний, возникающих в ходе регулирования уровня постоянного потенциала, и синхронизации нейронных разрядов с медленными колебаниями. В ходе развертывания приступа предположены четыре фазы – нарастания медленной активности, высокочастотных вспышек, синхронизации с появлением острых пиков, угасания приступа. Проведено сопоставлением модели с записью электрокортикограммы во время операции.

Ключевые слова: эпилепсия, ЭЭГ, высокочастотная активность, медленноволновая активность, регулирование, синхронизация.

DOI: 10.31857/S0006302921040189

Интерес, который вызывает эпилепсия, обусловлен как тем, что, с одной стороны, она является третьей по частоте среди органических поражений мозга, так и тем, с другой стороны, что проявляется в виде специфических электрографических паттернов, и понимание механизмов их возникновения позволяет прояснить механизмы функционирования мозга [1, 2]. Разнообразие форм заболевания выражается и в разнообразии эпилептиформных паттернов на электроэнцефалограмме (ЭЭГ), однако для них, как правило, характерны высокая амплитуда и острая форма волн [3]. Среди прочих типичных для паттернов разрядной активности свойств отмечаются спонтанное возникновение и независимость от фоновой активности, однотипно повторяющиеся по форме комплексы волн, тенденция к усилению и рекрутированию [1]. Запись непосредственно с поверхности коры позволила регистрировать не наблюдаемые при обычной (скальповой) ЭЭГ вспышки высокочастотной активности, проявляющиеся в диапазоне, превышающем не только обычно принимаемую верхнюю границу β-ритма 35 Гц, но и границу γ-ритма 70 Гц, и включающие частоты до 250–500 и даже 1000 Гц. Как правило, появление таких вспышек предшествует появлению видимого на снимаемой со скальпа ЭЭГ эпилептиформного паттерна, в частности, пик-волновых комплексов. Это позволяет поставить два вопроса – какова роль этих вспышек в формировании эпилептического очага и по какой причине они трудно регистрируемы со скальпа, хотя хорошо проявляются при регистрации с коры. Ответ на эти вопросы позволит прояснить патогенез эпилепсии и будет способствовать разработке методов выявления эпилептической активности, включая как аппаратуру и методику регистрации, так и алгоритмы обработки электроэнцефалограмм.

Сокращение: ЭЭГ – электроэнцефалограмма.

МОДЕЛЬ СИНХРОНИЗАЦИИ РАЗНОРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КАК МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ПРИСТУПА

В качестве источника электроэнцефалограммы в настоящее время в литературе принимается суммирование дипольных возбуждающих и тормозящих синаптических потенциалов [2]. Исторически первое объяснение – образование волн суммированием потенциалов действия, что породило термины «синхронизация» и «десинхронизация», обозначавшие появление и исчезновение высокоамплитудной ритмической активности – было отвергнуто с появлением микроэлектродной записи. Также было отвергнуто объяснение электроэнцефалограммы колебаниями уровня постоянного потенциала [4]. Однако представля-

ется целесообразным для объяснения феноменов ЭЭГ во всем их разнообразии вернуть в рассмотрение и эти механизмы, не отрицая, а дополняя ими представление о возбуждающих и тормозящих синаптических потенциалах как источниках формирования биоэлектрической активности. В работе [5] нами предложена модель формирования низкочастотной (δ-, θ- и, предположительно α-диапазонов) составляющей ЭЭГ как колебаний уровня постоянного потенциала, возникающих в процессе его регулирования. Для объяснения эпилептиформных феноменов, протекающих за короткое время (спайки – 20–50 мс, высокочастотные колебания достигают частоты 500 и более Гц), помимо такого механизма и постсинаптических потенциалов следует, вероятно, включить и имеющие меньшую временную протяженность феномены, в частности потенциалы действия.

Невозможность зарегистрировать на скальпе потенциал действия, продемонстрированная в самом начале развития электроэнцефалографии и вызвавшая отказ от объяснения ЭЭГ синхронизацией потенциалов действия, обусловлена, как нам представляется, разным характером убывания электрического потенциала при различной конфигурации зарядов. Мультипольное разложение поля, создаваемого системой зарядов, представляет его, как сумму потенциалов, создаваемого единичным зарядом, диполем, квадруполем и мультиполями более высокого порядка. Хотя непосредственно сравнивать между собой заряд, дипольный и квадрупольный потенциалы невозможно, поскольку они имеют разные размерности, однако для определенной точки регистрации возможно сопоставлять вклад различных мультиполей в суммарный потенциал. При этом с ростом расстояния потенциал, формируемый единичным зарядом, убывает обратно пропорционально расстоянию, диполем – обратно пропорционально квадрату расстояния, квадруполем – обратно пропорционально кубу расстояния. Таким образом, в зависимости от расстояния между источником и местом регистрации, относительные вклады зарядовой, дипольной и квадрупольной составляющей будут меняться. Кроме того, на величину регистрируемого потенциала влияет угол между диполем или квадруполем и направлением на точку регистрации. Этим, в частности, можно объяснить то, что вспышки высокой частоты, хорошо видимые на монополярной записи, не проявляются на биполярной. Потенциал действия, создаваемый нервным импульсом, идущим по аксону, можно рассматривать, как квадрупольный, и при увеличении расстояния он быстро убывает, его регистрация возможно лишь в непосредственной близости. Этим может объясняться невозможность записи высокочастотных вспышек со скальпа: удаление на толщину мозговых оболочек, черепной кости и кожи уже достаточно для ослабления сигнала ниже порога регистрации.

Однако разнесенные в пространстве источники могут синхронизироваться, формируя поле, убывающее медленнее, чем от единичного источника соответствующего вида. Рассмотрим простейший случай – круглую площадку радиуса R, в каждой точке которой одинаковые и однообразно, нормально к поверхности площадки, ориентированные квадрупольные источники, и найдем потенциал в точке, расположенной над центром площадки на расстоянии d. Создаваемый единичным квадруполем Q в данной точке потенциал равен

$$\pi(r,h) = Q\frac{3\cos^2\theta - 1}{l^3} = Q\left(\frac{3h^2}{\left(r^2+h^2\right)^{\frac{5}{2}}} - \frac{1}{\left(r^2+h^2\right)^{\frac{3}{2}}}\right),$$

где l – расстояние от квадруполя до точки регистрации. Тогда суммарный потенциал равен

$$\Pi(h) = \int_0^R Qr\left(\frac{3h^2}{\left(r^2+h^2\right)^{\frac{5}{2}}} - \frac{1}{\left(r^2+h^2\right)^{\frac{3}{2}}}\right)dr..$$

После замены $y = (r^2 + h^2)$ и $dy = 2rdr$ получим

$$\Pi(h) = \frac{Q}{2}\int_{h^2}^{R^2+h^2}\left(3h^2y^{-\frac{5}{2}} - y^{-\frac{3}{2}}\right)dy = \frac{Q}{4}\left(-9\frac{h^2}{\left(R^2+h^2\right)^{\frac{3}{2}}} + \frac{8}{h} + \frac{1}{\left(R^2+h^2\right)^{\frac{1}{2}}}\right).$$

Очевидно, при $h << R$ убывание потенциала медленное, определяясь вторым слагаемым, обратно пропорциональным расстоянию, а по мере роста ускоряется и при $h >> R$ приближается по скорости убывания к квадрупольному.

Это позволяет сделать вывод, что суммирование пространственно распределенных потенциалов действия может сформировать конфигурацию поля, регистрируемого на достаточно большом расстоянии. Можно предположить, что отдельные видимые лишь при регистрации с коры высокочастотные разряды в ходе развития эпилептической активности синхронизируются во времени, формируя спайк или острую волну, которая уже доступна регистрации и на скальпо-

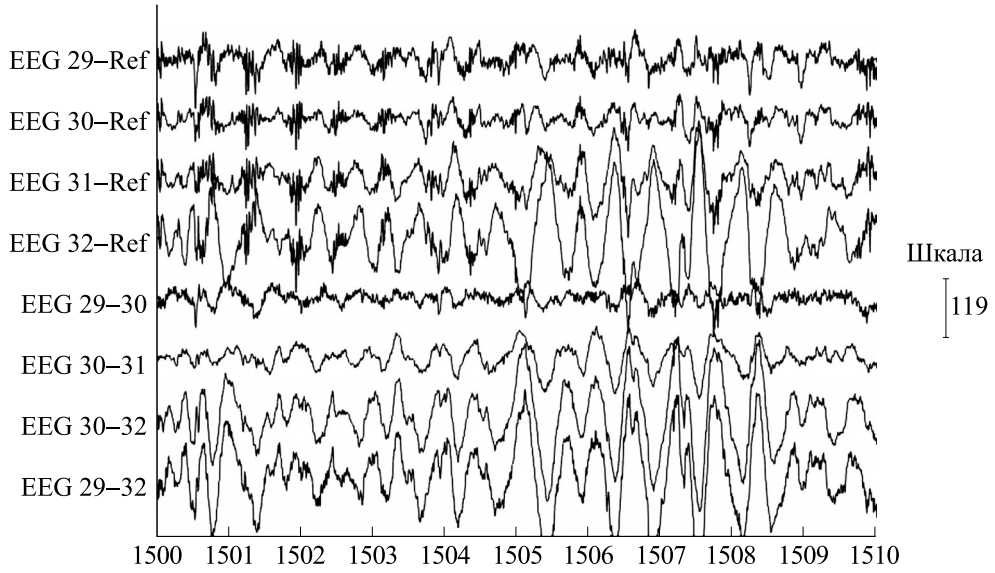


Рис. 1. Фрагмент электрокортикографической записи во время приступа. Высокочастотные вспышки хорошо заметны на монополярной записи (первые четыре канала), но не на биполярной (последующие четыре канала). Медленные колебания отчетливо видны в обоих случаях.

вых электродах в ходе обычной ЭЭГ, а не только электрокортикографии.

Механизм такой синхронизации может быть выведен из высказанной ранее гипотезы о том, что низкочастотные колебания (от δ- до, предположительно, части α-диапазона) биопотенциала отражают процессы регулирования ионного состава в ходе поддержания уровня постоянного потенциала нейрона [5]. Предполагаемый механизм этого регулятора основан на совместном действии потенциал-зависимых кальциевых каналов и калий-натриевого насоса, управляемого ионами кальция. Отклонение уровня потенциала меняет поступление ионов кальция, а их накопленная величина регулирует скорость работы калий-натриевого насоса. Такая двухступенчатая схема может рассматриваться как интегральный регулятор, который, в отличие от более простого пропорционального регулятора, является астатическим, т. е. способен поддерживать требуемое значение параметра при различной нагрузке. Это взаимодействие может быть в линейном приближении описано дифференциальным уравнением второго порядка, решением которого являются затухающие синусоидальные колебания, частота которых зависит, с одной стороны, от концентрации ионов кальция, а с другой стороны, поскольку калий-натриевый насос использует АТФ, – от концентрации АТФ. Ее дефицит приводит к замедлению работы насоса, что проявляется в снижении частоты колебаний и росте их амплитуды.

Потенциал единичного осциллятора мал, и его регистрация затруднена. Однако имеют место механизмы синхронизации колебаний, которые формируют достаточно далеко распространяющееся поле, регистрируемое, в частности, как ЭЭГ. Для данной модели наиболее существенными представляются два из них – диффузия ионов в нервной ткани и возбуждение нервной клетки полем потенциала действия другой. Возможны и иные механизмы синхронизации, которые, действуя на большем расстоянии, могут участвовать в формировании вторичных и зеркальных очагов.

В силу диффузии изменение концентрации ионов вблизи нервной клетки – единичного осциллятора – оказывает влияние на колебания соседних осцилляторов. Возникает волна, удовлетворяющая волновому уравнению с затуханием $\Delta u = \alpha\frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + \beta\frac{\partial u}{\partial t}$ и пробегающая по ткани от точки первичного возбуждения. Если пространственный ее полупериод сравним с размером области, с которой регистрируется сигнал, эта волна отчетливо проявляется на ЭЭГ.

Изменение концентрации ионов меняет возбудимость клеток, способствуя спонтанным разрядам, так что вспышки высокочастотных колебаний есть пачки таких разрядов, возникающие на определенной фазе медленной волны. Разряды отдельных нейронов возникают независимо, но с определенной вероятностью могут при очередной вспышке оказаться настолько близки по времени, что одновременное их действие окажется достаточным для возбуждения разряда в соседних клетках. Различие между синхронизацией на второй и синхронизацией на третьей стадии состоит в том, что на второй стадии колебания ионной

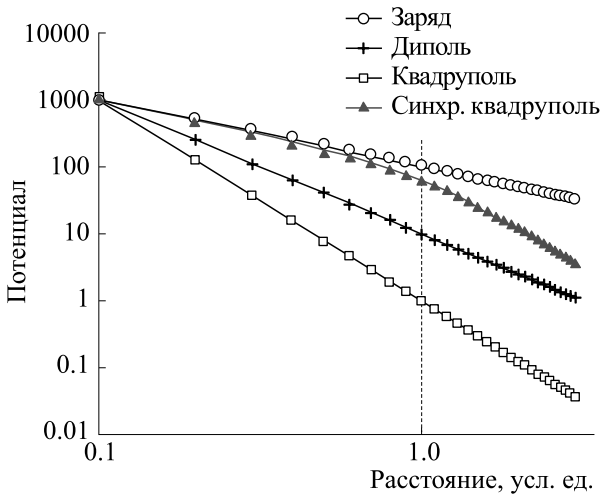


Рис. 2. Убывание создаваемого различными конфигурациями потенциала в зависимости от расстояния (шкала по осям абсцисс и ординат логарифмическая, расстояние по оси абсцисс – в усл. ед.).

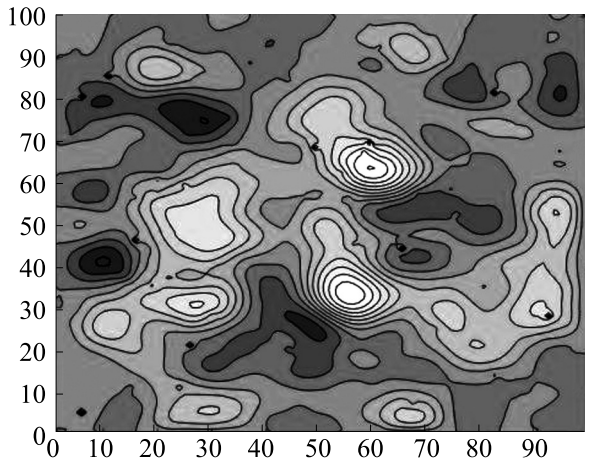


Рис. 3. Численная модель распространения осцилляций при возбуждении случайно выбранных отдельных осцилляторов пуассоновским потоком импульсов.

концентрации меняют вероятность спонтанного проявления потенциала действия, и повышение этой вероятности проявляется в учащении разрядов, что и регистрируется как высокочастотная активность, огибающая которой синхронизирована с низкочастотной активностью. На третьей же стадии между собой синхронизируются по времени отдельные разряды, формируя острый пик. Более формально это можно описать моделью, в которой разряды i-го нейрона образуют пуассоновский процесс с параметром λ, зависящей от концентрации ионов c_i в окрестности нейрона, как $\lambda_i = \lambda(c_i)$. Суммарный поток также будет пуассоновским процессом с $\lambda = \sum\lambda_i$. Если для возбуждения разряда необходимо возникновение на промежутке времени Δt не менее k спонтанных разрядов, то вероятность такого события выражается через неполную гамма-функцию, как

$$P(k) = 1 - \frac{\Gamma(k+1,\lambda)}{k!}.$$

На второй стадии, когда медленные волны перемещаются по участку нервной ткани и максимальная возбудимость клеток не возникает одновременно, суммарная интенсивность потока λ не столь велика и $P(k)$ существенно меньше единицы. Поэтому отдельные разряды возникают независимо, проявляясь в виде пачек высокочастотных колебаний. Однако $P(k)$ и не столь мала, чтобы в какой-то момент одновременное импульс от k и более нейронов не имел бы места. Это событие приводит к генерации потенциала действия и других нейронов, формируя высокоамплитудный импульс, уже доступный регистрации со скальпа. Эта одновременность генерации потенциала действия приводит к одновременности колебаний ионного состава и синхронизации фаз медленных волн. В результате максимальная возбудимость нейронов имеет место одновременно по всему участку нервной ткани, в этот момент параметр интенсивности пуассоновского процесса λ принимает значения существенно большие, чем на второй стадии, $P(k) \approx 1$, т. е. разряды становятся постоянно повторяющимися.

Таким образом серия разрядов соседних нейронов, возникающая на определенной фазе пробегающей по ним медленной волны, перерождается в синхронный разряд, который уже может быть зарегистрирован на отдалении от места генерации, проявляясь в виде острого пика на ЭЭГ. В зависимости от степени одновременности разрядов это может быть спайк (длительность менее 70 мс), острая волна (более 70 мс) или множественные спайки. Возникающее вследствие изменения концентрации ионов и последующего процесса ее регулирования медленное колебание, в свою очередь, создает условия для формирования нового острого пика. Замыкается цепь обратной связи и возникает длительная серия однообразных паттернов, например «пик–волна». Прекращаются они либо по истощению клеток, либо по поступлению внешних импульсов, способных сбить синхронизацию.

Развитие эпилептической активности, таким образом, представляется четырехстадийным. На первой стадии появляется медленная активность, на второй медленные волны пространственно синхронизируются, и на определенной фазе волны возникают спонтанные разряды нейронов, проявляющиеся на электрокортикограмме, как вспышки высокочастотной активности, на третьей стадии эти вспышки синхронизируются во

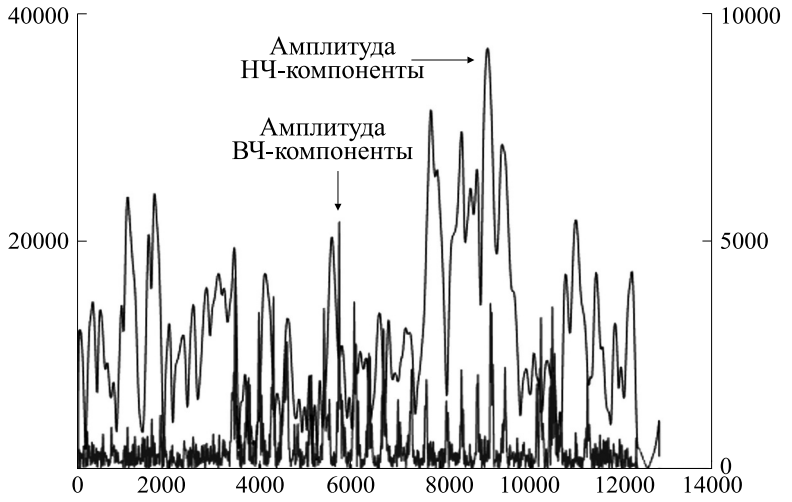


Рис. 4. Мгновенные мощности составляющих сигнала в мкВ^2. По оси абсцисс время от начала записи в отсчетах (частота записи 512 Гц).

времени, образуя регистрируемые в том числе и на скальповой ЭЭГ острые волны, четвертая стадия – угасание эпилептической активности.

АНАЛИЗ ДАННЫХ

Для проверки этого предположения подвергнем частотной фильтрации отрезок записи электрокортикограммы, выделив низкочастотную (1–5 Гц) и высокочастотную (40–100 Гц) компоненты. Фильтрованный сигнал был подвергнут преобразованию Гильберта и получены оценки мгновенных амплитуд компонентов сигнала (представляет интерес также и оценка мгновенных частот, но для нее требуется более узкополосная фильтрация или переход к методу Гильберта–Хуанга [6]).

Видна картина изменений во времени обоих видов активности и их соотношения. На данном фрагменте можно выделить четыре участка – от начала фрагмента до приблизительно 7.5 с (отсчет 3800), от 7.5 с до 17.2 с (отсчет 7800), от 17.2 с до 23 с (отсчет 10800) и следующий за 23 секундами. Для первого характерна малая амплитуда высокочастотной активности и нерегулярная низкочастотная, во втором появляются регулярные вспышки высокочастотной активности, синхронизирующиеся с низкочастотной, в третьем амплитуда низкочастотной активности растет, а высокочастотной несколько снижается, в четвертом угасает как низкочастотная, так и высокочастотная активность. При этом длительность высокочастотных вспышек на третьем участке короче, чем на втором. Если в качестве оценки длительности вспышки принять время, за которое амплитуда нарастает до максимального значения от величины в половину максимальной и затем убывает до половины максимальной, то для второго участка приведенной записи это время составляет 96 мс, а для третьего – 69 мс.

Возникает гипотеза, что это отражает четыре стадии развития эпилептического приступа. На первой стадии, предшествующей приступу, в силу различных причин – нарушений гемодинамики, снижения оксигенации, механического сдавления опухолью или гематомой, метаболических отклонений или иных факторов – нарушается функционирование регулятора, поддерживающего уровень постоянного потенциала. Величина отклонения растет, как и время возвращения к нормальному значению регулируемого параметра, что проявляется, как высокоамплитудные колебания низкой частоты. В силу изменения концентрации ионов меняется и возбудимость нейронов, приводя к возникновению спонтанной импульсной активности. Это составляет вторую стадию, на которой эти импульсы, возникающие на определенной фазе медленноволновой активности, проявляются в виде вспышек высокой частоты. В свою очередь такие вспышки вызывают колебания концентрации ионов и этим запускают медленные волны, синхронизируясь с ними и между собой. Возникает контур положительной обратной связи, в котором синхронизированные разряды вызывают медленное колебание, а оно, меняя возбудимость ткани, способствует на определенной фазе колебания появлению синхронизированного разряда. Степень временной синхронизации разрядов настолько высока, что при записи они сливаются в пик или острую волну, а за счет описанной выше пространственной синхронизации формируемое ими электрическое поле может быть зарегистрировано не только в непосредственной близости, но и на удалении от источника. Это третья стадия, уже доступная ре-

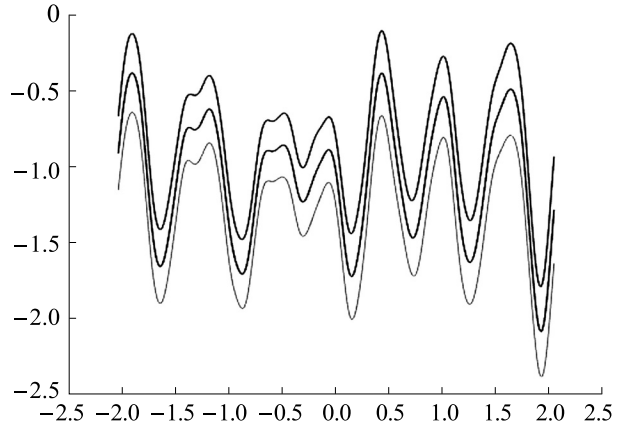


Рис. 5. Усреднение для второй стадии развития эпилептической активности. Средние значения (центральная линия) и средние ± стандартное отклонение (верхняя и нижняя линии) в мкВ, по оси абсцисс время в мс (нулевое значение соответствует максимуму мощности высокочастотной активности).

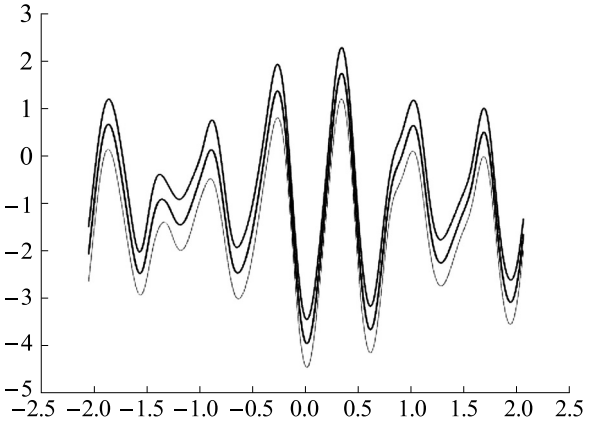


Рис. 6. Усреднение для третьей стадии развития эпилептической активности. Средние значения (центральная линия) и средние ± стандартное отклонение (верхняя и нижняя линии) в мкВ, по оси абсцисс время в мс (нулевое значение соответствует максимуму мощности высокочастотной активности).

гистрации электродами на скальпе при клинической ЭЭГ, проявляется как «пик-волновый комплекс» или иные эпилептиформные феномены. На четвертой стадии активность угасает, по причине ли истощения или в силу появления импульсов от иной структуры мозга, сбивающих синхронизацию.

Для проверки предположения о наличии синхронизации такого рода было произведено усреднение медленноволновой активности, причем в качестве триггера усреднения были выбраны пики на высокочастотной компоненте, превышающие пороговое значение. Усреднение проведено для отрезков как до, так и после пика, отдельно для второй (рис. 5) и третьей (рис. 6) стадий исследуемого фрагмента электрокортикограммы, показаны средние значения и интервал в одно стандартное отклонение.

Можно видеть, что разряд (соответствующий нулевому отсчету по оси X) проявляется при выраженной негативной полярности низкочастотной компоненты и способствует, в свою очередь, развитию колебания низкой частоты, формируя контур обратной связи, порождающий повторяющуюся активность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предлагаемая модель, в силу ее крайне упрощенного характера, может рассматриваться лишь как первое приближение к полноценно объясняющей явление во всей его полноте модели. Тем не менее она позволяет объяснить некоторые феномены эпилептиформной активности, как и ЭЭГ вообще. Основным ее недостатком следует признать ограничение лишь элементарными формами взаимодействия нейронов – через изменение концентрации ионов в межнейронном пространстве и через непосредственное электрическое взаимодействие. Более же сложные межнейронные связи вообще не вовлекается в рассмотрение. Но то, что при такой степени упрощения получают объяснение некоторые наблюдаемые явления, позволяет надеяться, что при введении в рассмотрение более сложных форм взаимодействия, учете структуры нервной ткани и топологии нейронной сети, включении в модель электрических и биохимических явлений не только в нейронах, но и в глиальных структурах, данная модель может быть доведена до полноценно объясняющей и практически применимой.

Аргументом в пользу предлагаемой модели может служить связь нарушений электролитного баланса, прежде всего гипокальциемии, а также гипонатриемии и гипомагниемии, с развитием эпилепсии [7]. Нарушение работы контура регулирования вследствие недостатка кальция может приводить к появлению медленной активности, которая, в свою очередь, создает условия для появления высокочастотных вспышек, затем формирующих острые волны.

Для проверки предложенной модели может быть использовано сопоставление данных электрокортикографии, скальповой электроэнцефалографии, магнитоэнцефалографии и других методов. Это позволит проверить предположение о том, что различие частотного состава сигнала, регистрируемого данными методиками, может объясняться различием конфигурации источника потенциала, а также рассмотреть формы синхронизации между собой сигналов, имеющих различную частоту.

Неясным остается вопрос о механизме перехода к четвертой фазе, прекращения приступа. Если синхронизация играет основную роль в его возникновении, то подача стимулов, ее нарушающих, может оказаться способом пресечения эпиприпадка. Возможно, вошедший в клиническую практику метод стимуляции блуждающего нерва [8] использует именно этот принцип для прекращения приступа. В таком случае открывается возможность новых методов лечения эпилепсии, с использованием вживляемых электродов или магнитостимуляции области очага. Однако они будут требовать выявления вспышек высокочастотной активности и соответствующего изменения методики регистрации сигнала, а также выработки критериев автоматического распознавания патологической активности в отличие от физиологической.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность за помощь и ценное обсуждение Н.А. Архиповой, Л.Б. Иванову, А.Б. Козловой, М.А. Куликову, В.И. Лукьянову, Л.Б. Окниной, К.Ю. Саркисовой, М.Ю. Челяпиной, Е.В. Шаровой.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-013-00967а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. А. Карлов, *Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин* (Медицина, М., 2010).
2. *Clinical Electroencephalography*, Ed. by O. Mecarelli (New York, Springer, 2019).
3. *Нейрофизиологические исследования в клинике*, под ред. Е. М. Трошиной (НМИЦ нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко, М., 2019).
4. М. Н. Жадин, *Биофизические механизмы формирования электроэнцефалограммы* (Наука, М., 1984).
5. Е. Л. Машеров, Биофизика **64** (3), 572 (2019).
6. N. E. Huang and S. S. P. Shen, *Hilbert–Huang Transform and its Applications* (World Scientific, London, 2005).
7. M. A. Samuels and A. H. Ropper, *Samuel's Manual of Neurologic Therapeutics* (LWW, Philadelphia, 2017).
8. C.A. Edwards, A. Kouzani, K. L. Lee, and E. K. Ross, Mayo Clinic Proc. 92 (9), 1427 (2017).

A Model of Activity Generation in the Epileptic Focus

E.L. Masherov

N.N. Burdenko National Scientific and Practical Center for Neurosurgery, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 4-ya Tverskaya-Yamskaya ul. 16, Moscow, 125047 Russia

A model of activity generation in the epileptic focus was proposed originating from assumption about synchronization between oscillations which arise when the resting potential level is regulated, and synchronization between neuronal discharges with slow oscillations. At the onset of a seizure, four phases were identified – an increase of slow wave activity, high-frequency spike activity, synchronization in the presence of sharp peaks, and extinction of a seizure. This model was compared to electrocorticography data recorded during surgery.

Keywords: epilepsy, EEG, high-frequency activity, slow-wave activity, regulation, synchronization

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 791–801

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 612.821

СТОЙКОЕ СНИЖЕНИЕ ЧИСЛА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВЯЗЕЙ МОЗГА ПРЕДОПРЕДЕЛЯЕТ ДЛИТЕЛЬНОЕ НАРУШЕНИЕ СОЗНАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

© 2021 г. Л.Б. Окнина*, О.С. Зайцев, Е.Л. Машеров**, Э.Л. Погосбекян**, А.С. Зигмантович*, М.М. Копачка**, Е.В. Александрова****

**Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а*

***Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко МЗ РФ, 125047, Москва, ул. 4-ая Тверская-Ямская, 16*

E-mail: leliia@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.09.2020 г.
После доработки 19.01.2021 г.
Принята к публикации 26.01.2021 г.

Тяжелая черепно-мозговая травма может вести к длительному нарушению сознания с различными клиническими проявлениями, которые трудны для дифференцировки и прогнозирования развития. В работе на основе записей биопотенциалов были реконструированы и проанализированы функциональные связи мозга, активирующиеся при прослушивании тонов у 20 пациентов с нарушением сознания вследствие травмы мозга. Показано, что у пациентов с затяжным нарушением сознания возможно увеличение числа функциональных связей в лобных отделах, тогда как число «вертикальных» связей снижено. У пациентов с хроническим нарушением сознания значительно снижено число функциональных связей, причем даже в тех случаях, когда отмечается анатомическая сохранность трактов мозга. Можно полагать, что выявленные особенности функциональных связей будут способствовать более точной оценке состояния пациентов, с которыми невозможен вербальный контакт, а также прогнозу возможности восстановления сознания и подбору наиболее адекватной терапии.

Ключевые слова: тяжелая черепно-мозговая травма, синдром ареактивного бодрствования, состояние минимального сознания, церебральные функциональные связи, восстановление сознания.

DOI: 10.31857/S0006302921040190

Тяжелая черепно-мозговая травма (ЧМТ) может вести к длительному (в течение нескольких месяцев и даже лет) нарушению сознания с различными клиническими проявлениями, течением и нейрофизиологическими механизмами. Наибольшую трудность при этом представляет выявление, дифференцировка и прогноз дальнейшего развития: 1) синдром ареактивного бодрствования, обозначающегося в современной англоязычной литературе как unresponsive wakefulness state (UWS), ранее известный как вегетативное состояние [1], и 2) состояние минимального сознания – minimally conscious state (MCS) [1–3].

UWS характеризуется пробуждением пациента (открывание глаз) при отсутствии других признаков восстановления сознания. При этом у пациентов в UWS могут выявляться спонтанная реакция на свет и звук, чередование сна-бодрствования и реакции на боль. У пациентов в MCS появляются дифференцированные эмоциональные реакции и неустойчивые попытки выполнения отдельных инструкций (например, открыть/закрыть глаза, пожать руку) и даже попытки говорить. При этом отсутствие таких реакций не всегда означает, что у пациента отсутствует сознание [4].

Несмотря на постоянно совершенствующиеся подходы к диагностике, число ошибок в дифференцировке UWS и MCS составляет в настоящее время около 40% [5]. Это приводит к трудностям клинического прогноза, подбора лечения и реабилитации.

Можно полагать, что методы выявления нейрофизиологических механизмов, лежащих в ос-

Сокращения: ЧМТ – черепно-мозговая травма, UWS – синдром ареактивного бодрствования (unresponsive wakefulness state), MCS – состояние минимального сознания (minimally conscious state), СВП – слуховые вызванные потенциалы, ДТ-МРТ – диффузионно-тензорная магнитно-резонансная томография.

нове каждого из перечисленных выше состояний, смогут повысить точность диагностики. В данном контексте особую актуальность приобретает оценка реакций пациента на внешние стимулы, которые могут быть выявлены с помощью нейрофизиологических методов, но скрыты от врача отсутствием эмоциональных, двигательных и других клинических проявлений сознания. Традиционно для выявления «скрытого» сознания используют регистрацию и анализ длиннолатентных компонентов слухового вызванного потенциала (СВП), наличие которых позволяет предположить сохранность когнитивных функций [6, 7]. Однако оценка амплитудно-временных параметров компонентов СВП хотя и позволяет выявить наличие когнитивной деятельности, но не обладает высокой специфичностью в отношении клинической классификации состояния пациентов [8].

Перспективным для разделения UWS и MCS является анализ функциональных связей мозга. Электрическая активность клеток определяет функциональные связи мозга. Зная пространственные и временные характеристики электрического сигнала, можно вычислить структурные связи – расположение нервных волокон. Сопоставляя вычисленные области активации структур мозга и функциональные связи, можно охарактеризовать состояние функциональных нервных сетей, установленные отличия в которых также могут быть использованы для уточнения статуса пациентов [9]. К настоящему времени выявлена разная степень сохранности лобно-париетальной сети, сети пассивной работы мозга (default mode) и слуховой функциональной сети у пациентов в UWS и MCS [10–12].

В последние несколько лет оценку функциональных сетей начали проводить на основе анализа биопотенциалов мозга [13]. Одним из этапов такого анализа является реконструкция функциональных связей и их сопоставление с предположительно сохранными анатомическими трактами мозга [14].

Необходимо отметить, что у пациентов в UWS и MCS нарушены обе составляющих сознания: бодрствование и осознание, включающее в себя восприятие контекста сознания, что относится к самоосознанию и окружающей действительности [15]. Бодрствование связывают с корректной работой кортико-таламо-субкортикальной мозговой сети и корково-стволовым взаимодействием, тогда как взаимодействие между областями коры обеспечивает полноту восстановления осознания [16]. Можно предполагать, что нарушение «вертикальных» функциональных связей, входящих в состав функциональных сетей, обеспечивающих поддержание сознание, является одним из необходимых условий восстановления сознания в тех случаях, когда выделяется анатомическая сохранность трактов.

Оценка анатомической сохранности проводящих путей может быть проведена на основе диффузионно-тензорной магнитно-резонансной трактографии (ДТ-МРТ) [17]. Однако метод ДТ-МРТ в некоторых случаях обладает низкой чувствительностью при нахождении трактов: от 4 до 92% [18]. Это особо значимо для пациентов с ЧМТ и диффузным-аксональным повреждением, у которых поражены проводящие пути при относительной сохранности нервных центров [1]. В этой связи особый интерес представляет анализ функциональных связей у пациентов с сохранными анатомическими трактами, особенно в тех случаях, когда функциональные связи, ассоциированные с трактами, не определяются.

Метод реконструкции проводящих путей мозга на основе записей биопотенциалов базируется на вычислении функциональных связей мозга между регистрирующими электродами, расположенными на поверхности скальпа. Затем полученные значения связей пересчитываются на анатомические тракты, которые соединяют области мозга, находящиеся под регистрирующими электродами. Для корректного решения задачи все тракты мозга разбиваются на определенные кластеры, учитывающие проекцию трактов, активные во время выполнения задания зоны мозга, а также имеющие порог активации выше вычисленного на основе значений функциональных связей [14].

Для вычислений функциональных связей часто используют метод Грейнджера. Метод представляет собой меру линейной зависимости, которая проверяет, можно ли уменьшить дисперсию ошибки для линейной авторегрессионной модели оценки сигнала A при добавлении линейной модели оценки второго сигнала B. Если данное утверждение верно, то сигнал B оказывает причинное влияние по Грейнджеру на сигнал A, т. е. независимая информация о прошлом B улучшает предсказание A по сравнению с ситуацией, когда известно только прошлое A. Мера причинности по Грейнджеру имеет положительные значения, когда есть причинно-следственная связь, и равна нулю, если такой связи нет [19].

Целью данного исследования было на основе анализа биопотенциалов выявить особенности функциональных связей и провести реконструкцию активных трактов у пациентов с затяжным и хроническим нарушением сознания после тяжелой ЧМТ. В качестве базовой гипотезы взято предположение, что у пациентов с синдромом ареактивного бодрствования и минимального сознания в разные сроки после травмы корковые и «вертикальные» функциональными связи будут отличаться. Для проверки гипотезы методом

Характеристика пациентов

Пациент	Пол	Время после тяжелой ЧМТ, сутки (начало наблюдения)	Возраст	Уровень сознания (начало наблюдения)	Уровень сознания (окончание наблюдения)	Тип нарушения сознания
1	М	55	31	UWS	UWS	З
2	М	232	17	UWS	UWS	Х
3	М	72	18	UWS	UWS	З
4	М	839	34	UWS	UWS	Х
5	М	32	49	UWS	UWS	З
6	М	85	36	UWS	UWS	З
7	М	63	62	UWS	UWS	З
8	М	2829	30	UWS	UWS	Х
9	М	271	32	UWS	UWS	Х
10	М	1634	31	MCS	MCS	Х
11	Ж	665	35	MCS	MCS	Х
12	М	27	19	MCS	MCS	З
13	М	316	24	MCS	MCS	Х
14	М	25	27	MCS	MCS	З
15	Ж	45	34	MCS	MCS	З
16	М	80	26	MCS	MCS	З
17	М	504	36	MCS	MCS	Х
18	М	361	23	MCS	MCS	Х
19	М	627	42	MCS	MCS	Х
20	М	620	56	MCS	MCS	Х

Примечание. UWS (unresponsive unconscious state) – состояние ареактивного бодрствования, MCS (minimally conscious state) – состояние минимального сознания. З – затяжное нарушение сознания, Х – хроническое нарушение сознания.

Грейнджера были вычислены функциональные связи, которые затем были пересчитаны на предположительно активные анатомические тракты мозга.

МЕТОДИКА

Дизайн исследования. Исследование является частью проекта, направленного на выявление нейрофизиологических механизмов восстановления сознания после тяжелой ТЧМТ. Данная публикация ограничена анализом функциональных связей при прослушивании простых тонов.

Пациенты, вошедшие в исследование. В исследование включены двадцать пациентов (восемнадцать мужчин, две женщины) с тяжелой ЧМТ (с диффузным аксональным повреждением) и нарушением сознания. Характеристики пациентов представлены в таблице.

В зависимости от длительности нарушения сознания пациенты были отнесены к одной из двух групп [20]: 1) с затяжным нарушением сознания – при длительности до шести месяцев (у всех обследованных пациентов, отнесенных к этому варианту, нарушение сознания было до трех месяцев) и 2) с хроническим нарушением сознания – свыше шести месяцев. В исследование включены данные регистрации биопотенциалов при поступлении в стационар, до проведения медикаментозного лечения и реабилитационных мероприятий.

В состоянии UWS было девять пациентов. Из них пять человек с затяжным и четыре – с хроническим нарушением сознания. При дальнейшем наблюдении у всех пациентов были отмечены некоторые позитивные изменения в состоянии, но выхода из UWS так и не произошло.

С MCS было одиннадцать пациентов. Из них четыре человека с затяжным и семь – с хроническим нарушением сознания. При дальнейшем наблюдении у двух пациентов с затяжным и у двух с хроническим MCS отмечено существенное улучшение в состоянии, но выхода из угнетенного сознания не отмечалось.

Положительные клинические изменения включали расширение двигательных возможностей, более устойчивую фиксацию взора и слежения за объектами, появление отдельных эмоциональных реакций, а также клинических признаков понимания речи в виде попыток выполнения

простых инструкций (открывание/закрывание глаз, простые движения конечностями), и попыток произнесения звуков (речи).

Контрольная группа. Дополнительно был обследован один пациент (мужчина, 34 года) с тяжелой ЧМТ и транзиторным (менее одного месяца) нарушением сознания, у которого восстановление сознания отмечено на 25-е сутки после травмы.

Контрольная группа состояла из двадцати здоровых испытуемых в возрасте от 18 до 59 лет (средний возраст 41 год). Все они были правшами, не имели в анамнезе неврологических, психиатрических заболеваний и ЧМТ. Все испытуемые были осведомлены о цели и методах исследования (подписывали информированное согласие об участии в исследовании).

Регистрация биопотенциалов. Регистрацию электроэнцефалограмм проводили на оборудовании фирмы «Нейроботикс» (Россия) от 32 электродов, расположенных по схеме 10–10%. Вертикальную и горизонтальную электроокулограмму регистрировали от супраорбитального гребня и от наружного угла глазной щели правого глаза для мониторирования морганий и глазных движений и последующей коррекции артефактов (>50 мкВ). Регистрацию проводили относительно ушных электродов, используя цифровое объединение. Электроэнцефалограммы регистрировали при импедансе менее 5 кОм и частотной полосой пропускания от 0.1 до 70 Гц, использовали аналого-цифровое преобразование с точностью 16 бит. Частота опроса составляла 1024 Гц. Использовали режекторный фильтр 50 Гц.

Регистрация слуховых вызванных потенциалов. При регистрации слуховых вызванных потенциалов (СВП) использовали двухстимульную звуковую последовательность методики необычности стимула (oddball paradigm) [6, 7]. Учитывая состояние пациентов и их быструю утомляемость, всего предъявлялось 100 звуковых стимулов со следующими параметрами: стандартный (высокий тон) – интенсивностью 76 дБ над порогом слышимости, частотой 800 Гц и длительностью 80 мс; целевой (низкий тон) – интенсивностью 76 дБ, частотой 400 Гц, длительностью 80 мс. При этом стандартных тонов было 80%, целевых – 20%. Звуки подавались через наушники бинаурально в псевдослучайном порядке.

Звуковая последовательность предъявлялась без какой-либо предварительной инструкции – пассивная ситуация. Предполагали, что при этом будут выявляться функциональные связи, активирующиеся при непроизвольном внимании.

Анализ данных. Биопотенциалы обрабатывались в программе «Brainstorm» [21], работающей в среде «MATLAB» (R2015b, Math Works, США).

Первоначально биопотенциалы оценивали визуально и к дальнейшему анализу принимали безартефактные участки записи. Перед дальнейшим анализом и выделением вызванных ответов проводили коррекцию электроокулограммы и фильтрацию 2–40 Гц.

Эпоха усреднения СВП включала 100 мс предстимульного интервала и 1000 мс после стимула. Первоначально полученные индивидуальные СВП оценивали для выделения длиннолатентных компонентов. Компонент N100 определяли на интервале от 70 до 130 мс, компонент N200 – на интервале от 100 до 300 мс и компонент P300 – на интервале от 200 до 500 мс. Данные интервалы были выбраны с учетом предыдущих исследований, показывающих наиболее вероятные значения латентности компонентов СВП у пациентов с нарушением сознания [8].

Затем для каждой группы пациентов, имеющих затяжное или хроническое нарушение состояния, вычисляли усредненные по группе СВП (GrandMean) в ответ на целевой тон, которые использовали для построения функциональных связей.

Функциональные связи вычисляли по методу Грейнджера. Была использована модель с порядком 10, которая при частоте опроса 1024 позволяет учитывать процессы передачи сигнала с задержкой порядка 10 мс. Функциональные связи вычисляли между всеми возможными парами регистрирующих электродов. Для расчета использовали отрезок времени от 0 до 1000 мс от подачи стимула. Полученные данные представляли в виде таблиц и графиков типа «тепловая карта» (heatmap).

Полученные значения функциональных связей были пересчитаны на тракты мозга. При пересчете использовали модель, включающую в себя 130 трактов [14] и порог визуализации 0.56. Среди рекомендованных было выбрано такое пороговое значение, при котором выявлялись наиболее выраженные отличия у пациентов разных групп наблюдений. Настоящее исследование ограничено качественной оценкой реконструированных трактов.

В отдельных случаях было проведено сопоставление реконструированных трактов с данными диффузионно-тензорной трактографии. Для трактографии проводили сканирования на магнитно-резонансном томографе с напряженностью магнитного поля 3.0 Тл (3,0T Signa HDxt, General Electric, США) на основе эхо-планарной импульсной последовательности «Спиновое эхо» (SE EPI) с $TR = 10000$ мс, $TE_{min} = 102$ мс, $FOV = 240$ мм, изотропным размером воксела – $2.5 \times 2.5 \times 2.5$ мм и набором диффузионных градиентов по 110 направлениям с диффузионным весом 3000 с/мм^2. С помощью программного пакета FMRIB FSL 5.0 (http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl) для каждого диффузионного изображения выполнялась коррекция движений и удалялся тепловой

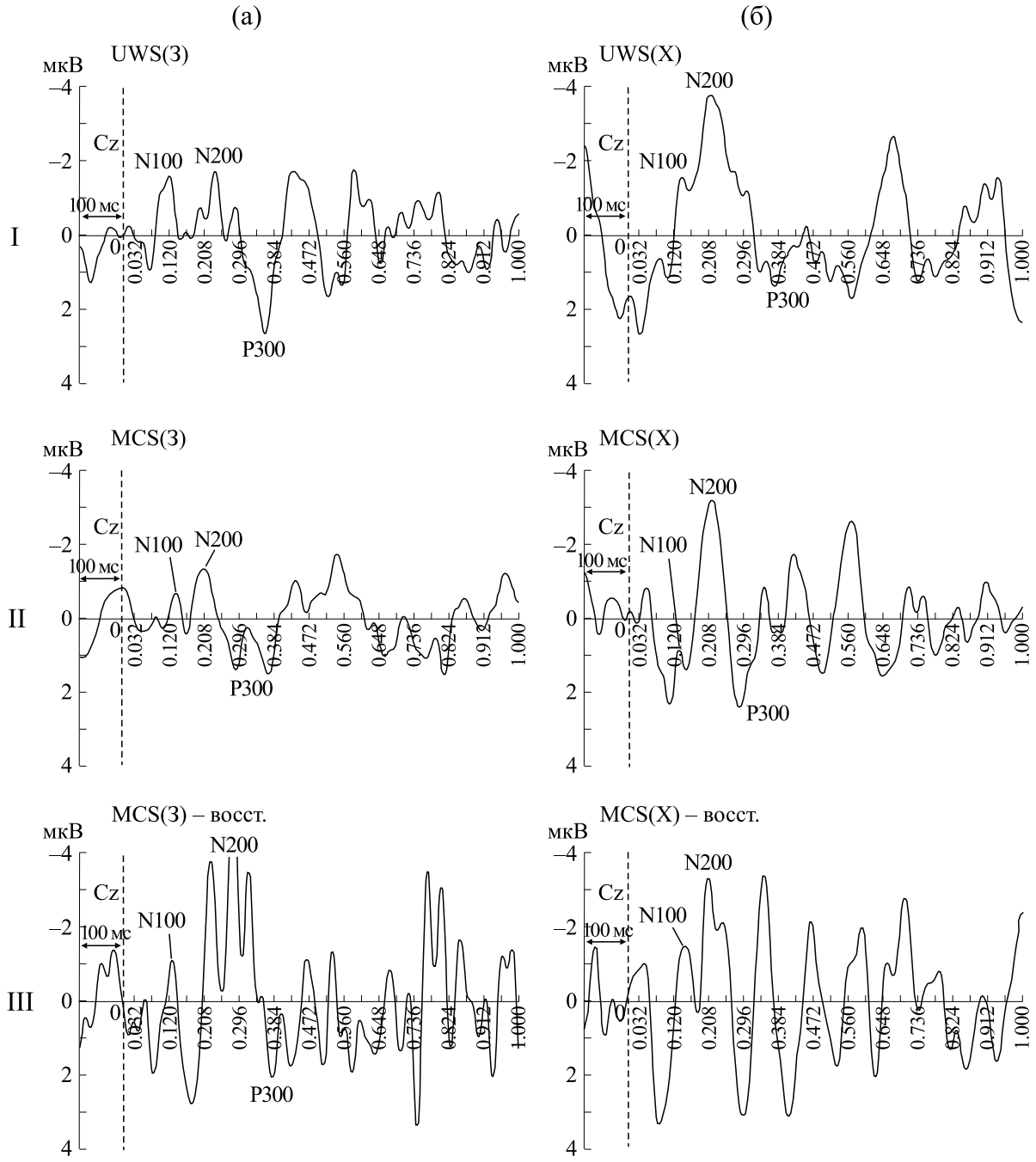


Рис. 1. СВП, усредненные по группам наблюдений (GrandMean): (а) – у пациентов с затяжным (З) бессознательным состоянием, (б) – у пациентов хроническим (Х) бессознательным состоянием. I – Пациенты с синдромом ареактивного бодрствования (UWS); II – пациенты в состоянии минимального сознания, у которых за время наблюдения не было отмечено динамики состояния (MCS); III – пациенты в состоянии минимального сознания, у которых отмечены позитивные изменения состояния, но без восстановления сознания (MCS-восст). Данные представлены для отведения Cz.

шум. Затем с помощью программы Mrtrix3 (https://www.mrtrix.org) удаляли артефакты Гиббса и вероятностным методом вычисляли траектории нервных волокон по всему объему просканированного мозга. В качестве критерия остановки работы Mrtrix3 указывали число нервных волокон, которые программа должна найти: 1.5 миллиона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При визуальном анализе СВП были выделены и проанализированы компоненты N100, N200 и P300. На рис. 1 представлены усредненные по группам наблюдений СВП в ответ на целевой тон. Ноль на шкале времени соответствует времени

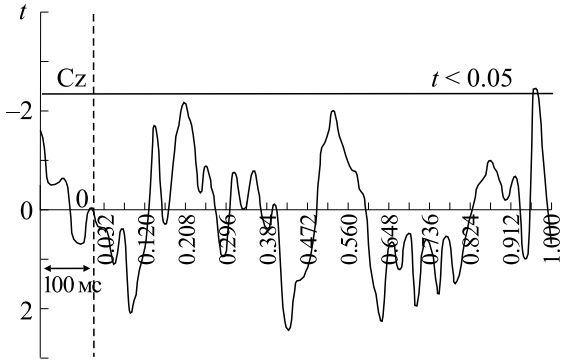


Рис. 2. График значений *T*-критерия для каждого отсчета СВП в отведении Cz для пациентов в затяжном UWS и MCS. Значимых отличий амплитуды СВП ни для одного отсчета выявлено не было: уровень значимости $t < 0.05$ не достигается ни на одном отсчете ВП. Критерий получен как разности СВП, усредненные по группам, деленные на стандартную ошибку этой разницы (*Z*-оценка). Этот критерий должен иметь распределение Стьюдента с числом степеней свободы ($n1 + n2 - 2$), где $n1$ и $n2$ – число наблюдений в первой и второй группе соответственно. Поскольку выбирается максимальное значение из имеющихся, то достижение *T*-критерием критического значения, которое бы имело доказательную силу в случае единственного наблюдения, без введения поправки на множественные сравнения, статистически доказательной силы не имеет. Поправка на множественные сравнения эквивалентна принятию более строгих требований к критерию значимости, например, поправка Бонферонни заменяет желаемый уровень значимости на уровень, в n раз меньший (n – число сравнений).

подачи звукового стимула. Предстимульный интервал равен 100 мс, ответ на стимул – от 0 до 1000 мс.

Только у пациентов с затяжным UWS СВП имел достаточно отчетливую морфологию. Выделялись компоненты N100, N200 и P300. У пациентов с хроническим UWS отчетливо выделялся только компонент N200, тогда как компоненты N100 и P300 были менее выражены.

У пациентов с MCS, вне зависимости от длительности пребывания в бессознательном состоянии и динамики состояния, с достаточной убедительностью выделялся только компонент N100.

Учитывая, что пики компонентов СВП имели выраженную индивидуальную вариативность и слабую выделяемость, для вычисления функциональных связей был проанализирован весь ответ (на временном интервале от 0 до 1000 мс после подачи стимула) для каждого из отведений. Перед вычислением функциональных связей для каждого из регистрируемых отведений провели сопоставления СВП у пациентов всех групп наблюдений. Это позволило выявить временные интервалы, где отличия в амплитуде наиболее выражены. На рис. 2 приведен график значений *T*-критерия для пациентов в затяжном UWS и MCS в отведении Cz. Сравнивались значения СВП по каждому отсчету в отдельности. Сопоставление проводили с использованием двухвыборочного *T*-критерия для независимых выборок.

Аналогичным образом были проанализированы компоненты СВП у пациентов с MCS в затяжном и хроническом бессознательном состоянии, а также у пациентов с хроническим UWS и MCS. Значимых отличий ни на одном временном интервале выявлено не было ни для одной из пар сопоставлений. Таким образом, все выявленные при визуальном анализе отличия СВП в разных группах наблюдений, хотя и выявляются на очень небольшом временном интервале, носят статистически недостоверный характер.

Реконструкция функциональных связей. При визуализации реконструированных функциональных трактов каждую из групп пациентов рассматривали отдельно.

У пациентов с UWS и MCS отмечается разное количество выявленных функциональных связей, которое зависит как от состояния пациента, так и от длительности бессознательного состояния. На рис. 3 представлены «тепловые карты» и результаты реконструкции функциональных трактов в трех проекциях головы. У пациентов с затяжным UWS (рис. 3а, I) отмечается самое большое количество связей по сравнению с пациентам как с хроническим UWS (рис. 3б, II), так и с пациентами с MCS (рис. 3, II и III). У пациентов с хроническим UWS, напротив, выявляется наименьшее количество связей по сравнению с пациентами других групп наблюдений. Максимальные отличия выражены в количестве «вертикальных» функциональных связей, а также лобных и теменных корковых связей.

У пациентов с MCS выраженность функциональных связей отличается при разном развитии заболевания. У пациентов с MCS без динамики состояния отмечается практически полное отсутствие «вертикальных» функциональных связей (рис. 3а, II; рис. 3б, II). При этом у пациентов с затяжным MCS (рис. 3а, II) выявляются корковые функциональные связи в лобной и теменной области, тогда как у пациентов с хроническим MCS (рис. 3б, II) выявляются функциональные корковые связи преимущественно в лобной области.

У пациентов с MCS и последующим улучшением состояния выявляются односторонние «вертикальные» функциональные связи при слабом выделении корковых функциональных связей, которые представлены сниженным числом функциональных связей в теменной области. Это отмечается у пациентов как с затяжным, так и хроническим MCS (рис. 3а, III; рис. 3б, III).

На рис. 4 представлена реконструкция функциональных связей у здоровых испытуемых (рис. 4а) и индивидуальные данные пациента с

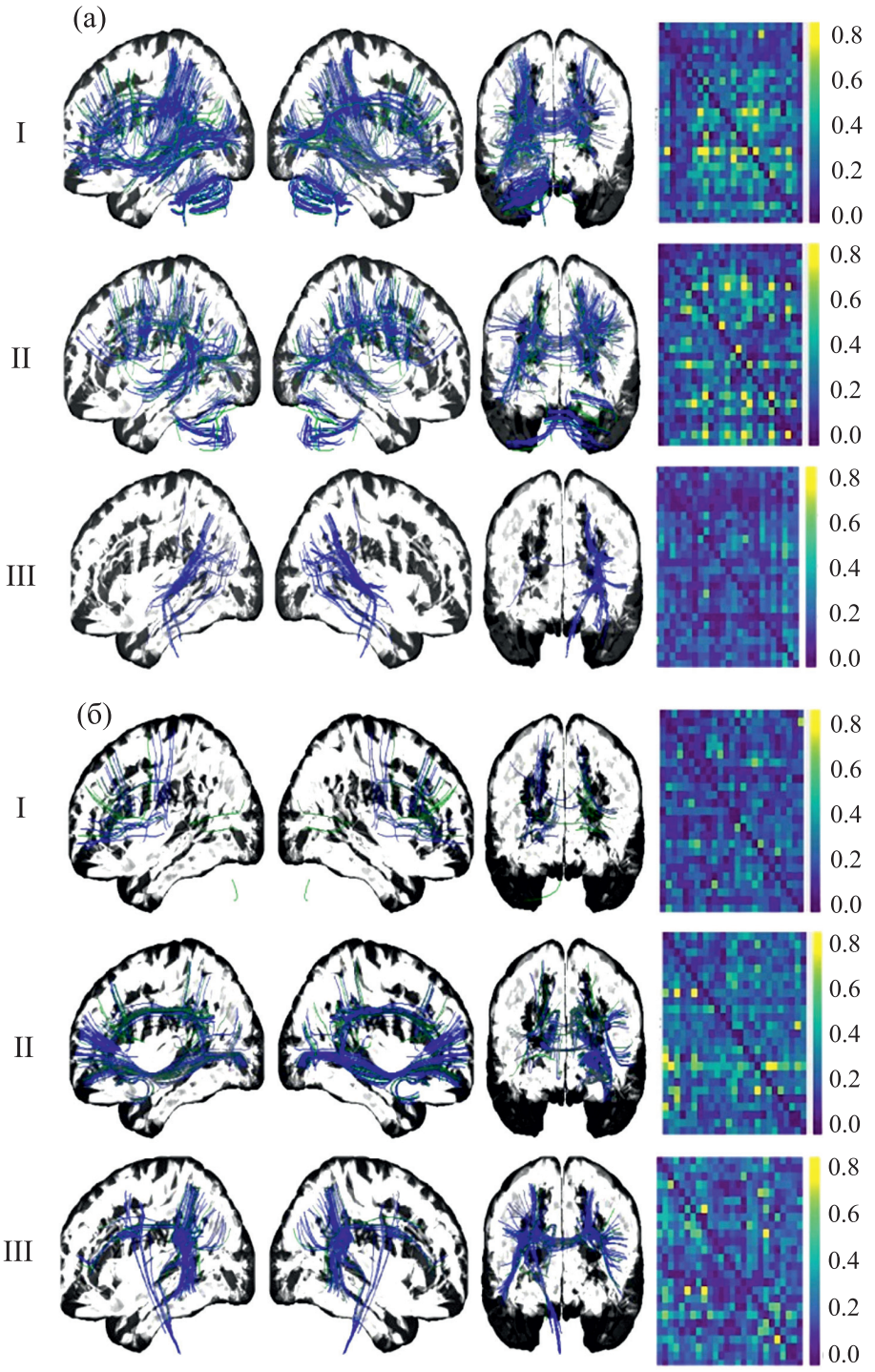


Рис. 3. Реконструкция активных функциональных трактов в трех проекциях (порог визуализации 0,56) и «тепловая карта» значений показателей Грейнджера у пациентов: (а) – с затяжным нарушением сознания, (б) – с хроническим нарушением сознания. I – Пациенты с UWS (с затяжным UWS (n = 5), с хроническим UWS (n = 4); II – пациенты с MCS, у которых за время наблюдения не было отмечено динамики состояния (с затяжным MCS (n = 2), с хроническим MCS (n = 5)); III – пациенты в состоянии минимального сознания, у которых отмечены позитивные изменения состояния, но без восстановления сознания (с затяжным MCS (n = 2), с хроническим MCS (n = 2)). Синим цветом показаны однонаправленные функциональные связи, зеленым – двунаправленные.

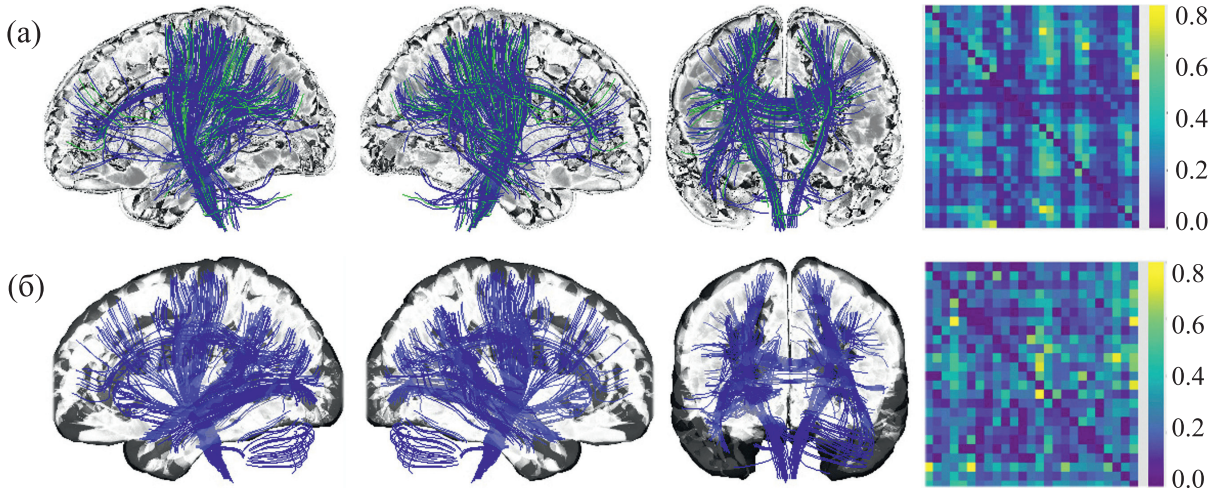


Рис. 4. Реконструкция активных функциональных трактов в трех проекциях (порог визуализации 0.56) и «тепловая карта» значений показателей Грейнджера: (а) – у здоровых испытуемых ($n = 20$), (б) – у пациента с транзиторным нарушением сознания после ЧМТ. Синим цветом показаны однонаправленные функциональные связи, зеленым – двунаправленные.

ЧМТ с UWS (рис. 4б), у которого спустя 25 суток после травмы отмечено восстановления сознания до развернутого контакта. Данный пациент рассматривался отдельно, поскольку у него отмечено относительно быстрое восстановление сознания, т.е. нарушение сознания было транзиторным. У данного пациента отчетливо выявляются «вертикальные» функциональные связи и корковые функциональные связи в лобных и теменных отделах. При этом необходимо отметить, что у здоровых испытуемых среди корковых связей преобладают связи в теменной области, тогда как у пациента с ЧМТ соотношение лобных и теменных функциональных связей примерно одинаковое.

Также необходимо отметить, что у здоровых испытуемых функциональные связи присутствуют как односторонние функциональные связи (на рисунке показаны синим цветом), так и двухсторонние (показаны зеленым цветом). У пациента все выявляемые функциональные связи односторонние.

Проведенные в отдельных случаях сопоставления выявленных реконструированных функциональных трактов с анатомическими трактами по данным ДТ-МРТ не выявили их полного соответствия. В частности, отмечались сохранные тракты по данным ДТ-МРТ даже в тех случаях, когда реконструированные функциональные тракты не выявлялись. На рис. 5 представлены индивидуальные данные трактографии у здорового испытуемого (рис. 5а), у пациента с транзиторным нарушением сознания (рис. 5б) и у пациента с хроническим синдромом ареактивного бодрствования (рис. 5в). Несмотря на отличия в состоя-

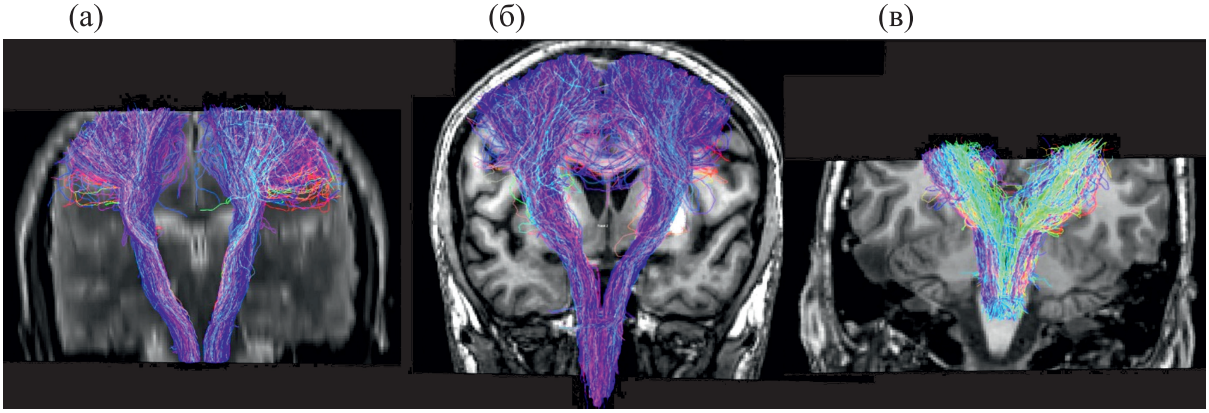


Рис. 5. ДТ-МРТ кортико-спинальных трактов: (а) – у здорового испытуемого (М, 22 года); (б) – у пациента с транзиторным нарушением сознания; (в) – у пациента с хроническим UWS (М, 34 года). Цвет показывает направление тракта: справа налево – красный, спереди назад – зеленый, сверху вниз – синий.

нии, во всех случаях отмечается выделение «вертикальных» анатомических трактов мозга. При этом необходимо отметить, что у пациента с хроническим нарушением сознания направление связей отличается от таковых у здоровых испытуемых и пациента с транзиторным нарушением сознания (на рис. 5 отличия представлены разным цветом).

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании были зарегистрированы и проанализированы ответы мозга на тоны у пациентов с тяжелой ЧМТ, находящихся в состоянии ареактивного бодрствования и минимального сознания. В работе, используя метод Грейнджера, были вычислены функциональные связи, предположительно связанные с непроизвольным вниманием при восприятии звуков. На основе полученных значений функциональных связей была выполнена реконструкция активных во время выполнения задачи трактов мозга. В отдельных случаях было проведено сопоставление реконструированных трактов с данными трактографии, что позволило сопоставить анатомическую и функциональную целостность проводящих путей.

Необходимо отметить, что метод реконструкции трактов мозга на основе математического анализа биопотенциалов новый и имеет ряд ограничений. Для вычисления функциональных связей был использован метода Грейнджера. При этом вычисление проводили по всей эпохе анализа СВП. Это было сделано с учетом того, что у пациентов с тяжелой ЧМТ амплитуда и латентность компонентов N100, N200 и P300 достаточно вариативны и не могут быть использованы как диагностический критерий [8]. Для подтверждения отсутствия значимых различий СВП у пациентов разных групп наблюдений проводили сопоставление вызванных ответов по каждому отсчету. Вычисленные значения *T*-критерия при этом не достигли уровня статистической значимости даже при достаточно «мягких» критериях, без введения поправок на множественное сравнение. Отчасти это может быть обусловлено относительно высокой вариативностью данных и малой выборкой.

Такое «загрубление» интервала поиска хотя и не позволяет выявить уровень нарушения, связанный с этапами обработки слуховой информации, но может выявить доминирующие функциональные связи, связанные с восприятием и оценкой слуховой информации. В исследовании наличие функциональных связей оценивали через коэффициенты связи случайных процессов, вычисленные статистической обработкой зарегистрированных с поверхности скальпа пациентов биопотенциалов мозга. При этом исследование ограничено проведением вычислений на усредненном мозге, без учета индивидуальной анатомии пациентов, и степенью проявления диффузного аксонального повреждения. Кроме того, исследование ограничено качественным анализом функциональных связей, тогда как сила и направление выявленных функциональных связей требует отдельного изучения.

Однако несмотря на имеющиеся ограничения, в исследовании были выявлены закономерности, отражающие отличия функциональных связей у пациентов с UWS и MCS.

В работе были проанализированы функциональных связи, полученные на основе анализа СВП у пациентов с затяжным и хроническим бессознательным состоянием, выход из которого не произошел за время пребывания в стационаре. Ранее уже было показано ухудшение показателей компонента P300 СВП [8] и уменьшение волокон мозолистого тела («облысение» мозолистого тела) [22] в процессе формирования хронического бессознательного состояния. Подобные изменения можно рассматривать в контексте функциональных сетей мозга, которые включают в себя области активации и функциональные связи между ними [9, 13, 23, 24]. Можно предположить, что в остром периоде травмы при условии анатомической сохранности трактов мозга часть функциональных связей будет выявляться, хотя их активность не может обеспечить полноценную работу функциональных сетей. Это согласуется с максимальным количеством функциональных связей, выявленных у пациентов с затяжным нарушением сознания, а также тот факт, что у пациента с транзиторным нарушением сознания количество связей превышает таковое у здоровых испытуемых.

Феномен некоторого увеличения выявляемых функциональных трактов в близкие к травме сроки ранее подробно не изучался. Выявленное в настоящей работе увеличение числа функциональных связей в лобной области может отражать компенсаторное усиление сохранных анатомических связей, в случае включения которых в частично сохранные функциональные сети возможно восстановление когнитивных функций. Кроме того, хотя отличия параметров компонентов СВП носят статистически недостоверный характер, у всех пациентов можно отметить лучшую выделяемость компонента N100. Этот компонент связан с автоматическими и непроизвольными процессами восприятия слуховой информации, которые у пациентов с нарушением сознания рассматриваются в контексте разной степени активации передней системы внимания [25].

Сознание и когнитивные функции не ограничены только корковой активацией [16, 26]. В когнитивную деятельность вовлечены структуры ствола, что делает выявленные «вертикальные»

функциональные связи важными для диагностики состояния пациента и прогноза восстановления сознания. В исследованиях функциональных связей у пациентов с обратимым нарушением сознания вследствие седации пропофолом показаны изменения выраженности «вертикальных» функциональных связей в зависимости от глубины седации [27]. В данном контексте выявленные в настоящей работе «вертикальные» связи отражают активность таламо-кортикальной функциональный сети и сети пассивной работы мозга (default mode) [28]. Можно предположить, что для восстановления сознания у пациентов с тяжелой ЧМТ сохранность «вертикальных» функциональных связей является одним из необходимых условий, отражающих взаимодействие между стволом мозга и корой больших полушарий.

Большая выраженность реконструированных функциональных трактов в близкие к травме сроки может отражать усиленную активацию первичных областей мозга, принимающих сигнал о стимулах из вне. Однако структурно-функциональные нарушения вследствие травмы мозга, в частности наличие диффузного аксонального повреждения, не позволяют активироваться привычным функциональным связям, вызывая гипервозбуждение отдельных областей мозга и построение новых функциональных связей. Особо стоит отметить, что выявляемая анатомическая целостность трактов не всегда означает функциональную сохранность между отделами мозга. Кроме того, выявленные анатомические тракты у пациентов в бессознательном состоянии имеют отличные качественные характеристики, что отражается в направлении волокон, которые преобладают при визуализации тракта. Эти отличия проявляются и при реконструкции функциональных связей. У пациентов преобладают односторонние функциональные связи, тогда как у здоровых испытуемых функциональные связи представляют собой смесь односторонних и двухсторонних функциональных связей. Можно полагать, что в случае достаточного количества сохранных анатомических трактов между двумя зонами активации возможно формирование новых функциональных связей, которые не являются прямыми, однако они оказываются способны выполнять компенсаторную роль для обеспечения полноценной работы функциональной сети. При этом утраченные связи перестают быть видимыми в период нескольких месяцев после травмы как при оценке функциональных связей, так и при трактографии. Это согласуется с Валлеровой аксональной дегенерацией (1850), которая продолжается в течение нескольких месяцев после повреждения мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании было показано, что у пациентов с затяжным UWS отмечается большее количество «вертикальных» функциональных связей по сравнению с пациентами с затяжным MCS. У пациентов с хроническим бессознательным состоянием отмечается общее снижение числа функциональных связей. У пациентов с хроническим UWS отмечаются корковые связи в лобных отделах, у пациентов с хроническим MCS отмечаются функциональные связи в лобных и теменных отделах. Отсутствие функциональных связей может иметь место даже в тех случаях, когда анатомические тракты мозга сохранны.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол был одобрен этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, на базе которого было проведено исследование. Учитывая, что пациенты находились без сознания, письменное информированное согласие на проведение исследования подписывали родственники пациента, которые получили полную информацию о методах и целях исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено на средства Государственного бюджета по госзаданию на 2019-2021 г. (тема АААА-А17-117092040004-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Laureys, G. Celesia, F. Cohadon, et al., BMC Med. **8** (1), 1 (2010).
2. M. Boly, M. E. Faymonville, P. Peigneux, et al., Neuropsychol. Rehabil. **15** (3–4), 283 (2005).
3. L. Naccache, Brain **141** (4), 949 (2018).
4. R. D. Sanders, G. Tononi, S. Laureys, and J. W. Sleigh, Anesthesiology **116** (4), 946 (2012).
5. R. Formisano, M. D'Ippolito, and S. Catani, Brain Inj. **27** (11), 1332 (2013).
6. E. Donchin, W. Ritter, and W. C. McCallum, in *Brain Event-Related Potentials in Man*, Ed. by E. Callaway, P. Tueting, and S. H. Koslow (Academic Press, N.Y., 1978), pp. 349–411.
7. J. Polich, Clin. Neurophysiol. **118** (10), 2128 (2007).
8. L. B. Oknina, O. S. Zaitsev, E. L. Masherow, et al., J. Adv. Med. Med. Res. **27** (4), Art. no. 42477 (2018).

9. K. Murphy and M. D. Fox, Neuroimage **154**, 169 (2017).
10. A. Demertzi, G. Antonopoulos, L. Heine, et al., Brain **138** (9), 2619 (2015).
11. B. Cao, Y. Chen, R. Yu, et al., Neuroimage Clin. **24**, Art. no.102071 (2019).
12. B. I. Martinez and S. E. Stabenfeldt, Biol. Eng. **13** (1), 1 (2019).
13. N. Coquelet, X. De Tiège, F. Destoky, et al., Neuroimage **210**, 116556 (2020).
14. F. C. Yeh, S. Panesar, D. Fernandes, et al., Neuroimage **178**, 57 (2018).
15. G. Vithoulkas and D. F. Muresanu, J. Med. Life **7** (1), 104 (2014).
16. L. Billeri, S. Filoni, E. F. Russo, et al., Brain Sci. **10** (1), 42 (2020).
17. J. A. McNab, B. L. Edlow, T. Witzel, et al., Neuroimage **80**, 234 (2013).
18. K. Maier-Hein, P. Neher, J. C. Houde, et al., Nature Comm. **8**, Art. no. 1349 (2017).
19. J. Geweke, J. Am. Statistic. Association **77**, 304 (1982).
20. О. С. Зайцев, *Психопатология тяжелой черепно-мозговой травмы* (Медпресс-информ, М., 2011).
21. F. Tadel, S. Baillet, J. C. Mosher, et al., Comput. Intell. Neurosci. **2011**, Art. ID 879716 (2011).
22. Н. Е. Захарова, А. А. Потапов, В. Н. Корниенко и др., Вопр. нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко. **3**, 3 (2010).
23. S. Corchs, G. Chioma, R. Dondi, et al., Front. Neurosci. **13**, 1323 (2019).
24. S. Chennu, J. Annen, S. Wannez, et al., Brain **140** (8), 2120 (2017).
25. S. E. Petersen and M. I. Posner, Annu. Rev. Neurosci. **35**, 73 (2012).
26. A. K. Beck, G. Lütjens, K. Schwabe, et al., Brain Struct. Funct. **223** (1), 461 (2018).
27. L. B. Oknina, A. O. Kantserova, E. L. Masherov, et al., *World J. Pharmaceut. Med. Res.* **5** (2), 237 (2019).
28. R. L. Buckner and L. M. DiNicola, Nat. Rev. Neurosci. **20** (10), 593 (2019).

A Stable Breakdown of the Number of Brain Functional Connectivity Patterns Predetermines Prolonged Disorders of Consciousness in Patients with Traumatic Brain Injuries

L.B. Oknina*, O.S. Zaitsev, E.L. Masherov**, E.L. Pogosbekyan**, A.S. Zigmantovich*, M.M. Kopachka**, and E.V. Alexandrova****

**Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

***Academician N.N. Burdenko National Medical Research Institute of Neurosurgery, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. 4-ya Tverskaja-Jamskaja 16, Moscow, 125047 Russia*

Severe brain traumatic injury may cause long-term disorders of consciousness with different clinical implications, which are difficult to differentiate and poor at predicting the outcome. In this study, using the bioelectrical activity, brain functional connectivity patterns were reconstructed and analyzed while being activated during listening to tones in 20 patients with disorders of consciousness due to brain traumatic injury. It was revealed that patients with long-term disorders of consciousness might have the greater number of functional connectivity patterns in the frontal area than the number of "vertical" connectivity patterns. In patients with chronic disorders of consciousness, the number of functional connectivity patterns significantly decreases even when anatomically the integrity of brain tracts is preserved. It is possible to assume that the revealed features of functional connectivity could contribute to an accurate assessment of the patients' state in the absence of verbal contact and to the selection of adequate therapy.

Keywords: severe brain traumatic injury, unresponsive wakefulness state, minimally conscious state, cerebral functional connectivity, consciousness recovery

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 802–810

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 612.83

ЭФФЕКТЫ ФАЗОЗАВИСИМОЙ ЧРЕСКОЖНОЙ СТИМУЛЯЦИИ СПИННОГО МОЗГА В РЕГУЛЯЦИИ КИНЕМАТИКИ ШАГАТЕЛЬНЫХ ДВИЖЕНИЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. И.Н. Богачева, Н.А. Щербакова, А.А. Савохин, А.А. Гришин, Ю.П. Герасименко

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

E-mail: boiss@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2020 г.
После доработки 26.02.2021 г.
Принята к публикации 23.03.2021 г.

Исследовалось влияние чрескожной электрической стимуляции спинного мозга на кинематические параметры движений ипсилатеральной и контралатеральной ноги у здоровых испытуемых при ходьбе по беговой дорожке (1.5–1.7 км/ч). Стимулирующие электроды располагались на 2.5 см латеральнее средней линии спинного мозга с правой и левой стороны на уровне L1 и T11 позвонков. Во время фазы опоры применяли стимуляцию на уровне L1 с частотой 15 Гц, затем во время фазы переноса – на уровне T11 с частотой 30 Гц, далее следовала чередующаяся стимуляция L1 и T11. Влияние стимуляции в фазе переноса (T11) было более эффективным, чем в фазе опоры (L1), а наибольшее изменение кинематических параметров наблюдалось при сочетании стимуляции L1 и T11. При ритмической стимуляции с одной стороны в шаге ипсилатеральной ноги увеличивалась амплитуда изменения углов в тазобедренном, коленном и/или голеностопном суставах, длина переноса и высота подъема ноги. В шаге контралатеральной ноги наблюдались схожие, но менее выраженные изменения параметров. Увеличение продолжительности стимуляции в фазе переноса на 10% вызывало изменения кинематических параметров шага ипси- и контралатеральной ноги. Максимальный эффект наблюдался при двусторонней чередующейся стимуляции. Полученные данные показывают, что применение фазозависимой чрескожной электрической стимуляции спинного мозга с учетом естественной синергии может быть инструментом управления кинематическими параметрами движения.

Ключевые слова: спинной мозг, электрическая стимуляция, кинематика движений, шагательный цикл.

DOI: 10.31857/S0006302921040207

Чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга (ЧССМ) является новым эффективным методом регуляции двигательных функций [1, 2]. Показано, что у здоровых испытуемых воздействие непрерывной ЧССМ в условиях внешней поддержки ног приводит к инициации непроизвольных шагоподобных движений [2], а у пациентов с полным перерывом спинного мозга вызывает двигательные ответы в мышцах нижних конечностей [3–5]. Локомоторная синергия – это ритмический процесс, который возникает в результате сложных динамических, т.е. изменяющихся во времени, взаимодействий между нейронными сетями спинного мозга и механизмами обратной связи. В основе шагательной ритмики лежит периодическое переключение активности экстензоров и флексоров, что определяет характерную структуру шагательного цикла, состоящего из фазы опоры и фазы переноса [6].

Результаты исследований, полученных в последнее время, показывают, что при помощи ЧССМ можно получить локальный доступ к конкретным нейронным структурам спинного мозга. Установлено, что ЧССМ способна дифференцированно активировать моторные пулы нижних конечностей через активацию афферентов дорсальных корешков на основе их анатомического расположения вдоль ростро-каудальной оси [7]. Показано, что при осуществлении стимуляции латеральнее средней линии спинного мозга в области пояснично-крестцового утолщения избирательно активируются ипсилатеральные спинномозговые сенсомоторные сети [8]. В настоящей работе ритмическая ЧССМ осуществлялась в зоне вхождения дорсальных корешков в спинной мозг для активации флексорных и экстензорных моторных пулов нижних конечностей в определенные фазы шагательного цикла. Учитывая, что

Сокращение: ЧССМ – чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга.

в основе шагательной ритмики лежит динамическое взаимодействие между нейронными сетями и моторными пулами флексоров и экстензоров обеих конечностей, ставилась задача оценить влияние фазозависимой ЧССМ на кинематику движений ипсилатеральной и контралатеральной ноги. Исследование направлено на разработку методов, сочетающих ЧССМ с локомоторной тренировкой, для реабилитации после двигательных нарушений различного генеза.

МЕТОДИКА

В исследованиях принимали участие здоровые добровольцы мужского пола в возрасте от 19 до 35 лет ($N = 11$). Задачей испытуемых была ходьба по беговой дорожке (h/p/cosmos gaitway®, h/p/Cosmos Sports & Medical, Германия) со скоростью 1.5–1.7 км/ч. После 15 с ходьбы без стимуляции к испытуемым применяли ЧССМ (L1-L2) для воздействия на моторные пулы мышц-разгибателей, которую осуществляли во время фазы опоры, затем для воздействия на моторные пулы мышц-сгибателей (T11-T12) в фазе переноса ноги и далее попеременную активацию мышц разгибателей и сгибателей в соответствующей фазе цикла (L1+T11). При стимуляции слева, т.е. когда ипсилатеральной была левая нога, на заключительном этапе добавляли чередующуюся ЧССМ справа, также с учетом фаз шагательного цикла. Фазы шагательного цикла определяли по движению тазобедренного сустава ипсилатеральной (по отношению к месту стимуляции) ноги. Начало разгибания тазобедренного сустава соответствовало началу фазы опоры, а начало сгибания – фазы переноса. Стимуляция обеспечивалась электродами, расположенными с правой или левой стороны (2.5 см латерально) от средней линии спинного мозга.

Вторая серия исследований была проведена с использованием алгоритма продления стимуляции в фазе переноса на заданный период времени от длительности шагового цикла, поскольку время окончания стимуляции флексоров ноги происходит, как правило, раньше постановки стопы на опору. В данной серии экспериментов длительность стимуляции в фазе переноса увеличивали на 10%.

Для ЧССМ применяли пятиканальный электростимулятор Био-Стим-5 (ООО «Косима», Россия) [9]. Прямоугольные импульсы длительностью 1 мс модулировали частотой 5 кГц, частота стимуляции равнялась 15 Гц для экстензорных и 30 Гц для флексорных пулов, интенсивность стимуляции – 15–90 мА. Для регистрации кинематических характеристик движений ног при ходьбе использовали систему 3D-видеоанализа (Qualisys, Швеция). Светоотражающие маркеры фиксировали на следующих билатеральных антропометрических точках: плечевой акромиальной (плечевой сустав), вертельной (тазобедренный сустав), верхнеберцовой (коленный сустав), нижнеберцовой (голеностопный сустав); конечной (первый палец стопы).

Для измерения кинематических характеристик создавали трехмерную модель движущегося человеческого тела в программе Qualisys Track Manager. По данным точкам рассчитывали амплитуду движений: в тазобедренном суставе между тремя точками – плечевой акромиальной, вертельной и верхнеберцовой; в коленном суставе – между вертельной, верхнеберцовой и нижнеберцовой; в голеностопном суставе – между верхнеберцовой, нижнеберцовой и конечной.

Для анализа данных использовали специально разработанную в среде Labview программу. Анализировали следующие кинематические параметры каждой фазы шагательного цикла: длину и траектории движения ноги в фазе опоры и фазе переноса, высоту подъема ноги и изменение амплитуды углов в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах. Рассчитывали среднее значение и среднеквадратичное отклонение по шести циклам до стимуляции и при всех условиях стимуляции. Для оценки статистической значимости различий использовали t-критерий Стъюдента и непараметрический парный критерий Вилкоксона, отличия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что влияние ЧССМ на кинематические параметры движений зависит от фазы шагательного цикла и места приложения стимуляции.

Рис. 1 показывает изменение суставных углов в одном шагательном цикле и усредненные траектории движения ноги (по траектории конечной точки, определяемой по положению маркера, закрепленного на большом пальце ноги) для одного испытуемого. Величина угловых перемещений в суставах ног изменялась под действием ЧССМ (рис. 1). Траектория движений конечной точки характеризуется длиной в фазах опоры и переноса, еще одним параметром, определяющим форму траектории, является высота подъема. ЧССМ на уровне L1 практически не изменяла высоту подъема, в то время как при ЧССМ T11 наблюдалось увеличение высоты подъема и длины траектории в фазе переноса. Этот эффект был еще более выражен при чередующейся стимуляции (L1+T11). Период опоры при ЧССМ изменялся индивидуально для каждого испытуемого, общих закономерностей при этом не установлено. Для контралатеральной ноги можно видеть схожие, но менее выраженные изменения кине-

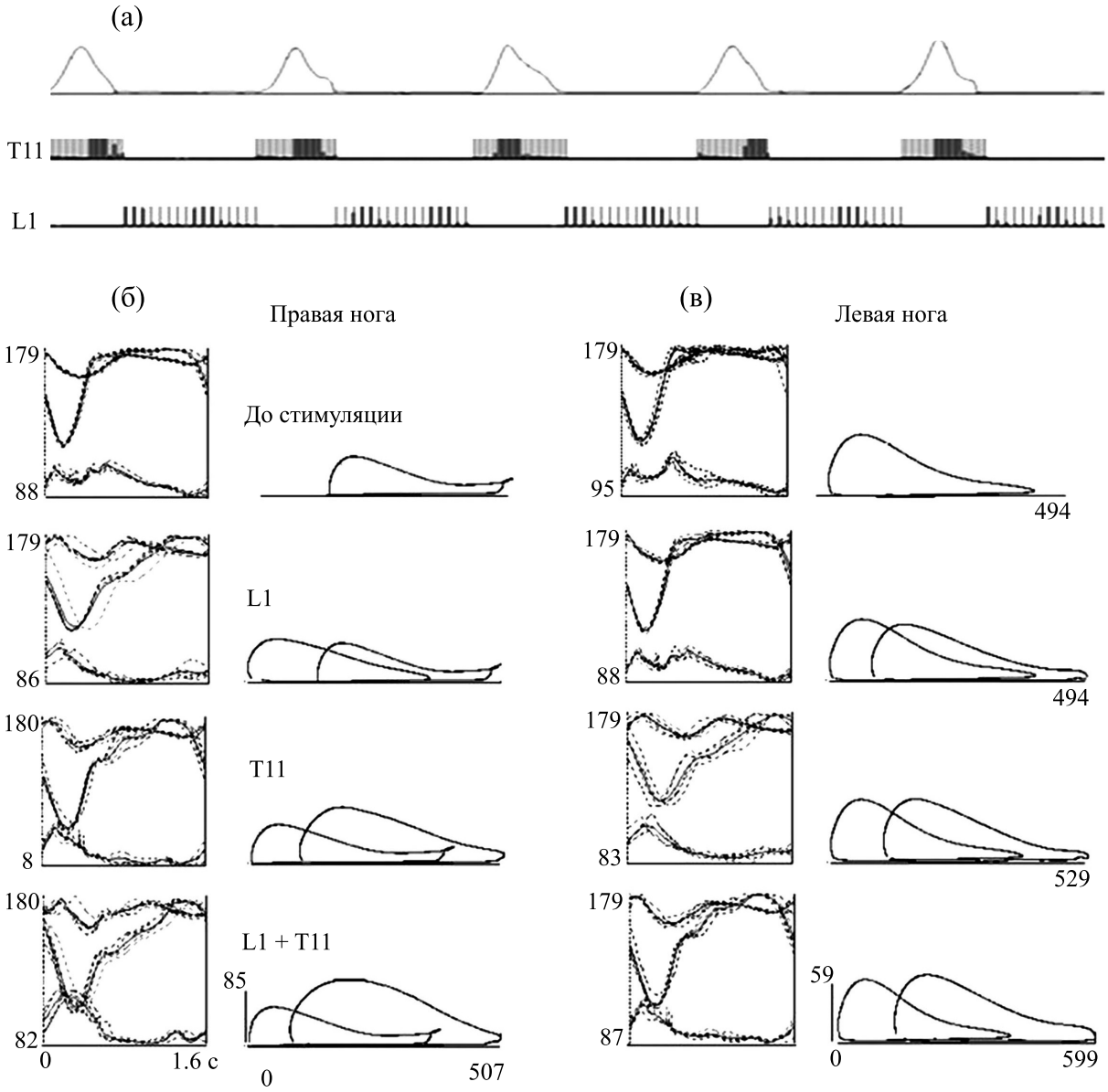


Рис. 1. (а) – Схема стимуляции в разные фазы шагательного цикла, верхняя линия – высота подъема ноги (перемещение маркера на первом пальце стопы в вертикальном направлении). (б) – Изменение суставных углов ипсилатеральной (правой) ноги в шагательном цикле при разных условиях стимуляции. (в) – Изменение суставных углов контралатеральной (левой) ноги в шагательном цикле при разных условиях стимуляции. На панелях (б) и (в) слева: верхняя кривая – угол в тазобедренном суставе, средняя кривая – в коленном суставе, нижняя кривая – в голеностопном суставе; по оси X – время в секундах, по оси Y – угловое перемещение. На панелях (б) и (в) справа: сравнение траекторий движения ноги в шагательном цикле; по оси X – длина опоры (мм), по оси Y – высота подъема (мм). Условия стимуляции обозначены на рисунке.

матических параметров траектории движения (рис. 1 и 2).

Заметим, что при стимуляции с правой стороны аналогичные, но количественно менее выраженные изменения по сравнению с ипсилатеральной ногой, наблюдались у всех испытуемых и в контралатеральной левой ноге (рис. 2 и 3). Однако если стимуляцию проводили с левой стороны, то у двух испытуемых не наблюдалось увеличение подъема контралатеральной правой ноги. Разнонаправленные изменения рефлекторной возбудимости спинального центра наблюдались также другими авторами, а изменения рефлекторной возбудимости как при произвольном сокращении мышц сгибателей стопы, так и при произвольном сокращении мышц разгибателей стопы были более выражены с ипсилатеральной стороны, чем с контралатеральной [10].

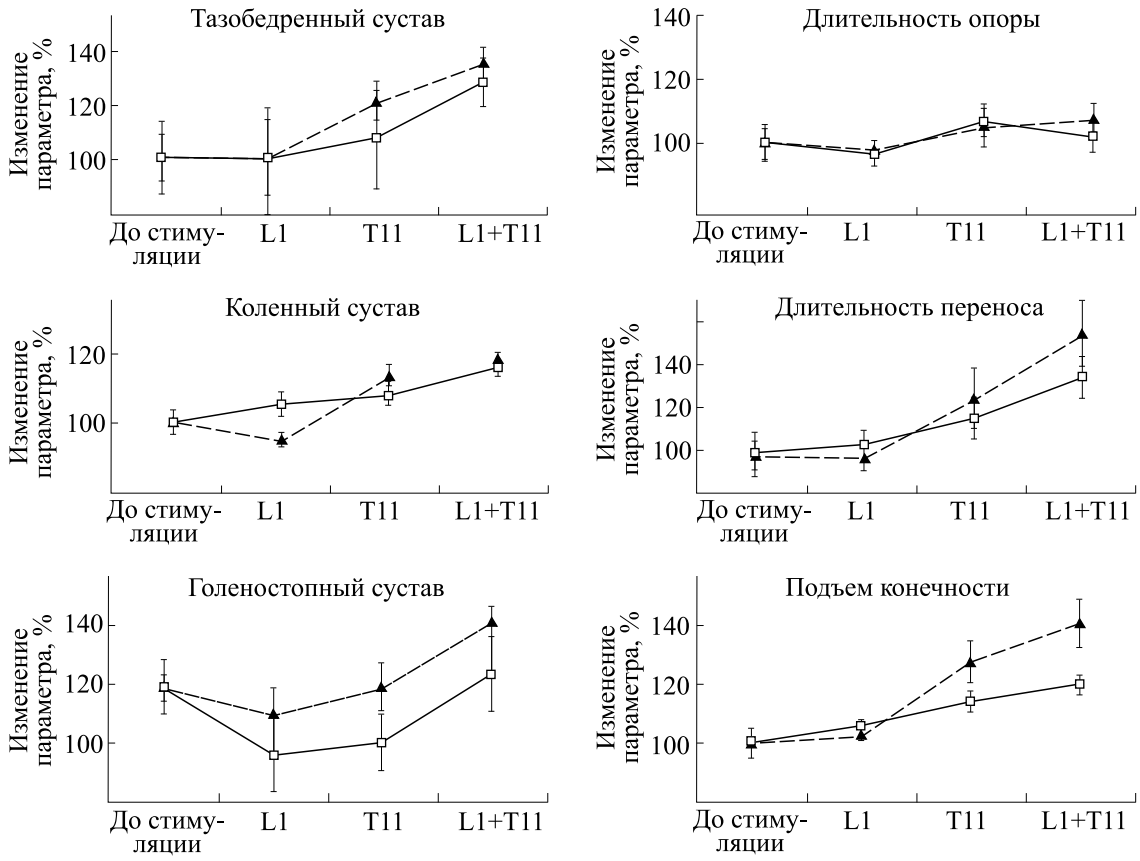


Рис. 2. Изменение амплитуды суставных углов (слева) и кинематических параметров в шагательном цикле (справа) при разных условиях стимуляции для ипсилатеральной (черные треугольники) и контралатеральной ноги (белые квадраты). Статистически значимые отличия указаны по отношению к ходьбе до стимуляции ($p < 0.05$). Представлены значения: до стимуляции, L1 – стимуляция в фазе опоры, T11 – стимуляция в фазе переноса, L1+T11 – чередующаяся стимуляции в фазе опоры и переноса.

На рис. 3 представлены усредненные данные для всех испытуемых ($n = 11$). Подъем ноги при стимуляции в фазе переноса (T11) увеличивался на 29.8%, а в контралатеральной – на 12.4%. При чередующейся (L1+T11) стимуляции этот эффект усиливался в ипсилатеральной ноге – до 41.1%, а в контралатеральной – до 19%. Увеличение подъема ноги коррелировало с увеличением амплитуды движения в суставах на 4–28%. При этом увеличивалась амплитуда углов как минимум в двух суставах, амплитуда угла в тазобедренном суставе возрастала у всех испытуемых в ипси- и контралатеральной ноге. Амплитуда в коленном и голеностопном суставе изменялась индивидуально. При чередующейся ЧССМ увеличение подъема в ипсилатеральной ноге происходило за счет увеличение амплитуды движения в трех суставах. Стимуляция одного локуса влияла на голеностопный сустав меньше, чем двойная стимуляция, это было более выражено в контралатеральной ноге, а в ипсилатеральной правой ноге амплитуда угла в голеностопном суставе, хотя и незначительно, уменьшалась у всех испытуемых.

На рис. 4 представлены обобщенные результаты экспериментов при продлении периода стимуляции во время фазы переноса на 10%. В этом случае при чередующейся стимуляции амплитуда изменения угла в тазобедренном суставе увеличилась на 26% для ипсилатеральной ноги и на 19% для контралатеральной ноги, в голеностопном суставе – в обеих ногах на 8%. Высота подъема ноги также увеличилась у всех испытуемых по сравнению со значениями этих параметров до стимуляции. В среднем по группе увеличение высоты подъема в ипсилатеральной ноге составляло 57.4%, в контралатеральной – 34.2%, хотя индивидуальные показатели у некоторых испытуемых были выше при двойной стимуляции с начальной длительностью. Полученные данные показывают, что, регулируя время воздействия ЧССМ в фазе переноса, можно достичь большего влияния стимуляции на кинематические параметры шага для каждого испытуемого.

На рис. 5 показаны изменения кинематических параметров шага при двусторонней стимуляции, в этом случае на фоне чередующейся сти-

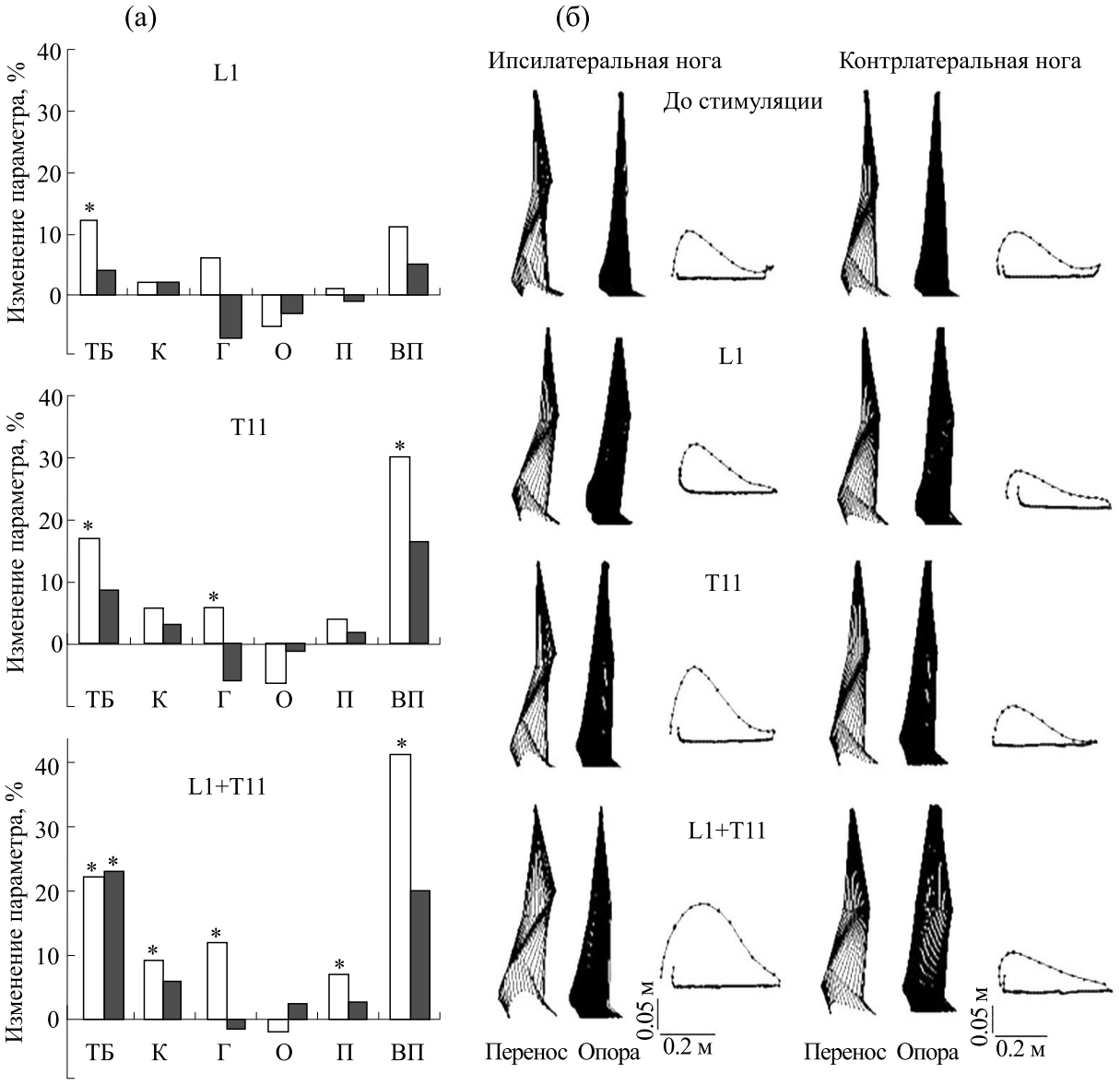


Рис. 3. (а) – Изменения кинематических параметров шагательного цикла при стимуляции в ипсилатеральной (светлые столбики) и контралатеральной ноге (темные столбики). По оси *X* обозначены: ТБ – амплитуда угла в тазобедренном суставе, К – в коленном суставе, Г – в голеностопном суставе, О – длина опоры, П – длина переноса, ВП – высота подъема ноги; по оси Y – изменения в процентах от значений параметров до стимуляции. Статистически значимые отличия указаны по отношению к ходьбе до стимуляции ($p < 0.05$). (б) – Стик-диаграммы движений ноги в фазе переноса и в фазе опоры и траектория движения конечной точки в одном шагательном цикле (на примере одного испытуемого).

муляции с левой стороны добавлялась такая же стимуляция справа в соответствующие для этой ноги фазы. В этом случае наблюдали максимальные изменения кинематических параметров шага для обеих ног. Наиболее выраженные изменения регистрировали в левой ноге, которую стимулировали первой по времени, при включении стимуляции справа эффект в левой ноге усиливался. Значения параметров были выше при продлении периода стимуляции в фазе переноса на 10%. Так, амплитуда угла в тазобедренном суставе увеличилась на 30% в правой и на 38% в левой ноге, что составляло 5–7 градусов. Увеличение в коленном суставе составляло 18–20%. В голеностопном суставе наблюдали разнонаправленные изменения. Высота подъема увеличивалась в среднем на 69% для правой и на 98% для левой ноги, что было выше, чем при стимуляции с одной стороны, и составляло 3–5 см.

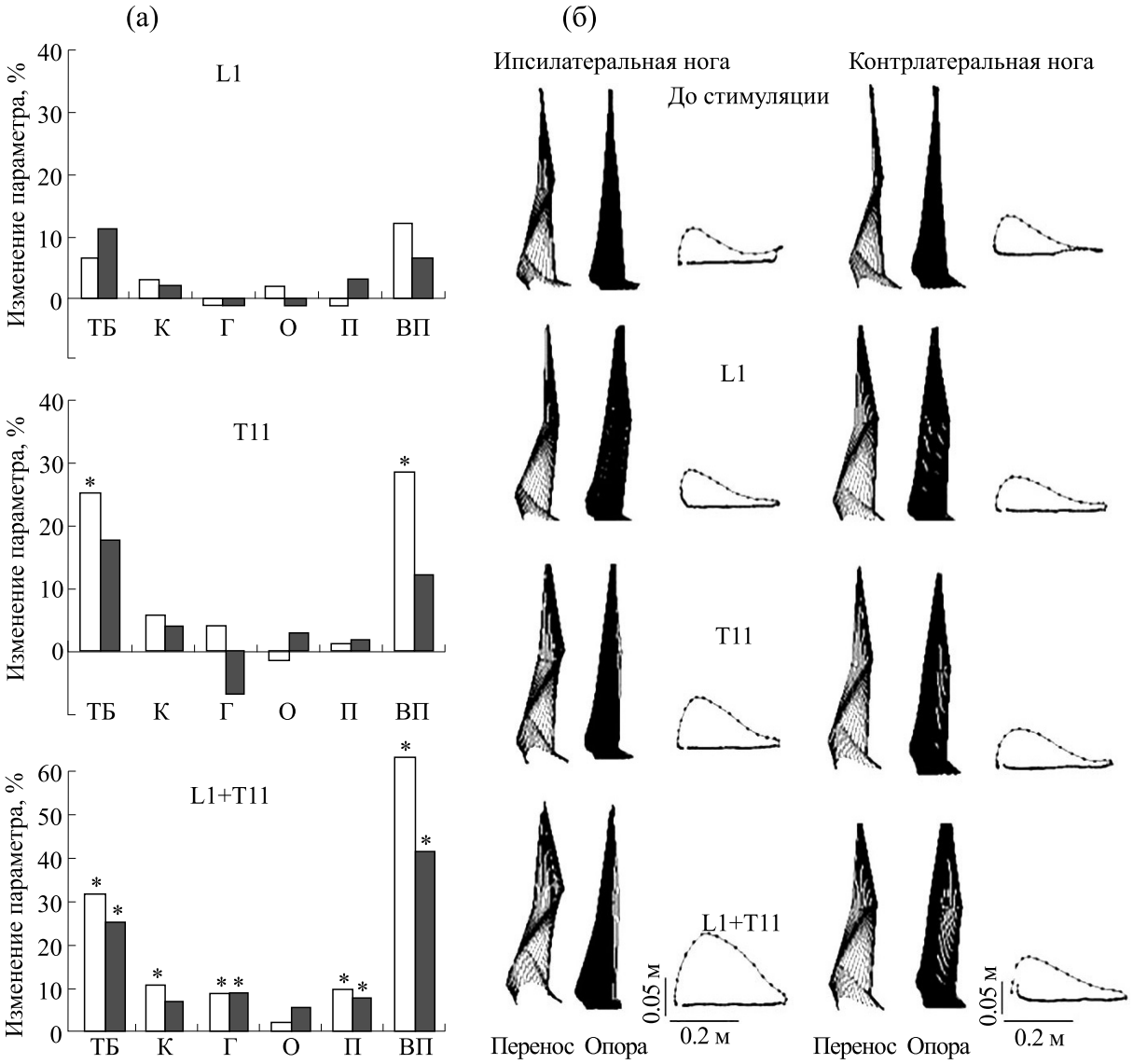


Рис. 4. Результаты, аналогичные представленным на рис. 3, при увеличении периода стимуляции в фазе переноса на 10%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при локомоции модуляция спинальных локомоторных сетей обеспечивается афферентными сигналами от опорно-двигательного аппарата и является фазозависимой. Это относится как к проприоцептивным воздействиями, так и к нисходящим проводящим путям [11]. В работе [7] использовали ЧССМ разных уровней спинного мозга (Т10-Т11, Т11-Т12 и Т12-L1) в виде одиночных однофазных прямоугольных импульсов длительностью 1 мс. Была показана относительная избирательность рекрутирования различных мотонейронных пулов, иннервирующих мышцы ног, и высказано предположение о возможности селективной активации флексорных/экстензорных моторных пулов. Полученные в нашей работе данные показывают зависимость эффекта ЧССМ от времени и места ее приложения. Ранее, при изучении моносинаптических ответов, вызванных ЧССМ (Т11-Т12) во время ходьбы и бега у здоровых людей, была показана фазозависимая модуляция амплитуды этих ответов во всех исследуемых мышцах (с обеих сторон), причем амплитуда была большей, если мышца была активирована [12]. Фазозависимую модуляцию моторных ответов наблюдали также у спинальных пациентов, что свидетельствовало о спинальном уровне их регуляции [3].

Действительно, воздействие на сгибательные пулы в фазе переноса приводило к увеличению подъема, так как именно мышцы-сгибатели были активированы в этой фазе шагательного цикла, а

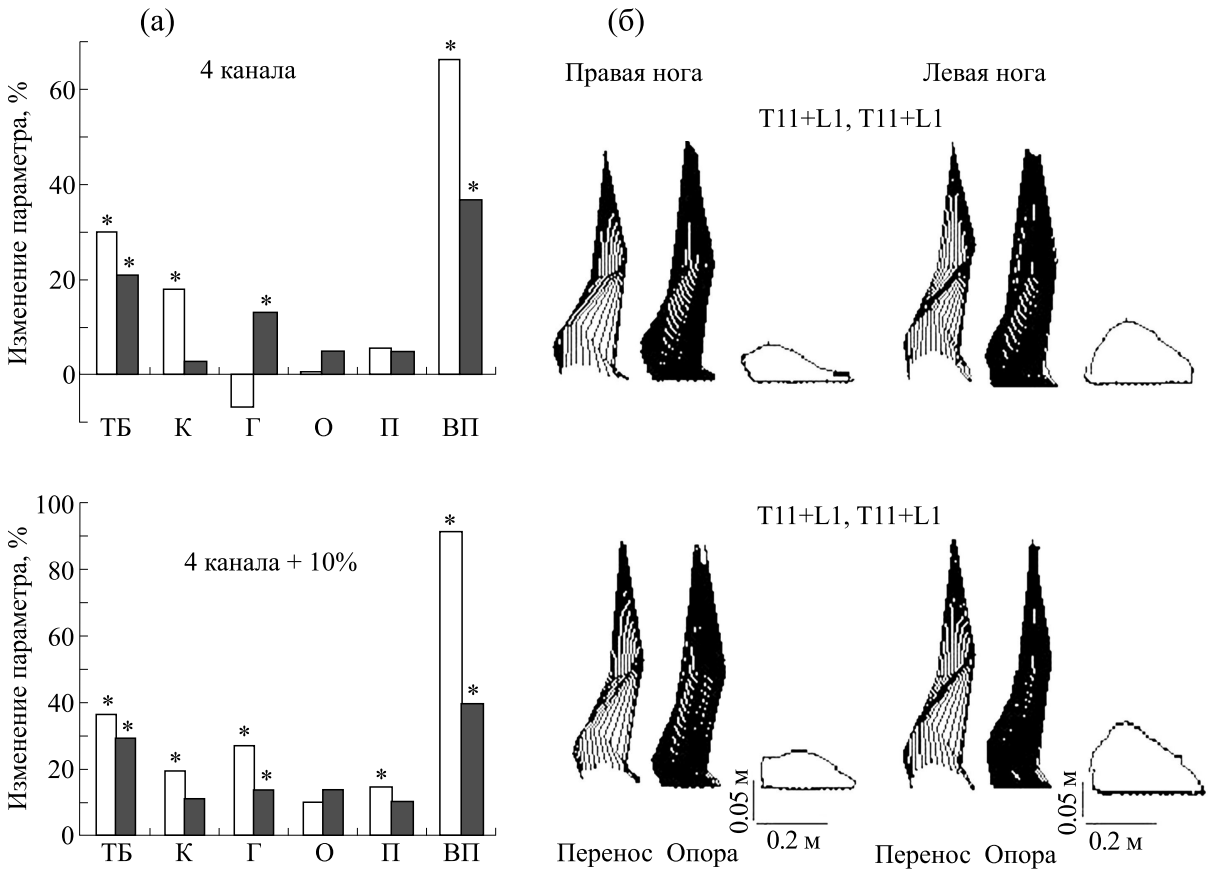


Рис. 5. Верхний ряд: (а) – Изменения параметров шага в шагательном цикле во время одновременной стимуляции слева и справа для левой ноги (светлые столбики) и правой ноги (темные столбики). Обозначения на осях *X* и *Y* те же, что на рис. 3. (б) – Стик-диаграммы движений ноги в фазе переноса и в фазе опоры и траектория движения конечной точки в одном шагательном цикле (на примере одного испытуемого). Нижний ряд: то же при увеличении длительности периода стимуляции в фазе переноса на 10%.

стимуляция повышала их возбудимость. Эффект был более выражен в ипсилатеральной ноге. Это согласуется с данными последних исследований, представленных в работе [13], где авторы показали, что при моторном пороге стимуляции мышечная активность и выработка силы, вызванные ЧССМ, наносимой на 2 см латеральной линии позвоночника, выше в ипсилатеральной ноге. В более ранней работе [14] было показано, что односторонняя травма седалищного нерва вызывает изменения моторного и рефлекторного ответа в икроножной мышце обеих конечностей, но изменения в ипсилатеральной ноге были более выражены. Так, амплитуда моторного ответа в ипсилатеральной мышце снижалась до 28.1%, а в контралатеральной – до 75.1% по сравнению с контролем. Применение ЧССМ в фазе опоры не вызывало существенных изменений кинематических характеристик движения как в ипси-, так и в контралатеральной ноге, вероятно, влияние сенсорных сигналов при давлении стопы на опору под действием гравитационных сил было достаточно сильным, особенно в условиях движущейся ленты, что и было определяющим условием моторного выхода. Изменения кинематических параметров при контралатеральной стимуляции можно объяснить наличием динамической взаимосвязи между нейронными сетями, управляющими движением правой и левой ноги, т.е. тех структур, которые обычно называют генератором шагательных движений. Это означает, что спинальный механизм при участии супраспинальных команд и обратной связи от рецепторов обеих конечностей определяет шагательную ритмику, и даже при ходьбе по движущейся ленте, которая сама по себе задает ритм и скорость, ЧССМ вносит коррекцию кинематических параметров движения. На увеличение синергетических эффектов указывают максимальные изменения параметров шага при чередующейся стимуляции. В то время как ЧССМ экстензорных пулов не изменяла кинематику в шагательном цикле, однако в сочетании со стимуляцией флексоров усиливала эффект воздействия.

Влияние ЧССМ на ипсилатеральную ногу было более выраженным, а в контралатеральной

правой ноге подъем не изменялся у двух испытуемых. Возможно, это связано с латеральным доминированием, однако, такая характеристика больше относится к верхним, чем к нижним конечностям. Значительные уровни двусторонней асимметрии в спинально вызванных потенциалах при ЧССМ отмечались и в работе [7], где авторы не связывают это наблюдение с латеральным доминированием.

Полученные нами результаты могут обуславливаться механизмами действия ЧССМ, которые на основании экспериментальных и модельных данных часто сравнивают с механизмами действия эпидуральной стимуляции спинного мозга [5, 15, 16]. Если одиночная стимуляция вызывает моносинаптический ответ, то непрерывная, как эпидуральная, так и чрескожная стимуляция определенной амплитуды и частоты, может вызывать шагательную ритмику с участием полисинаптических путей. Предполагается, что с увеличением интенсивности ЧССМ даже одиночными импульсами, помимо Ia-афферентов афференты меньшего диаметра, в том числе группы Ib, афференты II группы, кожные афференты, спинномозговые интернейроны, а также прямая активация эфферентов вентральных корешков [17] могут вносить вклад в спинально вызванные потенциалы. В случае ипсилатеральной ноги стимуляция активирует в первую очередь дорсальные корешки, а воздействие на контралатеральную конечность происходит более сложным путем с большим количеством синаптических переключений. Система афферентов флексорного рефлекса имеет тормозные и возбудительные пути к мотонейронам ипси- и контралатеральных сторон. Взаимодействие сигналов с билатеральных афферентных входов происходит на уровне мотонейронов, на интернейронах системы афферентов флексорного рефлекса и тормозных интернейронах [18]. В работе [19] с использованием эпидуральной стимуляции было показано, что проприоцептивные афференты вызывают моносинаптические реакции в нейронах разгибателях и задействуют нейроны сгибатели через полисинаптические пути. Возможно, это объясняет больший эффект воздействия при стимуляции пулов-сгибателей.

Увеличение подъема ноги обусловлено изменением амплитуды изменений суставных углов под действием стимуляции. Наибольший подъем сопровождался увеличением амплитуды всех суставных углов. Практически у всех испытуемых при чередующейся ЧССМ наблюдали увеличение угла в тазобедренном суставе, вероятно, это происходит потому, что при стимуляции на уровне T11 первыми вовлекаются в активность проксимальные мышцы [7]. Показано также, что циклы восстановления рефлексов, т. е. временной ход изменения их возбудимости, более быстрый у мышц бедра [4]. Увеличение двух других углов было индивидуальным. Известно, что даже в случае обычной ходьбы характер походки сильно различается у разных людей. Некоторые люди при ходьбе прилагают наибольшие усилия в голеностопном суставе, в то время как у других большая нагрузка приходится на коленный сустав [20].

Сопоставляя данные, полученные до и после продления периода стимуляции в фазе переноса, можно заключить, что влияние ЧССМ на параметры шага зависит от временных границ ее воздействия в конкретной фазе цикла, при этом необходимо учитывать точность детектирования фаз шагательного цикла и точность запуска стимуляции. Применение фазозависимой ЧССМ для разработки алгоритма управления кинематикой движения согласуется с представлениями о принципе работы спинального генератора ритма или генератора шагательных движений с переключением активности флексоров и экстензоров как одной, так и обеих конечностей.

Полученные данные показали следующее.

1. В то время как ЧССМ в фазе опоры (L1) незначительно изменяла кинематические параметры движения по сравнению со стимуляцией в фазе переноса (T11), при сочетании стимуляции T11 и L1 в разные фазы шагательного цикла достигался наибольший эффект.

2. В ипсилатеральной ноге изменялась траектория движения, главным образом, за счет увеличения подъема при осуществлении переноса ноги. Увеличивалась амплитуда изменения суставных углов, наибольшее влияние стимуляция оказывала на движение в тазобедренном суставе. В контралатеральной ноге наблюдались аналогичные, но менее выраженные изменения.

3. При увеличении периода стимуляции в фазе переноса на 10% эффект стимуляции усиливался как в ипси-, так и контралатеральной ноге, что указывает на возможность с помощью фазозависимой ЧССМ влиять на кинематические параметры шага путем подбора более точных временных границ приложения стимуляции.

4. Двусторонняя стимуляции с учетом фаз шагательного цикла вызывала максимальные изменения параметров движений в обеих конечностях, улучшая межконечностные взаимодействия.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых методов нейрореабилитации, направленной на регуляцию кинематики движения у людей с двигательными нарушениями.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Е.А. Праздниковой за помощь в обработке экспериментальных данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке НИР с ООО «Косима» №2/2019 от 01.12.2019 г. в рамках проекта НТИ «Разработка нейростимуляционного устройства для регуляции двигательных функций у больных с последствиями острого нарушения мозгового кровообращения», а также Программы «Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства» (проект № АААА-А18-118050890115-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все испытуемые были проинформированы об условиях исследования и дали письменное согласие на участие в нем в соответствии с Хельсинской декларацией и нормами российского и международного права.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Р. М. Городничев, Е. А. Пивоварова, А. М. Пухов и др., Физиология человека **38** (2), 158 (2012).
2. Y. Gerasimenko, R. Gorodnichev, A. Puhov, et al., J. Neurophysiol. **113**, 834 (2015).
3. C. J. Dy, Y. P. Gerasimenko, V. R. Edgerton, et al., J. Neurophysiol. **103**, 2808 (2010).
4. K. Minassian, U. S. Hofstoetter, S. M. Danner, et al., Neurorehabilitation and Neural Repair **30** (3), 233 (2016).
5. U. S. Hofstoetter, B. Freundl, H. Binder, et al., eCollection (2019). DOI: 10.1371/journal.pone.0227057
6. H. Van de Crommert, Th. Mulder, J. Duysens, et al., Gait and Posture **7**, 251 (1998).
7. D. G. Sayenko, D. A. Atkinson, C. J. Dy, et al., J. Appl. Physiol. **118**, 1364 (2015).
8. J. S. Calvert, G. A. Manson, P. J. Grahn, and D. G. Sayenko, J. Neurophysiol. **122**, 2111 (2019). DOI: 10.1152/jn.00454.2019
9. A. A. Grishin, T. R. Moshonkina, I. A. Solopova, et al., Biomed. Engineer. **50**, 300 (2017).
10. И. Н. Плещинский, Р. Х. Бикмуллина и А. Н. Розенталь, Физиология человека **32** (2), 31 (2006).
11. S. Rossignol, R. Dubuc, and J. P. Gossard, Physiol. Rev. **86** (1), 8 (2006).
12. G. Courtine, S. J. Harkema, C. J. Dy, et al., J. Physiol. **582**, 1125 (2007).
13. D. G. Sayenko, M. Rath, A. R. Ferguson, et al., J. Neurotrauma **36** (9), 1435 (2019).
14. А. А. Еремеев, И. Н. Плещинский и Т. В. Бабынина, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **87** (12), 1673 (2001).
15. J. Ladenbauer, K. Minassian, U. S. Hofstoetter, et al., IEEE Trans. Neural Systems and Rehabilitation Engineer. **18** (6), 637 (2010).
16. M. Capogrosso, F. B. Wagner, J. Gandar, et al., Nature Protoc. **13** (9), 203 (2018).
17. F. D. Roy, G. Gibson, and R. B. Stein, Exp. Brain. Res. **233** (2), 281 (2012).
18. И. Н. Плещинский и Н. Л. Алексеева, Физиология человека **22** (1), 123 (1996).
19. F. B. Wagner, J. B. Mignardot, Le Goff-Mignardot, et al., Nature **563** (7729), 65 (2018).
20. E. B. Simonsen, Dan. Med. J. **61** (4), B4823 (2014).

Phase-Dependent Effects of Transcutaneous Spinal Cord Stimulation on Regulation of Kinematics of Human Stepping Motions

I.N. Bogacheva, N.A. Shcherbakova, A.A. Savokhin, A.A. Grishin, and Yu.P. Gerasimenko

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, Saint Petersburg, 199034 Russia

The effect of transcutaneous electrical spinal cord stimulation on the kinematic parameters of movement of the ipsilateral and contralateral legs in healthy subjects during treadmill walking at speeds of 1.5 to 1.7 km/h has been studied. The stimulation electrodes were located 2.5 cm laterally on right and left sides of the spinal midline applied to vertebral levels L1 and T11. During the stance phase, stimulation was administered over L1 at a frequency of 15 Hz, during the swing phase the stimuli was delivered to T11 at a frequency of 30 Hz, followed by alternating stimulation at L1 and T11. The stimulation during the swing phase (T11) was more effective than that during the stance phase (L1), the most impressive changes in kinematic parameters were observed when combined delivery of stimulations to L1 and T11 was performed. With unilateral spinal stimulation, the amplitude of the angles in the hip, knee and/or ankle joints, the length of the transfer and the height of the leg elevation increased in the ipsilateral leg. Similar but less pronounced changes were observed in the contralateral leg. An increase of stimulation duration in the swing phase by 10% caused a change in the kinematic stepping parameters both in ipsilateral and contralateral legs. The maximum effect was observed using bilateral alternating stimulation. The obtained data show that phasic transcutaneous electrical spinal cord stimulation, using a wide range of natural walking speeds, can be applied to control kinematic movement parameters.

Keywords: spinal cord, electrical stimulation, movement kinematics, walking cycle

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 811–822

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 004.942

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АРМИРУЮЩЕЙ КОНСТРУКЦИИ ПРОТЕЗА КРОВЕНОСНОГО СОСУДА НА ОСНОВЕ ВНУТРЕННЕЙ ГРУДНОЙ АРТЕРИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2021 г. К.Ю. Клышников*, М.А. Резвова*, Е.А. Овчаренко*, Т.В. Глушкова*, А.В. Батранин, Д.В. Нуштаев***, Ю.Н. Захаров****, *****, В.Г. Борисов****, Ю.А. Кудрявцева*, Л.С. Барбараш***

**Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6*

***Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30*

****ЗАО «Северсталь Менеджмент», 127299, Москва, ул. Клары Цеткин, 2*

*****Кемеровский государственный университет, 650000, Кемерово, ул. Красная, 6*

******Кемеровский филиал Института вычислительных технологий СО РАН, 650025, Кемерово, ул. Рукавишникова, 21*

E-mail: KlyshnikovK@gmail.com

Поступила в редакцию 25.07.2019 г.
После доработки 14.07.2020 г.
Принята к публикации 02.06.2021 г.

Исследование посвящено оценке сохранения остаточного просвета армированного биопротеза сосудистого русла ксеногенного происхождения «КемАнгиоПротез» (ЗАО «НеоКор», Кемерово) при перегибе. Использованный в работе комплекс натурных и численных методов позволил определить механические свойства исследуемых объектов. В работе были использованы параметры шага спирали – 4 мм и толщины нити – 0.3–0.5 мм. Показано, что свойства материала сосудистой стенки анизотропны при сравнении продольного и поперечного направлений приложения нагрузки. Так, модули упругости составили 1.37 (0.90, 1.12, 1.44, 1.72) МПа против 0.80 (0.97, 1.23, 1.61, 2.15) МПа, соответственно, статистически значимо различаясь ($p < 0.05$). С помощью метода конечных элементов, использованного в работе на этапе подбора параметров армирующего слоя, показано, что остаточный просвет сосудистого протеза нелинейно зависит от особенностей армирования – количества нанесенных спиралей. Показано, что использование внешнего полимерного армирующего слоя позволяет снизить эффект перекрытия сосудистого протеза в случаях его изгиба, что характерно для инфраингвинальных реконструкций, в особенности при сравнении с исходным неармированным изделием. Дополнительно, введение усиления повышает радиальную жесткость протеза, что, потенциально, способно привести к снижению риска образования аневризм сосудистой стенки в отдаленном периоде.

Ключевые слова: численное моделирование, протез сосудистого русла, армирование, остаточный просвет сосуда.

DOI: 10.31857/S0006302921040219

Проведение операций реваскуляризации в настоящее время является актуальным направлением решения проблемы атеросклероза артерий нижних конечностей при критических ишемиях [1]. «Золотым стандартом» таких операций является использование аутологичного нативного сосуда, однако вследствие ограниченности собственного материала ввиду патологических изменений широкое распространение в хирургической практике получили синтетические протезы и протезы биологического происхождения (из сосудов крупного рогатого скота) [2, 3].

Преимущества биопротезов перед синтетическими заключаются в изначальной схожести их механических и функциональных характеристик с тканями пациента: эластичности, податливости (комплаентности), прочности, биомеханики и высокой биосовместимости [3, 4]. Тем не менее имеющийся опыт показывает, что в 10% случаев клинического использования биологических сосудов возникает патологическое растяжение сосудистой стенки – образование аневризм, что в результате приводит к необходимости повторной операции [5].

Описанную проблему способны решить варианты армирования – упрочнения сосудистой стенки каркасом биоинертных материалов (полимерами, металлическими сетками) [6, 7]. Для реализации заявленной идеи был выбран способ, основанный на принципах метода послойного плавления (FDM – Fused Deposition Modeling) [8]. FDM-технология предполагает изготовление моделей путем продавливания расплава материала через формующее отверстие в экструдере, расположенном над коллектором заданной формы, при этом скорость подачи расплава (экструзии) и перемещение головки экструдера контролируется числовым программным управлением [9]. Используя данную технологию, возможно получать усиливающие конструкции различной формы для коррекции комплаентности, жесткости и давления разрыва сосудистых протезов. При проектировании армирующего слоя важно провести обоснованный выбор ключевых параметров: шага спирали и ее диаметра в сечении. Метод компьютерного моделирования сегодня является наиболее предпочтительным среди прочих доступных ввиду возможности проведения итеративного анализа конструкционных свойств в зависимости от заданных параметров [10]. Построение модели сосудистого протеза с заданными, определяющими свойства параметрами, и последующий инженерный анализ напряженно-деформированного состояния конструкции в условиях физиологических нагрузок, выполненный на основе метода конечных элементов, позволяет провести итеративную оптимизацию структуры конструкции и определить ее наиболее эффективные параметры.

Настоящая работа посвящена анализу возможности создания армирующего каркаса сосудистого протеза методом послойного плавления с учетом результатов компьютерного моделирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В работе исследовали протезы сосудистого русла человека, выполненные из биологического ксеногенного материала – внутренней грудной артерии крупного рогатого скота, коммерческие образцы ($N = 5$) которых были предоставлены компанией ЗАО «НеоКор». Каждый сосудистый протез разделяли на два участка равной длины по 60 мм, один из которых выступал в качестве контрольного, а другой был модифицирован дополнительным армирующим слоем. Создание армирующего слоя, представляющего собой полимерную спираль из биоинертного поливинилиденфторида, осуществляли на опытной установке, реализующей принцип контролируемой экструзии термопластичного материала на поверхность сосуда. Оборудование представляет собой платформу, обеспечивающую взаимосвязанное перемещение экструдирующего блока относительно вращающегося вала, на который монтирован участок протеза для армирования (рис. 1а–в). Таким образом последовательное скоординированное движение двух элементов позволяет наносить полимерный армирующий материал в виде спиралей на поверхность сосуда (рис. 1в,г).

Дизайн исследования. Исследование остаточного просвета при перегибе сосудистого биологического протеза осуществляли в три этапа:

1. Определение физико-механических свойств. Этап предполагал исследование экспериментальных и контрольных образцов в условиях одноосного продольного и радиального нагружения (рис. 2а,б) с определением основных упруго-деформативных показателей биологического и полимерного материалов.

2. Калибровка численных методов. Для обеспечения соответствия между результатами численного моделирования и натурным экспериментом проводили предварительную настройку параметров моделирования в четырех тестах.

3. Итеративный подбор параметров армирующего слоя. Этап был реализован в виде серии численных экспериментов, оценивающих изгибную жесткость в зависимости от варьирования параметров спиралей для армирования – количества, толщины нити, шага.

Определение физико-механических свойств. Физико-механическим испытаниям подвергали серию из пяти армированных сосудистых протезов и пяти контрольных образцов без упрочнения. Армирование заключалось в нанесении двойной полимерной спирали толщиной 0.5 мм с шагом спирали 2 мм. Определение свойств образцов осуществляли на универсальной испытательной машине Z50 (Zwick/Roell, Германия) в условиях одноосного растяжения в продольном и поперечном направлениях (рис. 2). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Шапиро–Уилка. Показано, что для большинства показателей распределение отлично от нормального ($p < 0.01$), в связи с чем вся описательная статистика результатов исследования физико-механических свойств представлена как медианная величина, 25-я и 75-я процентили, максимум и минимум. Для попарного сравнения количественных показателей физико-механических испытаний, с учетом того, что выборки являются независимыми, использовали U-критерий Манна-Уитни, при этом достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

Полученные результаты в виде зависимостей «сила–перемещение» использовали на этапе калибровки в качестве референсных для подбора

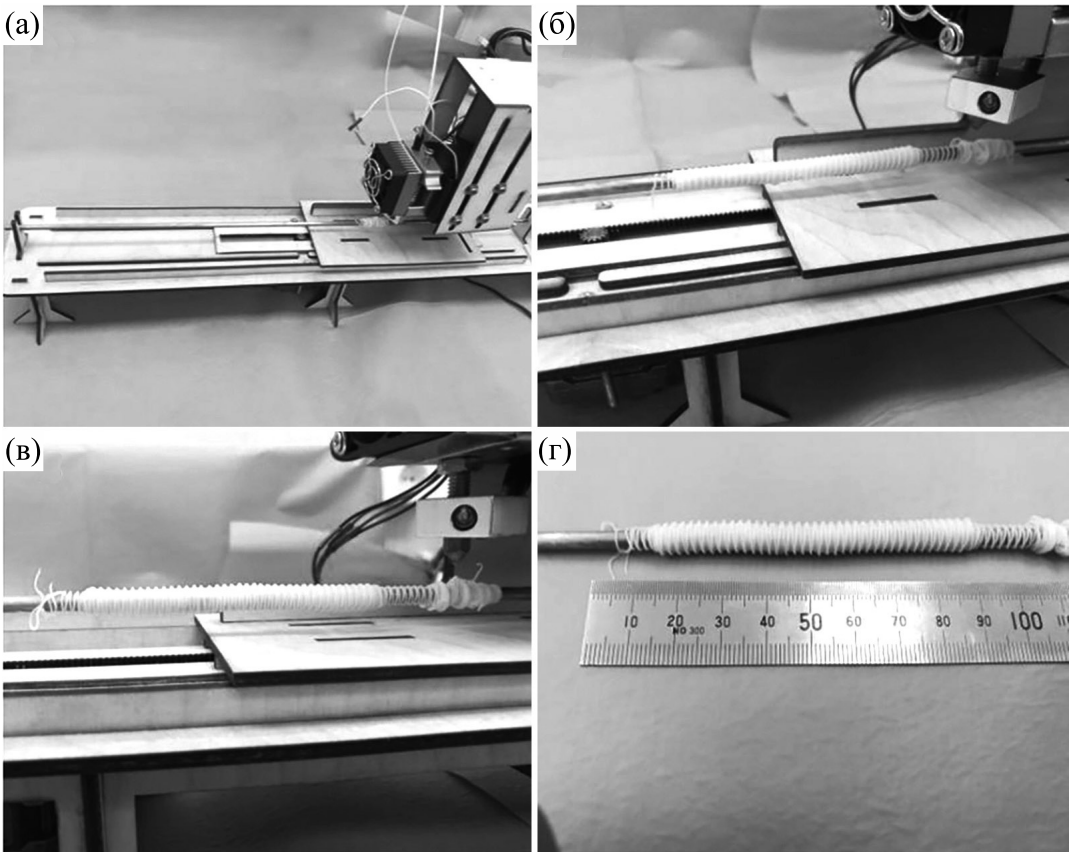


Рис. 1. Опытный образец изготовления спирали на прототипе установки: (а) – вид установки в сборе, (б) – первый этап нанесения упрочняющей спирали в один слой в одном направлении, (в) – наложение повторного слоя в противоположном направлении для повышения армирующих свойств, (г) – габаритный вид полученного образца с армированием.

параметров линейной модели материала численного моделирования

Калибровка численных методов. В рамках численной калибровки полностью воспроизводили параметры физико-механического натурного испытания и граничные условия, т.е. зажимы универсальной испытательной машины (рис. 2). Трехмерными моделями для проведения данного исследования выступили реконструкции, полученные в результате компьютерного микротомографического сканирования [10] на установке с субмиллиметровым разрешением Орел-МТ (НИ ТПУ, Россия). Реконструкцию моделей сосудистых протезов с армированием и без такового осуществляли в среде MATLAB (MathWorks, США) с получением stl-файлов для дальнейшего экспорта в среду инженерного анализа Abaqus/CAE (Dassault Systemes, Франция). В ходе калибровки попарно сравнивали результаты расчетов и экспериментальные данные в осях «сила–перемещение», выбирая модели материалов для моделирования, демонстрирующие наиболее близкие к натурным значения в четырех случаях:

а) окружное растяжение участка протеза без армирования – выбор модели материала для биологической компоненты;

б) продольное одноосное растяжение сосудистого протеза без армирования – выбор модели материала для биологической компоненты;

в) окружное растяжение участка протеза с экспериментальным режимом армирования (толщина спирали 0.5 мм, шаг спирали 2 мм) – выбор модели материала для полимерной компоненты;

г) продольное одноосное растяжение протеза с аналогичным режимом армирования – выбор модели материала для полимерной компоненты.

При этом настройку материалов проводили последовательно: изолированное сравнение и выбор свойств биологической компоненты, а затем – аналогичный подбор и выбор свойств протеза в сборе (совокупность сосуда и полимерного усиления). Тип аппроксимации модели материала при расчете выбирали среди наиболее часто используемых вариантов, используемых в качестве описания биологических сосудов [11]:

а) линейная модель, аппроксимируемая модулем упругости, согласно уравнению Гука;

б) нелинейная модель Neo Hooke:

$$W_{NH} = C_{10}(I_1 - 3),$$

где I_1 – первый инвариант деформации, такой что $I_1 = \mathrm{tr}(C)$, где C – тензор деформации Коши–Грина, а C_{10} – механическая постоянная [12].

в) нелинейная модель Ogden:

$$W_{\mathrm{Ogden}} = \frac{2\mu}{\alpha^2}\left(\lambda_1^{\alpha} + \lambda_2^{\alpha} + \lambda_2^{\alpha} - 3\right),$$

где λ – отношения растяжения, α и μ – параметры материала [11].

г) полиномиальная модель второго порядка:

$$W_{\mathrm{poly}} = C_{10}(I_1 - 3) + C_{01}(I_2 - 3) + C_{20}(I_1 - 3)^2 + C_{11}(I_1 - 3)(I_2 - 3) + C_{30}(I_1 - 3)^3,$$

где I_1, I_2 и I_3 – инварианты деформации, а C_{10}, C_{01}, C_{20}, C_{11}, C_{30}, – гиперэластичные константы [12, 13].

Для полимерной компоненты выбирали аналогичные модели материала.

Дополнительно для определения оптимальных размеров и типов сетки конечных элементов при расчете проводили анализ чувствительности. Для этого формировали серию расчетов на одной из моделей неармированного сосудистого протеза, при которых варьировали:

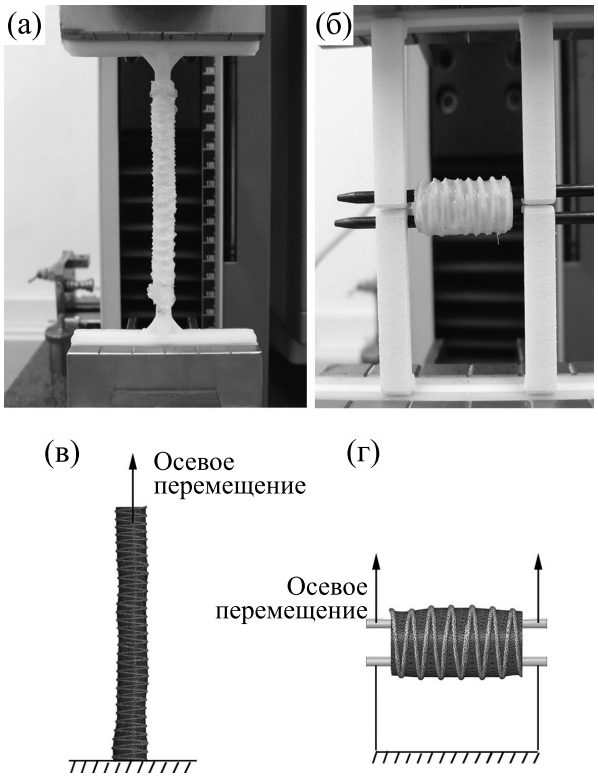


Рис. 2. Этапы исследования сосудистых протезов: (а) – физико-механическое одноосное исследование экспериментальных сосудов в продольном направлении; (б) – то же в радиальном направлении; (в) – численная версия исследования в продольном направлении; (г) – то же в радиальном направлении.

а) размер сетки конечных элементов, выраженный итоговым количеством элементов 860 тыс. – 9 тыс. элементов.

б) тип конечного элемента, различающийся точностью – трехмерные тетраэдры вида C3D4 и C3D4H с четырьмя точками интегрирования, а также C3D10 и C3D10H с десятью точками интегрирования.

Критерием удовлетворительности настроек сетки конечных элементов стало последовательное сравнение результатов приложения к моделям внутреннего давления 120 мм рт. ст. с последующим анализом различий максимального напряжения; максимальной деформации; радиального перемещения. В качестве референсных значений выбирали результаты расчетов с наиболее мелкой сеткой (860 тыс. элементов) и наиболее точным типом конечных элементов (C3D10H). После этого упрощали сетку и снижали точность элементов до тех пор, пока отклонение количественных результатов от референсных – не превышали 5%. Данный анализ призван снизить время расчета с приемлемым сохранением количественных результатов, поэтому критерием выбора настроек сетки конечных элементов стало время расчета, в зависимости от примененных настроек.

Верификация численных методов. Выбранные в результате калибровки численных методов и оптимальные настройки моделирования применяли для отдельного расчета на примере образца сосуда, армированного одинарной спиралью с шагом 2 мм, отличного от использованного при калибровке. Верификацию моделирования проводили путем сравнения расчетных результатов и результатов натурного одноосного теста в кривых «сила–перемещение».

Подбор параметров армирующего слоя. Одной из функциональных характеристик, на повышение которой рассчитано введение армирующей оболочки исследуемого сосудистого протеза, является поддержание просвета сосуда в случае перегиба на критические углы. Для подбора свойств упрочняющего слоя был выбран тест на изгиб до 90° с оценкой диаметра остаточного просвета в зависимости от характеристик армирования –

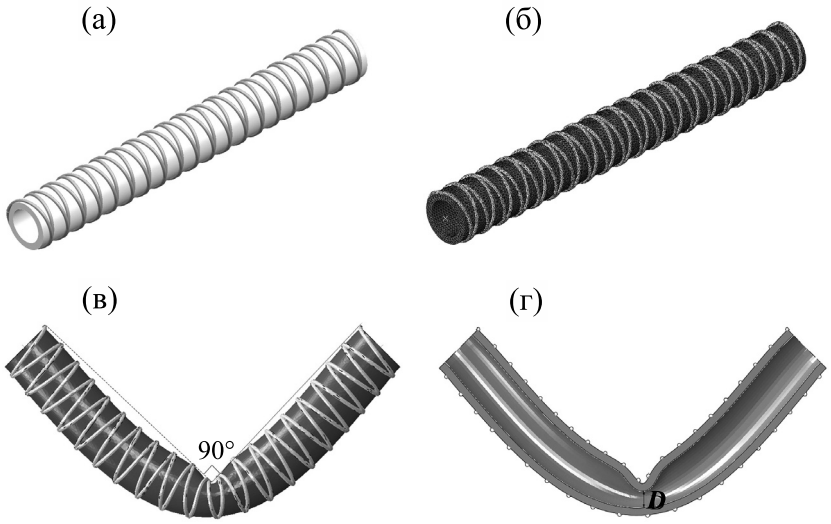


Рис. 3. Этапы подбора параметров армирующего слоя: (а) – трехмерная модель одного из вариантов (толщина 0.5 мм, шаг спирали 2 мм); (б) – сетка конечных элементов, построенная на основе трехмерной модели; (в) – финальное состояние модели сосудистого протеза после нагружения (изгиба до 90°); (г) – принцип определения диаметра остаточного просвета экспериментального сосуда после изгиба до 90° (продольный срез).

количества спиралей, толщины нити, шага спирали [14]. Для этого в системе NX 9.0 (Siemens, Германия) проектировали соответствующие трехмерные модели таким образом, чтобы получить комбинацию вариантов, включающую:

1) одну, две или четыре спирали;

2) толщину нити 0.1–0.3–0.5 мм;

3) шаг спирали 4–5–6 мм.

Полученные таким образом модели импортировали в ПО Abaqus/CAE, где на основе твердотельных объектов получали трехмерную сетку конечных элементов, состоящую из 316000–427000 тетраэдров второго порядка с 10 точками интегрирования (тип C3D10). Приложение изгибающей нагрузки осуществляли с использованием референсных точек, управляющих концевыми участками модели протеза.

К каждой такой точке прикладывали граничное условие на перемещение (26.5 мм) и на вращение (1.57 радиана) таким образом, чтобы осуществить одновременно сближение и изгиб проксимального и дистального участков на необходимый угол – 90° (рис. 3в). При этом для наиболее физиологического воспроизведения условий функционирования сосуда на всем протяжении исследования на его внутреннюю поверхность оказывало влияние давление в 120 мм рт. ст. В работе оценивали в качестве основного параметра минимальный остаточный просвет армированного сосудистого протеза при изгибе на референсный угол 90°. Дополнительно оценивали напряженно-деформированное состояние: количественные значения напряжения по Мизесу и логарифмической деформации, а также качественное их распределение на эпюрах для визуализации областей высоких значений данных показателей с позиции оценки риска разрушения участков сосудистого протеза.

Учитывая радиальную асимметрию наложения армирующего слоя – прежде всего, образования сплавлений спиралей для вариантов двух и четырех спиралей, – предполагается, что при изгибе по разным осям (оси *1*, *2* или *3* на рис. 4) свойства армирования будут различаться. В связи с чем, каждую модель сосудистого протеза с армированием тестировали для нескольких направлений, для учета такой геометрической анизотропии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение физико-механических свойств. Результаты одноосного тестирования при попарном сравнении экспериментальных образцов с армированием и без такового продемонстрировали значительное изменение механических свойств для случая поперечного и радиального растяжений. Важно отметить, что при сравнении двух вариантов нагружения исходного (без усиления) протеза модули упругости были различны для обоих вариантов нагрузок: 1.67 для продольного направления против 0.80 МПа для радиального направления. Это обусловлено анизотропией материала за счет слоистой структуры сосудистой стенки. Введение в состав конструкции спиралевидных элементов несколько нивелирует анизотропию изделия в целом: сосудистый протез с упрочнением повысил свою жесткость в 1.44 раза при продольной нагрузке и в 2.9 раза при поперечной (табл. 1).

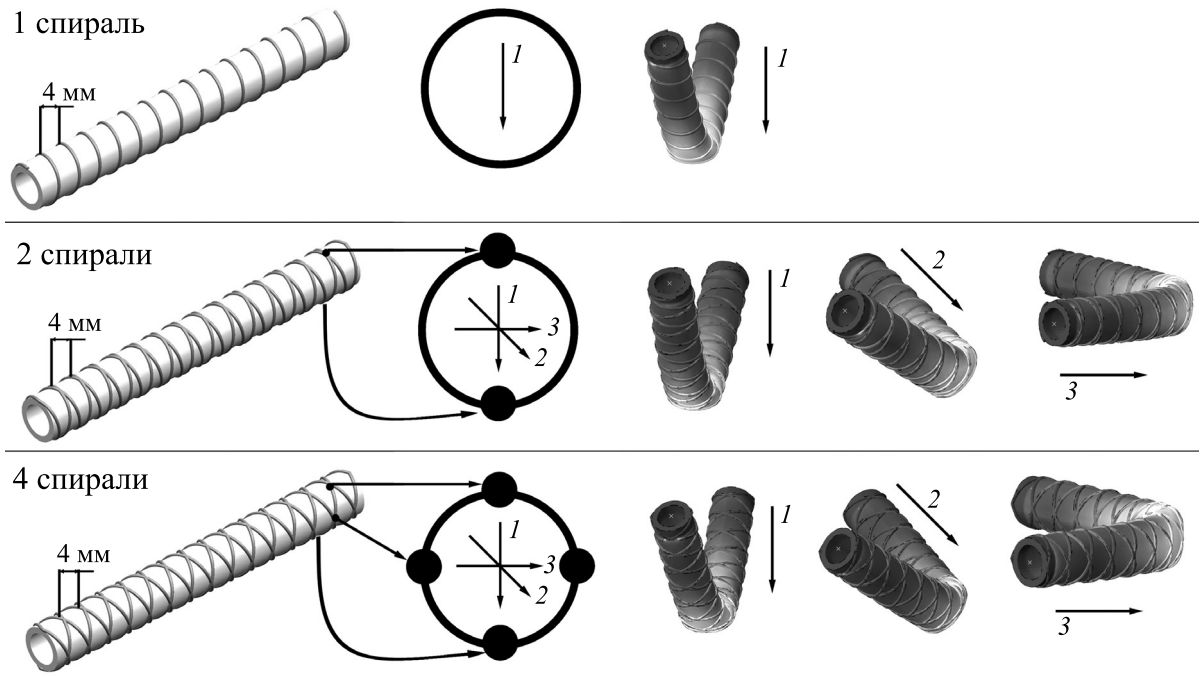


Рис. 4. Особенности тестирования сосудистых протезов с учетом геометрической анизотропии нанесения армирующих спиралей, слева-направо: исходная трехмерная модель, визуализирующая сохранение шага (на примере 4 мм); схематичная визуализация образования точек сплавления для случаев одной, двух и четырех спиралей армирования с пояснением направления нагрузки изгиба; пример нагруженных состояний в зависимости от направления изгиба.

При этом статистический анализ показал достоверное ($p < 0.05$) различие свойств только для неармированного варианта сосудистых протезов.

Калибровка численных методов. В ходе этапа калибровки при сравнении результатов натурных физико-механических испытаний и расчетных данных было показано, что ряд моделей материалов для описания биологической компоненты не позволяет воспроизвести экспериментальные данные – это линейная модель, модели Neo Hooke и Ogden (рис. 5а,б). При этом отмечено значительное несоответствие результатов для двух моделей – линейной и Neo Hooke, принципиально не воспроизводящих характер кривой

Таблица 1. Упруго-деформативные характеристики исследуемых образцов

Объект	Модуль упругости, МПа	Предел прочности, МПа	Предел прочности, %
Без армирования (продольная нагрузка)	1.37*,† (0.90, 1.12, 1.44, 1.72)	1.61† (1.35, 1.56, 1.85, 2.05)	87† (65, 77, 91, 101)
Без армирования (поперечная нагрузка)	0.80*,‡ (0.57, 0.75, 0.96, 1.44)	1.5‡ (1.3, 1.4, 1.7, 2.1)	85† (72, 80, 99, 120)
Армирование поливинилиденфторидом (продольная нагрузка)	1.92† (1.15, 1.24, 2.14, 2.60)	4.36† (3.44, 4.12, 4.53, 5.73)	97‡ (84, 91, 103, 115)
Армирование поливинилиденфторидом (поперечная нагрузка)	1.45‡ (1.23, 1.34, 1.76, 2.60)	2.46‡ (1.78, 2.24, 2.79, 3.41)	141‡ (97, 121, 159, 164)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (минимум, 25-я процентиль, 75-я процентиль, максимум); *, †, ‡ – достоверно значимые различия с уровнем значимости $p < 0.05$.

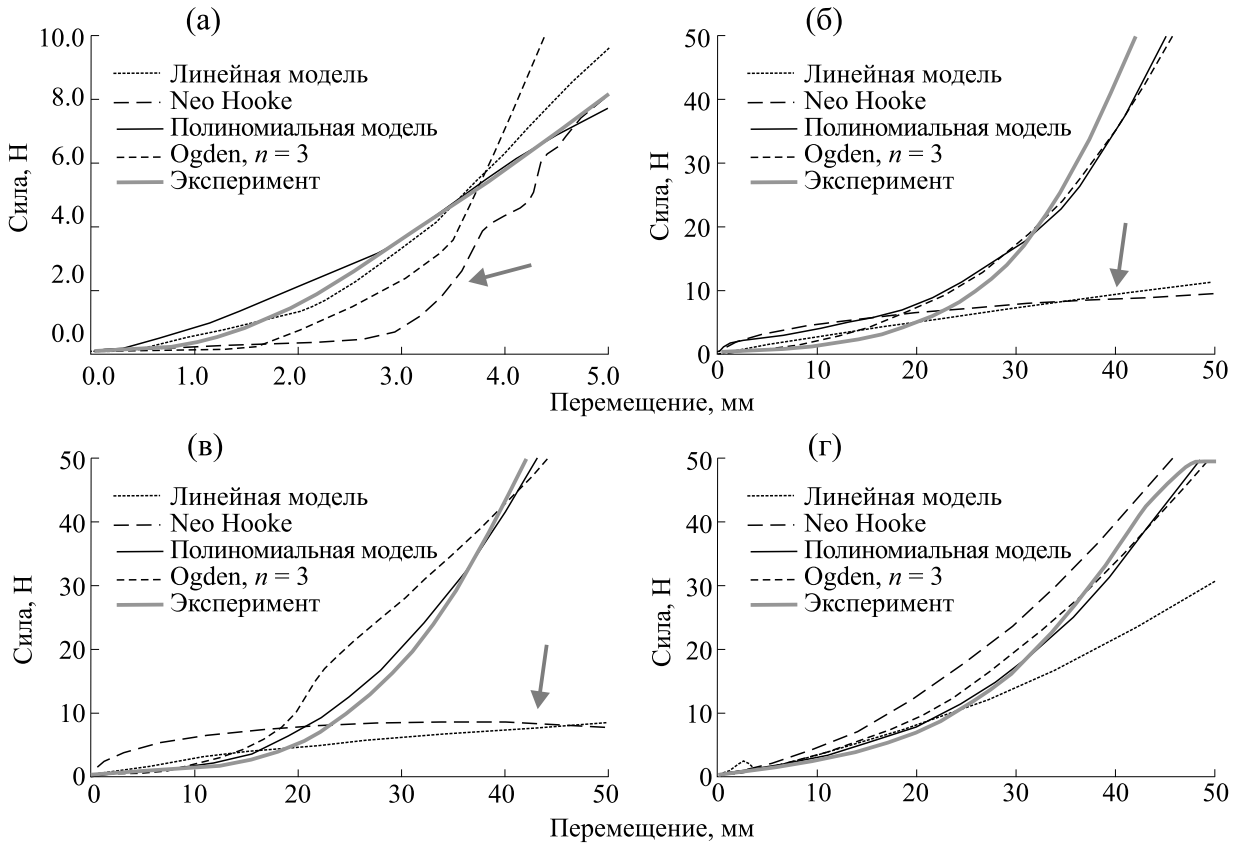


Рис. 5. Калибровка модели материала, используемой для расчета на основе экспериментальных данных: (а) – выбор модели материала для биологической компоненты в случае растяжения в радиальном направлении; (б) – то же, при продольном растяжении; (в) – определение модели материала всего протеза в сборе, с учетом полимерной компоненты; (г) – то же, в продольном направлении.

для продольного растяжения (рис. 5б). Таким образом, на первом этапе – подборе свойств биологической компоненты – наилучшие показатели сходимости продемонстрировала полиномиальная модель. Последующее включение в расчетную модель полимерного армирующего элемента также продемонстрировало неприемлемость двух вариантов – линейной модели и Neo Hooke, в особенности при численном расчете деформации в окружном направлении (рис. 5в). Моделирование продольного растяжения протеза в сборе в значительной мере совпадало с натурным экспериментом также для модели полиномиальной модели (табл. 2).

Анализ чувствительности (рис. 6) продемонстрировал, что упрощение расчетной модели негативно сказывается на точности результатов. Сравнение с референсной – самой плотной сеткой конечных элементов (860 тыс. элементов) – показало, что возможно снижение размерности не более чем в два раза (до 430 тыс. элементов), не вызывая значимых отклонений количественных результатов. Дальнейшее упрощение существенно искажает результат моделирования. Аналогич-

Таблица 2. Характеристики исследуемых при численном моделировании материалов

Объект	C10, МПа	C01, МПа	C20, МПа	C11, МПа	C02, МПа	D1, мм/мм	D2, мм/мм
Сосудистый протез	–0.015	0.015	7.1	–10.11	4.4	0.01	0.01
Полимерная спираль	–0.035	0.035	13.2	–19.61	7.8	0.01	0.01

Примечание. Представлены феноменологические коэффициенты моделей материала, применимые в Abaqus/CAE – изотропной полиномиальной модели второго порядка, согласно представлению в разделе «Материалы и методы» [12, 13].

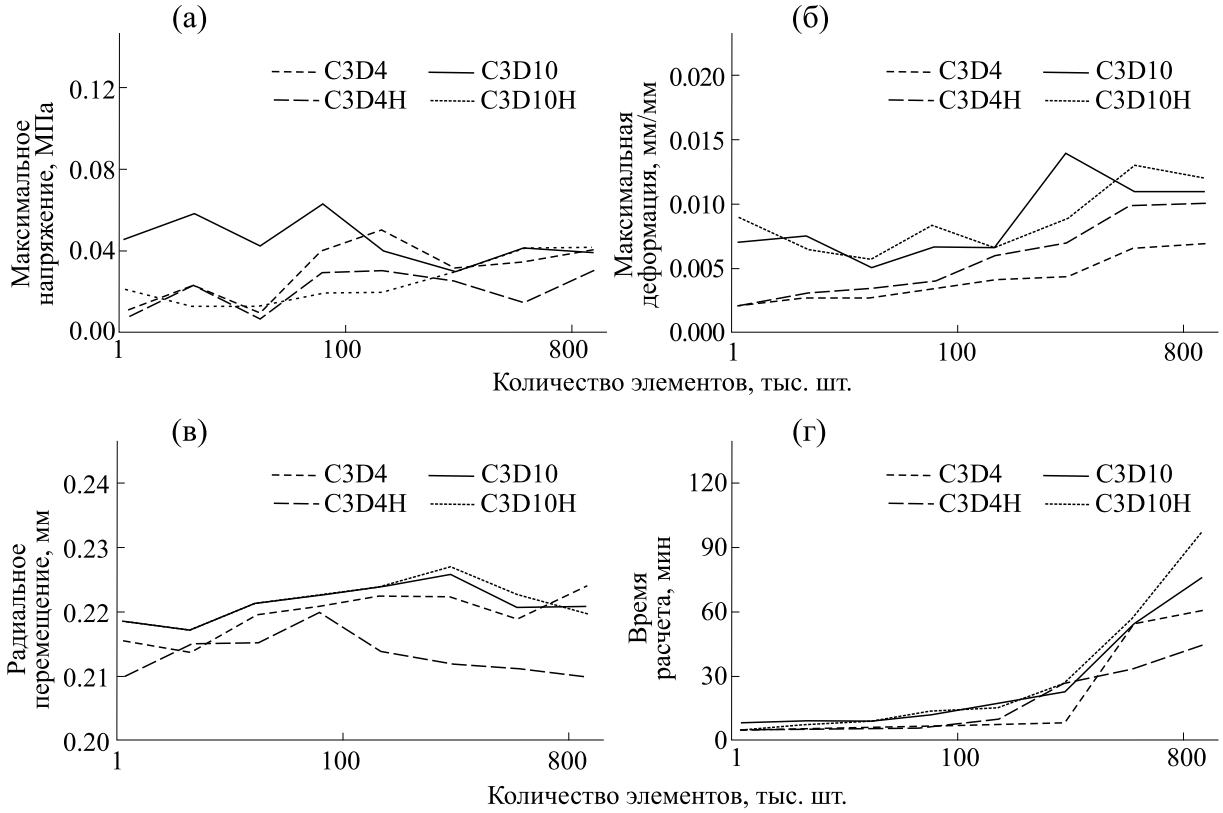


Рис. 6. Результаты анализа чувствительности моделирования в зависимости от настроек: (а) – зависимость максимального напряжения от количества и типа конечных элементов при расчете; (б) – зависимость максимального значения деформации от количества и типа конечных элементов при расчете; (в) – зависимость радиального перемещения от количества и типа конечных элементов; (г) – время расчета моделирования в зависимости от количества и типа конечных элементов.

ные результаты были получены при варьировании типа конечных элементов: только тип C3D10 – трехмерные тетраэдры с 10 точками интегрирования – позволил обеспечить приемлемый уровень точности по сравнению с референсом (гибридными элементами C3D10H). Совокупность внесенных изменений настроек моделирования позволила снизить расчетное время с 96 до 53 мин для данной упрощенной постановки – приложения внутреннего давления, однако с сохранением точности.

Верификация численных методов. В целом результаты численного верификационного расчета сходятся с экспериментальными данными, однако в зоне больших деформаций – в правой части кривой «сила–перемещение» – наступает расхождение показателей (рис. 7). Расчетная модель в случае окружного и продольного перемещений завышает значение силы на 26 и 2.6% соответственно.

Подбор параметров армирующего слоя. *Количество спиралей.* Ожидаемо при численном анализе с ростом количества спиралей до четырех происходит рост диаметра остаточного просвета сосуда, однако его характер не линеен: показано, что наибольший скачок показателя происходит при переходе от одной к двум спиралям, при добавлении еще пары спиралей остаточный просвет увеличивается, но не столь значительно. Так, диаметр просвета вырос на 11–32% для перехода «1–2» спирали в исследуемых моделях. В случаях перехода «2–4» спирали рост диаметра остаточного просвета составил 21.5–44.3%.

Шаг спирали. Была получена линейная обратно пропорциональная зависимость остаточного просвета от шага спирали, сохраняющаяся для всех вариантов армирования – рост шага спирали приводил к падению диаметра просвета (рис. 8).

Толщина нити. Влияние толщины нити армирующего слоя спирали на диаметр остаточного просвета также было в достаточной мере прогнозируемо – наблюдали прямо пропорциональную зависимость силы сжатия (рис. 8).

Направление изгиба. Исследования силы сжатия для различных направлений (*1*, *2*, *3*) подтвердило предположение об анизотропии свойств армирующей спирали. При этом наибольшую разницу между всеми тремя направлениями изгиба продемон-

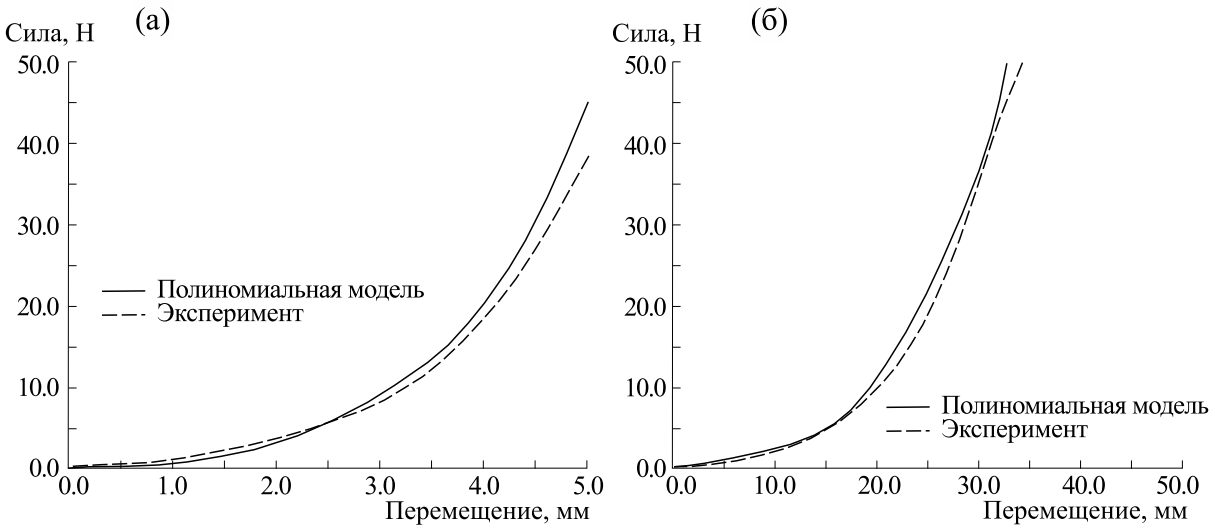


Рис. 7. Результаты верификации подобранной модели материала и настроек расчета в сравнении с экспериментальными данными для двух случаев нагрузки: (а) – в радиальном и (б) – в продольном направлениях.

стрировали варианты армирования с двумя спиралями: вариативность показателя силы составила до 68% (между направлением *1* и *3*). Для варианта с четырьмя спиралями направления *1* и *3* значимо не различались (до 11%), а направление *2*, напротив, продемонстрировало снижение силы относительно направления *1* на 16%.

Напряженно-деформированное состояние. Анализ количественных показателей напряженно-деформированного состояния – напряжения по Мизесу и логарифмической деформации – не выявил наличия в моделях областей, для которых были превышены значения предела прочности как по напряжению, так и по деформации. Максимум данных показателей наблюдали для случаев с одной спиралью, при которых образовывался «излом» центральной части протеза, в особенности при большом шаге спирали. Так, для случая одной спирали с толщиной нити 0.5 мм и шагом спирали 6 мм значение напряжения биоматериала составило 0.96 МПа, деформации – 0.66. Для аналогичного случая, но с использованием четырех спиралей, в биоматериале наблюдали максимальные значения 0.575 МПа и 0.24 соответственно.

Контроль. Анализ результатов расчета остаточного просвета неармированной модели сосудистого протеза продемонстрировал наименьшее среди всех вариантов значение диаметра остаточного просвета – 0.46 мм.

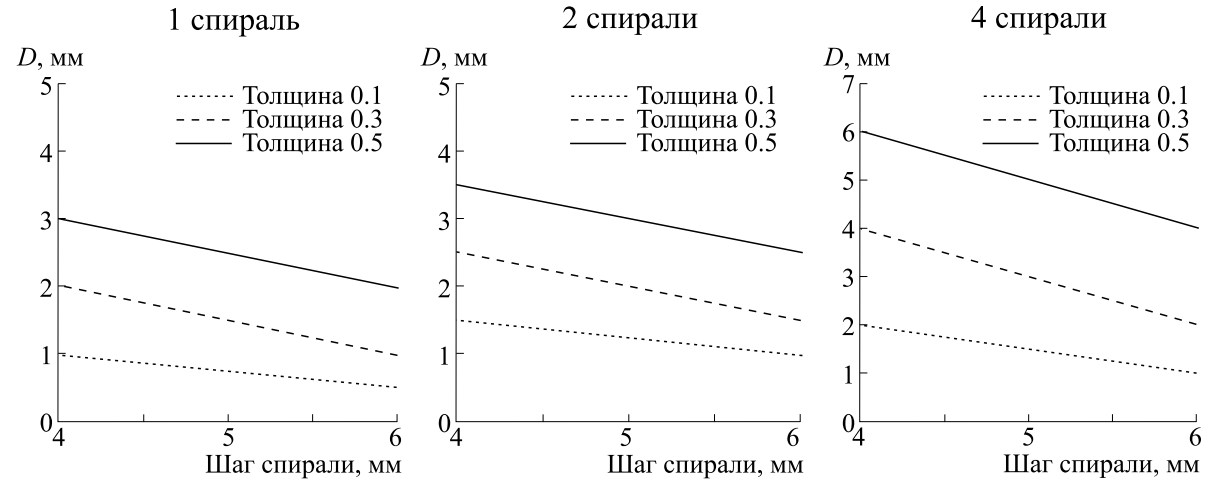


Рис. 8. Зависимости диаметра остаточного просвета (*D*, мм) от основных параметров армирующей спирали, сгруппированные по количеству нитей – от одной до четырех, при сравнении изгиба по направлению 1.

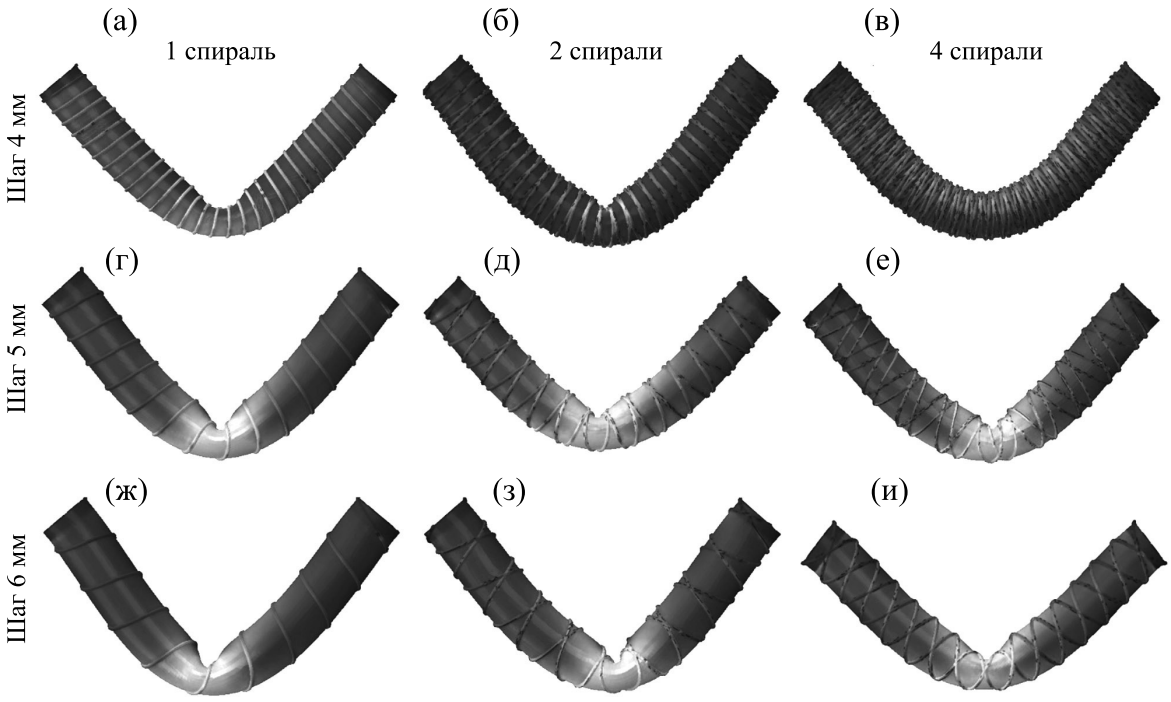


Рис. 9. Эпюры напряжения в исследуемых образцах и визуализация остаточного просвета сосудистого протеза на примере нити 0,5 мм: (а), (г), (ж) – односпиральное армирование с шагом 4, 5 и 6 мм соответственно; (б), (д), (з) – то же, с двумя спиралями армирования; (в), (е), (и) – то же, с четырьмя спиралями.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение физико-механических свойств. Исследование биологических протезов подтвердило анизотропию материала изделия для начального состояния без усиления. Исходная жесткость «живой» сосудистой стенки артерий в значительной мере обусловлена свойствами медии и адвентиции – мышечный слой, расположенный циркулярно, обеспечивает ограничение подвижности (т.е. ограничение диаметра) в радиальном направлении; соединительно-тканный слой – в продольном [15]. При консервации биологического сосудистого протеза диглицидиловым эфиром этилен гликоля или глутаровым альдегидом, мышечные клетки медии погибают и не могут поддерживать достаточную радиальную жесткость, так как этот процесс является активным и требует поддержания тонуса гладкой мускулатуры. При этом коллагеновые и эластиновые волокна адвентиции являются пассивными структурами и после консервации в значительной мере сохраняют свои упруго-эластические свойства. Таким образом, происходит значимое снижение жесткости радиального направления и сохранение жесткости продольного (модуль упругости 0.8 МПа против 1.37 МПа соответственно). Предположительно, данный механизм и приводит к наблюдаемым в клинике осложнениям – выбуханию сосудистой стенки и образованию аневризм за счет структурной дегенерации [16, 17]. Введение армирующего слоя позволяет повысить радиальную жесткость, при этом геометрия армирования в виде спирали(ей) позволяет контролируемо влиять раздельно на радиальную составляющую и продольную за счет плотности намотки, толщины нитей и количества спиралей.

Калибровка и верификация численных методов. В целом показано, что калибровка и подбор модели материала могут быть достаточно эффективны даже для сложных конструкций, содержащих разнородные объекты – биологического и синтетического происхождения. Полученные в данной работе модели могут быть использованы для проведения дальнейших тестов и численных расчетов. Описанные в литературе аналогичные исследования изгиба стент-графтов дополнительно подтверждают состоятельность метода [18, 19]. Однако биологическая компонента конструкции сосудистого протеза в значительной мере усложняет численный анализ за счет нелинейности своей физико-механической характеристики, выраженной необходимостью использовать полиномиальные модели материала (табл. 2). Тем не менее в работе показано, что при использовании корректных моделей материала и высокодетализированных реконструкций протеза на основе микротомографических методов исследования

возможно добиться высокой сходимости натурных и компьютерных экспериментов.

Подбор параметров армирующего слоя. Исследования параметров армирования сосудистого протеза позволили выявить основные закономерности для выбора свойств упрочняющего слоя – зависимости от толщины нити, шага и общей его плотности. Немаловажным оказалось раскрытие нелинейности при наборе количества спиралей – прирост диаметра остаточного просвета для перехода «1–2» спирали оказался ниже, чем для перехода «2–4» спирали (рис. 9в,е,и). Предположительно, данный эффект обусловлен созданием устойчивой геометрии армирующего слоя за счет сплавлений, которые ограничивают движения спиралей как относительно друг друга, так и для биологической части сосуда в продольном направлении, чего нельзя ожидать в случае односпирального варианта. Введение в армирующий слой дополнительных двух спиралей значимо не влияет на описанную подвижность, однако снижает влияние направления изгиба на диаметр остаточного просвета, что, по-видимому, является дополнительным преимуществом варианта из четырех спиралей.

Два других параметра – толщина спирали и ее шаг – оказали значимое влияние на итоговую конфигурацию и механических отклик армированного сосудистого протеза. В связи с этим общая рекомендация для подбора параметров армирования – значимые толщины (0.3–0.5 мм) и плотность (4 мм) намотки – способны поддерживать достаточный уровень проходного отверстия даже при перегибе на критический угол.

Сравнение диаметра остаточного просвета при перегибе с контролем, в качестве которого выступила модель сосуда без армирования, продемонстрировало преимущества нанесения полимера, даже в случае односпирального варианта с минимальной плотностью. Так, остаточный просвет для контроля составил 0.46 мм (7.6% от исходного), а для наихудшего случая армирования – 0.52 мм (8.7%); для наиболее плотного нанесения спиралей – 4 спирали с толщиной нити 0.5 мм и шагом 4 мм – просвет составил 5.1 мм (85%). Таким образом, возможно рекомендовать создание армирующего слоя, в том числе «минимальной» конфигурации, в задачах поддержания просвета сосудистого протеза при перегибе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование армирующего слоя позволяет снизить эффект перекрытия сосуда при критических перегибах, что важно для инфраингвинальных реконструкций. Описанный эффект особенно наглядно проявляется при сравнении с неармированным сосудистым протезом, для которого характерно минимальное сохранение остаточного диаметра. Кроме того, изменение радиальной жесткости сосудистого протеза за счет нанесения армирующего слоя способно привести к профилактированию аневризм сосудистой стенки в отдаленном периоде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Haghighat, S. E. Altin, R. R. Attaran, et al., J. Clin. Med. **7** (4), E82 (2018).
2. A. Farber and R. T. Eberhardt, JAMA Surgery **151** (11), 1070 (2016).
3. Б. С. Суковатых, Л. Н. Беликов, О. А. Родионов и др., Вестн. Нац. медико-хирургич. Центра им. Н.И. Пирогова **12** (1), 32 (2017).
4. Б. С. Суковатых, Л. Н. Беликов, М. Б. Суковатых и Д. В. Сидоров, Анналы хирургии **21** (5), 312 (2016).
5. Л. С. Барбараш, Н. Н. Бурков, Ю. А. Кудрявцева и др., Ангиология и сосудистая хирургия **18** (2), 21 (2012).
6. C. Singh and X. Wang, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. **48**, 125 (2015).
7. M. S. El-Kurdi, Y. Hong, J. J. Stankus, et al., Biomaterials **29** (22), 3213 (2008).
8. S. M. Giannitelli, D. Accoto, M. Trombetta, and A. Rainer, Acta Biomater. **10** (2), 580 (2014).
9. H. V. Raeisdasteh, S. Davaran, A. Ramazani, and R. Salehi, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. **28** (16), 1797 (2017).
10. M. L. Neal and R. Kerckhoffs, Brief. Bioinformatics **11** (1), 111 (2010).
11. S. Misra, K. T. Ramesh, and A. M. Okamura, Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin. **13** (6), 811 (2010). DOI: 10.1080/10255840903505121

12. C. Noble, K. D. Carlson, E. Neumann, et al., J. Mech. Behav. Biomed. Mater. **101**, 103453 (2020). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2019.103453
13. C. Lally, F. Dolan, and P. J. Prendergast, J Biomech. **38** (8), 1574 (2005). DOI: 10.1016/j.jbiomech.2004.07.022
14. С. Г. Стучебров, А. В. Батранин, И. А. Милойчикова и др., Вестн. Нац. исслед. ядерного университета МИФИ **6** (1), 31 (2017).
15. N. Demanget, S. Avril, P. Badel, et al., J. Mech. Behav. Biomed. Mater. **5** (1), 272 (2012).
16. К. Жункейра и Ж. Л. Карнейро, *Гистология: атлас: учебное пособие* (ГЭОТАР-Медиа, М., 2009).
17. Л. С. Барбараш, С. В. Иванов, И. Ю. Журавлева и др., Ангиология и сосудистая хирургия **12** (3), 91 (2006).
18. Н. Н. Бурков и И. Ю. Журавлева, Медицина и образование в Сибири, № 4, 65 (2013).
19. N. Demanget, P. Latil, L. Orgéas, et al., Ann. Biomed. Eng. **40** (12), 2674 (2012).

Experimental Study of the Reinforcing Element of a Vascular Prosthesis Fabricated Using Internal Thoracic Artery of Big Cattle

K.U. Klyshnikov*, M.A. Rezvova*, E.A. Ovcharenko*, T.V. Glushkova*, A.V. Batranin, D.V. Nyshtaev***, Yu.N. Zakharov****, *****, V.G. Borisov****, Yu.A. Kudryavtseva*, and L.S. Barbarash***

**Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Sosnovy bulvar 6, Kemerovo, 650002 Russia*

***Tomsk Polytechnic University, prosp. Lenina 30, Tomsk, 634050 Russia*

****CJSC «Severstal Management», ul. Clary Zetkin 2, Moscow, 127299 Russia*

*****Kemerovo State University, ul. Krasnaya 6, Kemerovo, 650000 Russia*

******Kemerovo Branch of the Institute of Computational Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Rukavishnikova 21, Kemerovo, 650025 Russia*

The goal of this study was to assess a patency rate for a reinforced vascular bioprosthesis with xenogenic cells KemAngioProsthesis (JSC "NeoCor", Kemerovo) in case of its mechanical deformation. The complex of natural and numerical methods used in the work made it possible to determine the mechanical properties of the objects under study. In the work, we used the parameters of the pitch of the helix, 4 mm, and the thickness of the thread, 0.3–0.5 mm. It is shown that the material properties of the vascular wall are anisotropic as compared to the longitudinal and transverse directions under loading. Thus, the elastic moduli were 1.37 (0.90, 1.12, 1.44, 1.72) MPa versus 0.80 (0.97, 1.23, 1.61, 2.15) MPa, respectively; and the statistical analysis showed significant differences of these moduli among layers ($p < 0.05$). With the finite element method used to select parameters for the reinforcing lining it was found that the patency rate for a vascular prosthesis depends nonlinearly on the number of spirals used. It is shown that the external polymeric reinforcing lining in case of its mechanical deformation can offer satisfying patency rates and outcomes, what is typical of infra-inguinal reconstructions, especially when compared to the original non-reinforced product. Additionally, the introduction of reinforcement increases the radial stiffness of the prosthesis, which, potentially, can lead to a decrease in the risk of vascular wall aneurysms in the long term.

Keywords: numerical modeling, vascular bioprosthesis, reinforcing element, patency rate

БИОФИЗИКА, 2021, том 66, № 4, с. 823–832

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

УСТОЙЧИВОСТЬ РЕКУРРЕНТНЫХ СВОЙСТВ ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОЗЕРНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

© 2021 г. А.В. Русаков*, Б.В. Адамович, Т.В. Жукова**, Р.З. Ковалевская**, А.Б. Медвинский*, Т.М. Михеева**, Н.И. Нуриева*, Н.П. Радчикова***, ******

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

***Белорусский государственный университет, 220030, Минск, пр. Независимости, 4, Республика Беларусь*

****Московский педагогический государственный университет, 119991, Москва, ул. Малая Пироговская, 1/1*

*****Московский государственный психолого-педагогический университет, 127006, Москва, ул. Сретенка, 29*

E-mail: rusakov_a@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.03.2021 г.
После доработки 20.04.2021 г.
Принята к публикации 21.04.2021 г.

Представлен анализ многолетней динамики гидроэкологических характеристик системы Нарочанских озер (Беларусь) за период с 1979 по 2018 гг. За этот период произошло резкое изменение антропогенной нагрузки на водосбор Нарочанской экосистемы, связанный с проведением мероприятий по ее экологическому оздоровлению, а также инвазия моллюска *Dreissena polymorpha* Pallas. Показано, что изменение внешней нагрузки на озерную экосистему привело к существенным изменениям в амплитуде колебаний концентраций гидроэкологических характеристик, тогда как предсказуемость таких колебаний изменилась незначительно.

Ключевые слова: многолетняя динамика, биогенная нагрузка, численный рекуррентный анализ, озерные экологические системы.

DOI: 10.31857/S0006302921040220

Оценка влияния антропогенной нагрузки на функционирование озерных экологических систем – востребованная, но сложная комплексная задача. Основная сложность при решении такой задачи заключается в невозможности напрямую измерить факторы, относящиеся к антропогенному воздействию, а, следовательно, необходимо отделить изменения в поведении экосистемы, вызванные естественной вариативностью природных факторов, от изменений, вызванных изменением антропогенного давления на исследуемую систему. Для решения такой задачи необходимо наличие большого числа полевых наблюдений как за динамикой гидробионтов, так и за динамикой гидрохимических и гидрологических характеристик исследуемой экосистемы, с последующим их анализом как линейными, так и нелинейными методами. К таким данным предъявляется ряд требований, а именно: длительность и непрерывность наблюдений, единообразие методов измерения на протяжении всего времени измерений, регулярность и синхронность наблюдений. Таким требованиям удовлетворяют данные, полученные в результате многолетних непрерывных наблюдений за динамикой гидроэкологических характеристик системы Нарочанских озер (Республика Беларусь). В результате многолетних мониторинговых наблюдений был выделен ряд внешних факторов, существенно определивших этапы эволюции экосистем Нарочанских озер и их современное состояние [1, 2]. Было показано, что интенсивная биогенная нагрузка в виде активного сельскохозяйственного производства в районе водосбора озерной экосистемы привела к прогрессирующему эвтрофированию водоемов к концу 1980-х годов. С конца 1980-х годов начала проводиться программа экологического оздоровления Нарочанских озер, включающая перепрофилирование сельхозугодий (замена более 2000 га пахотных земель пастбищами и сенокосами), залесение 683 га водоохранной зоны, вынос за пределы водосбора девяти животноводческих ферм и благоустройство восьми оставшихся ферм, организацию обводного коллектора для сбора, последующей очистки и сброса за пределы водосбора сточных вод Нарочанской курортной зоны [3]. Благодаря целенаправленному снижению биогенной нагрузки, существенно снизи-

Таблица 1. Основные характеристики исследуемых озер [2]

Показатели	оз. Баторино	оз. Мястро	оз. Нарочь
Площадь водного зеркала, км2	6.3	13.1	79.6
Объем водной массы, млн м3	18.7	70.1	710.0
Глубина (средняя/максимальная), м	2.4/5.5	5.4/11.3	8.9/24.8
Время водообмена, лет	1.0	2.5	10–11

лись концентрации азота и фосфора и повысилась прозрачность воды [1, 2, 4]. Еще одним фактором, существенно повлиявшим на функционирование Нарочанской системы озер, явилось вселение в конце 1980-х годов в озера мощнейшего фильтратора – моллюска *Dreissena polymorpha* Pallas [1, 5]. Оба этих фактора привели к бентификации экосистемы, т. е. смещению процессов трансформации вещества из толщи воды в придонный слой [1, 2]. Процессы эвтрофирования, как и противоположно направленные процессы деэвтрофирования или олиготрофизации, а также протекающие в Нарочанских озерах процессы бентификации оказали влияние на все звенья трофической цепи и все основные гидроэкологические параметры. На фоне таких существенных изменений функционирования озерной экосистемы оценка изменения ее динамики, в том числе предсказуемости, за периоды разной антропогенной нагрузки может дать дополнительную информацию для оценки влияния на экологические системы как интенсивной сельскохозяйственной деятельности, так и мероприятий по экологическому оздоровлению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Озера Баторино, Мястро и Нарочь, послужившие полигоном исследований, расположены на северо-западе Беларуси, принадлежат бассейну р. Неман и представляют собой систему из трех полимиктических водоемов, имеющих общую водосборную территорию и соединенных между собой протоками [6]. Трофность озер снижается в ряду Баторино – Мястро – Нарочь [7]. Основные характеристики озер Нарочанской экосистемы представлены в табл. 1.

Мониторинговые исследования проводили в глубоководной зоне озер на станциях и горизонтах постоянных наблюдений с частотой один-три раза в месяц во время вегетационного сезона. В зависимости от погодных условий первый отбор проводили в апреле или мае, последний – в ноябре. Пробы воды отбирали при помощи двухлитрового батометра Рутнера на шести горизонтах водного столба (0.5, 3, 6, 8, 12 и 16 м) в оз. Нарочь (54°53′18′′N, 26°43′20′′E), четырех горизонтах (0.5, 4, 7 и 9 м) в оз. Мястро (54°52′02′′N, 26°52′83′′E) и трех горизонтах (0.5, 3 и 5 м) в оз. Баторино (54°50′80′′N, 26°80′06′′E). При мониторинговых наблюдениях воду со всех горизонтов смешивали для получения интегральной пробы, отражающей средний состав озерной воды (объем воды каждого горизонта в интегральной пробе был пропорционален доле, которую составляет данный слой в общем объеме озера в соответствии с данными батиметрии).

Методики анализа гидроэкологических показателей (содержание общего углерода, общего азота, общего фосфора, хлорофилла, сестона, биомасса фитопланктон) были подробно описаны в наших предыдущих работах [2, 9].

В рамках численного рекуррентного анализа повторяемость состояния исследуемой динамической системы может быть представлена в виде рекуррентной матрицы

$$R_{ij}(\varepsilon) = H(\varepsilon - \|\mathbf{X}(i) - \mathbf{X}(j)\|);\ i, j = 1, ..., N, \qquad (1)$$

где $\mathbf{X}(k)$, $k = i, j$ – вектор, описывающий состояние исследуемой системы; N – число измерений состояния этой системы; ε – малый параметр (некоторые правила выбора численного значения параметра ε представлены в работе [8]); H – функция Хевисайда: $H(x) = 0$, если $x < 0$, в противном случае $H(x) = 1$, $\|.\|$ – норма. Матрица (1) используется для визуализации рекуррентности в виде рекуррентных диаграмм. Рекуррентные диаграммы представляют собой набор точек в системе координат i и j, причем черные точки соответствуют координатам (i, j), для которых $R_{ij} = 1$, а белые точки соответствуют координатам (i, j), для которых $R_{ij} = 0$. Такие рекуррентные диаграммы симметричны относительно диагональной линии $R_{ii} = 1$.

Очевидно, что разные динамические процессы будут отображаться разными структурами на рекуррентной диаграмме. Так, рекуррентная диаграмма периодических осцилляций представляет собой набор диагональных линий, параллельных основной диагонали $R_{ii} = 1$. Расстояния между этими линиями (как по горизонтали, так и по вертикали) равны периоду колебаний. Хаотическая динамика отображается апериодическими

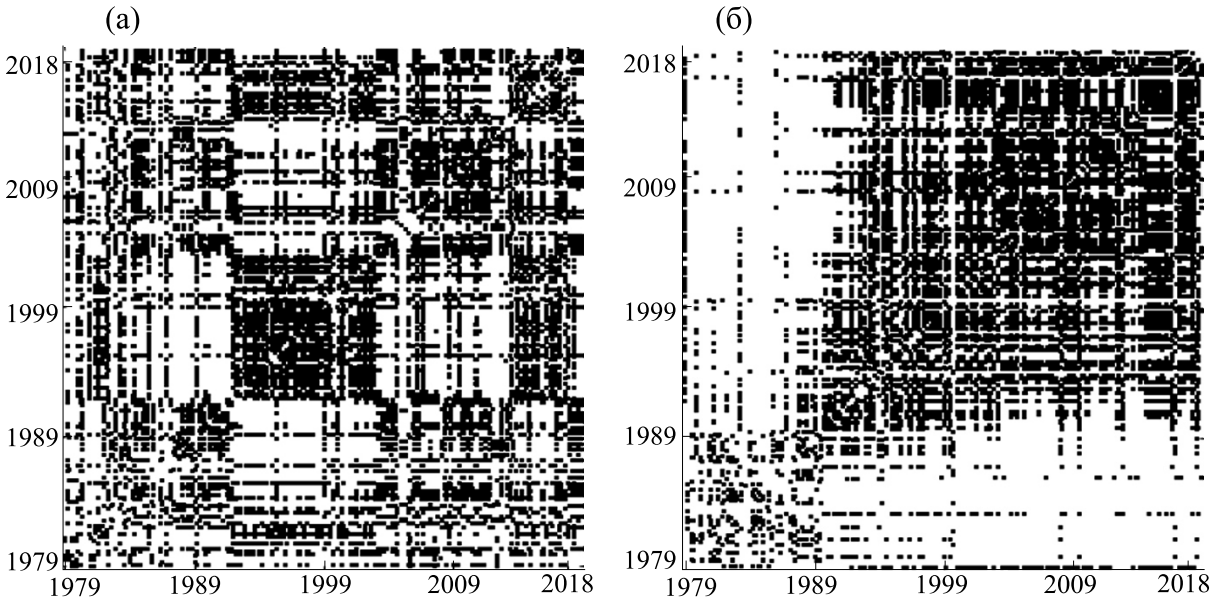


Рис. 1. Рекуррентные диаграммы концентраций биогенных элементов в озере Баторино за весь период наблюдения: (а) – концентрация общего азота, (б) – концентрация общего фосфора.

структурами, короткими диагональными линиями, которые повторяются не регулярно. Таким образом, внешний вид рекуррентной диаграммы позволяет оценить динамику исследуемых процессов, наличие и влияние шума, а также наличие резких изменений состояния системы.

На рис. 1 представлены рекуррентные диаграммы изменения концентраций общего азота (рис. 1а) и общего фосфора (рис. 1б) в озере Баторино за весь период наблюдения. Можно видеть, что распределение точек на диаграмме существенно неравномерное. Для общего азота области с высокой плотностью рекуррентных точек соседствуют с разряженными участками, что говорит об изменении характера динамики на этих участках (сравни рис. 1а и 2а). Для общего фосфора в течение 1990-х годов произошло резкое изменение состояния системы. Это связано с уменьшением биогенной нагрузки на систему Нарочанских озер в результате мероприятий по экологическому оздоровлению, а также с вселением моллюска *Dreissena* [1, 3]. На рекуррентной диаграмме хорошо виден этот переход (рис. 2б). Область с низкой плотностью рекуррентных то-

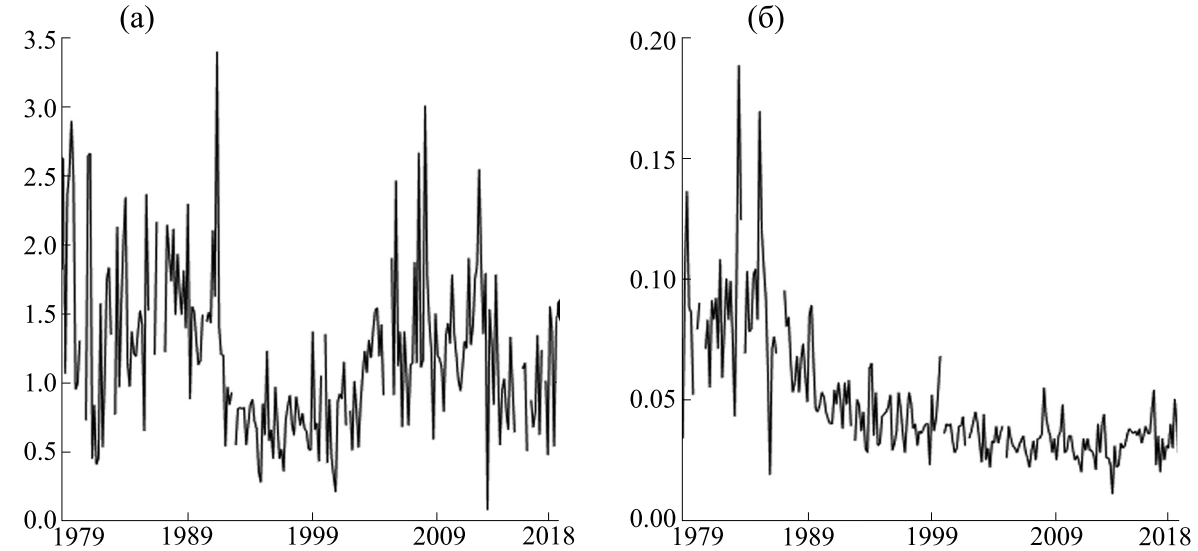


Рис. 2. Концентрация общего азота в мг/л (а) и общего фосфора в мг/л (б) в озере Баторино.

чек переходит в область с высокой плотностью (вдоль главной диагонали $R_{ii} = 1$) в районе 1990 г.

Подробное рассмотрение рекуррентных диаграмм позволяет выявить мелкомасштабные структуры, состоящие из точек, вертикальных, горизонтальных и диагональных отрезков. Отдельные точки характеризуют случайные события или сильные флуктуации, вертикальные и горизонтальные отрезки – ламинарность процесса, диагональные отрезки – повторяемость динамики временного ряда в течение некоторого времени. Такие мелкомасштабные структуры используются для вычисления мер количественного рекуррентного анализа. Так, для иррегулярных и хаотических процессов диагональные отрезки длины l, параллельные диагональной линии $R_{ii} = 1$, являются результатом того, что фазовая траектория проходит одни и те же области фазового пространства в разные моменты времени, и сегмент этой траектории оказывается практически параллельным другому близкому ему сегменту в течение l временных единиц. Длина таких диагональных отрезков удовлетворяет следующему тождеству [10]:

$$\left(1 - R_{i-1,j-1}\right)\left(1 - R_{i+1,j+1}\right)\prod_{k=0}^{l-1} R_{i+k,j+k} \equiv 1, \qquad (2)$$

где $R_{i-1,j-1} = 0$, если $R_{1,j} = 1$ или $R_{i,1} = 1$ и $R_{i+k,j+k} = 0$, если $R_{N,j} = 1$ или $R_{i,N} = 1$. Поскольку такие диагональные отрезки длины l означают рекуррентность характера динамического процесса на протяжении l временных шагов, то горизонт предсказуемости (T_{pr}) этого процесса может быть представлен как усредненная длина диагональных отрезков:

$$T_{\text{pr}} = \frac{\sum_{l=l_{\min}}^{N} lP(l)}{\sum_{l=1_{\min}}^{N} P(l)}, \qquad (3)$$

где $P(l)$ – гистограмма диагональных отрезков длины l [7], т. е.

$$P(l) = \sum_{i,j=1}^{N}\left(1 - R_{i-1j-1}\right)\left(1 - R_{i+lj+l}\right)\prod_{k=0}^{l-1} R_{i+kj+k};\ i \neq j, \qquad (4)$$

и $l_{\min}$ – пороговое значение длины диагонального отрезка, позволяющее исключить из рассмотрения слишком короткие отрезки, соответствующие временным интервалам, в течение которых автокорреляция, заметная вначале, приближается к нулю (или близкому к нулю значению).

В работе [11] предложена еще одна численная мера оценки динамики временного ряда по рекуррентной матрице. Эта мера была предложена для анализа зашумленных временных рядов, которыми является большинство временных рядов, полученных в ходе полевых наблюдений; эта мера представляет собой отношение количества всех точек рекуррентной диаграммы, входящих в диагональные отрезки с длиной, превышающей пороговое значение $l_{\min}$, к общему количеству точек на диаграмме:

$$P_{\text{d}} = \frac{\sum_{l=l_{\min}}^{N} lP(l)}{n}, \qquad (5)$$

где n – общее количество точек на рекуррентной диаграмме, для которых $R_{ij} = 1$.

В данной работе для оценки динамических характеристик озерной экосистемы Нарочанских озер за временные периоды, характеризующиеся разной антропогенной нагрузкой, применяли обе меры (3) и (5). В работах [2, 9, 12] проведен статистический анализ временных рядов таких биогенных элементов, как общий азот и общий фосфор, а также хлорофилла. Выделено три этапа эволюции экосистемы Нарочанских озер, существенно различающихся по характеру изменения динамики хлорофилла, оцененного путем анализа линий тренда и их коэффициентов детерминации для всех озер [12]: период, характеризующийся интенсивной сельскохозяйственной деятельностью, а, следовательно, высокой биогенной нагрузкой (1978–1983 гг.), период, характеризующийся снижением биогенной нагрузки и концентрации хлорофилла во всех озерах (1984–1990 гг.), период, соответствующий отклику экосистемы на программу экологического оздоровления системы Нарочанских озер и вселение моллюска *Dreissena* (1991–2013 гг.). В данной работе произведен анализ временных рядов за период с 1979 по 2018 годы, состоящих из средних месячных значений таких гидроэкологических характеристик, как концентрация общего углерода, общего азота, общего фосфора, сестона, хлорофилла и биомассы фитопланктона в период с мая по октябрь, для каждого озера Нарочанской группы. Из нашего анализа исключали короткий переходный период с 1989 по 1992 годы, а динамику колебаний гидрологических характеристик оценивали за два периода: высокой биогенной нагрузки (1979–1988 гг.) и низкой биогенной нагрузки (1993–2018 гг.). Для выбора численного значения параметра ε в выражении (1) использовали плотность заполнения рекуррентной диаграммы:

$$P_f = n/N^2, \qquad (6)$$

где n – количество единиц рекуррентной матрицы, N – длина исследуемого ряда (длина стороны рекуррентной матрицы). Для всех случаев величина P_f выбиралась близкой к 0.19.

Исследуемые в данной работе гидроэкологические характеристики демонстрируют существенные вариации их значений от измерения к

измерению (в качестве примера на рис. 5 показаны временные ряды, т.е. колебания концентраций, общего азота и общего фосфора в оз. Баторино). Такие колебания носят нерегулярный характер. Тем не менее им свойственна повторяемость, но не абсолютная, а с точностью до величины параметра ε, который используется в соответствии с уравнением (1) для построения рекуррентной матрицы. В результате черные точки на рекуррентных диаграммах (см. рис. 1) соответствуют таким моментам времени, когда колебания демонстрируют некоторую – с точностью до ε – повторяемость (рекуррентность). В том случае, когда такая рекуррентность характеризует не одно значение временного ряда, а несколько идущих подряд значений, черные точки на рекуррентной диаграмме образуют диагональные отрезки, параллельные основной диагонали $R_{ii} = 1$, длина которых l удовлетворяет тождеству (2). В соответствии с уравнением (3) горизонт предсказуемости T_{pr} исследуемого временного ряда определяется как усредненная длина таких диагональных отрезков. Изменение величины T_{pr} на разных участках временного ряда может отражать изменение характера динамики исследуемого процесса. Наличие одиночных, т. е. не входящих в состав диагональных отрезков, точек на рекуррентной диаграмме соответствует одиночным флуктуациям состояния исследуемой динамической системы. При неизменной плотности заполнения рекуррентных диаграмм (6): $P_f \approx 0.19$ – изменениям количества одиночных флуктуаций соответствуют изменения численного значения параметра P_{d} (см. уравнение (5)).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Процессы, протекающие в экологических системах, носят ярко выраженный рекуррентный характер. Это связано с выраженной сезонностью многих процессов, а также с колебаниями численности и концентраций, вызванных трофическими взаимодействиями. Примечательно, что антропогенная нагрузка, связанная с активной хозяйственной деятельностью, носит ярко выраженный сезонный характер. Колебания численности гидробионтов в озерных экосистемах могут носить регулярный, иррегулярный и даже хаотический характер [7]. При этом экологические процессы существенно нелинейны [13, 14], что подразумевает преимущество нелинейных методов оценки динамики по сравнению с линейными методами [14, 15].

Анализ рекуррентных диаграмм, построенных для разных гидроэкологических характеристик за весь период наблюдения с 1979 по 2018 годы, позволил уточнить момент изменения характера их динамики после проведения мероприятий экологического оздоровления Нарочанской экосистемы и других внешних воздействий и выбрать время переходного периода с 1989 по 1992 годы для исключения из дальнейшего анализа. На рис. 1 показаны рекуррентные диаграммы для временных рядов концентраций общего азота (рис. 1а) и общего фосфора (рис. 1б) за весь период исследований с 1979 по 2018 годы в озере Баторино. Четко видно отличие в структурах рекуррентных диаграмм до переходного периода (с 1989 по 1992 годы) и после, что соответствует реакции экосистемы на снижение антропогенной нагрузки на озерную экосистему. Оказалось, что структура рекуррентной диаграммы за период с 1993 по 2018 годы для общего фосфора не меняется, тогда как для общего азота наблюдается изменение в структуре рекуррентной диаграммы в течение этого периода. В связи с этим численную оценку рекуррентных свойств динамики гидроэкологических характеристик проводили не за весь период с 1993 по 2018 годы, а отдельно с 1993 по 2005 годы и с 2006 по 2018 годы.

В табл. 2 и 3 представлены значения параметра T_{pr}, характеризующего горизонт предсказуемости, и параметра P_{d}, характеризующего зашумленность динамики концентраций гидрологических характеристик и биомассы фитопланктона за периоды 1979–1988 гг., 1993–2005 гг. и 2006–2018 гг. для озер Баторино (Бат. 1, Бат. 2, Бат. 3), Мястро (Мяст. 1, Мяст. 2, Мяст. 3) и Нарочь (Нар. 1, Нар. 2, Нар. 3). На рис. 3–8 приведены диаграммы размаха, характеризующие динамику концентраций гидроэкологических характеристик для озер Нарочанской группы за выбранные периоды для каждого озера. На рисунках представлены медианы, верхний и нижний квартили, а также максимальные и минимальные значения.

Сопоставляя результаты численного рекуррентного анализа, представленного в табл. 2 и 3, а также результаты статистического анализа, представленные на рис. 3–8, можно дать оценку изменению динамики гидроэкологических характеристик в каждом из озер, начиная с периода высокой антропогенной нагрузки (1979–1988 гг.) и заканчивая периодом, значительно удаленным по времени и от мероприятий по экологическому оздоровлению системы Нарочанских озер, и от вселения в озера *Dreissena polymorpha* Pallas [12] (с 2006 по 2018 годы). Так, изменения параметров T_{pr} и P_{d} для динамики концентрации общего фосфора для разных озер не имеют выраженных тенденций, тогда как изменение ее амплитуды (рис. 3) во всех озерах имеет ярко выраженную тенденцию к уменьшению от первого периода к последнему. Видно значительное уменьшение медианы концентрации общего фосфора за второй период по сравнению с первым во всех озерах. Таким образом, такая гидроэкологическая

Таблица 2. Значения параметра T_{pr} для каждого озера Нарочанской экосистемы за периоды 1979–1988 гг., 1993–2005 гг. и 2006–2018 гг.

	Бат. 1	Бат. 2	Бат. 3	Мяст. 1	Мяст. 2	Мяст. 3	Нар. 1	Нар. 2	Нар. 3
Фосфор	3.44	3.19	3.59	3.17	3.52	3.13	3.36	3.15	3.21
Азот	3.71	3.71	3.42	3.22	3.66	3.18	3.25	3.23	3.2
Углерод	3.2	3.25	3.44	3.08	3.23	3.55	3.08	3.06	3.125
Сестон	3.1	3.12	3.46	3.27	3.18	3.28	3.09	3.1	3.44
Хлорофилл	3.38	3.26	3.21	3.25	3.26	3.24	3.08	3.29	3.32
Биомасса фитопланктона	–	3.38	3.31	–	3.06	3.16	–	3.33	3.3

Примечание. Параметр Tpr характеризует горизонт предсказуемости изменения концентраций гидрологических характеристик и биомассы фитопланктона.

Таблица 3. Значения параметра P_d для каждого озера Нарочанской экосистемы за периоды 1979–1988 гг., 1993–2005 гг. и 2006–2018 гг.

	Бат. 1	Бат. 2	Бат. 3	Мяст. 1	Мяст. 2	Мяст. 3	Нар. 1	Нар. 2	Нар. 3
Фосфор	0.09	0.14	0.11	0.11	0.14	0.13	0.11	0.1	0.1
Азот	0.15	0.18	0.07	0.21	0.28	0.12	0.12	0.17	0.06
Углерод	0.05	0.12	0.15	0.12	0.12	0.12	0.12	0.1	0.1
Сестон	0.11	0.13	0.08	0.1	0.16	0.14	0.1	0.12	0.06
Хлорофилл	0.13	0.13	0.13	0.04	0.18	0.1	0.11	0.13	0.16
Биомасса фитопланктона	–	0.14	0.07	–	0.09	0.1	–	0.12	0.1

Примечание. Параметр P_d характеризует зашумленность динамики концентраций гидрологических характеристик и биомассы фитопланктона.

характеристика, как концентрация общего фосфора, показала одинаковую для всех озер реакцию на уменьшение биогенной нагрузки, что связано, по-видимому, со снижением поступления фосфора в результате прекращения активной хозяйственной деятельности и природоохранных

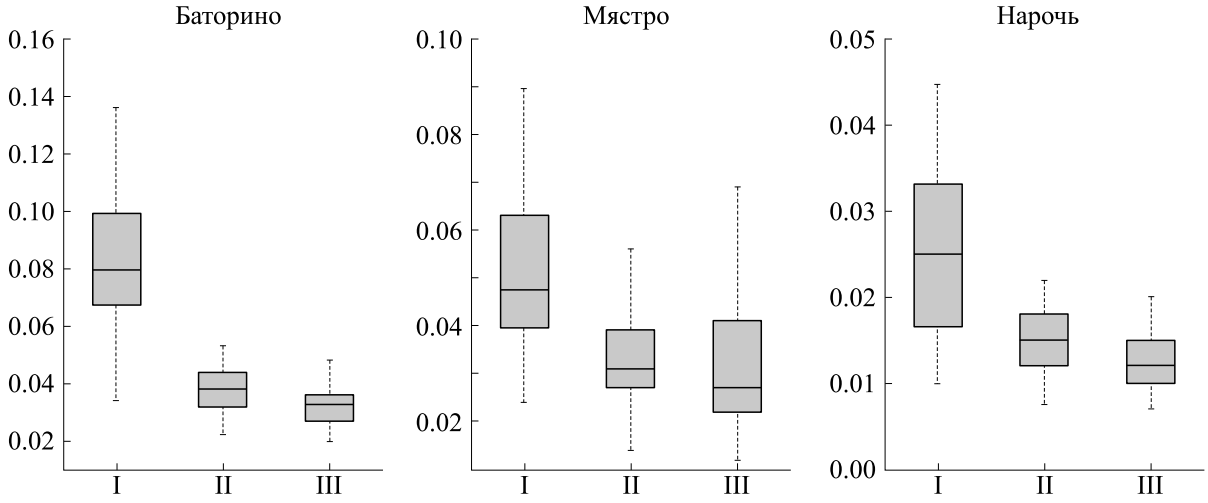


Рис. 3. Диаграммы размаха, характеризующие динамику концентраций (мг/л) общего фосфора в озерах за периоды 1979–1988 гг. (I), 1993–2005 гг. (II), 2006–2018 гг. (III). Представлены медиана, верхний и нижний квартиль, наибольшее и наименьшее значения.

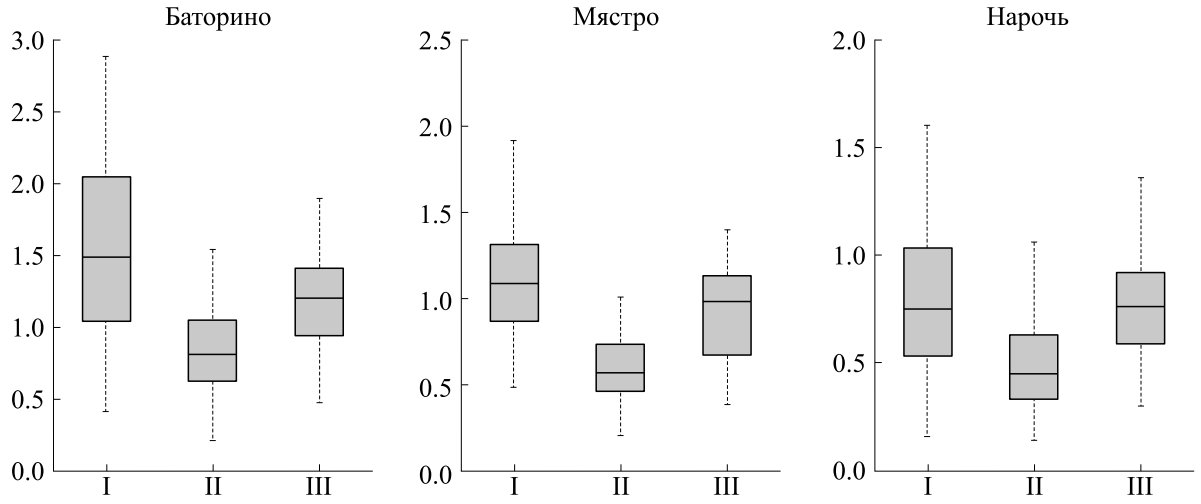


Рис. 4. Диаграммы размаха, характеризующие динамику концентраций (мг/л) общего азота в озерах за периоды 1979–1988 гг. (I), 1993–2005 гг. (II), 2006–2018 гг. (III). Представлены медиана, верхний и нижний квартиль, наибольшее и наименьшее значения.

мероприятий на водосборе Нарочанских озер [3] по сравнению с первым рассматриваемым периодом (1979–1988 гг.).

Предсказуемость динамики концентрации общего азота T_{pr} практически не меняется для Нарочи, незначительно уменьшается за третий период в Баторино и возрастает по сравнению с другими периодами в Мястро за второй период. Параметр P_d показывает одинаковую тенденцию к существенному уменьшению за третий период во всех озерах. Статистические характеристики (рис. 4) тоже имеют сходную для всех озер картину – уменьшение амплитуд колебаний за второй период и увеличение в третий, при этом в Нарочи медиана за третий период практически идентична с медианой за первый период. Медианы концентраций общего азота за третий период в озерах Мястро и Баторино также приближаются к значениям медиан за первый период. Можно сделать вывод, что такая гидроэкологическая характеристика, как концентрация общего азота, отражает сходную для озер динамику нагрузки по этому биогенному элементу, несмотря на разный трофический статус озер, разные размеры и разную скорость водообмена.

Для динамики концентрации общего углерода параметр T_{pr} демонстрирует незначительный тренд к увеличению предсказуемости для озер Баторино и Мястро, тогда как изменения этого параметра для озера Нарочь незначительны. Параметр P_d не меняется для озера Мястро, слабо меняется для Нарочи и демонстрирует значительное уменьшение в Баторино для периода высокой антропогенной нагрузки. Разброс амплитуд колебаний концентрации углерода и ее медианные значения (рис. 5) для всех озер демонстрируют разные тенденции. Так, для Баторино медианные значения уменьшаются от этапа к этапу, в Нарочи демонстрируют незначительный тренд к постоянному увеличению, для Мястро медиана незначительно уменьшается во второй период и увеличивается за третий период. Можно сделать вывод, что концентрация общего углерода более чувствительна к отличиям основных характеристик между озерами, чем к одинаковым для всех озер внешним воздействиям и изменению общей антропогенной нагрузки.

Для динамики концентрации сестона параметр T_{pr} демонстрирует незначительный тренд к увеличению предсказуемости для озер Баторино и Нарочь, тогда как изменения этого параметра для озера Мястро незначительны. Для динамики концентрации хлорофилла параметр T_{pr} демонстрирует противоположный динамике концентрации сестона незначительный тренд к уменьшению предсказуемости для Баторино, похожий незначительный тренд к увеличению предсказуемости в Нарочи, изменения этого параметра для озера Мястро незначительны. Параметр P_d слабо меняется как для концентрации сестона, так и для концентрации хлорофилла для всех озер и периодов, кроме значительного уменьшения в озере Нарочь за третий период для концентрации сестона и значительного уменьшения за первый период в Мястро для концентрации хлорофилла. Статистические характеристики (рис. 6, 7) имеют сходную для всех озер картину – существенное уменьшение амплитуд колебаний за второй период и идентичные со вторым периодом амплитуды колебаний за третий период. Можно предположить, что реакция сестона и хлорофилла на внешние воздействия отражает с некоторым лагом ре-

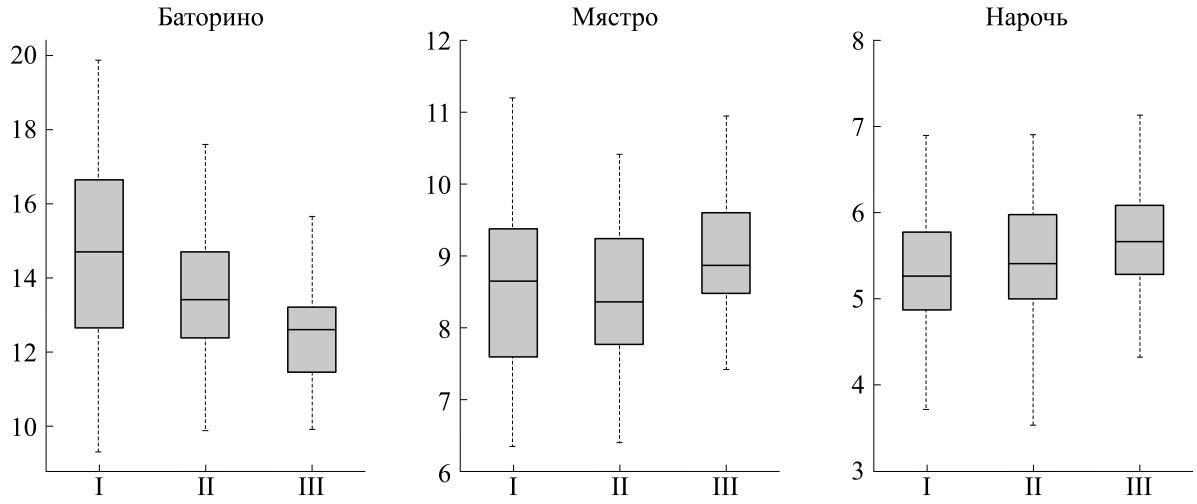


Рис. 5. Диаграммы размаха, характеризующие динамику концентраций (мг/л) общего углерода в озерах за периоды 1979–1988 гг. (I), 1993–2005 гг. (II), 2006–2018 гг. (III). Представлены медиана, верхний и нижний квартиль, наибольшее и наименьшее значения.

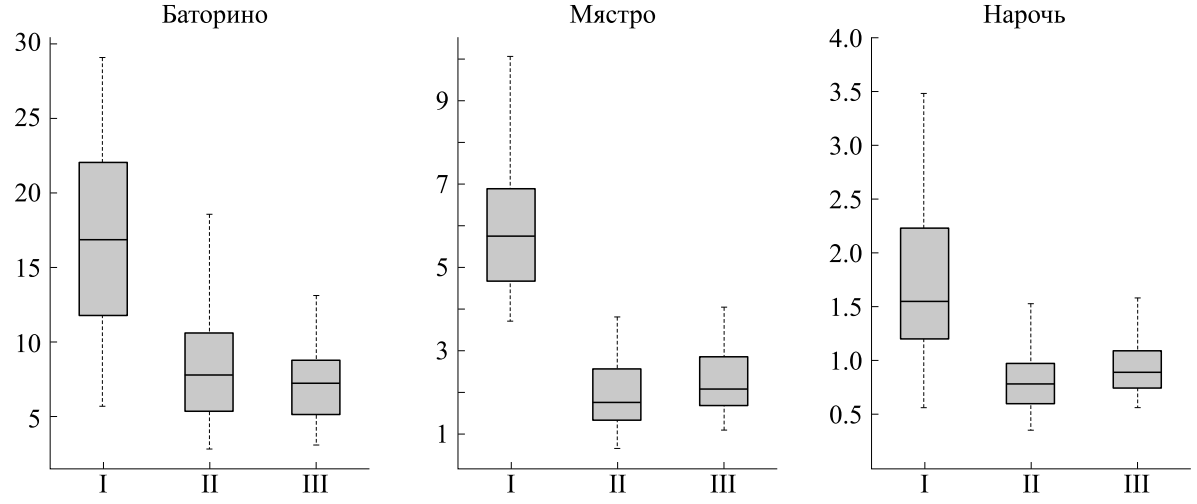


Рис. 6. Диаграммы размаха, характеризующие динамику концентраций (мг/л) сестона в озерах за периоды 1979–1988 гг. (I), 1993–2005 гг. (II), 2006–2018 гг. (III). Представлены медиана, верхний и нижний квартиль, наибольшее и наименьшее значения.

акцию других гидроэкологических характеристик, в особенности общего фосфора, на изменение внешних воздействий. Показано [1, 7], что фосфор является лимитирующим компонентом в экологической системе Нарочанских озер, что частично подтверждает такое предположение.

Изменение динамики биомассы фитопланктона является, наверное, самой интегральной из представленных гидрологических характеристик. К сожалению, данных о биомассе фитопланктона за первый период недостаточно, чтобы достоверно вычислить параметры T_{pr} и P_d, а также получить статистические характеристики за первый период для озер Баторино и Мястро. Тем не менее из представленных рекуррентных характеристик видно, что только параметр P_d за третий период в озере Баторино существенно меньше, чем параметр P_d за предыдущий период, все остальные параметры показывают сходные значения. Динамика статистических характеристик биомассы фитопланктона (рис. 8) для всех озер сходна с динамикой статистических характеристик для сестона.

Таким образом, несмотря на то что в экологической системе Нарочанских озер в связи с изменением внешних условий, связанных с прекращением интенсивной сельскохозяйственной деятельно-

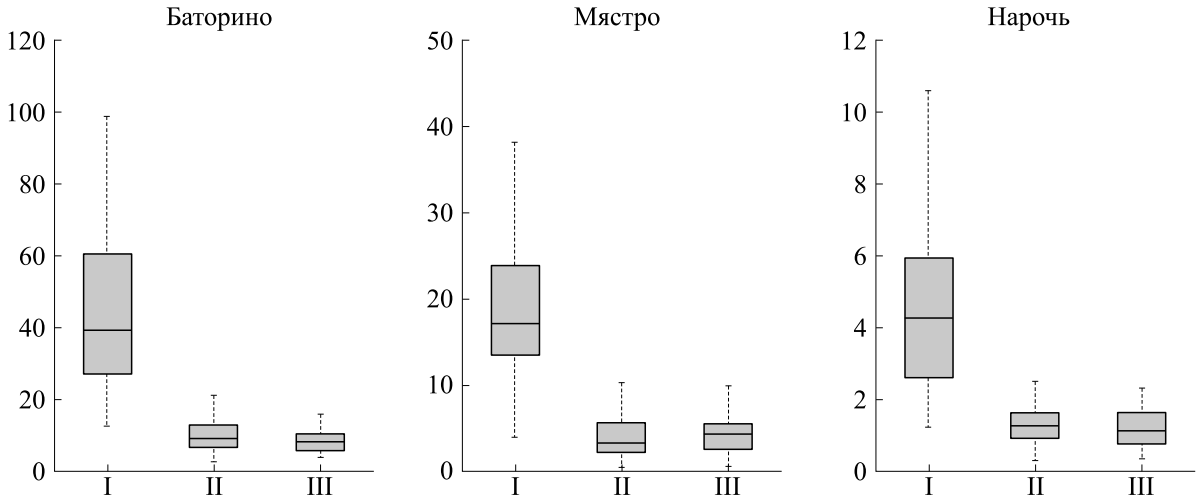


Рис. 7. Диаграммы размаха, характеризующие динамику концентраций (мкг/л) хлорофилла в озерах за периоды 1979–1988 гг. (I), 1993–2005 гг. (II), 2006–2018 гг. (III). Представлены медиана, верхний и нижний квартиль, наибольшее и наименьшее значения.

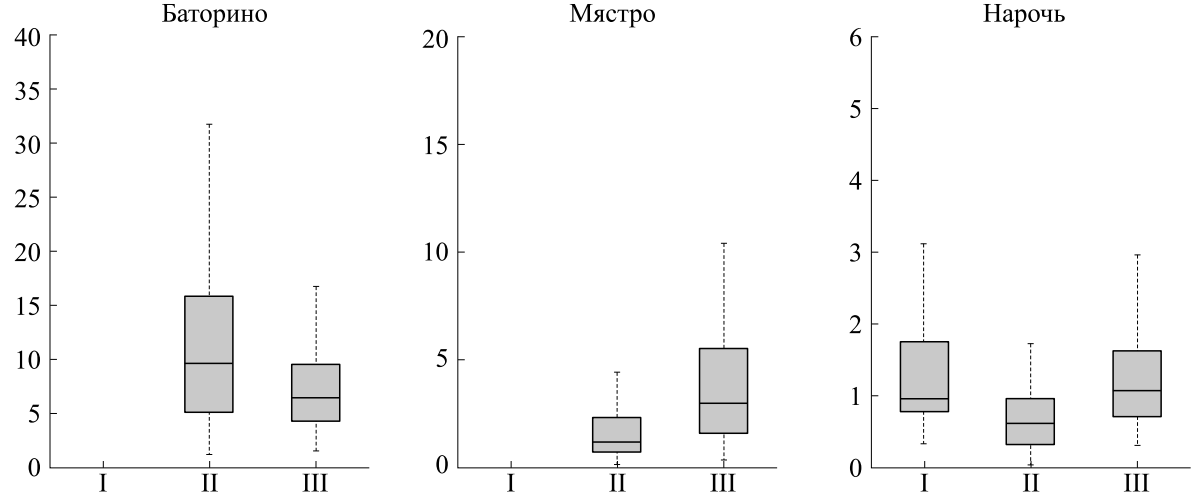


Рис. 8. Диаграммы размаха, характеризующие динамику концентраций (мг/л) биомассы фитопланктона в озерах за периоды 1979–1988 гг. (I), 1993–2005 гг. (II), 2006–2018 гг. (III). Представлены медиана, верхний и нижний квартиль, наибольшее и наименьшее значения.

сти, проведением мероприятий по экологическому оздоровлению и вселением моллюска-фильтратора произошли существенные изменения динамики гидробиологических характеристик по амплитуде (так, медианные значения концентраций общего фосфора, сестона и хлорофилла уменьшились в два и более раза), рекуррентные свойства динамики гидробиологических характеристик менялись незначительно. Постоянство характера динамики системы в плане предсказуемости говорит о ее качественной устойчивости к внешним воздействиям, сохранению устойчивых трофических связей и взаимодействий между гидробионтами. Детальное изучение механизмов таких взаимодействий и влияния на них внешних факторов возможно, по-видимому, только с применением методов математического моделирования экологических систем, в частности, с помощью математических моделей, использующих данные полевых наблюдений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00381-21-00 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (научный проект № 20-54-00017) и Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь (грант Б20Р–273).

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. А. П. Остапеня, Т. В. Жукова, Т. М. Михеева и др., Труды БГУ, **7** (1), 135 (2012).
2. B. V. Adamovich, T. V. Zhukova, T. M. Mikheyeva, et al., J. Sib. Fed. Univ. Biol. **10** (4), 379 (2017).
3. Т. В. Жукова и А. П. Остапеня, Природные ресурсы (Межведомственный бюллетень), № 3, 68 (2000).
4. Т. В. Жукова, Водные ресурсы **40** (5), 468 (2013).
5. L. E. Burlakova, A. Yu. Karatayev, and D. K. Padilla, Hydrobiologia **571**, 133 (2006).
6. *Экологическая система Нарочанских озер*, под ред. Г. Г. Винберга (Университетское, Минск, 1985).
7. 7. B. V. Adamovich, T. V. Zhukova, T. M. Mikheeva, et al., Water Resources **43** (5), 809 (2016).
8. A. B. Medvinsky, B. V. Adamovich, R. R. Aliev, et al., Ecol. Complexity **32**, 90 (2017).
9. Т. В. Жукова, Н. П. Радчикова, Т. М. Михеева и др., Биология внутренних вод, № 3, 250 (2017).
10. N. Marwan, M. C. Romano, M. Thiel, and J. Kurths, Phys. Rep. **438**, 237 (2007).
11. А. В. Русаков, А. Б. Медвинский и Н. И. Нуриева, Биофизика **63** (4), 751 (2018).
12. Б. В. Адамович, Р. З. Ковалевская, Н. П. Радчикова и др., Биофизика **60**, 769 (2015).
13. D. Kaplan and L. Glass, *Understanding Nonlinear Dynamics* (Springer, New York, 1995).
14. H. Kantz and T. Schreiber, *Nonlinear Time Series Analysis* (Cambridge University, Cambridge, 1997).
15. S. P. Otto and T. Day, *A Biologist's Guide to Mathematical Modeling in Ecology and Evolution* (Princeton University, Princeton, 2007).

Stability of Recurrent Properties of the Hydrobiological Characteristics of a Lake Ecosystem in Response to the Contribution of Anthropogenic Influences

A.V. Rusakov*, B.V.Adamovich, T.V. Zhukova**, R.Z. Kovalevskaya**, A.B. Medvinsky*, T.M. Mikheyeva**, N.I. Nurieva*, and N.P. Radchikova***, ******

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

***Belarussian State University, prosp. Nezavisimosty 4, Minsk, 220030 Belarus*

****Moscow Pedagogical State University, ul. Malaya Pirogovskaya 1/1, Moscow, 119991 Russia*

*****Moscow State University of Psychology and Education, ul. Sretenka 29, Moscow, 127006 Russia*

This paper presents analysis of the long-term dynamics of hydroecological characteristics of the ecosystem of Naroch Lakes (Belarus) covering the period from 1979 to 2018. Over this period, because of the significant enhancement of human activities such as the implementation of measures to improve lake conditions and after the invasion of the shellfish *Dreissena polymorpha* Pallas, drastic changes have taken place on a catchment scale in the Naroch ecosystem. It is shown that anthropogenic activities have had some impacts on the lake ecosystem leading to significant changes in hydroecological characteristics, namely in the amplitude of concentration fluctuations, while predictability of the time series changed slightly.

Keywords: long-term dynamics, nutrient load, recurrence analysis, lake ecosystems