## Том 65, номер 5, 2020

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Молекулярные механизмы редокс-регуляции Na,К-АТФазы	
И.Ю. Петрушанко, В.А. Митькевич, А.А. Макаров	837
Влияние вязкости среды на молекулярную динамику формирования вторичной структуры полипептидов (AlaGly) <sub>25</sub> и (AlaGly) <sub>75</sub>	
А.А. Эрендженова, Г.А. Армеев, К.В. Шайтан	860
Исследование эффективности маркирования ДНК флуоресцентными красителями ближнего инфракрасного диапазона	
В.Е.Шершов, А.Ю.Иконникова, В.А.Василисков, С.А.Лапа, Р.А. Мифтахов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина	865
Нанокапсула на основе природного минерала клиноптилолита с оболочкой из лецитина	
А.Г. Погорелов, Т.А. Степанова, А.И. Панаит, В.А. Балашов, А.А. Гулин, В.Н. Погорелова	872
Микробный синтез наночастиц: механизмы, характеристики, применение	
Т.А. Воейкова, О.А. Журавлева, В.С. Кулигин, Е.И. Кожухова, Е.В. Иванов, В.Г. Дебабов	878

### БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Модели фотосинтетического электронного транспорта

Г.Ю. Ризниченко, Н.Е. Беляева, А.Н. Дьяконова, И.Б. Коваленко, А.С. Маслаков, Т.К. Антал, С.Н. Горячев, Т.Ю. Плюснина, В.А. Федоров, С.С. Хрущев, А.Б. Рубин	886
Функциональное состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля в условиях деструкции тубулинового цитоскелета	
И.Ю. Макеева, Т.И. Пузина	903
Изменение электрических свойств форменных элементов крови в условиях механического стресса <i>in vitro</i>	
Е.А. Сладкова	910
Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах воздействия в опытах <i>in vitro</i>	
В.В. Зинчук, Е.С. Билецкая	915
Лиганды рецепторов сигма-1 – хлорпромазин и трифлуоперазин – ингибируют транспорт Na <sup>+</sup> в эпителии кожи лягушки	
А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая	920
Эффективность консервации в жидком азоте микробиоты кишечника человека в зависимости от состава криозащитной среды	
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.)	924

### БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Модель предпосылок видообразования в представлениях теорий перколяций и самоорганизованной критичности

А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, В.А. Твердислов, Н.Т. Левашова

Эколого-генетические модели в популяционной биофизике	
Е.Я. Фрисман, О.Л. Жданова, Г.П. Неверова	949
Динамика системы «хищник—жертва» со стадным поведением в обоих случаях и сильным эффектом Олли у жертвы	
С. Бисвас, Д. Пал, Г.С. Махапатра, Г.П. Саманта	967
Моделирование весенней агрегации пчел в улье при больших суточных колебаниях температуры наружного воздуха	
С.В. Оськин, Д.А. Овсянников	978
Представление трехмерной структуры эпителия как регулярной клеточной сети (на примере глаза дрозофилы)	
Г.А. Савостьянов	986
Флуориметрический анализ влияния шламовых загрязнителей на фитопланктон	
С.В. Беспалова, С.М. Романчук, С.В. Чуфицкий, В.В. Перебейнос, Б.А. Готин	994
Влияние гипотермии на пуринергическую синаптическую модуляцию в диафрагме крысы	
А.Е. Хайруллин, А.У. Зиганшин, С.Н. Гришин	1003
Влияние природы лиганда на противоопухолевую активность и цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа	
А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, О.О. Рябая, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина	1009
Пониженная биодоступность оксида азота у лошадей с симптомокомплексом колик: оценка методом ЭПР-спектроскопии	
В.А. Сереженков, Н.А. Ткачев, З.С. Артюшина, М.И Кузнецова, М. Ковач, А.Ф. Ванин	1017
Особенности когнитивных процессов крыс в условиях умеренной гипомагнитной среды	
Д.Р. Хусаинов, И.И. Коренюк, В.И. Шахматова, К.Н. Туманянц, Н.С. Трибрат, Е.Д. Хорольская, А.В. Чайка, И.А. Борзова	1025

# дискуссии

Механизмы взаимодействия стабильных изотопов с биологическими объектами с учетом нескомпенсированного нейтрона в химических связях

А.А. Елкина, Е.Н. Тумаев, А.А. Басов, А.В. Моисеев, В.В. Малышко, Е.В. Барышева, А.В. Чуркина, С.С. Джимак

1034

# Contents

\_

\_

# Vol. 65, No. 5, 2020

# **Molecular Biophysics**

Molecular Mechanisms of Redox Regulation of the Na,K-ATPase	
I.Yu. Petrushanko, V.A. Mitkevich, and A.A. Makarov	837
Effect of Medium Viscosity on Molecular Dynamics of the Formation of Secondary Structure of the $(AlaGly)_{25}$ and $(AlaGly)_{75}$ Polypeptides	
A.A. Erendjenova, G.A. Armeev, and K.V. Shaitan	860
Study of the Eficiency of DNA Labelling Using Near Infrared Fluorescent Dyes	
V.E. Shershov, A.Yu. Ikonnikova, V.A. Vasiliskov, S.A. Lapa, R.A. Miftakhov, V.E. Kuznetsova, A.V. Chudinov, and T.V. Nasedkina	865
A Clinoptilolite Natural Mineral-Based Nanocapsule Surrounded by a Shell Composed of Lecithin	
A.G. Pogorelov, T.A. Stepanova, A.I. Panait, V.A. Balashov, A.A. Gulin, and V.N. Pogorelova	872
Microbial Synthesis of Nanoparticles: Mechanisms, Characteristics, Application	
T.A. Voeikova, O.A. Zhuravliova, V.S. Kuligin, E.I. Kozhukhova, E.V. Ivanov, and V.G. Debabov	878

# **Cell Biophysics**

### Models of Photosynthetic Electron Transport

G.Yu. Riznichenko, N.E. Belyaeva, A.N. Diakonova, I.B. Kovalenko, A.S. Maslakov, T.K. Antal, S.N. Goryachev, T.Yu. Plyusnina, V.A. Fedorov, S.S. Khruschev, and A.B. Rubin	886
The Functional State of the Photosynthetic Apparatus of Potato Plants upon Destruction of the Tubulin Cytoskeleton	
I.Yu. Makeeva and T.I. Puzina	903
Change of Electrical Properties of Formed Blood Elements under <i>in vitro</i> Mechanical Stress	
E.A. Sladkova	910
Different Ozone Dosage Effects on Oxygen Transport in Blood, in vitro Experiments	
V.V. Zinchuk and E.S. Biletskaya	915
Sigma-1 Receptor Ligands Chlorpromazine and Trifluoperazine Inhibit Na <sup>+</sup> Transport in Frog Skin Epithelium	
A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, and N.I. Krutetskaya	920
Efficiency of Preservation of Human Gut Microbiota in Liquid Nitrogen Depending on the Composition of the Cryoprotective Medium	
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)	924

# **Complex Systems Biophysics**

A Model of Speciation Preconditions in the Notions of Percolation and Self-Organized Criticality Theories	
A.Ya. Garaeva, A.E. Sidorova, V.A. Tverdislov, and N.T. Levashova	932

Discussions	
D.R. Khusainov, I.I. Koreniyuk, V.I. Shakhmatova, K.N. Tumanyants, N.S. Tribrat, E.D. Khorolskaya, A.V. Chajka, and I.A. Borzova	1025
The Peculiar Features of Cognitive Processes in Rats Exposed to the Hypomagnetic Field by Moderate Magnetic Shielding	
V.A. Serezhenkov, N.A. Tkachev, Z.S. Artyushina, M.I. Kuznetsova, M. Kovac, and A.F. Vanin	1017
Reduced Nitric Oxide Bioavailability in Horses with Colic: Evaluation by ESR Spectroscopy	
A.F. Vanin, L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, E.I. Nekrasova, O.O. Riabaya, N.V. Bluhterova, V.A. Rykova, and M.M. Fomina	1009
The Influence of the Ligand Nature on the Antitumour Activity and the Cytotoxic Effect of the Binuclear Dinitrosyl Iron Complexes	
A.E. Khayrullin, A.U. Ziganshin, and S.N. Grishin	1003
Influence of Hypothermia on Purinergic Synaptic Modulation in Rat Diaphragm	
S.V. Bespalova, S.M. Romanchuk, S.V. Chufitskiy, V.V. Perebeinos, and B.A. Gotin	994
Fluorescence Analysis of Coal Slurry Pollution Effects on Phytoplankton	
G.A. Savostyanov	986
Representation of a Three-Dimensional Epithelial Structure as a Cell Regulatory Network in a Drozophila Eye Model	
S.V. Oskin and D.A. Ovsyannikov	978
Simulation of Bees' Aggregation in the Hive in Spring when Daily Outdoor Air Temperature Fluctuates a Great Deal	
S. Biswas, D. Pal, G.S. Mahapatra, and G.P. Samanta	967
Dynamics of a Prey–Predator System with Herd Behaviour of Prey and Predator and with Strong Allee Effect in Prey	
E.Ya. Frisman, O.L. Zhdanova, and G.P. Neverova	949
Ecological and Genetic Models in Population Biophysics	

Mechanisms of Interaction between Non-Radioactive Isotopes and Biological Objects in the Presence of a Noncompensated Neutron in Chemical Bonds

A.A. Elkina, E.N. Tumaev, A.A. Basov, A.V. Moiseev, V.V. Malyshko, E.V. Barisheva, A.V. Churkina, and S.S. Dzhimak

1034

УДК 577.32

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ Na,К-АТФазы

#### © 2020 г. И.Ю. Петрушанко, В.А. Митькевич, А.А. Макаров

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

*E-mail: irina-pva@mail.ru* Поступила в редакцию 15.11.2019 г. После доработки 17.06.2020 г.

Принята к публикации 19.06.2020 г.

Обзор посвящен молекулярным механизмам редокс-регуляции Na,К-АТФазы. Na,К-АТФаза создает трансмембранный градиент ионов натрия и калия, необходимый для жизнедеятельности всех клеток животных, а также является рецептором для кардиотонических стероидов, регулирующих пролиферацию и апоптоз клеток. Функционирование Na,К-АТФазы зависит от окислительно-восстановительного (редокс) статуса клеток. Изначально было показано, что фермент ингибируется при окислительном стрессе, однако теперь ясно, что редокс-регуляция Na,K-ATФазы является сложным процессом и не объясняется одним лишь окислительным повреждением белка. Активность фермента максимальна при физиологической концентрации кислорода, снижаясь как при гипоксии, так и при гипероксии, а также при падении или возрастании внутриклеточного глутатиона. Таким образом, активность Na,K-ATФазы максимальна в определенном диапазоне редоксусловий. В настоящее время стало очевидным, что нарушение активности Na,K-ATФазы при ряде патологий, таких как гипоксия, ишемия, диабет, болезнь Альцгеймера, связано именно с изменением редокс-статуса клеток. Рецепторная функция Na,K-ATФазы также зависит от редокс-статуса клеток, что необходимо учитывать при рассмотрении действия кардиотонических стероидов на клетки и ткани. В обзоре особое внимание уделено редокс-модификациям тиоловых групп различных субъединиц Na,К-АТФазы и рассмотрению процессов регуляции, в которые они вовлечены в норме и патологии. Понимание молекулярных механизмов редокс-регуляции поможет предотвратить нарушение функционирования Na,K-ATФазы при патологических условиях и снизить повреждение клеток.

Ключевые слова: Na,K-ATФаза, редокс-регуляция, глутатионилирование, нитрозилирование, окисление, остатки цистеина, кардиотонические стероиды.

DOI: 10.31857/S0006302920050014

Na.К-АТФаза – трансмембранный белок, который за счет энергии гидролиза АТФ создает трансмембранный градиент Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>. Данный градиент используется для транспорта других ионов, аминокислот и глюкозы, поддержания внутриклеточного pH и уровня  $Ca^{2+}$  [1–3]. Транспортная и гидролитическая активности Na,К-АТФазы чувствительны к редокс-статусу клеток [4-8]. Они максимальны при физиологической концентрации кислорода, снижаясь как при гипоксии, так и гипероксии, а также при падении или возрастании внутриклеточного глутатиона [5, 6]. Соотношение восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона определяет тиоловый редокс-статус клетки и изменяется при гипоксии, окислительном стрессе и многих патологиях [9, 10]. Нарушение функционирования

Na,К-АТФазы при ряде патологий связано именно с изменением редокс-статуса клеток [7, 8].

Ранее неоднократно отмечалось, что активность Na, K-ATФазы снижается при недостатке кислорода, и это происходит гораздо раньше, чем истощение клеток по  $AT\Phi$ , которое может привести к ингибированию фермента [11–13]. Снижение активности наблюдалось и при окислительном стрессе [4, 14, 15]. В дальнейшем было показано, что снижение активности Na,K-АТФазы происходит не только при гипоксии, но и при гипероксии [6], а избыток глутатиона, как и его недостаток, может также привести к снижению активности фермента [5]. Таким образом, активность Na,К-АТФазы имеет максимум в определенном диапазоне редокс-условий. Вопрос о механизмах ее редокс-регуляции является крайне актуальным, потому что нарушение работы этого фермента критично для жизнеспособности клеток. В электровозбудимых тканях функционирование Na, K-АТФазы необходимо еще и для

Сокращения: GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, КТС – кардиотонические стероиды, АФК – активные формы кислорода.

нормального формирования потенциала действия. Именно нарушение функционирования Na,K-АТФазы в ткани мозга и сердца при ишемии и гипоксии является одним из самых ранних и критичных событий, приводящих к нарушению работы ткани и последующей гибели клеток [7, 8]. При этом вопрос о редокс-регуляции Na,К-АТФазы не ограничивается только регуляцией активности фермента. В последнее время появляется все больше работ, свидетельствующих об огромном значении Na, К-АТФазы как рецептора к кардиотоническим стероидам (КТС) [16-20]. Эти вещества, которые ранее рассматривались как экзогенные ядовитые соединения, специфически ингибирующие Na,K-ATФазу, затем были найдены в организме животных и человека, и в настоящее время рассматриваются как важные гормоноподобные регуляторы. Na,K-АТФаза является единственным известным рецептором КТС. Связывание их с Na, К-АТФазой приводит к активации целого ряда сигнальных каскадов, опосредующих пролиферацию и апоптоз клеток. КТС активно использовались человечеством на протяжении сотен лет для лечения сердечной недостаточности. Однако они очень токсичны и вызывают ряд серьезных побочных эффектов. В настоящее время благодаря исследованиям рецепторной функции Na, К-АТФазы причины многих из этих эффектов стали ясны. Тем не менее такие исследования еще только начинаются, и в этом направлении больше вопросов, чем ответов. Понимание того, как изменяется рецепторная функция Na,K-ATФазы при окислительном стрессе, гипоксии или иных изменениях редокс-статуса очень важно для выявления особенностей регуляции рецепторной функции фермента, а также для правильного использовании КТС в терапевтических целях.

Влияние редокс-статуса на функционирование белка возможно как вследствие непосредственной модификации его остатков, так и опосредованно, например, через редокс-чувствительные киназы. В данном обзоре фокус смещен на аспект редокс-регуляции Na,K-ATФазы путем непосредственной модификации остатков цистеина субъединиц Na,K-ATФазы.

#### СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ Na,К-АТФазы

Функциональный мономер Na,K-ATФазы состоит из каталитической  $\alpha$ -субъединицы и регуляторной  $\beta$ -субъединицы [1].  $\alpha$ -Субъединица (100–113 кДа) имеет десять трансмембранных доменов, содержит участки связывания ATФ, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и осуществляет гидролиз ATФ, а также транспорт ионов. Кроме того, на  $\alpha$ -субъединице локализован участок связывания KTC. Как C-, так и N-конец  $\alpha$ -субъединицы находятся в цитозоле.  $\alpha$ -Субъединица содержит малую и большую цитозольную петли, которые формируют три основных цитозольных домена: N-конец белка и малая цитозольная петля формируют актуаторный домен (А), большая петля формирует нуклеотидсвязывающий домен (N) и фосфорилируемый домен (Р). β-Субъединица (55 кДа – гликозилированная часть, 36-38 кДа – белковая часть) содержит один трансмембранный домен. Большая часть β-субъединицы формирует внеклеточный домен. Она необходима для транспорта вновь синтезированной Na,K-АТФазы в мембрану, а также для правильной ориентации α-субъединицы в цитоплазматической мембране и для окклюзии К<sup>+</sup> [21]. В течение каталитического цикла Na, K-АТФаза проходит две основные конформации: Е1 и Е2 [1, 7, 22]. Согласно циклу Альберса-Поста [1, 7, 22], цитозольный Na<sup>+</sup> связывается с ферментом в Е1-конформации, обладающей высоким сродством к АТФ. Это приводит к гидролизу АТФ, фосфорилированию фермента (E1P) и окклюзии трех ионов Na<sup>+</sup>. Конформационный переход Е1Р-Е2Р приводит к снижению сродства к Na<sup>+</sup> и возрастанию сродства к К<sup>+</sup>. Происходит высвобождение Na<sup>+</sup> во внеклеточную среду и связывание двух ионов К<sup>+</sup>. Это приводит к дефосфорилированию фермента и окклюзии ионов калия (E2(2K<sup>+</sup>)). В этой конформации фермент связывает АТФ с низким сродством, что способствует переходу Е2-Е1 и высвобождению К<sup>+</sup> в цитозоль. Это приводит к возрастанию сродства к АТФ. Таким образом, при низких концентрациях  $AT\Phi$ , еще достаточных для фосфорилирования, фермент будет ингибироваться, поскольку станет невозможным связывание АТФ в сайте с низким сродством и уход  $K^+$  [1].

Данные по ограниченному трипсинолизу Na,K-ATФазы [23, 24], Fe-катализируемому окислительному расщеплению [25], флуоресценции фермента [26], а также тепловой денатурации [27, 28] в конформациях E1 и E2 указывают на различное относительное расположение доменов Na,K-ATФазы в этих состояниях. С появлением пространственной структуры Na,K-ATФазы в E1P- [29] и E2P-конформациях [30] многие данные о доменной организации фермента были подтверждены, однако, к сожалению, структуры фермента в E1-конформации до сих пор нет. Согласно нынешним представлениям, E1-конформация является более открытой в цитозоль, чем E2- и E2P-конформации [23–30].

В настоящее время известны четыре изоформы  $\alpha$ -субъединицы и три изоформы  $\beta$ -субъединицы. В отличие от повсеместно распространенной  $\alpha$ 1-изоформы распределение других изоформ  $\alpha$ -субъединицы тканеспецифично.  $\alpha$ 2-Изоформа играет важную роль в регуляции сократимости клеток и распространена в скелетных мышцах и сердце [31–34], а также в глиальных клетках [35].

 $\alpha$ 3-Изоформа распространена в нейронах, сетчатке глаза и встречается также в сердце [34–36]. Созревание нейронной сети сопровождается увеличением уровня экспрессии α3-субъединицы [37], в то время как  $\alpha$ 2-субъединица важна для модуляции нейрональной активности в неонатальный период, но во взрослом мозге встречается только в астроцитах [33]. а 4 встречается только в тестикулах [32, 38]. 61- и 62-изоформы в различных пропорциях встречаются в разных тканях, тогда как β3-изоформа экспрессируется только в некоторых тканях, например в сетчатке [36]. Изозимы фермента, содержащие одинаковые изоформы β-субъединицы, но разные изоформы αсубъединицы, отличаются по чувствительности к КТС, причем показано, что важную роль в данной селективности играет остаток сахара КТС, агликоны не обладают селективностью в отношении изоформ α-субъединицы [39]. Изозимы, состоящие из разных α- и β-изоформ, имеют различную чувствительность к субстратам, сердечным гликозидам и окислительному стрессу [7, 39].

### ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТКИ

Окислительно-восстановительный (редокс) статус клетки определяется соотношением восстановленных и окисленных форм молекул. В клетках животных много редокс-пар молекул, которые вовлечены в поддержание внутриклеточного редокс-статуса, но самой распространенной является пара 2GSH/GSSG [9, 10]. Глутатион (ү-глутамилцистеинилглицин) – основной низкомолекулярный тиол клеток животных. Он не только определяет окислительно-восстановительный статус клетки, поддерживает SH-группы белков в восстановленном состоянии, защищает клетку от активных форм кислорода ( $A\Phi K$ ), но и участвует в выводе ксенобиотиков. Окисленная форма глутатиона представляет собой гексапептид, две молекулы глутатиона, соединенные SSмостиком. В норме содержание в клетке: GSH – 1-10 мМ, GSSG - 50-500 мкМ [10]. Следовательно, в покоящихся клетках [GSH]/[GSSG] > 100.Но в состоянии окислительного стресса это соотношение может существенно снизиться: 1 < < [GSH]/[GSSG] < 10 [10]. GSH синтезируется в цитозоле в ходе двух ферментативных АТФ-зависимых реакций, катализируемых глутамин-цистеин-лигазой и глутатион-синтетазой, и затем транспортируется в различные компартменты клетки [40]. Восстановление GSSG до GSH катализируется глутатион-редуктазой, которая в качестве субстрата использует НАДФ-Н.

Редокс-потенциал, определяемый парой GSSG/GSH [10], при 25°С и рН 7.0, составляет

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

$$Ehc = -240 - \frac{59.55}{2} \log \frac{[GSH]^2}{[GSSG]}$$
. Соотношение [GSH]/

[GSSG] является основным индикатором редоксстатуса клетки. Величина редокс-потенциала этой пары коррелирует с биологическим статусом клетки, составляя при пролиферации около -240 мВ, при дифференцировке - 200 мВ и при апоптозе -170 мВ [10]. Как следует из приведенного выше выражения, редокс-потенциал пары 2GSH/ GSSG зависит не только от соотношения окисленной и восстановленной формы, но и от концентрации GSH. Это обусловлено тем, что из двух молекул GSH образуется одна молекула GSSG. В то же время для пар НАД-Н/НАД<sup>+</sup> и НАДФ-Н/НАДФ<sup>+</sup> редокс-потенциал зависит только от соотношения окисленной и восстановленной форм. В клетках и тканях соотношение НАД $\Phi$ -Н/НАД $\Phi^+$  около 100/1, тогда как НАД-H/HAД<sup>+</sup> − от 1/10 до 1/1000 [41]. В то время как НАДФ-Н является основным источником электронов для биосинтеза и участвует в реакции восстановления глутатиона, НАД<sup>+</sup> участвует в процессах катаболизма и служит стоком электронов [10].

Изначально понятие редокс-статуса использовалось для описания соотношения восстановленной и окисленной пар молекул. Однако уже много лет его используют в более широком смысле для того, чтобы описать окислительно-восстановительную среду клетки. Зачастую это понятие не очень хорошо определено. В одной из ключевых работ по этой тематике [10] было высказано предложение характеризовать редокс-статус среды как сумму редокс-потенциалов всех пар, каждый из которых умножен на концентрацию восстановленного компонента пары. Хотя редокс-потенциал пары НАДФ-Н/НАДФ<sup>+</sup> ниже, чем редокс-потенциал пары 2GSH/GSSG, количество восстановленного НАДФ-Н (0.1 мМ) [42] существенно ниже, чем GSH (5-10 мМ). Поэтому общий окислительно-восстановительный статус клетки зависит в основном от пары 2GSH/GSSG, которую также называют главным редокс-буфером клетки [10].

При изменении редокс-статуса клетки ряд белков изменяет свое функционирование [9]. В большинстве случаев окислительные модификации тиолов (SH) остатков цистеина обеспечивают редокс-зависимую регуляцию активности белков. Данные модификации можно разделить на обратимые: сульфенирование (S–OH); глутатионилирование (S–SG) – присоединение глутатиона к тиоловой группе белка с образованием дисульфидного мостика; нитрозилирование (S–NO) – присоединение NO и необратимые: сульфенирование (S–NO) – присоединение NO и необратимые: сульфинирование (S–O<sub>2</sub>H) и сульфонирование (S–O<sub>3</sub>H). В то время как обратимые модифика-

ции вовлечены в сигнальные функции и редоксрегуляцию функции белка, необратимые модификации приводят к потере контроля над регуляцией функции белка и его последующей деградации.

#### РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ Na,K-АТФазы

Функционирование Na,К-АТФазы зависит от окислительно-восстановительного статуса клеток. В первую очередь было обнаружено ингибирование активности Na,K-АТФазы при развитии окислительного стресса, которое сопровождается снижением количества восстановленных SHгрупп α-субъединицы [4, 14, 20]. Затем было установлено, что тканеспецифичные изоформы α2 и α3 более чувствительны к окислению, чем конститутивная α1-изоформа [4, 20, 43-45]. При этом присутствие миллимолярных концентраций АТФ защищало фермент от окисления гидроксильными радикалами [46], а также от ингибирования цистеин-модифицирующим реагентом [47]. Проведенное сравнение последовательностей изоформ показало, что α1- и α2-изоформы имеют равное число остатков цистеина, а изоформа α3 имеет один дополнительный цистеин, таким образом, более высокая чувствительность к окислению изоформ α2 и α3 по сравнению с изоформой α1 не связана с большим количеством тиоловых групп в тканеспецифичных изоформах [7].

Необратимое окисление тиоловых групп делает невозможным их дальнейшие редокс-зависимые модификации, вследствие чего белок становится нечувствительным к изменению редоксстатуса клетки [48]. Na,K-ATФаза с необратимо окисленными тиоловыми группами подвергается деградации [49]. Активность Na,K-ATФазы максимальна в определенном диапазоне внутриклеточных редокс-условий. Как истощение нейрональных клеток по глутатиону, так и их загрузка глутатионом приводит к ингибированию транспортной активности Na,K-ATФазы [5].

Одним из первых свидетельств о редокс-чувствительности Na,K-ATФазы является ее ингибирование при снижении уровня кислорода. Способность Na,K-ATФазы отвечать на снижение уровня кислорода была показана на различных типах клеток, включая нейроны, кардиомиоциты, эритроциты, гепатоциты, гладкомышечные клетки, эпителиальные клетки легкого и т.д. [11–13, 50–53]. Однако позже было установлено, что не только гипоксия, но и гипероксия может снижать активность фермента. Так, на гранулярных клетках мозжечка крыс было показано, что активность Na,K-ATФазы имеет максимум при физиологическом парциальном давлении кислорода  $pO_2$  (3–5 кПа) и снижается, как в условиях гипоксии, так и в условиях гипероксии [6]. Таким образом, было установлено, что активность Na,K-ATФазы чувствительна к изменению редокс-статуса клеток, реализующегося в случае окислительного стресса, изменения уровня внутриклеточных тиолов и уровня оксигенации.

#### МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ Na,К-АТФазы

Основные механизмы редокс-чувствительности Na,K-АТФазы можно разделить на две группы — прямая модификация тиоловых групп остатков цистеина субъединиц белка и редокс-зависимое фосфорилирование фермента [7, 8].

Наибольшее количество остатков цистеина содержит каталитическая α-субъединица. В зависимости от изоформы их количество составляет 23 или 24 остатка, 15 из которых расположены в цитозоле и доступны для модификаций. Работы по точечному мутагенезу остатков цистеина с заменой их на аланин или серин, а также полная замена всех остатков цистеина не позволили выявить ни одного остатка цистеина, критичного для функционирования Na,K-АТФазы [54]. Мутант α1-субъединицы Na,К-АТФазы овцы с полной заменой остатков цистеина демонстрирует снижение  $K_{0.5}$  для Na<sup>+</sup>, двукратное возрастание  $K_{0.5}$  для K<sup>+</sup> и не влияет на  $K_{\rm m}$  для АТФ. Хотя замены незначительно влияют на активность, стабильность функционального мономомера α-β снижается. При этом замена Cys242 у овцы (соответствующего Cys244 у крысы) на аланин делает клетки очень чувствительными к кардиотоническому стероиду уабаину [54]. Замены цитозольных остатков цистеина могут приводить к ингибированию активности Na,К-АТФазы максимум в два раза, при этом  $K_{0.5}$  для Na<sup>+</sup> не меняется, а сродство к К<sup>+</sup> и АТФ изменяется. Большинство остатков цистеина, замена которых влияет на активность фермента, локализовано в большой цитозольной петле М4-М5. Поскольку замены не вызывают существенного изменения активности [54], а модификация остатков цистеина может существенно менять функционирование фермента [8, 48], можно заключить, что цистеины важны не непосредственно для активности Na, K-АТФазы, а для редокс-чувствительной регуляции ее активности. Тиоловые группы остатков цистеина αсубъединицы Na, К-АТФазы не образуют SS-мостиков [55]. Данные по мутагенезу также свидетельствуют о том, что SS-мостики α-субъединицы не нужны для фолдинга и активности белка. Тиоловые группы α-субъединицы находятся в восстановленном состоянии или могут быть модифицированы: окислены, нитрозилированы или глутатионилированы [8, 48, 55].

β-Субъединица имеет семь остатков цистеина. Из них шесть находятся на внеклеточной части белка и образуют три SS-мостика, а один (Cys46) является восстановленным и локализован вблизи трансмембранной части белка, погружаясь и выходя из мембраны в ходе каталитического цикла, вследствие чего он может подвергаться модификациям, в частности глутатионилированию [56, 57].

Третья субъединица (FXYD), являющаяся тканеспецифичной, содержит в зависимости от изоформы один или два остатка цистеина, один из которых может подвергаться глутатионилированию [57].

#### РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕМ СУБЪЕДИНИЦ Na,K-АТФазы

Полученные данные демонстрировали, что окисление тиоловых групп Na,K-АТФазы не может объяснить наблюдаемое значительное ингибирование фермента при гипоксии, поскольку даже полностью окисленный белок вследствие инкубации с высокими концентрациями перекиси водорода обладает активностью [4, 14, 15]. Тот факт, что индуцированное изменение уровня GSH в клетке существенно изменяет активность фермента [5], а при гипоксии редокс-статус клеток и соотношение GSH/GSSG меняется [6], позволил предположить, что глутатион может напрямую модифицировать Na, K-АТФазу. Субъединицы Na,К-АТФазы содержат тиоловые группы, а это значит, что при изменении редокс-статуса, в частности при окислительном стрессе, возможно S-глутатионилирование – образование смешанных дисульфидов между цистеинами белка и глутатионом. Возможные пути глутатионилирования белков подробно описаны в работах [9, 58]. В частности, глутатионилирование возможно при взаимодействии тиоловой группы белка с GSSG или при взаимодействии частично окисленной тиоловой группы с GSH [58]:

> $P-S^- + GSSG \rightarrow P-SSG + GS^-$ ,  $P-SOH + GSH \rightarrow P-SSG + H_2O$ .

Соответственно, развитие окислительного стресса, сопровождающееся ростом GSSG и окислением белков, будет приводить к индукции глутатионилирования [9, 58]. Эта модификация защищает тиоловые группы белков от необратимого окисления, а в некоторых случаях приводит к изменению функционирования белка. При нормализации редокс-условий в клетке равновесие смещается в сторону реакции деглутатионилирования, протекающей с участием специальных ферментов, таких как глутаредоксин [58]. Необходимо отметить, что глутаредоксин спосо-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

бен катализировать как реакцию глутатионилирования, так и деглутатионилирования в зависимости от уровня внутриклеточного НАДФ-Н.

Глутатионилирование α-субъединицы и его влияние на активность Na,К-АТФазы. α-Субъединица Na.K-АТФазы имеет около 23 остатков цистеина (23 в изоформах α1 и α2 и 24 – в α3-изоформе) [7]. Около 15 цистеинов локализованы в цитозоле и, таким образом, могут подвергаться редокс-зависимым модификациям. Было обнаружено, что α-субъединица Na.К-АТФазы подвергается глутатионилированию [48, 59]. На очищенном белке из солевых желез утки и почек кролика было показано, что инкубация Na, K-АТФазы с GSSG индуцирует увеличение глутатионилирования α1субъединицы и приводит к ингибированию фермента вплоть до полной его инактивации [48]. Уровень глутатионилирования В-субъединицы при этом не меняется. Инкубация с GSSG приводит к дозозависимому снижению активности фермента, развивающемуся во времени. Ингибирующее действие GSSG является бифазным: быстрое взаимодействие фермента с GSSG приводит к снижению активности на 80%, затем медленное взаимодействие приводит к полной инактивации белка. Для очищенного фермента из солевых желез утки и кролика величина IC<sub>50</sub> составляет около 60 мкМ [48]. Обработка сарколеммальной фракции гомогената сердца крысы GSSG также приводила к росту глутатионилирования α-субъединицы и ингибированию Na,K-АТФазы на 80% [48, 59]. При этом преинкубация сарколеммальной фракции со 100%-м кислородом в течение 30 мин или преинкубация очищенного белка в течение нескольких часов с 20% кислорода приводила к исчезновению чувствительности Na,K-АТФазы к действию GSSG, не влияя существенным образом на активность фермента [48]. Вероятно, это связано с окислением тиоловых групп белка и утрате их способности взаимодействовать с GSSG. Важно отметить, что ингибиторный эффект GSSG на сарколеммальную фракцию сердца значительно снижался при активации NO-синтаз [59]. Это может быть связано со глутатионилирования снижением тиоловых групп вследствие нитрозилирования. Инкубация очищенного фермента с восстановителем, например, дитиотреитолом снижает глутатионилирование α-субъединицы и восстанавливает активность фермента. Также деглутатионилирование и восстановление активности фермента достигается при инкубации с глутаредоксином и НАДФ-Н [48]. Индукция глутатионилирования α-субъединицы Na,K-АТФазы была продемонстрирована не только на очищенном белке из почек и солевых желез, но и на ряде клеточных линий, ткани сердца, мышечной ткани в разных видах животных: утке, кролике, свинье, мыши, крысе, слепыше и человеке [48, 55, 59-67]. Это свидетельствует

о том, что механизм глутатионилирования αсубъединицы является общим для различных органов и тканей в различных организмах.

В мышечных тканях кроме α1-субъединицы экспрессируется α2-субъединица, которая, будучи солокализована с Na/Ca-обменником, играет важную роль в регуляции мышечного сокращения [32, 68]. На ткани сердца и скелетных мышцах было показано, что глутатионилированию подвергается как α1-, так и α2-изоформа Na,К-АТФазы [48, 62–65]. При этом чувствительность α2-изоформы к глутатионилированию выше, чем чувствительность α1-изоформы [48]. На препарате из сердца крысы было показано, что концентрация GSSG, ингибирующая α2β-изофермент на 50%, в шесть раз ниже, чем концентрация, ингибирующая а1β-изофермент (*IC*<sub>50</sub> составляет около 44 и 265 мкМ соответственно) [48]. Это хорошо коррелирует с большей чувствительностью α2-изоформы к окислению [69]. Хотя число остатков цистеина в этих изоформах одинаково,  $\alpha 2$ -изоформа отличается от  $\alpha 1$  дополнительным цистеином в актуаторном домене (Cys 236) и отсутствием цистеина в нуклеотидсвязывающем домене (Cys 458). Ранее было высказано предположение [7], что большая чувствительность к окислению фермента с α2-изоформой по сравнению с α1-изоформой может быть следствием сдвига равновесия Е2-Е1 в сторону более открытой в цитозоль конформации Е1 [23]. Еще одной возможной причиной является разное окружение остатков цистеина в этих изоформах. Анализ двух ближайших аминокислот вблизи остатков цистеина в последовательности α1- и α2-изоформ показал, что для остатков Cys 206 и 579 в α2-изоформе по сравнению с α1-изоформой происходит замена незаряженных аминокислот на положительно заряженные, что может приводить к сдвигу рК тиоловых групп цистеинов и, следовательно, к их большей доступности для редокс-модификаций [8].

Возрастание уровня глутатионилирования α-субъединицы приводит к значительному снижению активности фермента, вплоть до его полного ингибирования [48]. Такое значительное изменение активности белков при глутатионилировании может наблюдаться в случае, если глутатионилирующийся остаток цистеина находится вблизи активного центра, как в случае с альдозоредуктазой [9, 70]. Было установлено, что причиной ингибирования Na,К-АТФазы является нарушение связывания адениновых нуклеотидов [48]. Вследствие этого преинкубация Na,К-АТФазы с GSSG нарушает дозозависимую активацию фермента АТФ. С другой стороны, преинкубация Na, К-АТФазы с возрастающими концентрациями АТФ приводит к дозозависимому снижению ингибирующего действия GSSG [48]. В присутствии высоких концентраций адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) ингибирование Na,K-АТФазы GSSG нарушается [48, 64]. Наиболее эффективным защитным действием обладал АТФ, поскольку меньшие его концентрации требовались для нивелирования эффекта ингибирования GSSG [64]. Это может объясняться тем, что связывание АТФ приводит к изменению конформации белка, в частности, к сближению фосфорилируемого и нуклеотидсвязывающего доменов, переводя фермент в Е1-закрытое состояние, что делает регуляторные цистеины недоступными для взаимодействия с GSSG [71].

Было высказано предположение, что основным регуляторным остатком является Cys452, находящийся вблизи участка связывания АТФ [48]. Согласно данным молекулярного моделирования, внесение отрицательного заряда вследствие глутатионилирования может нарушать связывание АТФ. Это также соответствовало данным масс-спектрометрии, согласно которым при инкубации с GSSG увеличивается уровень глутатионилирования остатков Cys454, 456, 459, локализованных в нуклеотидсвязывающем домене вблизи сайта связывания АТФ и Cys244, локализованного в малой цитозольной петле, формирующей актуаторный домен [48]. Однако эксперименты по точечному мутагенезу показали, что наиболее критичным для ингибирования активности при глутатионилировании являются вовсе не Cys454, 456, 459, а остаток Cys244 [60]. При замене этого остатка на аланин Na,К-АТФаза теряет способность ингибироваться при инкубации с GSSG. В настоящее время причина снижения активности при глутатионилировании Cys244 не совсем ясна. Остаток Cys244 может приближаться к АТФ-связывающему сайту, когда Na,К-АТФаза находится в Е2-конформации. В конформации Е2 АТФ связывается с белком с низким сродством и способствует уходу  $K^+$  [7]. Вероятно, глутатионилирование Cys244 нарушает данный процесс.

Эффективность глутатионилирования α-субъединицы зависит от конформации фермента, что связано с изменением доступности остатков цистеина [72]. Максимальное увеличение уровня глутатионилирования α-субъединицы при инкубации с GSSG наблюдается в случае, когда фермент находится в Е1-конформации. В Е2-конформации эффективность глутатионилирования снижается. Самая низкая эффективность глутатионилирования наблюдается в Е2Р- и Е2Р-уабаин-конформациях. Как было сказано выше, при изменении конформации меняется взаимное расположение цитозольных доменов. Так, согласно данным ограниченного трипсинолиза, в Е1 конформации большая и малая цитозольные петли находятся отдельно друг от друга, в то время как в Е2-конформации они приближены друг к другу [23]. Таким образом, можно было предпо-

ложить, что в Е1-конформации большая часть остатков цистеина доступна для модификации. Проведенный анализ существующих структур Na,К-АТФазы показал, что действительно в E1Pконформации количество доступных растворителю остатков цистеина максимально, в то время как в Е2Р- и Е2Р-уабаин-конформациях оно существенно ниже [72]. Таким образом, эффективность глутатионилирования коррелирует с количеством остатков цистеина, доступных растворителю [72]. Обнаруженная зависимость эффективности глутатионилирования от конформации фермента может пролить свет на роль лигандов и белков-партнеров во влиянии на редокс-модификацию тиоловых групп Na,K-АТФазы и регуляцию его активности. В частности, связывание уабаина будет снижать эффективность глутатионилирования фермента. Кроме того, смещение равновесия Е2-Е1 может быть причиной большей чувствительности к глутатионилированию тканеспецифичной α2-изоформы по сравнению с α1-изоформой.

Для того чтобы установить, как влияет глутатионилирование на конформацию фермента, был проведен анализ трипсинолиза α-субъединицы для ряда конформаций Na, K-ATPазы, глутатионилированной в различной степени [74]. Деглутатионилирование α-субъединицы приводит к увеличению скорости трипсинолиза для фермента в Е1- и Е2-конформациях. Дополнительное увеличение уровня глутатионилирования фермента в конформации Е2Р приводит к увеличению содержания более высокомолекулярных фрагментов по сравнению с нативным и деглутатионилированным препаратами. Другими словами, глутатионилирование уменьшает количество доступных сайтов для протеолиза по сравнению с неглутатионилированным белком. Это свидетельствует о том, что глутатионилирование влияет на конформацию фермента и его чувствительность к трипсинолизу [74]. Таким образом, можно предполагать, что глутатионилирование α-субъединицы вследствие влияния на конформацию Na,К-АТФазы может изменять ее взаимодействие с белками-партнерами.

Поскольку Na,K-ATФаза является редоксчувствительным ферментом, при исследовании ее свойств важно представлять, в каком состоянии находятся тиоловые группы белка. В одной из работ были охарактеризованы модификации остатков цистеина  $\alpha$ 1-субъединицы очищенного препарата Na,K-ATФазы из солевых желез утки [67]. Было установлено, что  $\alpha$ 1-субъединица Na,K-ATФазы содержит глутатионилированные, нитрозилированные и окисленные до SOH и SO<sub>2</sub>H остатки цистеина. Данные модификации были зарегистрированы как с помощью Вестернблоттинга, так и с помощью масс-спектрометрии. Инкубация с химическими восстановителями частично устраняла эти модификации, что приводило к незначительному увеличению активности фермента. В работе были использованы три химических восстановителя с различными стандартными редокс-потенциалами: трис(2-карбоксиэтил)фосфин, дитионит натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) и боргидрид натрия (NaBH<sub>4</sub>), которые имеют окислительно-восстановительные потенциалы -290 мВ, -416 мВ и -1024 мВ соответственно. Максимальную эффективность в снятии глутатионилирования, нитрозилирования и снижении уровня окисления продемонстрировал самый сильный восстановитель – боргидрид натрия. Только под действием этого восстановителя наблюдалось достоверное возрастание активности белка, однако оно составляло менее 20%. В то же время ферментативная система глутаредоксин/глутатионредуктаза деглутатионилировала нативную Na,K-АТФазу в меньшей степени, чем химические восстановители (на 20%), но, в отличие от них, приводила к значительному увеличению активности фермента (до 30%). Таким образом, ферментативная восстановительная система специфически влияет на глутатионилирование регуляторных остатков цистеина α1-субъединицы Na,К-АТФазы. На белке из почек кролика, обработанном восстановителями дититотретитолом, меркаптоэтанолом и трис(2-карбоксиэтил)фосфином, также было отмечено снижение исходного глутатионилирования белка и некоторое повышение активности [66]. Во всех случаях полное снятие глутатионилирования с нативного белка оказалось невозможным [66, 67].

Кроме регуляторного глутатионилирования αсубъединицы, которое влияет на активность фермента и может быть снято восстановителями, было обнаружено также базальное глутатионилирование. Это глутатионилирование не может быть удалено при обработке нативного белка восстановителями. Однако обработка восстановителями денатурированного белка приводит к деглутатионилированию [55]. Было высказано предположение, что связывание глутатиона с рядом остатков цистеина происходит в процессе синтеза белка, и в нативном белке данные остатки цистеина уже недоступны для модификации. Действительно, на клетках фибробластов мыши линии SC1 было показано, что длительная гипоксия в течение нескольких суток (72 ч) приводит к возрастанию уровня базального глутатионилирования Na,K-ATФазы, в то время как при острой гипоксии происходит увеличение только регуляторного глутатионилирования [55]. Тщательный анализ структур Na, K-АТФазы (PBD коды: 3В8Е, 3KDP, 3WGU, 3WGV, 4HYNT) показал, что вблизи некоторых остатков цистеина (Cys206-Cys244; Cys454–Cys458–Cys459; Cys700–Cys369; Cys601) имеются полости с неразрешенной электронной плотностью [55]. Они не могут быть объяснены

присутствием воды и по размеру соответствуют молекуле глутатиона. Глутатионилированные остатки белков часто регистрируют с помощью масс-спектроскопии, однако детекция глутатионилированных белков в кристаллических структурах очень редка. Впервые подход по обнаружению глутатионилированных остатков цистеина с помощью анализа неразрешенной электронной плотности вблизи остатков цистеина в структуре белка (митохондриального АВС транспортера) был описан в работе [74]. Анализ структур α-субъединицы Na,K-АТФазы показал, что в полости с неразрешенной плотностью направлены тиоловые группы двух остатков цистеинов, при этом глутатион может быть связан только с одним из них [55]. Дисульфидные связи в α-субъединице не обнаружены [55]. Анализ первичной последовательности вблизи цистеиновых групп белков показал, что, действительно, только в ближайшей окрестности одного из цистеинов имеются положительно заряженные аминокислотные остатки, смещающие рК тиоловой группы, что увеличивает способность данного цистеина глутатионилироваться. В паре Cys204-Cys242 это Cys204, в паре Cys367-Cys698 - Cys698; в паре Cys452-Cys456 - Cys456. Было высказано предположение, что базальное глутатионилирование, происходящее в момент синтеза белка, может лежать в основе так называемой редокс-памяти, обуславливая изменение свойств белка, синтезированного в измененных редокс-условиях. Вероятно, базальное глутатионилирование Na,K-АТФазы является котрансляционной модификацией, изменяющей свойства белка для адаптации к длительному изменению редокс-условий [55]. Данный аспект редокс-регуляции белков еще предстоит изучить.

Глутатионилирование β-субъединицы и его влияние на активность Na,К-АТФазы. У β-субъединицы есть только один восстановленный остаток цистеина, который может подвергаться редоксмодификациям, в частности, глутатионилированию – Cys46. В отличие от α-субъединицы инкубация фермента с GSSG не приводит к изменению уровня глутатионилирования В-субъединицы, что было показано на очищенных препаратах белка из солевых желез утки [48]. Впервые глутатионилирование β1-субъединицы было обнаружено в ткани сердца кролика [56]. Увеличение уровня глутатионилирования β1-субъединицы наблюдалось под действием пероксинитрита (ONOO-), перекиси водорода, параквата и активации НАДФ-Н-оксидазы ангиотензином II [56]. Преинкубация с супероксиддисмутазой приводила к снижению глутатионилирования индуцированного паракватом или активацией НАДФ-Ноксидазы. Таким образом, образование супероксид-анион-радикала вовлечено в индукцию глутатионилирования β-субъединицы. Увеличение

глутатионилирования β-субъединицы под действием ONOO- наблюдалось также на очищенном белке из почек свиньи [56]. Инкубация с дитиотреитолом приводила к существенному снижению уровня глутатионилирования. Интересно отметить, что в присутствии ингибитора NO-синтаз (L-NAME) общий уровень глутатионилирования был ниже и не возрастал под действием ангиотензина [56]. Позже глутатионилирование β-субъединицы было показано не только для сердечной мышцы, но и для скелетных мышц и гладкой мускулатуры [62, 63, 75]. В отличие от глутатионилирования α-субъединицы, индукция глутатионилирования Cys46 приводит лишь к частичному ингибированию фермента, его активность снижается на 20% [56].

Предполагают, что эффект ингибирования Na,K-ATФазы связан с нарушением взаимодействия между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами [56], поскольку в результате глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы снижается коиммунопреципитация этих субъединиц. К сожалению, в ряде случаев регистрация глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы не сопровождалась оценкой глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы, поэтому вычленить вклад глутатионилирования каждой из субъединиц сложно [75]. Глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы замедляет скорость перехода E1–E2P и скорость перехода E2–E1–E2P [56].

Необходимо отметить, что Cys46 находится вблизи мембраны и заглублен в нее в случае 2К+-Е2Р-конформации [76]. На очищенном белке из почек свиньи было показано, что данный остаток доступен для глутатионилирования в E1ATP- и E1Na(3)-конформации [77]. Так, для фермента в Е1АТР-конформации уровень глутатионилированной β-субъединицы почти в десять раз выше, чем в Е2-конформации, а для Е1-Na(3)-конформации в два с половиной раза выше, чем в Е2-конформации. При этом разницы между глутатионилированием в Е2- и Е2К-конформациях не наблюдалось. Кроме того, инкубация белка с ОNОО- приводила к существенному возрастанию глутатионилирования в Е1конформации (более чем в два раза), но не меняла глутатионилирования белка, находящегося в Е2-конформации [77]. Наблюдаемые эффекты связаны с тем, что Cys46 в Е2-конформации практически недоступен. При этом ингибирование активности при инкубации белка с ОNOOи GSH также наблюдалось гораздо более существенное, если белок находился в E1Na(3)-, а не в Е2-конформации. Данный эффект наблюдался как на очищенном белке из почек свиньи, так и на кардиомиоцитах свиньи, однако характер ингибирования различался вследствие того, что в кардиомиоцитах кроме β1-субъединицы присутствует нечувствительная к глутатионилированию β2-субъединица [77]. Преинкубация кар-

диомиоцитов с уабаином, который фиксирует фермент в Е2Р-конформации, предотвращает глутатионилирование индуцированное ONOO-[77]. Таким образом, присутствие уабаина снижает уровень глутатионилирования β-субъединицы при окислительном стрессе. В то время как глутатионилирование β1-субъединицы в конформации Е2 минимально, коиммунопреципитация β1- и α-субъединицы, напротив, выше в Е2-конформации. Глутаредоксин, снижая глутатионилирование β-субъединицы, повышает коиммунопреципитацию α- и β-субъединиц. Полученные данные свидетельствуют о том, что глутатионилирование β-субъединицы нарушает ее взаимодействие с α-субъединицей [77]. С другой стороны, доступность Cys46 может возрастать при нарушении взаимодействия между α-и β- субъединицами [78].

Трансмембранные домены изоформ β-субъединицы β2 и β3 имеют не очень высокую гомологию с β1 (от 57 до 61%) [79] и, вероятно, вследствие этого изоформы β2 и β3 не способны глутатионилироваться. Предполагают, что Cys46 в данных изоформах недоступен для модификаций [56].

Глутатионилирование FXYD-субъединицы и его влияние на активность Na, K-ATФазы. Хотя функциональный мономер Na,K-ATФазы состоит из α- и β-субъединиц, третья субъединица из семейства FXYD-белков может связываться с ферментом и влиять на его активность. Семейство FXYD содержит около семи небольших трансмембранных белков, которые могут модулировать активность Na,К-АТФазы. Эти белки в зависимости от изоформы содержат от одного до двух цистеинов, которые могут быть доступны для глутатионилирования. Впервые глутатионилирование было показано для субъединицы FXYD1, экспрессирующейся в сердце и известной как фосфолемман [57]. Глутатионилирование FXYD1 облегчает деглутатионилирование β1-субъединицы и таким образом обращает окислительное ингибирование Na,К-АТФазы. Субъединица FXYD содержит два остатка цистеина (Cys40 и Cys42 у FXYD1 человека). С помощью точечного мутагенеза было показано, что FXYD1 подвергается глутатионилированию по остатку Cys42 [57]. Подверженность данного остатка глутатионилированию обусловлена тем, что остаток Cys42, в отличие от Cys40, имеет в своем окружении положительно заряженные аминокислоты [57]. Суѕ42 в FXYD1 и FXYD7 фланкирован остатками аргинина и лизина. Изоформа FXYD2, в которой Cys42 фланкирован не двумя, а одной положительно заряженной аминокислотой, обладает меньшей способностью глутатионилироваться и вследствие этого не способна снижать глутатионилирование β1субъединицы. Введение второго положительно заряженного остатка рядом с цистеином восстанавливает реакционную способность данного остатка цистеина. И, наоборот, замена положительно заряженного остатка на глицин в FXYD1 лишает его описанной функции. Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что положительно заряженные аминокислотные остатки в ближайшем окружении остатка цистеина, сдвигая рК тиоловой группы, повышают эффективность глутатионилирования [80]. Уровень глутатионилирования FXYD возрастает при инкубации с ONOO<sup>-</sup>. Инкубация с дитиотреиолом снимает глутатионилирование. Активатор аденилатциклазы форсколин, индуцирующий увеличение глутатионилирования β1-субъединицы [81], приводит также к возрастанию глутатионилирования FXYD1 [57]. Супероксиддисмутаза предотвращает индукцию глутатионилирования, вызванную форсколином, что еще раз подтверждает важность супероксид-анион-радикала в процессе индукции глутатионилирования.

Инкубация кардиомиоцитов с ангиотензинном II приводит к возрастанию уровня глутатионилирования FXYD1. Также увеличение глутатионилирования было обнаружено в зоне инфаркта. Было установлено, что глутатионилирование и ингибирование  $\beta$ 1 может быть обращено добавлением FXYD3. Однако мутантная безцистеиновая форма FXYD не оказывает подобного действия. В сердцах FXYD-/-мышей уровень глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы был повышен. Таким образом, предполагают, что FXYD играет важную роль в деглутатионилировании  $\beta$ 1-субъединицы, восстанавливая ее активность, и, следовательно, вовлечена в динамическую регуляцию активности Na,K-АТФазы.

Установлено, что глутатионилирование субъединицы FXYD влияет на ее взаимодействие с αи β-субъединицами, которое было оценено с помощью коиммунопреципитации. Возрастание уровня глутатионилирования FXYD вследствие инкубации с ангиотензином или в зоне инфаркта приводит к снижению взаимодействия FXYD с а-субъединицей, тогда как взаимодействие FXYD с β-субъединицей возрастает [75]. До настоящего времени не ясен механизм деглутатионилирования В-субъединицы в присутствии FXYD. Это может происходить как вследствие реакции тиол-дисульфидного обмена между этими субъединицами, так и вследствие того, что глутатионилированная FXYD-субъединица, которая сильнее взаимодействует с β-субъединицей, предотвращает ее глутатионилирование. Анализ структур показывает, что способные глутатионилироваться остатки цистеина β-субъединицы и FXYD расположены далеко, что делает невозможным прямой тиол-дисульфидный обмен [75]. Необходимо отметить, что в отношении фосфолеммана (FXYD1), присоединение которого регулирует активность Na,K-АТФазы в сердце, су-

ществуют противоречивые данные о роли влияния его модификаций, фосфорилирования, пальмитоилирования (присоединение пальмитиновой кислоты) и глутатионилирования в условиях окислительного стресса на активность Na,K-ATФазы [82], которые в настоящее время пока не решены.

Итак, все три изоформы Na,К-АТФазы могут подвергаться глутатионилированию. При этом максимальное изменение активности, вплоть до полного ингибирования, наблюдается в случае αсубъединицы за счет нарушения связывания АТФ. Глутатионилирование β-субъединицы приводит к ингибированию фермента на 20% вследствие нарушения взаимодействия α- и β-субъединиц. Как для α-, так и для β-субъединицы максимальная эффективность глутатионилирования наблюдается для белка в Е1-конформации, снижаясь в Е2- и Е2Р-конформациях. Связывание уабаина с ферментом, фиксирующее Na,K-АТФазу в Е2Р-конформации, приводит к резкому снижению способности к глутатионилированию α- и β-субъединиц. Необходимо отметить, что в случае α-субъединицы глутатионилированию подвержены не только повсеместно распространенная α1-, но и тканеспецифичная α2-изоформа, тогда как в случае только одна из трех изо- $\phi$ орм —  $\beta$ 1, а в случае с FXYD только некоторые из изоформ, в частности FXYD1 и FXYD7.

#### РОЛЬ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ И НИТРОЗИЛИРОВАНИЯ СУБЪЕДИНИЦ Na,K-АТФазы В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Изменение уровня глутатионилирования Na, K-ATФазы может являться причиной изменения активности фермента при патологиях, сопровождающихся нарушением редокс-статуса.

Роль глутатионилирования и нитрозилирования α-субъединицы в регуляции активности Na,К-АТФазы при гипоксии и ишемии. Ингибирование Na, K-ATФазы является одним из самых ранних и критичных ответов клеток на гипоксию [6, 8, 48, 59, 83]. Как было описано ранее, оно наблюдается в самых разных тканях. Ингибирование Na,К-АТФазы приводит к быстрой диссипации градиента Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> и гибели клетки. Однако, с другой стороны, ингибирование Na,К-АТФазы начинается существенно раньше, чем развивается значительный окислительный стресс, и не может быть объяснено просто необратимым окислением остатков цистеина фермента [8]. Обнаружено, что ключевым фактором, приводящим к ингибированию фермента при гипоксии, является глутатионилирование каталитической α-субъединицы фермента [48]. Этот эффект был обнаружен в гомогенате сердца крысы [48, 59] и затем показан в

культуре клеток фибробластов мыши линии SC1 [61]. При гипоксии происходит снижение продукции NO, развитие окислительного стресса и рост GSSG [48, 59]. Так, было показано, что в ткани сердца при гипоксии происходит смещение баланса GSH/GSSG в сторону GSSG [48], и редокс-потенциал пары GSH/GSSG сдвигается в более окисленную область [59]. Это приводит к снижению нитрозилирования и росту глутатионилирования α-субъединицы Na,К-АТФазы [48, 59]. Возрастание уровня глутатионилирования и ингибирование фермента наблюдаются как при гипоксии на изолированном сердце [48, 59], так и при инкубации животного в гипоксийной камере [59]. Также S-глутатионилирование а1-субъединицы Na,K-АТФазы наблюдалось в клетках фибробластов мыши линии SC1 при их инкубации в течение трех с половиной часов в условиях гипоксии (0.2% pO<sub>2</sub> и 0.05% pO<sub>2</sub>) [55, 61].

Поскольку снижение уровня АТФ увеличивает эффективность глутатионилирования [64], то в этом случае процесс глутатионилирования α-субъединицы должен протекать существенно быстрее. Было высказано предположение, что глутатионилирование α-субъединицы Na,К-АТФазы, приводящее к ее ингибированию, является одним из этапов адаптации, позволяющим предотвратить истощение клеток по АТФ [8, 48] в первые минуты гипоксии. Доля АТФ, которая расходуется на поддержание работы Na,K-АТФазы, довольно существенна – от 20% внутриклеточных запасов в мышечной ткани до 80% в головном мозге [84]. Действительно, замена в α-субъединице регуляторных остатков цистеина на аланин предотвращает ингибирование фермента окисленным глутатионом и приводит к снижению жизнеспособности клеток НЕК293, экспрессирующих данный белок, в условиях гипоксии (1% O<sub>2</sub>, 24 ч) [60]. Как было сказано выше, наиболее критичным остатком, глутатионилирование которого приводит к существенному снижению активности, является Cys244 [60]. Кроме того, было установлено, что инкубация клеток SC1 с веществами, индуцирующими глутатионилирование Na,K-ATФазы, приводит к лучшей выживаемости клеток в условиях гипоксии и препятствует существенному снижению АТФ [61].

Схема редокс-регуляции активности Na,K-АТФазы вследствие модификации регуляторных остатков цистеина α-субъединицы приведена на рис. 1. Фермент находится в динамическом равновесии между различными состояниями. Его максимальная активность наблюдается в определенных редокс-условиях. В полностью активном ферменте регуляторные остатки цистеина не модифицированы. Окислительный стресс, в том числе вызванный гипоксией, приводит к окислению SH-групп регуляторных цистеинов до SOH и последующему глутатионилированию вследствие



**Рис. 1.** Редокс-регуляция активности Na,K-ATФазы вследствие модификации остатков цистеина α-субъединицы. На схеме отмечены регуляторные остатки цистеина α-субъединицы. В полностью активном ферменте они не модифицированы. Окислительный стресс, в том числе вызванный гипоксией, приводит к окислению SH-групп регуляторных остатков цистеина до SOH и последующему глутатионилированию вследствие их взаимодействия с GSH или к глутатионилированию вследствие их взаимодействия с GSH или к глутатионилированию SH-групп вследствие реакции тиол-дисульфидного обмена с GSSG, уровень которого возрастает. Истощение по ATФ усиливает эффективность глутатионилирования. Главную роль в ингибировании фермента играет глутатионилирование остатка Cys244 (выделено штриховкой). В результате нарушается связывание ATΦ. Ингибирование вследствие глутатионилирования регуляторных цистеинов обратимо при восстановлении нормальных редокс-условий, реакция деглутатионилирования может катализироваться, в частности, глутаредоксином (GRX). В случае сильного окислительного стресса тиоловые группы не успевают глутатионилироваться и возможно их необратимое окисление до SO<sub>2</sub>H и SO<sub>3</sub>H. Фермент с необратимо окисленными группами подвергается деградации.

их взаимодействия с GSH или к глутатионилированию SH-групп вследствие реакции тиол-дисульфидного обмена с GSSG, уровень которого возрастает. Истощение по АТФ усиливает эффективность глутатионилирования. Глутатионилирование защищает тиоловые группы белка от необратимого окисления. При этом глутатионилирование регуляторного остатка Cys244 приводит к нарушению связывания АТФ и инактивации фермента. Однако эта инактивация обратима при восстановлении нормальных редокс-условий. В частности, реакция деглутатионилирования может катализироваться глутаредоксином. В том случае, если окислительный стресс сильный и тиоловые группы не успевают глутатионилироваться, возможно их необратимое окисление до SO<sub>2</sub>H и SO<sub>3</sub>H. Фермент с необратимо окисленными группами подвергается деградации (рис. 1).

Было обнаружено, что инкубация клеток с веществами, индуцирующими глутатионилирование α-субъединицы Na,K-АТФазы, – проникающим аналогом глутатиона этилглутатионом, нитрозоглутатионом, N-ацетилцистеином приводят

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

к снижению повреждения фибробластов мыши линии SC1 при гипоксии [61]. На кардиомиоцитах из сердца крысы было показано, что данные вещества, в особенности этилглутатион и нитрозоглутатион, способны снижать повреждающее действие гипоксии и существенно увеличивать время нормальной сократимости клеток [65]. Наибольшим защитным эффектом обладал нитрозоглутатион, который не только увеличивал время сократимости клеток, сохраняя форму Ca<sup>2+</sup>-пика близкой к нормальной, но и более чем на треть ускорял восстановление нормальной сократительной функции сердца [65]. Тканеспецифичная α2-субъединица более важна для регуляции уровня кальция и сократимости кардиомиоцитов, чем конститутивная α1-субъединица, которая осуществляет контроль транспорта Na<sup>+</sup> и К<sup>+</sup> [68, 85, 86]. Оказалось, что инкубация кардиомиоцитов с нитрозоглутатионом приводит к увеличению уровня глутатионилирования α2-субъединицы, не изменяя глутатионилирование α1 [65]. Это соответствует полученным ранее данным о том, что α2-изоформа сердца крысы более

чувствительна к глутатионилированию, чем  $\alpha 1$  [48]. Предполагают, что специфические ингибиторы  $\alpha 2$  способны индуцировать положительный ионотропный эффект, не вызывая перегрузку кардиомиоцитов по Ca<sup>2+</sup> и аритмию [85]. По-видимому, в определенных концентрациях нитрозоглутатион может работать как селективный ингибитор  $\alpha 2$  в кардиомиоцитах [65]. Однако пока непонятно, опосредовано ли защитное действие нитрозоглутатиона при гипоксии только глутатионилированием  $\alpha 2$ -субъединицы или в это вовлечены и другие механизмы.

Регуляция активности Na, K-АТФазы при гипоксии тесно связана с изменением редокс-статуса, а также уровнем глутатионилирования и нитрозилирования белка. Важно отметить, что гипоксия изолированного сердца крысы приводит не только к повышению уровня глутатионилирования α-субъединицы [48, 59], но и снижению уровня ее нитрозилирования [59]. Подробно это было исследовано на модели изолированного сердца крысы. При гипоксии редокс-потенциал, обусловленный парой GSH/GSSG, сдвигается в более окисленную область. Так, в гомогенате сердца крысы он изменяется от -266 мВ (при 20% pO<sub>2</sub>) до -256 мВ (при 5% pO<sub>2</sub>). При этом производство NO в условиях гипоксии снижается [59]. Это связано с тем, что NO-синтазы обладают низким сродством к кислороду [7]. В результате уровень нитрозилирования α-субъединицы Na,К-АТФазы снижается, а уровень глутатионилирования возрастает. В присутствии ингибитора NOсинтаз (L-NAME) уровень NO снижается, и сдвиг редокс-потенциала в окисленную область происходит даже в условиях нормоксии. Уровень NO в нормоксии и гипоксии в присутствии этого ингибитора не отличается [59]. В результате в присутствии ингибитора NO-синтаз уровень нитрозилирования α-субъединицы снижается в условиях нормоксии и в условиях гипоксии уже не меняется, при этом уровень глутатионилирования в нормоксии возрастает, а в гипоксии нет [59]. На гранулярных клетках мозжечка крыс было показано, что активность Na,К-АТФазы максимальна при физиологическом содержании кислорода (3-5%)  $pO_2$ ), снижаясь при гипоксии и гипероксии. При этом L-NAME приводит к исчезновению максимума активности Na,К-АТФазы при физиологических концентрациях кислорода [6], а активация NO-синтаз существенно снижает ингибирование, индуцируемое GSSG [59]. Очевидно, кислород-индуцированная регуляция Na,K-АТФазы опосредована переключением между глутатионилированием и нитрозилированием регуляторных тиоловых групп, локализованных на каталитической α-субъединице фермента [59]. Таким образом, нитрозилирование и глутатионилирование – две конкурирующие редокс-модификации α-субъединицы, и изменение их уровня определяет активность Na,K-АТФазы. Регуляторное глутатионилирование — механизм адаптации клеток к окислительному стрессу и гипоксии.

У ряда животных, способных переживать гипоксию, процесс диссипации градиента Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> сильно замедлен за счет того, что при ингибировании Na, K-АТФазы реализуется закрытие ионных каналов, так называемый «канальный арест» [87]. При этом деятельность животного прекращается [88–91]. Отмечалось, что способность к выживанию в условиях гипоксии сохраняется даже в срезах ткани мозга гибернирующих животных, а уабаин ее повышает [92]. Кроме того, есть устойчивые к гипоксии виды, такие как черепаха, а также ведущие подземный образ жизни животные: голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) и слепыш (Spalax mole rate), которые способны быть активными при гипоксии. В условиях пониженного кислорода у этих животных, в отличие от крыс, не наблюдается ингибирования Na,K-АТФазы. Было показано, что при критичном  $pO_2$ слепыши (Spalax judaei и Spalax galili) по крайней мере в течение 20 мин способны поддерживать редокс-статус клеток достаточно восстановленным для того, чтобы Na,K-ATФаза не ингибировалась [59]. Интересно отметить, что у слепышей локализация остатков цистеина такая же, как и у крысы, и они тоже способны подвергаться глутатионилированию. Так, при инкубации с GSSG гомогената сердечной ткани слепышей происходит индукция глутатионилирования Na, K-ATФазы и ингибирование фермента [59]. Таким образом, у этого вида гипоксийно устойчивых животных присутствуют регуляторные остатки цистеина, которые, по-видимому, достаточно консервативны.

Роль глутатионилирования α-субъединицы в регуляции активности Na,К-АТФазы при болезни Альцгеймера. К изменению уровня глутатионилирования α-субъединицы Na,K-АТФазы могут приводить патологии, сопровождающиеся изменением редокс-статуса. Так, например, на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера происходит нарушение редокс-статуса нейрональных клеток, в частности, снижение содержания GSH [93-95]. При этом активность Na,K-АТФазы в этих клетках снижается [96-99]. Восстановление уровня глутатиона даже рассматривают в качестве возможной стратегии терапии при болезни Альцгеймера [95]. Было установлено, что патогенный пептид бета-амилоид (Аβ) способен непосредственно взаимодействовать с Na, K-АТФазой и ингибировать ее активность в течение 30-60 мин инкубации [99, 100]. Это быстрое ингибирование не связано с его проникновением в клетку [100]. Однако при более длительных временах инкубации необходимо также учитывать возможное ингибирование Na, K-АТФазы в результате измене-

ния редокс-статуса клеток под действием Аβпептида. Было показано, что инкубация клеток нейробластомы человека SH-SY-5Y в течение 24 ч с Аβ-пептидом приводит к существенному снижению уровня восстановленного глутатиона, изменению соотношения GSH/GSSG и индукции глутатионилирования α-субъединицы Na,K-АТФазы [101]. Таким образом, увеличение уровня глутатионилирования Na,K-ATФазы является одной из причин снижения активности фермента, наблюдаемого на ранних этапах развития болезни Альцгеймера [101]. В связи с этим становится ясна причина неудачной попытки восстановить активность Na, К-АТФазы в клетках мозга, подверженных действию Аβ-пептида, глутатионом и его синтетическими аналогами [98], наоборот, под действием этих веществ активность Na,K-АТФазы еще более снижалась. Повидимому, это связано с тем, что происходило еще большее увеличение глутатионилирования Na,K-АТФазы. В пользу этого свидетельствует тот факт, что проникающий аналог глутатиона (этилглутатион) приводит к ингибированию Na,K-АТФазы в нейрональных клетках [5], и при инкубации клеток с этилглутатионом и нитрозоглутатионом глутатионилирование α-субъединицы Na, K-АТФазы возрастает [61]. Таким образом, необходимо тщательно подбирать соединения и их рабочий диапазон концентраций для восстановления нормального редокс-статуса клеток при болезни Альцгеймера. Просто загрузка клеток глутатионом в условиях окислительного стресса может лишь увеличить уровень глутатионилирования белков. Можно предложить использовать для восстановления редокс-статуса клеток более сильные восстановители, такие как НАДФ-Н [101]. В последнее время появляется все больше свидетельств того, что изменение уровня нитрозилирования и глутатионилирования белков является важным аспектом патогенеза болезни Альцгеймера [102]. Можно надеяться, что вскоре появятся способы для нормализации редокс-статуса клеток и восстановления нормального функционирования белков при патологии.

Роль глутатионилирования Na,K-АТФазы в разных типах мышц. Глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы наблюдается не только в сердечной мышце, но и в других типах мышц. В окислительных мышечных волокнах скелетных мышц уровень глутатионилировнаия  $\alpha$ -субъединицы почти в два раза выше, чем в гликолитических мышечных волокнах [62]. При этом отмечено, что базальный уровень глутатионилирования  $\beta$ 1-субъединицы в обоих типах мышц выше, чем  $\alpha$ -субъединицы. Дитиотреитол снижает глутатионилирование и приводит к возрастанию активности фермента. Инкубация с GSSG приводит к возрастанию глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы как в окислительных, так и в гликолитических

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

типах волокон, при этом для β1-субъединицы в окислительных волокнах достоверного возрастания не наблюдается, но оно наблюдается для β2субъединицы в гликолитических волокнах [62]. Необходимо отметить, что ранее считалось, что β2-субъединица глутатионилироваться неспособна [77]. Хотя и в окислительных, и в гликолитических волокнах GSSG вследствие глутатионилирования Na, K-ATФазы приводит к ингибированию фермента, наибольшее ингибирование наблюдается в окислительных волокнах. Таким образом, предполагают, что глутатионилирование играет роль в регуляции работы Na, K-ATФазы в скелетных мышцах. В частности, глутатионилирование, индуцированное окислительным стрессом, особенно важно при длительной нагрузке. Было показано, что при физической нагрузке и β2-адренергической стимуляции в мышцах человека возрастает уровень глутатионилирования β1-субъединицы, тогда как уровень глутатионилирования α-субъединицы практически не меняется [63]. Таким образом, глутатионилирование способствует комплексной регуляции Na,К-АТФазной функции в скелетных мышцах человека. В частности, глутатионилирование Na,К-АТФазы может объяснить снижение максимальной активности Na,K-АТФазы после физической нагрузки, которое может быть вовлечено в развитие мышечной усталости [63].

Роль глутатионилирования В-субъединицы в регуляции активности Na,K-АТФазы в норме и патологии. В настоящее время описано несколько физиологических факторов, приводящих к изменению глутатионилирования β-субъединицы. Как было сказано выше, увеличение глутатионилирования β-субъединицы приводит к снижению активности Na,K-АТФазы, которое, однако, менее выражено, чем при глутатионилировании α-субъединицы и составляет около 20% [56]. Условия, в которых наблюдают возрастание глутатионилирования α-и β-субъединиц, различаются [48, 56, 59, 63]. Увеличение уровня глутатионилирования В-субъединицы наблюдали при стимуляции НАДФ-Н-оксидазы, которая может быть вызвана фосфорилированием субъединицы НАДФ-Н-оксидазы протеинкиназой С вследствие активации β1/β2-адренорецепторов или обработки миокарда ангиотензином II. Более того, увеличение глутатионилирования β-субъединицы наблюдалось в зоне инфаркта сердца овцы [56]. Похожий эффект достигается экспонированием кардиомиоциоцитов с активатором аденилатциклазы форсколином и последующей активацией протеинкиназой С [81] или прямой обработкой кардиомитоцитов пероксинитритом (ONOO<sup>-</sup>) [56]. Обработка гладкомышечных клеток сосудов нитрозоглутатионом также приводит к возрастанию глутатионилирования Снижение уровня супероксид-анион-радикала  $(O_2^{-})$  с помощью супероксиддисмутазы предотвращает

глутатионилирование β-субъединицы. Также предотвратить глутатионилирование позволяет стимуляция гуанилатциклазы, поскольку это мешает фосфорилированию и активации НАДФ-Ноксидазы [103]. Механизм индукции глутатионилирования β-субъединицы при обработке клеток ангиотензином был изучен достаточно подробно. Ангиотензин II активирует адренорецептор, что приводит к активации протеинкиназы С и фосфорилированию р47<sup>phox</sup>-субъединицы НАДФ-Н-оксидазы. В результате происходит транслокация р47<sup>phox</sup>, приводящая к активации НАДФ-Н-оксидазы и образованию  $O_2^{,-}$ . Взаимодействие  $O_2^{,-}$  с NO приводит к образованию пероксинитрита и индуцирует глутатионилирование [81]. Стимуляция гуанилатциклазы индуцирует осуществляемое фосфатазой РР2А-зависимое дефосфорилирование р47<sup>phox</sup>, препятствует активации НАДФ-Н оксидазы и нарушает глутатионилирование β1-субъединицы [103]. Этот сдвиг в сторону деглутатионилирования может приводить к активации Na,K-АТФазы. Также было показано, что ангиотензин ингибирует Na,K-АТФазу в гладкомышечных клетках легочной артерии путем индукции глутатионилирования β-субъединицы [104].

В отличие от активации  $\beta 1/\beta 2$ -адренорецепторов активация  $\beta 3$ -адренорецептора, напротив, снижает S-глутатионилирование  $\beta 1$ -субъединицы [104] и приводит к активации Na,K-ATФазы [105]. В мышах с делецией  $\beta 3$ -адренорецептора отмечается повышенный уровень окислительного стресса и возрастание глутатионилирования  $\beta 1$ -субъединицы. Ингибирование NO-синтазы снимает этот эффект [105]. Необходимо отметить, что сверхэкспрессия  $\beta 3$ -адренорецептора наблюдается при нарушении функции миокарда [106]. Можно предполагать, что она является компенсаторным механизмом. Об этом же свидетельствуют данные, полученные при гипергликемии.

Гипергликемия, индуцированная в организме кролика блокадой инсулинового рецептора, приводит к активации НАДФ-Н-оксидазы [107]. При активации НАДФ-Н-оксидазы происходит глутатионилирование эндотелиальных NO-синтаз, в результате чего в большей степени генерируется  $O_2^{,-}$ , чем NO [107]. Возрастание  $O_2^{,-}$  приводит к увеличению уровня глутатионилирования 81-субъединицы и ингибированию Na,K-ATФазы в кардиомиоцитах [107]. При этом активация β3-адренорецептора с помощью обработки агонистом снижает уровень окислительного стресса, вызванного гипергликемией. Это происходит в результате восстановления работы эндотелиальных NO-синтаз, возможно, за счет его связывания с белком теплового шока Hsp90, и синтезируемый NO снижает активацию НАДФ-Н оксидазы через канонический гуанилатциклазный путь, приводящий к дефосфорилированию p47<sup>phox</sup> и ее диссоциации от мембранных субъединиц. В результате предотвращается глутатионилирование β1-субъединицы и вызванное этим ингибирование Na,K-ATФазы [107]. Таким образом, сверхэкспрессия β3-адренорецептора, наблюдаемая в сердце крыс с диабетом [108], возможно, играет важную компенсаторную роль и позволяет снизить уровень окислительного стресса и вызванное этим ингибирование Na,K-ATФазы.

Подводя итог вышесказанному, можно предложить следующую схему регуляции глутатионилирования β-субъединицы и субъединицы семейства FXYD (рис. 2). Физиологические стимулы, приводящие к активации НАДФ-Ноксидазы (ангеотинезин II, активация β1/β2-адренорецепторов, гипергликемия), приводят к росту супероксид-анион-радикала, образованию пероксинитрита и индукции глутатионилирования β-субъединицы. В результате нарушается взаимодействие α- и β-субъединиц и снижается транспортная активность фермента. Повидимому, образование ONOO- важно для глутатионилирования β-субъединицы, поскольку в присутствии супероксиддисмутазы или ингибитора NO-синтаз, а также ловушки ONOO- глутатионилирование снижается. Глутатионилирование возрастает также при непосредственной обработке клеток ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или нитрозоглутатионом. В присутствии FXYD1 под действием вышеописанных стимулов происходит индукция ее глутатионилирования, что затрудняет глутатионилирование β-субъединицы и предотвращает ингибирование фермента. Обработка восстановителями или восстановление нормальных редокс-условий приводят к деглутатионилированию данных субъединиц. Эта реакция катализируется глутаредоксином (рис. 2).

Таким образом, глутатионилирование всех трех субъединиц вовлечено в редокс-регуляцию активности Na,K-АТФазы. В зависимости от условий и физиологических стимулов каждое из них играет свою роль, что обеспечивает регуляцию активности Na,K-АТФазы и адаптационный ответ клеток.

#### РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ Na,K-АТФазы

Na,K-ATФаза является единственным известным рецептором к эндогенным KTC [16–20], которые были впервые выделены из растений более 200 лет назад и издавна применялись для лечения хронической сердечной недостаточности. Несмотря на достаточно низкий терапевтический индекс вследствие близости терапевтических и токсичных доз, некоторые KTC, например дигоксин, до сих пор активно используются в терапии



**Рис. 2.** Редокс-регуляция активности Na,K-ATФазы вследствие модификации остатков цистеина  $\beta$ -субъединицы и FXYD1. Физиологические стимулы, приводящие к активации HAДФ-H-оксидазы (ангеотинезин II (Aнг. II), активация  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-адренорецепторов ( $\beta$ 1/ $\beta$ 2-AP), гипергликемия) приводят к росту супероксид-анион-радикала ( $O_2^-$ ), образованию пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>) и индукции глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы. В результате нарушается взаимодействие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и снижается транспортная активность фермента. Обработка клеток ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или нитрозоглутатионом (GSNO) также приводит к индукции глутатионилирования. В присутствии третьей субъединицы FXYD1 под действие данных стимулов в первую очередь происходит индукция ее глутатионилирования, что затрудняет глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы и предотвращает ингибирование фермента. Обработка восстановителями, такими как дитиотреитол (ДТТ), или восстановление нормальных редокс-условий при катализе глутаредоксином (GRX), приводят к деглутатионилированию с убъединицы.

[109]. Связывание КТС с внеклеточной частью  $\alpha$ субъединицы приводит к фиксации фермента в E2P-конформации и останавливает его каталитический цикл. Лечебное действие КТС основано на том, что ингибирование Na,K-АТФазы сердца приводит к возрастанию уровня натрия, что вызывает активацию Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обменника, возрастанию уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и в конечном итоге к увеличению силы сердечных сокращений [109]. В настоящее время понятно, что КТС не только ингибируют Na,K-АТФазу, но и вызывают активацию целого ряда сигнальных каскадов [17, 110].

Изначально КТС были найдены в растениях и на коже некоторых видов жаб, а затем обнаружены в крови позвоночных [111–115]. Все КТС содержат в своем составе стероидное (циклопентанпергидрофенантреновое) ядро. КТС делятся на два класса – карденолиды и буфадиенолиды. У карденолидов в семнадцатом положении стероидного ядра находится пятичленное лактоновое кольцо, а у буфадиенолидов – шестичленное лактоновое кольцо. Ряд КТС содержит остатки сахара. Карденолиды впервые были выделены из растений, а буфадиенолиды – из амфибий. В организме человека обнаружены представители обоих классов. Первым в плазме крови человека был обнаружен карденолид, эдогенный уабаин [116], а затем в плазме и моче был выявлен буфадиенолид, маринобуфагенин [115, 117, 118]. КТС обнаруживаются в крови в наномолярных и субнаномолярных концентрациях. Оба эндогенных КТС являются вазоконстрикторами [119]. Увеличение уровня маринобуфагенина наблюдается при ишемии миокарда [115] и почечной ишемии [120]. КТС вовлечены в развитие некоторых заболеваний, в том числе гипертонии [121]. Присутствие различных КТС в организме предполагает, что их действие на рецепторную функцию Na, K-ATФазы отличается. Действительно, различные КТС мо-

гут обуславливать разные биологические ответы [122]. Так, несмотря на то, что маринобуфагенин и уабаин практически одинаково ингибируют Na,K-ATФазу почечных эпителиальных клеток, концентрации этих ингибиторов, приводящие к гибели 50% клеток, отличаются на два порядка [123]. Эксперименты с очищенным препаратом Na,K-ATФазы показали, что связывание уабаина и маринобуфагенина индуцирует разные конформационные изменения в молекуле белка, что может быть причиной связывания различных белков партнеров и активации разных сигнальных каскадов [124].

КТС выполняют роль гормонов и продуцируются средним мозгом и надпочечниками при гипоксии и в ответ на определенные стимулы, такие как ангиотензин II, ацетилхолин, вазопрессин, катехоламины [125]. КТС играют важную роль в патофизиологии эссенциальной гипертонии, преэклампсии, конечной стадии почечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности и сахарного диабета [126]. Функция эндогенных КТС до конца не установлена, однако очевидно, что их действие опосредовано связыванием с Na, K-ATФазой, которое приводит к активации сигнальных каскадов, регулирующих гибель и пролиферацию клеток [20, 127]. Одним из основных и наиболее исследованных компонентов этих каскадов является Src-киназа. Это тирозиновая киназа, участвующая в регуляции целого ряда клеточных процессов, в том числе роста, выживаемости и дифференцировки клеток [128, 129]. Активность Src-киназы может регулироваться активирующим и ингибирующим фосфорилированием по остаткам Туг416 и Туг527 соответственно. Фосфорилирование по остатку Туг527 приводит к инактивации киназы, в то время как при дефосфорилировании Туг527 она становится активной, а фосфорилирование по Tyr416 приводит к еще большему возрастанию ее активности [130-132]. Часть молекул Na,К-АТФазы образует комплекс с Src-киназой. Связывание с Na,К-АТФазой уабаина приводит к высвобождению киназного домена Src-киназы из комплекса, что приводит к активации Src-киназы [133] и возрастанию уровня ее активирующего фосфорилирования [128]. Действие уабаина на фосфорилирование Src-киназы не зависит от концентраций внутриклеточных ионов, поэтому предполагают, что ингибирование уабаином Na,K-АТФазы, наблюдающееся при высоких концентрациях уабаина, и активация Src-зависимого сигналлинга реализуются по двум независимо регулируемым механизмам [134, 135-137].

На изолированных кардиомиоцитах крысы было показано, что активация сигнальных каскадов через Na,K-ATФазу уабаином приводит к увеличению генерации AФК [138–141]. Также уабаин стимулирует Na,K-ATФазный сигналлинг и генерацию АФК и в других типах клеток: нейрональных [142], раковых [143], поджелудочной железы [144], почек [145, 146]. В присутствии антиоксиданта N-ацетилцистеина, снижающего уровень АФК, сигналлинг нарушается [145]. В то же время устойчивое увеличение АФК в клетках миокарда на уровне, сопоставимом с уабаином, также способно активировать каскады, вовлеченные в сигналлинг Na,K-АТФазы, в частности, приводит к росту Ca<sup>2+</sup>, активации Erk1/2 и гипертрофических маркерных генов [147]. Так, добавление к культуре кардиомиоцитов глюкозооксидазы, приводящее к возрастанию уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, активирует сигнальные каскады через Na,K-АТФазу [138].

Kak Src-киназа, так и кавеолин (структурный белок кавеол), вовлеченные в рецепторную функцию Na, K-ATФазы, являются редокс-чувствительными и необходимы для формирования редокс-чувствительной сигнальной платформы [148–154]. Ряд данных свидетельствует о том, что базальный уровень АФК необходим для стимуляции каскадов, опосредованных связыванием уабаина с Na/K-АТФазой и активации Src-киназы [145, 146]. Показано, что в Src-киназе есть редокс-чувствительные остатки цистеина, окисление которых до SOH приводит к ее активации при возрастании АФК, например, при НАДФ-Н-опосредованном сигналлинге [153]. Таким образом, применение антиоксидантов требует тщательного рассмотрения с учетом того, что поддержание редокс-статуса в физиологическом диапазоне важно для эффективного АФК-сигналлинга [155].

Поскольку уабаин индуцирует рост АФК, возникает вопрос, не может ли сам по себе рост АФК приводить к индукции сигнального каскада, индуцированного Na, K-АТФазой. Добавление перекиси водорода или глюкозооксидазы стимулирует Na, K-АТФазный сигналлинг в клетках почек [145–147] и кардиомитоцитах [138, 145, 147]. Обработка антиоксидантами (N-ацетилцистеином или витамином Е) нарушает индукцию Na, K-ATФаза/Src-сигналлинга уабаином и глюкозооксидазой [145, 146]. При этом ингибирование с-Src и Erk1/2 отменяет эффекты АФК-индуцированного синтеза белка, на который не влияет хелатирование внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [138]. Необходимо отметить, что ингибирование с-Src-киназы антиоксидантами может блокировать уабаин-стимулированную генерацию АФК, но не влияет на индуцированное уабаином увеличение Ca<sup>2+</sup> [156]. Таким образом, можно сделать вывод, что возрастание Ca<sup>2+</sup>, вызванное уабаином, не является необходимым для роста АФК [157].

Необходимо отметить, что низкие концентрации уабаина приводят к клатрин-зависимому эндоцитозу Na,K-ATФазы, ассоциированной с Src-

киназой, что может приводить к снижению сигнальной функции и активности Na,K-ATФазы со временем [158]. Есть основания предполагать, что изменение уровня Na,K-ATФазы может зависеть от изоформного состава фермента. Так, уабаин приводил к увеличению мРНК  $\alpha$ 1- и  $\beta$ 1-изоформ и снижал при этом уровень мРНК  $\alpha$ 2- и  $\beta$ 2-изоформ [159]. Длительное повышение уровня КТС приводит к развитию гипертрофии и фиброза в тканях сердца и почек [160, 161].

В настоящее время существует следующая модель связывания Na, K-АТФазы с Src-киназой: SH2-домен Src-киназы связан с актуаторным доменом Na,K-АТФазы, а ее киназный домен – с нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-ATФазы [162–164]. Взаимодействие Src-киназы с актуаторным доменом более сильное и сохраняется все время, а вот взаимодействие с нуклеотидсвязывающим доменом нарушается при связывании уабаина, что приводит к высвобождению киназного домена и активации киназы. КТС-индуцированная активация Src-киназы в дальнейшем может приводить к активации митоген-активируемых киназ, индуцировать каскад через фосфолипазу С или влиять на сигнальный путь, опосредованный PI3-киназой [165]. Для реализации рецепторной функции через связывание с Src-киназой важно, чтобы в составе Na, K-ATФазы была α1-изоформа [164, 166], поскольку именно у этой изоформы есть участок взаимодействия с Src [167]. Однако интересно отметить, что фермент, имеющий в составе тканеспецифичную α3-изоформу каталитической субъединицы, реагирует на стимуляцию низкими дозами уабаина с активацией Erk1/2-киназы, но не Src-киназы [166, 168]. Таким образом, возможен клеточный сигналлинг, независимый от активации Src-киназы.

Необходимо отметить также, что кроме модели прямого взаимодействия Src-киназы с Na,K-АТФазой существуют и другие, менее исследованные модели, например модель, объясняющая активацию Src-киназы под действием уабаина ее временным взаимодействием с комплексом α1-Na,K-АТФаза-кавеолин-1 [169], или модель, в которой активация с-Src-киназы регулируется изменением соотношения АТФ/АДФ и низкими концентрациями Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> (обе эти модели были протестированы лишь в бесклеточной системе) [170, 171]. Было высказано предположение, что поскольку все модели объединяет то, что в результате стабилизируется Е2Р-конформация белка, а переход E2P-E1P замедляется (в присутствии КТС и/или из-за энергетического статуса клетки), то именно это замедление регулирует сигнальную функцию Na,К-АТФазы [157]. Ведущая роль изменения конформации Na, K-ATФазы в реализации сигналлинга представляется наиболее вероятной. В пользу этого свидетельствует тот факт, что связывание маринобуфагенина и уаба-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

ина, которые вызывают различные биологические ответы, приводит к разным изменениям конформации фермента [172]. В настоящее время все большее развитие получает представление о Na,К-АТФазе как о «стыковочной станции» для различных белков. Известны более десяти белков, которые могут связываться с ней и взаимодействие с некоторыми из них регулируется КТС [165]. Очевидно, что изменение конформации Na, K-АТФазы играет в регуляции связывания белков-партнеров важную роль. Так, например, некоторые белки (PI3-киназа, кавеолин, анкирин, проапоптотический белок Bcl-2) имеют перекрывающиеся сайты связывания в актуаторном домене Na,K-ATФазы и, следовательно, не могут связываться одновременно [164, 173-175]. Можно предположить, что КТС, стабилизирующие Na,К-АТФазу в разных конформациях, создают преимущества для связывания с ней разных белков-партнеров.

Несмотря на широкое применение экзогенных КТС и активное исследование роли эндогенных КТС, долгое время оставалось неясным, как гипоксия и иные изменения редокс-статуса клетки влияют на рецепторную функцию Na,K-АТФазы. Как уже было отмечено выше, некоторые виды млекопитающих отвечают на гипоксию увеличением уровня КТС в крови. Высказывались предположения, что уабаин может защищать сердце от ишемии-реперфузии за счет активации Src-киназы [176]. На клетках фибробластов мыши линии SC1 [177] и на клетках эмбриональной почки человека [60] было обнаружено, что в условиях гипоксии действие уабаина на клетки изменяется. В условиях острой гипоксии инкубация клеток с уабаином не приводит к активации Src-киназы, которое наблюдается в клетках, находящихся при 20% кислорода [177]. Напротив, ее активирующее фосфорилирование снижается по сравнению с необработанными уабаином клетками, находящимися в гипоксии [60, 177]. При этом в условиях острой гипоксии уровень активирующего фосфорилирования Src-киназы повышен по сравнению с контролем [60, 177]. Вероятно, это связано с активацией Src-киназы под действием повышенного уровня АФК вследствие модификации остатков цистеина [153], поскольку, как уже говорилось выше, уровень АФК в условиях гипоксии возрастает [8, 177]. Добавление уабаина, которое в обычных условиях вызывает рост АФК, в условиях гипоксии приводит к снижению индуцированного гипоксией роста АФК [177]. Возможно, именно вследствие этого при добавлении уабаина активация Src-киназы снижается [60]. Важно отметить, что высокие дозы уабаина, которые при 20% рО<sub>2</sub> через 24 ч инкубации приводят к снижению жизнеспособности клеток, в условиях гипоксии (0.05% pO<sub>2</sub>) не оказывают цитотоксического действия или даже повышают жизнеспособность клеток [177]. Таким



**Рис. 3.** Схематичное представление механизма редокс-регуляции рецепторной функции Na,K-ATФазы вследствие модификации остатков цистеина α-субъединицы. (а) – В условиях нормоксии Src-киназа связана с актуаторным и нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-ATФазы. Связывание уабаина (У) приводит к диссоциации киназного домена Src-киназы от нуклеотидсвязывающего домена Na,K-ATФазы и активации Src-киназы. Вследствие этого начинается рост AΦK, что приводит к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина Na,K-ATΦазы в нуклеотидсвязывающем домене и присоединение к нему киназного домена Src-киназы становится невозможным. (б) – Гипоксия и последующий рост AΦK приводят к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина Na,K-ATΦaзы от нуклеотидсвязывающего домена даже в отсутствие уабаина, что приводит к ее активации. Связывание уабаина с Na,K-ATΦaзой в условиях гипоксии приводит к снижению AΦK, что индуцирует деглутатионилирование Src-киназы востановления связывание связывание уабаина с Na,K-ATΦaзы и интибирование Src-киназы востановления связывания ее киназного домена с нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-ATΦaзы.

образом, в условиях гипоксии рецепторная функция Na,K-АТФазы существенно меняется, что необходимо учитывать при терапевтическом использовании КТС. С другой стороны, в присутствии уабаина клетки становятся менее чувствительны к гипоксии. Следовательно, одной из физиологических функций КТС действительно может быть их протекторное действие при ишемии и гипоксии. Вопрос о механизме изменения рецепторной функции при гипоксии пока остается открытым.

Эксперименты по точечному мутагенезу показали, что замена остатка Cys244 на аланин, которая приводит к утрате регуляторного цистеина и предотвращает ингибирование фермента GSSG, не влияет на рецепторную функцию Na,K-ATФазы. Однако замена трех остатков цистеина Cys454-458-459 на аланин нарушает активацию Src-киназы в ответ на уабаин или гипоксию, делая ее нечувствительной к данным стимулам [60]. Была создана трехмерная модель комплекса «Na,K-АТФаза:Src-киназа» на основе α1β1-изозима Na, K-АТФаза из почек свиньи (PDB 3wgu) и человеческой Src-киназы (PDB 2src). Докинг Srcкиназы и нуклеотидсвязывающего домена Na,K-АТФазы показал, что остатки цистеина Cys454-458-459 находятся вблизи интерфейса взаимодействия этих белков. Более того, по данным моде-S-глутатионилирование лирования остатков Cys458 и Cys459 нарушает связывание Src-киназы с нуклеотидсвязывающим доменом Na, K-ATФазы [60]. Таким образом, одной из причин изменения рецепторной функции Na,K-АТФазы при гипоксии является нарушение взаимодействия глутатионилированной Na,K-АТФазы с Srcкиназой.

Можно предположить следующий механизм редокс-чувствительности рецепторной функции Na,K-ATФазы (рис. 3). В условиях нормоксии связывание уабаина приводит к диссоциации ки-

назного домена Src-киназы от нуклеотидсвязывающего домена Na, K-ATФазы и активации Srcкиназы [162–164]. Вследствие этого начинается рост АФК [157, 177], что приводит к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина Na,К-АТФазы в нуклеотидсвязывающем домене, и присоединение к нему киназного домена Srcкиназы становится невозможным [60]. Гипоксия и последующий рост АФК приводят к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина и вызывают диссоциацию Src-киназы от нуклеотидсвязывающего домена даже в отсутствие уабаина, что приводит к ее активации [60, 177]. Связывание уабаина с Na,К-АТФазой в условиях гипоксии приводит к снижению АФК [177], что, повидимому, индуцирует деглутатионилирование Na,К-АТФазы и последующее ингибирование Src-киназы [60, 177] вследствие восстановления связывания ее киназного домена с нуклеотидсвязывающим доменом Na, K-АТФазы (рис. 3).

Таким образом, есть несколько причин редокс-чувствительности рецепторной функции Na,K-АТФазы: во-первых, это редокс-зависимые модификации остатков цистеина самой Na,K-АТФазы, которые могут влиять на связывание с Src-киназой и взаимодействие с КТС; во-вторых, изменение активности Src-киназы и иных участников сигнального каскада и, в-третьих, петля обратной связи, заключающаяся в том, что связывание КТС с Na,K-АТФазой само влияет на редокс-статус клеток [60, 157].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно заключить, что редоксзависимые модификации тиоловых групп Na,K-АТФазы – глутатионилирование и нитрозилирование - играют важную роль в регуляции транспортной и рецепторной функции фермента в норме и патологии. В зависимости от условий и физиологических стимулов определяющим для регуляции активности Na, К-АТФазы и адаптационного ответа клеток может являться изменение уровня глутатионилирования/нитрозилирования каталитической (α) или регуляторных субъединиц фермента (β, FXYD). Однако пока нет полного понимания согласованной редокс-регуляции всех трех субъединиц Na,К-АТФазы. Необходимо создание единой картины регуляции различных субъединиц фермента при изменении редокс-условий, обеспечивающей изменение его функционирования как целого. Только в этом случае будет возможно предотвращать и корректировать редокс-зависимые нарушения функционирования фермента, жизненно необходимого для каждой клетки нашего организма. Мы надеемся, что дальнейшие исследования редокс-регуляции транспортной и рецепторной функции Na,K-ATФазы дадут ответы на вопросы, поставленные в данном обзоре.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00374).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. J. H. Kaplan, Annu. Rev. Biochem. 71, 511 (2002).
- S. N. Orlov, A. A. Platonova, P. Hamet, and R. Grygorczyk, Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 305 (4), C361 (2013).
- M. J. Shattock, M. Ottolia, D. M. Bers, et al., J. Physiol. (Lond). 593, 1361 (2015).
- 4. D. Dobrota, M. Matejovicova, E.G. Kurella, and A. A. Boldyrev, Cell. Mol. Neurobiol. **19** (1), 141 (1999).
- I. Petrushanko, N. Bogdanov, E. Bulygina, et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290, R916 (2006).
- I. Y. Petrushanko, N. B. Bogdanov, N. Lapina, et al., J. Gen. Physiol. **130**, 389 (2007).
- 7. A. Bogdanova, I. Petrushanko, A. Boldyrev, and M. Gassmann, Curr. Enzyme Inhibit. **2**, 37 (2006).
- A. Bogdanova, I. Y. Petrushanko, P. Hernansanz-Agustín, and A. Martínez-Ruiz, Front. Physiol. 7, 314 (2016).
- 9. J. J. Mieyal, M. M. Gallogly, S. Qanungo, et al., Antioxid. Redox Signal. **10**, 1941 (2008).
- F. Q. Schafer and G. R. Buettner, Free Radic. Biol. Med. **30** (11), 1191 (2001).
- S. Suzuki, M. Noda, M. Sugita, et al., J. Appl. Physiol. 87 (3), 962 (1999).
- R. Carini, M. G. De Cesaris, R. Splendore, et al., Hepatology **31** (1), 166 (2000).
- A. Y. Bogdanova, O. O. Ogunshola, C. Bauer, and M. J. Gassmann, Membr. Biol. **195** (1), 33 (2003).
- 14. A. Boldyrev and E. Kurella, Biochem. Biophys. Res. Commun. **222** (2), 483 (1996).
- E. G. Kurella, O. V. Tyulina, and A. A. Boldyrev, Cell. Mol. Neurobiol. **19** (1), 133 (1999).
- 16. A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, and O. V. Fedorova, Pharmacol. Rev. **61**, 9 (2009).

- 17. A. O. Del Toro, L. Jimenez, L. Hinojosa, et al., Cardiol. Res. Pract. **2019**, 8646787 (2019).
- M. Haas, H. Wang, J. Tian, and Z. Xie, J. Biol. Chem. 277, 18694 (2002).
- M. Simonini, P. Casanova, L. Citterio, et al., Int. J. Mol. Sci. 19 (7), 1948 (2018).
- J. X. Xie, X. Li, and Z. Xie. IUBMB Life 65 (12), 991 (2013).
- 21. D. C. Chow and J. G. Forte, J. Exp. Biol. 198, 1 (1995).
- 22. G. Scheiner-Bobis, Eur. J. Biochem. 269, 2424 (2002).
- L. Segall, Z. Z. Javaid, S. L. Carl, et al., J. Biol. Chem. 278, 9027 (2003).
- 24. P. L. Jorgensen, Ann. N. Y. Acad. Sci. 986, 22 (2003).
- C. Lupfert, E. Grell, V. Pintschovius, et al., Biophys. J. 81, 2069 (2001).
- 26. S. J. Karlish, J. Bioenerg. Biomembr. 12, 111 (1980).
- 27. И. Ю. Петрушанко, В. А. Митькевич, В. А. Борзова и др., Биофизика **54** (6), 1019 (2009).
- 28. A. V. Grinberg, N. M. Gevondyan, N. V. Grinberg, and V. Y. Grinberg, Eur. J. Biochem. **268** (19), 5027 (2001).
- 29. R. Kanai, H. Ogawa, B. Vilsen, et al., Nature **502**, 201 (2013).
- 30. J. P. Morth, B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, et al., Nature **450**, 1043 (2007).
- 31. T. Clausen, Physiol. Rev. 83, 1269 (2003).
- J. Lingrel, A. Moseley, I. Dostanic, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 986, 354 (2003).
- A. E. Moseley, S. P. Lieske, R. K. Wetzel, et al., J. Biol. Chem. 278, 5317 (2003).
- P. Ostadal, A. B. Elmoselhi, I. Zdobnicka, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 306, 457 (2003).
- L. Peng, P. Martin-Vasallo, and K. J. Sweadner, J. Neurosci. 17, 3488 (1997).
- R. K. Wetzel, E. Arystarkhova, and K. J. Sweadner, J. Neurosci. 19, 9878 (1999).
- 37. Sundaram S.M., D. Safina, A. Ehrkamp, et al., Neurochem. Int. **128**, 163 (2019).
- 38. G. Blanco, Ann. N. Y. Acad. Sci. 986, 536 (2003).
- A. Katz, Y. Lifshitz, E. Bab-Dinitz, et al., J. Biol. Chem. 285 (25), 19582 (2010).
- A. Scirè, L. Cianfruglia, C. Minnelli, et al., Biofactors 45 (2), 152 (2019).
- 41. J. G. Reich and E. E. Sel'kov, *Energy metabolism of the cell: a theoretical treatise* (Acad. Press, N. Y., 1981).
- 42. H. Sies, In *Metabolic Compartmentation* (Acad. Press, Lond., 1982), p. 205.
- 43. А. Болдырев, Е. Булыгина, О. Герасимова и др., Биохимия **69** (4), 530 (2004).
- 44. A. A. Boldyrev, In: *Molecular and Therapeutical Aspects* of *RedOx Biochemistry*, Ed. by T. Bahorun and A. Gurib-Fakim (OICA, 2003), p. 59.
- 45. Z. Xie, M. Jack-Hays, Y. Wang, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 207, 155 (1995).

- K. Y. Xu, J. L. Zweier, and L.C. Becker, Ann. N. Y. Acad. Sci. 834, 680 (1997).
- 47. C. Gatto, S. J. Thornewell, J. P. Holden, and J. H. Kaplan, J. Biol. Chem. **274** (35), 24995 (1999).
- I. Yu. Petrushanko, S. Yakushev, V. A. Mitkevich, et al., J. Biol. Chem. 287, 32195 (2012).
- 49. F. Thevenod and J. M. Friedmann, FASEB J. 13, 1751 (1999).
- 50. A. Ziegelhoffer, K. Kjeldsen, H. Bundgaard, et al., Gen. Physiol. Biophys. **19** (1), 9 (2000).
- 51. M. Erecinska and I. A. Silver, Prog. Neurobiol. 43(1), 37 (1994).
- M. Inoue, N. Fujishiro, and I. Imanaga J. Physiol. 519, 385 (1999).
- 53. T. Clausen, Physiol. Rev. 83 (4), 1269 (2003).
- H. G. Shi, L. Mikhaylova, A. E. Zichittella, and J. M. Arguello, Biochim. Biophys. Acta 1464, 177 (2000).
- 55. V. A. Mitkevich, I. Y. Petrushanko, Y. M. Poluektov, et al., Oxid. Med. Cell Longev. 9092328 (2016).
- G. A. Figtree, C. C. Liu, S. Bibert, et al., Circ. Res. 105 (2), 185 (2009).
- 57. S. Bibert, C. C. Liu, G. A. Figtree, et al., J. Biol. Chem. **286**, 18562 (2011).
- J. J. Mieyal, M. M. Gallogly, S. Qanungo, et al., Antioxid. Redox Signal. 10 (11), 1941 (2008).
- S. Yakushev, M. Band, M. C. Tissot VanPatot, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 303, H1332 (2012).
- 60. I.Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, V. A. Lakunina, et al., Redox Biol. **13**, 310 (2017).
- 61. И. Ю. Петрушанко, О. В. Симоненко, К. М. Бурнышева и др., Молекуляр. биология **49**, 175 (2015).
- 62. C. Juel, PLoS One 9 (10), e110514 (2014).
- C. Juel, M. Hostrup, and J. Bangsbo, Physiol. Rep. 3 (8), e12515 (2015).
- С. Мэн, И. Ю. Петрушанко, Е. А. Климанова и др., Биохимия 79 (2), 209 (2014).
- 65. Y. M. Poluektov, I. Y. Petrushanko, N. A. Undrovinas, et al., Sci. Rep. 9 (1), 4872 (2019).
- 66. Е. А. Дергоусова, И. Ю. Петрушанко, Е. А. Климанова и др., Молекуляр. биология **52** (2), 289 (2018).
- 67. E. A. Dergousova, I. Y. Petrushanko, E. A. Klimanova, et al., Biomolecules 7 (1), 18 (2017).
- S. Despa, J. B. Lingrel, and D. M. Bers, Cardiovasc. Res. 95, 480 (2012).
- Z. Xie, M. Jack-Hays, Y. Wang, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 207, 155 (1995).
- 70. A. Chandra, S. Srivastava, J. M. Petrash, et al., Biochemistry **36** (50), 15801 (1997).
- 71. I. Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, A. A. Anashkina, et al., Sci. Rep. 4, 5165 (2014).

- 72. Y. M. Poluektov, E. A. Dergousova, O. D. Lopina, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **510** (1), 86 (2019).
- 73. Е. А. Дегоусова, Ю. М. Полуэктов, Е. А. Климанова и др., Биохимия **83** (8), 1220 (2018).
- 74. V. Srinivasan, A. J. Pierik, and R. Lill, Science **343** (6175), 1137 (2014).
- C. C. Liu, K. Galougahi, R. M. Weisbrod, et al., Free Radic. Biol. Med. 65, 563 (2013).
- H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius, and C. Toyoshima, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 13742 (2009).
- C. C. Liu, A. Garcia, Y. A. Mahmmoud, et al., J. Biol. Chem. 287, 12353 (2012).
- A. Garcia, N. D. Eljack, M. A. Sani, et al., Biochim. Biophys. Acta 1848, 2430 (2015).
- S. P. Barwe, S. Kim, S. A. Rajasekaran, et al., J. Mol. Biol. 365, 706 (2007).
- I. Dalle-Donne, R. Rossi, G. Colombo, et al., Trends Biochem. Sci. 34, 85 (2009).
- C. N. White, C. C. Liu, A. Garcia, et al., J. Biol. Chem. 285, 13712 (2010).
- D. Pavlovic, W. Fuller, and M. J. Shattock, J. Mol. Cell. Cardiol. 61, 83 (2013).
- W. Fuller, V. Parmar, P. Eaton, et al., Cardiovasc. Res. 57, 1044 (2003).
- 84. R. G. Boutilier, J. Exp. Biol. 204 (18), 3171 (2001).
- 85. M. Habeck, et al., J. Biol. Chem. 291, 23159 (2016).
- H.-J. Apell, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 150, 1 (2003).
- 87. L. T. Buck and M. E. Pamenter, Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. **224**, 61 (2018).
- L. T. Buck and P. W. Hochachka, Am. J. Physiol. 265, R1020 (1993).
- P. W. Hochachka, L. T. Buck, C. J. Doll, and S. C. Land, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9493 (1996).
- P. Hylland, S. Milton, M. Pek, et al., Neurosci. Lett. 235, 89 (1997).
- M. P. Wilkie, M. E. Pamenter, S. Alkabie, et al., Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 148, 355 (2008).
- A. P. Ross, S. L. Christian, H. W. Zhao, and K. L. Drew, J. Cereb. Blood Flow Metab. 26, 1148 (2006).
- W. M. Johnson, A. L. Wilson-Delfosse, and J. J. Mieyal, Nutrients 4, 1399 (2012).
- 94. S. Akterin, R. F. Cowburn, A. Miranda-Vizuete, et al., Cell Death and Differentiation **13**, 1454 (2006).
- 95. C. B. Pocernich and D. A. Butterfield, Biochim. Biophys. Acta. **1822** (5), 625 (2012).
- L. N. Zhang, Y. J. Sun, S. Pan, et al., Fundam. Clin. Pharmacol. 27, 96 (2013).
- V. M. Vitvitsky, S. K. Garg, R. F. Keep, et al., Biochim. Biophys. Acta 822, 1671 (2012).

- 98. C. Kairane, R. Mahlapuu, K. Ehrlich, et al., Curr. Alzheimer Res. 11, 79 (2014).
- C. A. Dickey, M. N. Gordon, D. M. Wilcock, et al., BMC Neurosci. 2, 1 (2005).
- 100. I. Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, A. A. Anashkina, et al., Sci. Rep. 6, 27738 (2016).
- 101. В. А. Лакунина, И. Ю. Петрушанко, К. М. Бурнышева и др., Докл. РАН 473 (3), 374 (2017).
- 102. R. R. Dyer, K. I. Ford, and R. A. S. Robinson, Methods Enzymol. **626**, 499 (2019).
- 103. K. Chia, C. C. Liu, E. J. Hamilton, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. **309**, 239 (2015).
- 104. S. M. Rahaman, K. Dey, T. Chakraborti, and S. Chakraborti, Ind. J. Biochem. Biophys. 52 (2), 119 (2015).
- 105. H. Bundgaard, C. C. Liu, A. Garcia, et al., Circulation. **122**, 2699 (2010).
- 106. S. Moniotte, L. Kobzik, O. Feron, et al., Circulation 103, 1649 (2001).
- 107. K. Galougahi, C. C. Liu, A. Garci, et al., Am. J. Physiol. Cell. Physiol. **309** (5), 286 (2015).
- 108. V. M. Altan, E. Arioglu, S. Guner, and A. T. Ozcelikay, Heart Fail. Rev. 12, 58 (2007).
- 109. F. M. Botelho, F. Pierezan, B. Soto-Blanco, and M. M. Melo, Toxicon. **158**, 63 (2019).
- 110. A. A. Shiyan, L. V. Kapilevich, A. V. Lopachev, et al., PLoS One **14** (9), e0222767 (2019).
- J. M. Hamlyn, M. P. Blaustein, S. Bova, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6259–6263 (1991).
- 112. R. S. Kieval, V. P. J. Butler, F. Derguini, et al., Am. Coll. Cardiol. 11, 637 (1988).
- 113. D. Lichtstein, I. Gati, and H. J. Ovadia, Cardiovasc. Pharmacol. 22, S102 (1993).
- 114. A. Hollman, Br. Heart J. 54 (3), 258 (1985).
- 115. A. Y. Bagrov, O. V. Fedorova, R. I. Dmitrieva, et al., Hypertension **31**, 1097 (1998).
- 116. J. H. Ludens, M. A. Clark, D. W. Du Charme, et al., Hypertension 17, 923 (1991).
- O. V. Fedorova, P. A. Doris, and A. Y. Bagrov, Clin. Exp. Hypertens. 20, 581–591 (1998).
- 118. H. C. Gonick, Y. Ding, N. D. Vaziri, et al., Clin. Exp. Hypertens. 20, 617 (1998).
- 119. A. Y. Bagrov and O. V. Fedorova, J. Hypertens. 16, 1953 (1998).
- 120. J. Tian, S. Haller, S. Periyasamy, et al., Hypertension 56, 914 (2010).
- 121. W. Schoner and G. Scheiner-Bobis, Am. J. Cardiovasc. Drugs 7, 173 (2007).
- 122. M. Dvela, H. Rosen, T. Feldmann, et al., Pathophysiology 14, 159 (2007).
- 123. O. A. Akimova, A. Y. Bagrov, O. D. Lopina, et al., J. Biol. Chem. 280, 832 (2005).

- 124. E. A. Klimanova, I. Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, et al., FEBS Lett. **589**, 2668 (2015).
- 125. C. De Angelis and G. T. Haupert, Am. J. Physiol. 274, F182 (1998).
- 126. A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, and O. V. Fedorova, Pharmacol. Rev. 61, 9 (2009).
- 127. R. S. El-Mallakh, K. S. Brar, and R. R. Yeruva, Insects 10 (4), 102 (2019).
- 128. M. Haas, H. Wang, J. Tian, and Z. Xie, J. Biol. Chem. 277, 18694 (2002).
- 129. G. A. Knock, V. A. Snetkov, Y. Shaifta, et al., Cardiovasc. Res. **80**, 453 (2008).
- 130. A. MacAuley and J. A. Cooper, Mol. Cell. Biol. 9, 2648 (1989).
- W. Xu, S. C. Harrison, and M. J. Eck, Nature 385, 595 (1997).
- 132. S. W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, P. W. Manley, et al., Structure **13**, 861 (2005).
- 133. J. Tian, T. Cai, Z. Yuan, et al., Mol. Biol. Cell. 17, 317 (2006).
- 134. J. Liu, J. Tian, M. Haas, et al., J. Biol. Chem. 275, 27838 (2000).
- 135. M. Haas, A. Askari, and Z. Xie, J. Biol. Chem. 275, 27832 (2000).
- 136. A. Aydemir-Koksoy, J. Abramowitz, and J. C. Allen, J. Biol. Chem. 276, 46605 (2001).
- 137. M. Haas, H. Wang, J. Tian, Z. Xie, J. Biol. Chem. 277, 18694 (2002).
- 138. L. Liu, J. Li, J. Liu, et al., Free Radic. Biol. Med. **41**, 1548 (2006).
- 139. J. Liu, J. Tian, M. Haas, et al., J. Biol. Chem. 275, 27838 (2000).
- 140. J. Tian, J. Liu, K. D. Garlid, et al., Mol. Cell Biochem. 242, 181 (2003).
- 141. Z. Xie, P. Kometiani, J. Liu, et al., J. Biol. Chem. 274, 19323 (1999).
- 142. A. Boldyrev, E. Bulygina, M. Yuneva, and W. Schoner, Ann. N. Y. Acad. Sci. **986**, 519 (2003).
- 143. Y. T. Huang, S. C. Chueh, C. M. Teng, J. H. Guh, Biochem. Pharmacol. 67, 727 (2004).
- 144. M. Kajikawa, S. Fujimoto, Y. Tsuura, et al., Diabetes 51, 2522 (2002).
- 145. Y. Yan, A. P. Shapiro, S. Haller, et al., J. Biol. Chem. 288, 34249 (2013).
- 146. Y. Yan, A. P. Shapiro, B. R. Mopidevi, et al., J. Am. Heart Assoc. 5, e003675 (2016).
- 147. Y. Wang, Q. Ye, C. Liu, et al., Free Radic. Biol. Med. 71, 415 (2014).
- 148. A. Y. Zhang, F. Yi, G. Zhang, et al., Hypertension 47, 74 (2006).
- 149. W. Han, H. Li, V. A. M. Villar, et al., Hypertension 51, 481 (2008).

- P. N. Seshiah, D. S. Weber, P. Rocic, et al., Circ. Res. 91, 406 (2002).
- 151. R. M. Touyz, G. Yao, and E. L. Schirin, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 981 (2003).
- 152. K. J. Bubb, A. B. Birgisdottir, O. Tang, et al., Free Radic. Biol. Med. **109**, 61 (2017).
- 153. D. E. Heppner, C. M. Dustin, C. Liao, et al., Nat. Commun. 9 (1), 4522 (2018).
- E. Giannoni and P. Chiarugi, Antioxid. Redox Signal.
  20 (13), 2011 (2014).
- 155. A. C. Montezano, R. M. Touyz, Antioxid. Redox Signal. **20** (1), 164 (2014).
- 156. J. Tian, X. Gong, and Z. Xie, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **281** (5), H1899 (2001).
- 157. R. D. Pratt, C. R. Brickman, C. L. Cottrill, et al., Int. J. Mol. Sci. **19**, 2600 (2018).
- 158. J. Liu, M. Liang, L. Liu, et al., Kidney Int. 67, 1844 (2005).
- 159. R. Hosoi, T. Matsuda, S. Asano, et al., J. Neurochem. **69** (5), 2189 (1997).
- 160. D. J. Kennedy, S. Vetteth, S. M. Periyasamy, et al., Hypertension 47, 488 (2006).
- 161. F. K. Khalaf, P. Dube, A. Mohamed, et al., Int. J. Mol. Sci. 19(9), E2576 (2018).
- M. Banerjee, Q. Duan, Z. Xie, PLoS One 10, e0142119 (2015).
- 163. Z. Li, T. Cai, J. Tian, et al., J. Biol. Chem. 284, 21066 (2009).
- 164. Z. Li and Z. Xie, Pflug. Arch. 457, 635 (2009).
- 165. L. Reinhard, H. Tidow, M. J. Clausen, and P. Nissen, Cell. Mol. Life Sci. 70, 205 (2013).
- 166. L. V. Karpova, E. R. Bulygina, and A. A. Boldyrev, Cell Biochem. Funct. **28** (2), 135 (2010).
- 167. H. Yu, X. Cui, J. Zhang, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. **314**, C202 (2018).
- 168. N. Madan, Y. Xu, Q. Duan, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. **00199**, 02016 (2016).
- 169. E. Yosef, A. Katz, Y. Peleg, et al., J. Biol. Chem. **291**, 11736 (2016).
- 170. K. M. Weigand, H. G. Swarts, N. U. Fedosova, et al., Biochim. Biophys. Acta 1818, 1269 (2012).
- 171. M. E. Gable, S. L. Abdallah, S. M. Najjar, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **446**, 1151 (2014).
- 172. E. A. Klimanova, I. Yu. Petrushanko, V. A. Mitkevich, et al., FEBS Lett. **589**, 2668 (2015).
- 173. P. K. Lauf, T. Alqahtani, K. Flues, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. **308**, C51 (2015).
- 174. P. K. Lauf, J. Heiny, J. Meller, et al., Cell. Physiol. Biochem. **3**, 257 (2013).
- 175. G. A. Morrill, A. B. Kostellow, and A. Askari, Steroids 77, 1160 (2012).
- 176. P. Pasdois, C. L. Quinlan, A. Rissa, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **292**, H1470 (2007).
- 177. В. А. Лакунина, К. М. Бурнышева, В. А. Митькевич и др., Молекуляр. биология **51**, 172 (2017).

### Molecular Mechanisms of Redox Regulation of the Na,K-ATPase

#### I.Yu. Petrushanko, V.A. Mitkevich, and A.A. Makarov

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

This review is dedicated to the molecular mechanisms of redox regulation of the Na,K-ATPase. The Na,K-ATPase creates a transmembrane gradient for the ions of sodium and potassium, which is necessary for the vital activity of all animal cells, and is also a receptor for cardiotonic steroids that regulate cell proliferation and apoptosis. The functioning of the Na,K-ATPase depends on redox status in the cells. Initially, it was shown that the enzyme is inhibited during oxidative stress, but it is now clear that redox regulation of Na.K-ATPase activity is a complex process and cannot be explained only by oxidative damage to the protein. The activity of the enzyme is maximal under physiological oxygen concentration and decreased by both hypoxia and hyperoxia, as well as due to decreased or increased intracellular glutathione concentration. Thus, the Na,K-ATPase reaches its maximal activity within a specific range of redox conditions. Today, it is obvious that a disturbance of the Na,K-ATPase activity in a number of pathologies such as hypoxia, ischemia, diabetes, Alzheimer's disease is associated with a change in redox status in the cells. Receptor function of the Na,K-ATPase also depends on redox status in the cells and should be taken into account while studying the effects of cardiotonic steroids on cells and tissues. In this review special focus is placed on redox modifications of thiol groups of various Na,K-ATPase subunits and on study of the regulatory processes in which these subunits are involved in normal and pathological conditions. Gaining insight into the molecular mechanisms of redox regulation can help us to understand what is needed to prevent the impairment of Na,K-ATPase function in pathological conditions thereby reducing cell damage.

Keywords: Na, K-ATPase, redox regulation, glutathionylation, nitrosylation, oxidation, cysteine residues, cardiotonic steroids — МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.3

# ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ СРЕДЫ НА МОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИНАМИКУ ФОРМИРОВАНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛИПЕПТИДОВ (AlaGly)<sub>25</sub> И (AlaGly)<sub>75</sub>

### © 2020 г. А.А. Эрендженова, Г.А. Армеев, К.В. Шайтан

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

*E-mail: shaytan49@yandex.ru* Поступила в редакцию 20.06.2020 г. После доработки 20.06.2020 г. Принята к публикации 29.06.2020 г.

Методами ланжевеновской динамики при различных значениях вязкости виртуальной среды изучен фолдинг модельных полипептидных последовательностей, состоящих из 50 и 150 аминокислотных остатков с чередованием аланина и глицина. Стартовые конформации соответствовали полностью развернутой структуре цепи. Изменение диссипативных свойств среды моделировалось за счет вариации параметров ланжевеновского термостата. Показано, что имеется достаточно высокая и пороговая чувствительность результата сворачивания цепи к вязкости среды. Сворачивание рассмотренных полипептидных последовательностей при вязкости среды уже порядка вязкости сжиженных газов происходит преимущественно в альфа-спиральные конформации. При уменьшении эффективной вязкости среды ниже критической происходит формирование неупорядоченных структур. Обращает внимание, что в условиях виртуальной среды энергетические эффекты не являются однозначным критерием для определения конформации в результате сворачивания полипептидной цепи. Наблюдаемые эффекты вязкости, приводящие к корреляции конформационных движений за счет действия диссипативных сил и отбору возможных путей конформационной релаксации цепи, непосредственным образом влияют на результат сворачивания в соответствии с предсказаниями аналитической теории.

Ключевые слова: молекулярная динамика, полипептиды, фолдинг, вязкость, вторичная структура, поверхность потенциальной энергии.

DOI: 10.31857/S0006302920050026

Моделирование конформационной динамики биополимеров является в настоящее время одним из наиболее часто используемых инструментов для изучения свойств различных макромолекулярных объектов. Увеличение вычислительных мощностей и переход к суперкомпьютерным вычислениям позволил в последние годы существенно расширить возможности применения молекулярной динамики для проведения численных экспериментов с макромолекулярными системами. Одной из актуальных проблем является компьютерный фолдинг белковых структур. Проблема формирования уникальной пространственной структуры белков хорошо известна и привлекает внимание уже более полувека [1-6]. С точки зрения фундаментальной физической теории проблема заключается в нахождении глобального минимума потенциальной (свободной) энергии макромолекулы и обеспечения попадания репрезентативной точки в этот глобальный

минимум. Характерное время фолдинга зависит от строения макромолекулы и условий проведения эксперимента и может меняться в достаточно широком диапазоне от наносекунд до микросекунд и более [4, 5, 7]. В широко известной работе [1] было обращено внимание на существование фундаментальной проблемы, известной как «парадокс Левинталя». При достаточно большом числе звеньев цепи ультрамногомерная поверхность потенциальной энергии макромолекулы имеет очень сложную структуру с экспоненциально большим числом локальных минимумов и других особенностей рельефа поверхности [8]. Это делает проблематичным попадание репрезентативной точки в глобальный минимум энергии за любое разумное время без неких специальных условий, накладываемых на поверхность потенциальной энергии. Для преодоления этого парадокса была выдвинута гипотеза о некотором специальном устройстве рельефа поверхности

потенциальной энергии макромолекул (принцип «минимальной фрустрации энергетической воронки»), для которых имеет место фолдинг в уникальные пространственные структуры [2]. Заметим, что никаких четких физических обоснований для подобного устройства энергетических ландшафтов, например, полипептидов в настоящее время не существует за исключением представлений, основанных на топологии конфигурационного пространства линейных полимерных макромолекул [9, 10]. Однако даже наличие определенных ограничений на строение рельефа многомерной поверхности потенциальной энергии не снимает вопроса о достижении репрезентативной точкой единственного глобального минимума энергии за разумное экспериментальное время [4–7]. Изучение проблемы релаксационного спуска репрезентативной точки в энергетической воронке методами многомерной геометрии показывает, что результат сворачивания полимерной цепи критически зависит от вязкости и в условиях жидкой среды характеризуется экстремальными принципами - максимумом скорости уменьшения потенциальной энергии при одновременном минимуме скорости диссипации энергии [11]. Последнее приводит к равнораспределению средних скоростей диссипации энергии по конформационным степеням свободы макромолекулы (в пределе очень большого числа звеньев), что демонстрируется как аналитическими [11, 12], так и численными [13] методами. Эти закономерности для движения репрезентативной точки на многомерном энергетическом ландшафте важны для процесса фолдинга. Силы вязкого трения приводят к корреляции конформационных движений [11-13], что существенно сокращает объем динамически доступного конфигурационного пространства в процессе фолдинга и определенным образом направляет общий тренд конформационной релаксации в направлении определенных пространственных структур. Было показано, что уменьшение вязкости среды ниже некоторого критического уровня дезорганизует процесс фолдинга полипептидов [14] и приводит к сворачиванию в случайные пространственные структуры. Ниже мы рассматриваем процесс фолдинга полипептидной цепи из полностью развернутой конформации на примере двух полипептидов различной длины - (AlaGly)<sub>25</sub> и (AlaGly)<sub>75</sub> (как и в работе [14]) - в широком диапазоне вязкости среды. Используется тот же протокол ланжевеновской (стохастической) динамики, программный пакет GROMACS [15] и полноатомное силовое поле AMBER99 [16]. Температура T = 300 К. Диэлектрическая проницаемость среды  $\varepsilon = 1$ .

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

Шаг интегрирования равен 1 фс, а длины траекторий — 2 нс. В рассматриваемых условиях такие длины траекторий оказались достаточными для изучения эффектов вязкости виртуальной среды на фолдинг рассматриваемых полипептидов.

Эффективная (виртуальная) вязкость среды (или коэффициент трения) определяется параметром ланжевеновского термостата:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = -m_i \xi \frac{d \vec{r}_i}{dt} + \vec{F}_i + \vec{f}_i, \qquad (1)$$

где  $\xi$  — эффективная вязкость, пс<sup>-1</sup>;  $m_i$  — масса *i*-й частицы,  $F_i$  — сумма сил, которая действует на *i*-ю частицу,  $f_i$  — случайная сила [17].

Эффективная вязкость среды варьировалась от 0.01 до 2. Для численного сравнения этот диапазон вязкостей варьировался от значений, которые характерны для плотных газов, до значений, характерных для маловязких жидкостей типа сжиженных газов (эти значения примерно на два порядка меньше вязкости воды). Значимые эффекты оказываются видны уже при этих вязкостях.

Результат расчета усреднял по выборке из двадцати траекторий, рассчитанных при одинаковых значениях параметров протокола моделирования. Для длинной цепи (AlaGly)<sub>75</sub> и больших значениях вязкости (когда процесс сворачивания был более медленным) проводили также дополнительные расчеты серий из двадцати траекторий длиной 4 нс. При относительно большой эффективной вязкости среды наблюдается фолдинг полипептидных цепей преимущественно в альфаспиральную конформацию.

На рис. 1 показана зависимость числа аминокислотных остатков в альфа-спиральной конформации при различных значениях параметра вязкости. Видно, что при увеличении вязкости от очень низких значений до величины порядка 0.2 имеет место резкое увеличение доли участков цепи в альфа-спиральной конформации. Для относительно низкомолекулярного пептида эта доля возрастает при увеличении вязкости. Для более высокомолекулярного полипептида эта доля выходит на насыщение уже при значении эффективной вязкости порядка 0.5 и составляет практически те же 75%, что и для более низкомолекулярного пептида.

На рис. 2 представлены типичные конформации после сворачивания полипептидов  $(AlaGly)_{25}$ и  $(AlaGly)_{75}$  при различной вязкости среды. Видно, что при большой вязкости среды сворачивание рассматриваемых полипептидов происходит преимущественно в альфа-спиральные конформации.



**Рис. 1.** Зависимость числа аминокислотных остатков в альфа-спиральной конформации при различных значениях параметра вязкости. Принадлежность аминокислотного остатка к альфа-спирали определялась с использованием программы DSSP [18]. Некоторое уменьшение доли аминокислотных остатков в альфа-спиральной конформации для более длинной полипептидной цепи связано с замедлением процесса сворачивания. Увеличение длины траектории до 4 нс нивелирует этот эффект.

На рис. 3 видно, что увеличение вязкости среды делает начальный участок сворачивания более плавным. Обращает на себя внимание тот факт, что конечный участок траектории приводит к близким средним значениям потенциальной энергии системы, хотя эти близкие значения потенциальной энергии соответствуют сильно разным конформациям. Формирование регулярной альфа-спирали оказывается возможным только в достаточно вязкой среде и энергетические соображения в условиях рассматриваемой модели виртуальной вязкой среды оказываются далеко не главными. Быстрая компактизация цепи, которая происходит при малых вязкостях (это можно наблюдать на рис. 4 при сравнении изменений радиусов гирации цепи), не ведет к формированию регулярной пространственной структуры типа альфа-спирали, даже если энергетически эта



**Рис. 2.** Типичные конформации полипептидов (AlaGly)<sub>25</sub> (слева) и (AlaGly)<sub>75</sub> (справа) в результате сворачивания при различной вязкости.



**Рис. 3.** Зависимость средней потенциальной энергии от времени в процессе сворачивания полипептидов (AlaGly)<sub>25</sub> (a) и (AlaGly)<sub>75</sub> (б) при различной вязкости. Усреднение потенциальной энергии проводили по 25 шагам интегрирования.

структура оказывается несколько более выгодной. Заметим, что из приведенных расчетов нельзя сделать выводы о точном различии в энергии конформаций. Это может являться предметом отдельных исследований с учетом всех особенностей в энергии взаимодействия атомов полипептидов с молекулами реальной среды. Но интересно то, что при высокой вязкости репрезентативную точку затягивает в область, отвечающую альфа-спирали, что говорит об определенной динамической корреляции между углами основной цепи [14] и непротивлении такому сворачиванию со стороны топографии энергетической поверхности полипептидов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, вязкость среды имеет важное значение для организации процесса фолдинга полипептидных структур. Рассмотренные поли-

пептидные цепочки, состоящие из аланина и глицина в вязкой среде, сворачиваются во вторичную структуру, преимущественно в альфа-спиральные конформации. Полипептид, состоящий из 150 остатков, формирует две альфа-спирали, соединенные петлей при относительной вязкости, равной 2, а при вязкости, равной 0.5, одну более длинную альфа-спираль. При увеличении вязкости среды до значений, которые сравнимы с вязкостью жидкостей, доля аминокислотных остатков в конформации альфа спирали увеличивается и превышает 70%. При низкой вязкости результат сворачивания можно рассматривать как стохастическую глобулу. Скорость сворачивания уменьшается при увеличении вязкости.

В условиях виртуальной вязкой среды потенциальная энергия альфа-спиральных конформаций мало отличается от энергии стохастической глобулы. Однако с увеличением вязкости среды происходит увеличение количества аминокис-



**Рис. 4.** Изменение радиусов гирации полипептидных цепей (AlaGly)<sub>25</sub> (a) и (AlaGly)<sub>75</sub> (б) при сворачивании при различной вязкости.

лотных остатков, образующих альфа-спирали, несмотря на то что видимого энергетического выигрыша при этом не происходит. Это связано с увеличением корреляции поворотов по торсионных углам полипептидной цепи [14] и, как следствие, направлении траекторий сворачивания в сторону спиральных конфигураций.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-02-40010).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. C. Levinthal, J. Chem. Phys. 65, 44 (1968).
- J. N. Onuchic and P. G. Wolynes, Curr. Opin. Struct. Biol. 14, 70 (2004).

- 3. E. I. Shakhnovich and A. M. Gutin, Nature (Lond.) **346**, 773 (1990).
- А. В. Финкельштейн, Физика белковых молекул (М.-Ижевск, 2014).
- K. A. Dill and J. L. MacCallum, Science 338, 1042 (2012).
- 6. A. Yu. Grosberg and A. R. Khokhlov, *Giant Molecules: Here, There, and Everywhere*, 2<sup>nd</sup> ed. (World Scientific, Singapore, 2011).
- 7. E. R. Henry, R. B. Best, and W. A. Eaton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **110**, 17880 (2013).
- 8. К. В. Шайтан, Биофизика, 63 (4), 629, (2018)
- 9. К. В. Шайтан, Биофизика 63 (5), 850 (2018).
- 10. К. В. Шайтан, Биофизика 63 (1), 5 (2018).
- 11. К. В. Шайтан, Биофизика 62 (1), 5 (2017).
- 12. К. В. Шайтан, М. А. Ложников и Г. М. Кобельков, Биофизика **62**, 249 (2017)
- К. В. Шайтан, Ф. Ю. Попеленский и Г. А. Армеев, Биофизика 62, 443 (2017)
- K. V. Shaitan, in *Stochastic Dynamics of Reacting Bio-molecules*, Ed. by W. Ebeling, L. Schimansky-Gefer, and Y. M. Romanovsky (World Scientific, Singapore, 2003), pp. 283–308.
- 15. S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, et al., Bioinformatics 29, 845 (2013).
- 16. E. J. Sorin and V. S. Pande, Biophys. J. 88, 2472 (2005)
- К. Хир, Статистическая механика, кинетическая теория и стохастические процессы (М., 1976).
- W. G. Touw, C. Baakman, J. Black, et al., Nucl. Acids Res. 43, D364 (2015).

# Effect of Medium Viscosity on Molecular Dynamics of the Formation of Secondary Structure of the (AlaGly)<sub>25</sub> and (AlaGly)<sub>75</sub> Polypeptides

#### A.A. Erendjenova, G.A. Armeev, and K.V. Shaitan

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

Folding of model polypeptide sequences consisting of 50 and 150 amino acid residues with the alanine and glycine repeat was explored using Langevin dynamics techniques at different values of the viscosity of a virtual medium. Starting conformations corresponded to a totally extended chain structure. The change in the dissipative properties of the medium was simulated under varying parameters of the Langevin thermostat. It is shown that there is a sufficiently high and threshold sensitivity of the result of chain folding to the viscosity of the medium. The folding of the considered polypeptide sequences when the viscosity of the medium is already on the order of viscosity of liquefied gases occurs mainly in alpha-helical conformations. With a decrease in the effective viscosity of the medium below the critical value, disordered structures are formed. It is noteworthy that in a virtual environment, energy effects are not an unambiguous criterion for determining conformational motions due to the action of dissipative forces and the selection of possible conformational relaxation paths of the chain, directly affect the folding result in accordance with the predictions of the analytic theory.

Keywords: molecular dynamics, polypeptides, folding, viscosity, secondary structure, potential energy surface

УДК 577.29:615

# ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МАРКИРОВАНИЯ ДНК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА

# © 2020 г. В.Е.Шершов, А.Ю.Иконникова, В.А.Василисков, С.А.Лапа, Р.А. Мифтахов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина

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

*E-mail: nased@biochip.ru* Поступила в редакцию 08.07.2020 г. После доработки 16.07.2020 г. Принята к публикации 17.07.2020 г.

Исследована эффективность маркирования ДНК производными 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, содержащих цианиновый краситель Су7 в качестве флуорофора. Два флуоресцентно-меченых аналога Су7-dUTP различались химическим строением линкера, соединяющего нуклеотид с флуорофором. Эффективность полимеразной цепной реакции и ингибирование модифицированными нуклеотидами исследовали методом ПЦР в реальном времени. Эффективность включения маркированных нуклеотидов в продукты ПЦР оценивали методом количественного электрофореза. Эффективность маркирования ДНК-мишени оценивали по связыванию флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биологического микрочипа (биочипа) с регистрацией результатов в ближнем инфракрасном диапазоне методом цифровой люминесцентной микроскопии. Показано, что увеличение длины линкера приводит к более эффективному встраиванию маркированного нуклеотида. Тем не менее оба соединения обеспечивали высокую чувствительность и специфичность анализа ДНК с использованием аллель-специфичной гибридизации на биочипе.

Ключевые слова: флуоресценция, модифицированные нуклеотиды, цианиновые красители ближнего ИКдиапазона, ПЦР в реальном времени, эффективность ПЦР, биологические микрочипы, аллель-специфичная гибридизация.

DOI: 10.31857/S0006302920050038

При исследовании биологически активных макромолекул используют разные форматы проведения анализа. Один из таких форматов основан на регистрации результатов анализов, проведенных на поверхности твердой подложки с использованием микроколичеств исследуемого вещества [1-3]. Для визуализации результатов широко используют флуоресцентные красители, которыми маркируют макромолекулы, участвующие в процедуре анализа. Наиболее часто используемые красители флуоресцируют в видимой области спектра, где существенная фоновая флуоресценция компонентов анализа может вызвать значительные помехи. Использование красителей Су5 с флуоресценцией в области 650-670 нм способствует снижению фоновой флуоресценции [4, 5]. В ближней инфракрасной области 750-1000 нм, также известной как «биологическое окно», фоновая флуоресценция потенциально может быть еще ниже [6, 7]. Среди органических красителей большой интерес представляют индотрикарбоцианиновые красители, аналоги Су7 с максимумами поглощения и флуоресценции в ближней инфракрасной области. Эти красители достаточно стабильны в условиях проведения молекулярно-биологического анализа и обладают высокими коэффициентами молярной экстинкции и высокими квантовыми выходами флуоресценции [8–10].

ДНК-полимеразы могут воспринимать дезоксиуридинтрифосфаты, маркированные цианиновыми красителями, в качестве субстратов и встраивать флуоресцентно-меченые нуклеотиды в синтезируемую *de novo* цепь ДНК в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1–3]. Ранее было показано, что флуоресцентно-меченые аналоги Су5-dUTP, различающиеся структурой цианинового флуорофора, а также химическим строением линкера, соединяющего нуклеотид с флуорофо-

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, Су7dUTP и Cy5-dUTP – флуоресцентно-меченые аналоги 5'трифосфат-2'-дезоксиуридина.

ром, влияют на взаимодействие с ДНК-полимеразой и соответственно на встраивание модифицированных нуклеотидов в ДНК [4, 5, 9].

В настоящей работе исследована эффективность флуоресцентного маркирования синтезируемой de novo ДНК в ходе ПЦР с помощью флуоресцентно-меченых 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, содержащих индотрикарбо-цианиновый аналог Су7, в зависимости от химического строения линкера, соединяющего флуорофор и маркированный нуклеотид. Для проведения ПЦР использовали две коммерческие Тад-полимеразы с горячим стартом. Для оценки факторов, влияющих на эффективность флуоресцентного маркирования ДНК, использовали комплексный подход, который ранее был разработан на примере аналогов Cy5-dUTP [5]. Ингибирование ПЦР нуклеотидами, маркированными флуоресцентной меткой, исследовали методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Эффективность включения маркированных нуклеотидов в продукты ПЦР оценивали на основании количественного анализа электрофореграмм по каналам SYBR Green I и Су7. Общую эффективность маркирования ДНК оценивали по связыванию флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР с набором олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биочипа с регистрацией результатов в ближнем инфракрасном диапазоне методом цифровой люминесцентной микроскопии. Комбинация этих методов позволила провести сравнительную оценку маркированных нуклеотидов и выбрать оптимальные варианты, обеспечивающие высокую чувствительность и специфичность анализа ДНК методом гибридизации с иммобилизованными олигонуклеотидами.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. В качестве мишени для амплификации использовали участок гена CDYL2, содержащий полиморфизм rs13329835 A>G. Были использованы следующие праймеры: CDYL2\_F -5'-CCAGTGAGGCCAGTACCATCATTT-3' (Forward primer) и CDYL2\_R - 5'-TCATTGGATCTCAT-TACTGGTGGTGGAGCTTTGGGTAT-3' (Reverse primer). Размер продукта составлял 113 п.о. Последовательность обратного праймера включала локусспецифичную часть и адаптер (малые прописные), что позволяло асимметрично нарабатывать ПЦРпродукт в ходе одноэтапной ПЦР для последующей гибридизации на биочипе.

Влияние различных Cy7-dUTP на прохождение ПЦР исследовали с помощью ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего

красителя EvaGreen. Использовали две коммерчески доступные полимеразы с горячим стартом: SynTaq ДНК-полимераза («Синтол», Россия) и Нот Start Таq ДНК-полимераза («СибЭнзим», Россия). Состав реакционной смеси: 5 мкг ДНК, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) в концентрации 200 мкМ каждый, 1×ПЦР буфер (SynTaq и Hot Start Taq, соответственно), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, праймеры в концентрации 300 нМ, 1×EvaGreen (Biotium, США) и 0.75 ед. активности полимеразы на реакцию. Также в реакцию добавляли один из двух Су7-dUTP (dU83, dU84) в концентрации 20, 8 и 4 мкМ. Реакцию проводили на приборе Light-Cycler 96 (Roche, Швейцария) по следующей программе: 94°С − 4 мин, 45 циклов (94°С − 15 с, 62°С − 30 с, 72°С – 30 с) с детекцией флуоресценции по каналу ResoLight.

Для оценки показателя динамики ПЦР в реальном времени использовали скорость амплификации, рассчитанную по тангенсу угла наклона линейного участка кривой накопления флуоресцентного сигнала (tga) [5], которую нормировали на скорость ПЦР без добавления модифицированных нуклеотидов.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле и проводили детекцию по каналу SYBR Green I с помощью системы гельдокументирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, CША) и по каналу Cy7 с использованием исследовательского анализатора гелей. Анализатор гелей имел поле регистрации  $15 \times 15$  см, был снабжен ртутной лампой и встроенным прибором с зарядовой связью RTE/CCD-1536-K/1 (Roper Scientific, Sarasota, США). Возбуждение флуоресценции проводили на длинах волны 615-645 нм, флуоресценцентные сигналы регистрировали в диапазоне пропускания 810-830 нм.

Электрофореграммы анализировали с помощью программы ІтадеІ. Эффективность встраивания (*Eff*) исследуемых Су7-dUTP определяли как долю флуоресцентно-меченого продукта в общем количестве наработанного продукта: *Eff* =  $I_{Cy7}/(I_{SG} \cdot Q_{Cy7} \cdot \varepsilon_{Cy7})$ , т.е. как отношение суммарной интенсивности сигналов по каналу Су7 ( $I_{Cy7} = S \cdot I_{cpeдH}$ , где S – площадь, занимаемая флуоресцентно-меченым продуктом,  $I_{средH}$  – среднее локальное значение флуоресценции ПЦР-продукта) к интенсивности сигналов по каналу SYBR Green I ( $I_{SG} = S \cdot I_{cpedH}$ ), с учетом квантового выхода ( $Q_{Cy7}$ ) и коэффициента молярной экстинкции ( $\varepsilon_{Cy7}$ ).

Для проведения аллель-специфичной гибридизации с флуоресцентно-меченым ПЦР-продуктом использовали иммобилизованные олигонуклеотиды, позволяющие определять два аллеля гена CDYL (аллель A и аллель G). В ячейках биочипа были им-



Рис. 1. Химическое строение изученных аналогов Су7.

мобилизованы ДНК-зонды 5'-СТААТАGGCACA-GAGAGATC-NH2-3' (CDYL2\_A) и 5'-СТААТАGG-CGCAGAGAGAT-NH2-3' (CDYL2\_G), ячейки на чипе продублированы.

В состав реакции входили 1×ПЦР буфер, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 2.5 ед. полимеразы SynTaq («Синтол», Россия), по 1 пМ локус-специфичных праймеров, 100 пМ универсального праймера 5'-ТСАТТGGATCTCATTA-3', 10 нг ДНК и исследуемые Су7-dUTP в концентрациях 20, 8, 4 и 2 мкМ. Гибридизацию на биочипе осуществляли в смеси, содержащей 25% формамида, 5×SSPE, 50 об. % ПЦР-продукта, в течение 6-8 ч при 37°С, после инкубации биочип промывали и высушивали. Флуоресцентные сигналы регистрировали на портативном цифровом люминесцентном микроскопе, с возбуждением в области 615-645 нм и регистрацией флуоресцентных сигналов в диапазоне пропускания 810-830 нм. Изображения анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Использовали образцы ДНК с известными генотипами по локусу CDYL2 rs13329835: гомозигота A/A, гетерозигота A/G и гомозигота G/G. Для определения эффективности маркирования ПЦР-продукта оценивали среднее значение интенсивности флуоресцентного сигнала от совершенных дуплексов. Дискриминационные отношения (ДО) рассчитывали по формуле  $\mathcal{Д}O = \Sigma IA / \Sigma IG$ , где  $\Sigma IA - сумма$  значений сигналов ячеек с иммобилизованными олигонуклеотидами CDYL2\_A,  $\Sigma IG - сумма$  значений сигналов ячеек с иммобилизованными олигонуклеотидами CDYL2\_G.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали два производных 5'-трифосфат-2'дезоксиуридина, связанных по 5'-положению с цвитерионными индотрикарбоцианиновыми красителями (аналогами Су7) и имеющих линкеры различного химического строения. Цвитерионное строение красителя обеспечивает его высокую гидрофильность и уменьшает неспецифическое связывание с ДНК и ДНК-полимеразой, а также влияет на суммарный электрический заряд красителя. В данном исследовании оба соединения имели суммарный нейтральный заряд [6, 11, 12]. Модификация урацила по 5'-положению через транс-алкеновую связь направляет модифицирующую группу в широкую бороздку двунитевой ДНК, а протяженный линкер отдаляет флуорофор от нуклеотида. Структурная формула исследованных флуоресцентно-меченых производных дезоксиуридинтрифосфата приведена на рис. 1, их оптические характеристики представлены в таблице.

В качестве мишени использовали последовательность гена CDYL2, содержащую полимор-

Сокращенное наименование	Заместитель флуорофора R <sup>1</sup>	Фрагмент линкера Х	$\epsilon \cdot 10^{-5},  \mathrm{M}^{-1} \mathrm{cm}^{-1}$	$\lambda^{abs}_{max, HM}$	λ <sup>em</sup> <sub>max</sub> , нм	Квантовый выход <i>Q</i> , %
dU83	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	-CH <sub>2</sub> -	1,95	744	767	27
dU84	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	- (CH <sub>2)5</sub> NHCOCH <sub>2</sub> -	1,99	744	767	29

Оптические характеристики исследованных флуоресцентно-меченых производных дезоксиуридинтрифосфата

Примечание. Измерения проведены в фосфатно-солевом буфере (0.15 M NaCl, 10 mM калий-фосфат, pH 7.4).



**Рис. 2.** Ингибирование полимеразной цепной реакции в зависимости от концентрации Cy7-dUTP. По оси *у* – скорость реакции в присутствии Cy7-dUTP, нормированная на скорость реакции без добавления модифицированного нуклеотида: (а) – ПЦР с полимеразой SynTaq, (б) – ПЦР с полимеразой Hot Start Taq. По оси абсцисс – концентрация Cy7-dUTP.

физм rs13329835 A>G. Белок CDYL2 играет важную роль в развитии опухолевых клеток (рост, метастазирование, пластичность), в т.ч. при раке молочной железы. Также показана роль полиморфизма rs13329835 в повышении риска развития рака молочной железы [13].

Влияние Cy-7-dUTP на скорость амплификации изучали методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen, который встраивается в образующуюся в процессе реакции двухцепочечную ДНК и начинает флуоресцировать. Каждый из исследуемых Cy7-dUTP добавляли в трех концентрациях: 20, 8 и 4 мкМ. В реакции использовали две коммерческие Таq-полимеразы – SynTaq и Hot Start Тад. Результаты представлены на рис. 2. Видно, что в случае обеих полимераз добавление любого из Cy7-dUTP в концентрации 4 или 8 мкм практически не приводит к снижению скорости реакции. Эффект ингибирования проявляется в присутствии 20 мкм Су7-dUTP, однако он выражен в разной степени для двух различных производных. Наименьшее влияние оказывал dUCy83, а в случае dU84 наблюдали заметное снижение скорости реакции (более чем в два раза).

Способность изучаемых модифицированных нуклеотидов встраиваться в ДНК в ходе ПЦР оценивали на основании количественного анализа электрофореграмм, полученных для продуктов ПЦР в реальном времени, по каналам SYBR Green I и Cy7 (рис. 3).

Эффективность встраивания маркированных нуклеотидов Таq-полимеразами определяли по отношению количества флуоресцентно-меченого продукта (определен на канале Су7) к общему количеству наработанного в реакции полноразмерного продукта (определен на канале SYBR Green I) с учетом спектральных характеристик красителей: квантового выхода Q и коэффициента молярной экстинкции е. Следует отметить, что оба производных близки по своим спектральным характеристикам (см. таблицу).

Результаты анализа электрофореграмм для полимераз SynTaq и Hot Start Taq представлены на рис. 4. Эффективность встраивания маркированных нуклеотидов в растущую цепь ДНК возрастает с ростом концентрации маркированных трифосфатов: 4 мкМ < 8 мкМ < 20 мкМ.

Для соединения dU84 наблюдается заметное увеличение встраивания маркированных нуклеотидов по сравнению с dU83, что связано с удлинением линкера, соединяющего флуорофор с нуклеиновым основанием. Аналогичная картина была получена ранее для красителей Су5 и Су3 [9].

Ранее было показано, что в ряду трифосфатов с электронейтральными красителями эффективность встраивания маркированных нуклеотидов несколько выше для цвитерионных красителей на протяженном линкере, эта же закономерность выявлена нами для соединений Cy7-dUTP [8, 9, 14]. Таким образом, в ряду исследованных маркированных трифосфатов наиболее эффективно встраиваются в растущую цепь ДНК соединения с цвитерионным красителем на более протяженном линкере и с суммарным элетронейтральным зарядом (dU84). Такая картина воспроизводима в случае обеих полимераз — SynTaq и Hot Start Taq.

Общую эффективность маркирования ДНК оценивали при связывании флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биочипа с измерением интенсивности флуоресценции красителей в составе ДНКдуплексов. На интенсивность флуоресцентных

868




**Рис. 3.** – Электрофореграммы ПЦР-продуктов, полученных в реакции с полимеразами SynTaq (a) и Hot Start Taq (б). Вверху – детекция по каналу SYBR Green, внизу – по каналу Cy7. *1, 2, 3* – dU83; *4, 5, 6* – dU84; в концентрациях 20, 8 и 4 мкМ каждый соответственно; 7 – продукт ПЦР без модифированного нуклеотида; *8* – маркер длины фрагментов PUC19.

сигналов помимо эффективности встраивания маркированных нуклеотидов в анализируемую ДНК-мишень влияет яркость флуоресценции красителей. Кроме того, красители, связанные с ДНК-мишенью, могут влиять на константу связывания с комплементарным зондом, неспецифически связываться с некомплементарными зондами и элементами биочипа. Также имеет значение количество наработанного продукта при проведении ПЦР. Поэтому общая эффективность маркирования ДНК, определяемая по результатам гибридизационного анализа продуктов ПЦР, является интегральной величиной, которая, собственно, и представляет интерес.



**Рис. 4.** Результаты количественного определения эффективности встраивания модифицированных нуклеотидов для двух полимераз: SynTaq (a) и Hot Start Taq (б). По оси ординат — нормированное значение эффективности встраивания (эффективность встраивания в процентном отношении к максимальному значению для dU84), по оси абсцисс — различные соединения Cy7-dUTP в концентрации 20, 8 и 4 мкМ соответственно.



**Рис. 5.** Результаты гибридизационного анализа. По оси ординат — интенсивность флуоресцентного сигнала от совершенных дуплексов. По оси абсцисс — различные соединения Cy7-dUTP в концентрации 20, 8, 4 и 2 мкМ соответственно.

Эффективность флуоресцентного маркирования ДНК трифосфатами Су7-dUTP в ходе ПЦР с полимеразой SynTaq, определенная по результа-



**Рис. 6.** Результаты гибридизационного анализа на биологическом микрочипе при концентрации 2 мкМ Cy7-dUTP (dU83 или dU84) в однораундовой ПЦР: (а) — картины распределения флуоресцентных сигналов; (б) — дискриминационные отношения для трех генотипов (A/A, A/G, G/G соответственно).

там гибридизационного анализа, представлена на рис. 5. Для полимеразы Hot Start Таq были получены аналогичные результаты.

Интенсивность флуоресцентных сигналов для обоих Cy7-dUTP возрастает с ростом концентрации маркированных трифосфатов в ПЦР смеси: 2 мкм < 4 мкм < 20 мкм (рис. 5) и коррелирует с эффективностью встраивания модифицированных нуклеотидов в ДНК (см. рис. 4). Это означает, что цвитерионные красители Су7 как таковые не влияют на эффективность гибридизационного анализа ДНК.

При сравнении картин гибридизации для dU83 и dU84 наблюдается увеличение интенсивности флуоресцентных сигналов в ряду dU83<dU84 (рис. 5), что также коррелирует с эффективностью встраивания модифицированных нуклеотидов в ДНК (см. рис. 4). Таким образом, для исследованных маркированных трифосфатов интенсивность флуоресцентных сигналов при проведении гибридизационного анализа выше для цвитерионного соединения с более протяженным линкером при суммарном электронейтральном заряде (рис. 5).

Примеры гибридизационных картин представлены на рис. 6а. Как видно, для гомозигот А/А и G/G сигналы от совершенных дуплексов заметно превышают сигналы от несовершенных дуплексов. При гетерозиготном генотипе A/G происходит эффективное связывание с ячейками биочипа, содержащими олигонуклеотиды, комплементарные обоим алеллям. Также было рассчитано дискриминационное отношение для всех трех вариантов генотипа: гомозигот «дикого типа», гетерозигот и гомозигот по «мутации». В случае обоих маркированных трифосфатов полученные значения дискриминационных отношений позволяют достоверно разделить все три генотипа – A/A, A/G и G/G – как в случае dU84, так и в случае dU83 (рис. 6б).

Следует отметить, что даже при минимальных концентрациях Cy7-dUTP (2 мкм) наблюдается достаточно высокий уровень флуоресцентных сигналов. Одной из проблем при использовании цвитерионных цианиновых красителей является их невысокая химическая стабильность и низкий квантовый выход [15, 16]. Исследованные нами 5'-трифосфат-2'-дезоксиуридина производные (аналоги Cy7-dUTP) демонстрируют высокую стабильность и высокий выход флуоресценции, эффективное включение флуоресцентно-меченых нуклеотидов в растущую цепь ДНК с SynTag и Hot Start Тад ДНК-полимеразами и, таким образом, обеспечивают высокую чувствительность и специфичность анализа ДНК при гибридизации с иммобилизованными олигонуклеотидами. Тот факт, что выявленные закономерности воспроизводятся при использовании двух различных

Таq ДНК-полимераз, также подтверждает достоверность полученных данных.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 годы» (соглашение № 05.604.21.0234, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0234).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Т. В. Наседкина, О. Е. Громыко, М. А. Емельянова и др., Молекуляр. биология **48** (2), 2014.
- 2. Д. О. Фесенко, И. С.Абрамов, В. Е. Шершов и др., Молекуляр. биология **52** (6), 997 (2018).

- 3. M. Emelyanova, L. Ghukasyan, I. Abramov, et al., Oncotarget **8** (32), 52304 (2017).
- 4. В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, Ю. П. Лысов и др., Биофизика **60** (6), 1216 (2015).
- 5. Т. С. Лисица, В. Е. Шершов, М. А. Спицын и др., Биофизика **62** (3), 464 (2017).
- V. E. Kuznetsova, M. A. Spitsyn, V. E. Shershov, et al., Mendeleev Commun. 26, 95 (2016).
- 7. М. А. Спицын, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов и др., Биоорган. химия **43** (4), 444 (2017).
- 8. M. A. Spitsyn, V. E. Kuznetsova, V. E. Shershov, et al., Dyes and Pigments **147**, 199 (2017).
- 9. O. A. Zasedateleva, V. A. Vasiliskov, S. A. Surzhikov, et al., Nucl. Acids Res. **46**, e732018 (2018).
- 10. Д. О. Фесенко, Т. О. Гусейнов, С. А. Лапа и др. Молекуляр. биология **52** (3), 533 (2018).
- P. J. Finn, L. Sun, S. Nampalli, et al., Nucl. Acids Res. 30 (13), 2877e85 (2002).
- 12. K. Sato, A. P. Gorka, T. Nagaya, et al., Bioconjug. Chem. 27 (2), 404e13 (2016).
- 13. Y. Hamdi, M. B. Rekaya, S. Jingxuan, et al., BMC Cancer **18** (1), 1295 (2018).
- 14. V. E. Shershov, V. E. Kuznetsova, S. A. Lapa, et al., Mendeleev Commun. 27, 360 (2017).
- 15. P. L. Southwick, L. A. Ernst, E. W. Tauriello, et al., Cytometry **11**, 418e30 (1990).
- O. Mader, K. Reiner, H. I. Egelhaaf, et al., Bioconjug. Chem. 15, 70e8 (2004).

## Study of the Eficiency of DNA Labelling Using Near Infrared Fluorescent Dyes

# V.E. Shershov, A.Yu. Ikonnikova, V.A. Vasiliskov, S.A. Lapa, R.A. Miftakhov, V.E. Kuznetsova, A.V. Chudinov, and T.V. Nasedkina

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

The efficiency of DNA labelling with derivatives of 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates, containing Cy7 cyanine dye as a fluorophore, was assessed. The two fluorescent Cy7l abeled dUTP analogues were distinquished from one another by the chemical structure of the linker used to connect the fluorophore to the nucleotide. The efficiency of polymerase chain reaction and inhibition by modified nucleotides were investigated by real-time PCR. The efficiency of incorporation of labeled nucleotides into PCR products was evaluated by quantitative electrophoresis. The efficiency of target DNA labelling was evaluated by binding of fluorescence-labeled PCR products to a matrice of oligonucleotide probes immobilized in hydrogel drops of biological microarray (biochip) with near infrared hybridization results recorded by digital luminescent microscopy. The increase of the linker length has been shown to result in more efficient incorporation of the labeled nucleotide. However, both compounds provided high sensitivity and specificity of DNA analysis using allelespecific hybridization on a biochip.

Keywords: fluorescence, modified nucleotides, near infrared cyanine dyes, real-time PCR, PCR efficiency, biological microarray, allele-specific hybridization

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА —

УДК 543.645.9

# НАНОКАПСУЛА НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО МИНЕРАЛА КЛИНОПТИЛОЛИТА С ОБОЛОЧКОЙ ИЗ ЛЕЦИТИНА

© 2020 г. А.Г. Погорелов\*, Т.А. Степанова\*, А.И. Панаит\*, В.А. Балашов\*, А.А. Гулин\*\*, \*\*\*, В.Н. Погорелова\*

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3 \*\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4 \*\*\*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3 E-mail: agpogorelov@rambler.ru Поступила в редакцию 22.01.2020 г. После доработки 19.05.2020 г. Принята к публикации 04.06.2020 г.

Разработана технология получения в лабораторных условиях наночастиц природного клиноптилолита — минерала из семейства цеолитов. Размер цеолитовых частиц определяли методом сканирующей электронной микроскопии, а нанокапсул — посредством динамического рассеяния света. Предложена методика нанесения на поверхность наночастицы слоя спирторастворимого фосфатидилхолина (лецитина). Адсорбцию лецитина частицами клиноптилолита изучали методом ультрафиолетовой спектрофотометрии. Показано, что образование комплекса фосфолипида и цеолита в этиловом спирте имеет сложную кинетику, причем в начальной фазе регистрируется адсорбция лецитина с последующей его десорбцией в растворитель.

Ключевые слова: нанокапсула, фосфатидилхолин (лецитин), клиноптилолит (цеолит), УФ-спектрометрия, сканирующая электронная микроскопия, динамическое рассеяние света. DOI: 10.31857/S000630292005004X

Наиболее естественным способом введения в организм нерастворимых в воде соединений является их потребление через желудочно-кишечный тракт. Данный прием особенно предпочтителен в случае необходимости непосредственной доставки веществ в область гастроэнтерального эпителия [1]. Однако ожидаемый эффект может быть менее значимым, что обусловлено действием ферментов (пептидазы, протеазы, амилазы, липазы, нуклеазы) и кислотности (pH  $\sim 2\div8$ ). Чтобы сохранить специфическую активность в условиях агрессивной среды желудка и просвета кишечника, вводимые вещества преобразуют в коллоид или суспензию наночастиц [2–6].

В качестве перспективных материалов при создании капсулы, которая может служить платформой для наноконтейнера, рассматривают неорганические вещества [7–9]. В их ряду находятся цеолиты — алюмосиликаты, которые применяются в пищевом производстве и в агротехнологиях [10–12]. Из семейства природных цеоли-

Сокращение: К/Ц – клиноптилолит/лецитиновый.

тов в биомедицинских целях наиболее широко используют клиноптилолит [13]. Пористая структура значительно увеличивает площадь внешней поверхности частиц данного цеолита, доступной для адсорбции. Показан ряд положительных качеств этого минерала - действие его как антиоксиданта [14], противовоспалительного агента [15] или детоксиканта [16]. Отработан метод получения синтетических наночастиц цеолита в лабораторных условиях [17-22], но их производство ограничено малыми объемами, стоимостью конечного продукта и необходимостью его очистки от исходных ингредиентов, участвующих в реакции. Альтернативой синтетическому продукту может быть природный цеолит, который добывают в промышленных масштабах [12, 23].

Поверхность наночастицы модифицируют с тем, чтобы обеспечить биосовместимость наносистемы из твердого неорганического материала [24–26] или нерастворимого в воде плотного вещества [27, 28] с мишенью. В случае слизистого эпителия предъявляют требование сродства наночастицы и мукусного слоя, что способствует ее закреплению на его поверхности. Мукоадгезивность обеспечивает покрытие частицы фосфолипидом [29, 30], в частности фосфатидилхолином – основным компонентом клеточной мембраны. Фосфолипидное покрытие также выполняет функцию поверхностно активного вещества, что стабилизирует суспензию. Поэтому капсулу, состоящую из цеолита (ядро) и фосфолипида (оболочка), рассматривают в качестве многофункциональной платформы для последующего создания специализированного наноконтейнера.

Примером успешного использования алюмосиликата может быть исследование, в котором изучали кристалл синтетического цеолита как основу транспортера для доставки нуклеиновых кислот и органических молекул [24]. В цитируемой работе применили покрытие из поли-L-лизина, что сделало более эффективным транспорт наночастицы в культивируемую HeLa-клетку. Однако обзор доступной литературы показывает отсутствие работ по созданию наноплатформы на основе природного цеолита. Кроме того, нет данных о том, как поведет себя фосфолипид при взаимодействии с наночастицами этого минерала. Таким образом, цель данной работы состояла в том, чтобы разработать методику получения наноразмерных частиц природного клиноптилолита и изучить сорбцию фосфатидилхолина полученными частипами.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Предподготовка клиноптилолита.** В работе использовали коммерческий препарат «Литовит М» (НПФ «Новь», Новосибирск), который произведен из природного минерала, добытого на Холинском месторождении (Бурятия). Каскадная механическая активация позволяет промышленным способом очистить природный цеолит от примесей и получить образец со 100%-м содержанием активного компонента – клиноптилолита. На начальном этапе подготовки исходный препарат тщательно растирали в фарфоровой ступке при комнатной температуре. В результате получали пудру клиноптилолита, состоящую из частиц микронного размера.

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы визуализировали посредством сканирующей электронной микроскопии. Для этого суспензию частиц клиноптилолита в дистиллированной воде (30 мг/100 мл) обрабатывали предварительно ультразвуком в течение 40 с. Каплю суспензии (~2 мкл) наносили на поверхность держателя образцов электронного микроскопа. Затем воду испаряли при комнатной температуре в струе чистого воздуха, после чего на поверхность образца наносили слой платины. Металл распыляли в среде аргоновой плазмы, ис-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

пользуя установку JFC-1600 (JEOL, Япония). Условия режима напыления были подобраны эмпирически, но, в соответствии с калибровочной кривой, которая прилагается к руководству по эксплуатации прибора, при заданных параметрах напыления формируется пленка толщиной 10 нм. Пленка тяжелого металла на поверхности препарата значительно усиливает сигнал вторичных электронов, снимает электростатический заряд и предохраняет образец от нагрева, который может служит причиной его механического разрушения. Тонкую структуру рельефа объекта изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (JEOL, Япония), при ускоряющем напряжении 25 кВ в режиме вторичных электронов.

Экстракция фосфатидилхолина. Для получения экстракта фосфатидилхолина использовали пищевую добавку E322 марки «ADLEC» (Lecigran 1000Р, производитель - Cargill, Германия), которая представляет собой смесь полярных фосфолипидов. Навеску препарата (600 мг) тщательно размешивали в 6 мл этилового спирта до состояния однородной суспензии. Экстракцию лецитина проводили в этиловом спирте при комнатной температуре в течение суток, после чего нерастворенный компонент отделяли центрифугированием при 600 g в течение 10 мин. Полученный маточный экстракт отбирали в чистую стеклянную герметичную пробирку, которую хранили при 4°С в темноте. Для экспериментов использовали рабочий раствор, который представляет собой маточный экстракт, разбавленный в 30 раз этиловым спиртом.

**УФ-спектрометрия.** В ультрафиолетовой области спектра поглощения фосфатидилхолина регистрируют три максимума: 200–210, 235 и 280 нм. Для измерений мы использовали пик поглощения карбонильными группами на длине волны 235 нм. Выбор был обусловлен нестабильностью сигнала на длине волны 200–210 нм, а также относительно низким уровнем пика на 280 нм. Оптическая плотность рабочего раствора лецитина на характерной длине волны (235 нм) составляет 0.76 единицы, что соответствует оптимальным условиям для аналитических измерений на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наноядро из природного клиноптилолита. В результате предварительной подготовки препарата «Литовит М» получили образец, состоящий из частиц микронного размера. В основу дальнейшей процедуры положена низкотемпературная обработка, для чего порошок микронных частиц клиноптилолита тщательно растирали в агатовой ступке при температуре –35°С. Схематично по-



Рис. 1. Последовательность получения наноразмерных частиц клиноптилолита. В эксперименте использовали коммерческий препарат «Литовит М» (НПФ «Новь», Новосибирск), который произвели из природного минерала, добытого на Холинском месторождении (Бурятия).

следовательность получения наноразмерных частиц клиноптилолита приведена на рис. 1.

Полученную при низкой температуре пудру переносили в парах жидкого азота в вакуумную камеру, где образец постепенно нагревали до

комнатной температуры. Такой прием позволяет исключить конденсацию на поверхность холодного образца микрокапель воды из атмосферы, что вызывает агрегацию наночастиц. Частицы клиноптилолита визуализировали методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2).

На рис. 2 приведены микрофотографии, демонстрирующие внешний вид препарата клиноптилолита на разных этапах предложенной технологии. Видно, что предобработка исходного препарата (рис. 2а) дает частицы микронного размера (рис. 26). После низкотемпературной обработки следует избегать контакта холодного образца с комнатной атмосферой, что вызывает агрегацию наночастиц в субмикронные кластеры (рис. 2в). При условии выполнения данного требования получаем готовый препарат частиц, размер которых визуально можно оценить в несколько десятков нанометров (рис. 2г). Указанная величина соответствует размеру синтетического нанокристалла L-цеолита, что показано методом просвечивающей электронной микроскопии [24].

Клиноптилолит/лецитиновый комплекс. Исходно был определен интервал времени, необходи-



**Рис. 2.** Микрофотографии частиц клиноптилолита: (а) – исходный препарат «Литовит М»; (б) – порошок, полученный после размола препарата в фарфоровой ступке при комнатной температуре; (в) – микронные агрегаты наночастиц, которые образуются после контакта пудры холодного препарата с атмосферными парами воды; (г) – наноразмерные частицы, полученные после размельчения пудры в агатовой ступке при низкой температуре (–35°С) с последующим плавным нагреванием препарата до комнатной температуры в вакууме.



**Рис. 3.** Изменение со временем оптической плотности на длине волны 235 нм в спектре поглощения рабочего раствора лецитина в этиловом спирте при инкубации в нем наночастиц клиноптилолита.

мый для завершения связывания лецитина клиноптилолитовым ядром. Исследование проводили следующим образом. Порцию наночастиц клиноптилолита (20 мг) инкубировали при комнатной температуре в течение разного временного интервала (1/4 ч, 1/2 ч, 1 ч, 1.5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч или 6 ч) в 4 мл рабочего раствора лецитина, перемешивая горизонтальным встряхиванием. Полученную суспензию центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Затем в кварцевую кювету отбирали 3 мл надосадочной жидкости, которую исследовали методом УФ-спектрометрии. Связывание лецитина сопровождается уменьшением его содержания в растворе, чему соответствует снижение оптической плотности на длине волны 235 нм. На рис. 3 показана кривая изменения величины данного параметра со временем при инкубации наночастиц клиноптилолита в рабочем растворе лецитина.

Кинетика сорбции лецитина имеет сложный характер (рис. 3). В интервале 1.5 ч оптическая плотность достигает минимального значения (~0.4), что означает максимальный уровень связывания фосфатидилхолина. Образование клиноптилолит/лецитинового (К/Ц) комплекса реализуется через адсорбцию, так как размер (~0.2 нм) пор цеолита не позволяет молекулам фосфолипида диффундировать внутрь частицы. Отметим, что адсорбция обратима, так как со временем оптическая плотность раствора восстанавливается до начального уровня (рис. 3). Данный факт свидетельствует о десорбции лецитина с поверхности клиноптилолитового ядра. Неустойчивость К/Ц-комплекса, возможно, обусловлена двумя разнонаправленными процессами: сорбцией фосфолипида на поверхности частицы и его последующим растворением в этиловом спирте.



Рис. 4. Изменение оптической плотности на длине волны 235 нм в спектре поглощения раствора лецитина в этиловом спирте: 1 – исходный рабочий раствор лецитина, 2 – рабочий раствор лецитина после 1.5 ч инкубации в нем 20 мг наночастиц клиноптилолита, 3 – раствор этилового спирта после 24 ч инкубации в нем капсул клиноптилолита, покрытых лецитином. На врезке: распределение размера нанокапсул с ядром из клиноптилолита и лецитиновой оболочкой, данные получены методом динамического светорассеяния.

Клиноптилолит/лецитиновая капсула. Рассматриваемая кинетика (рис. 3) достаточно медленная, с пролонгированным во времени выраженным экстремумом, что позволяет сепарировать К/Ц-комплекс. После образования комплекса (1.5 ч инкубации наночестиц в рабочем растворе) К/Ц-суспензию центрифугировали (600 g. 10 мин). Осадок переносили в 15 мл бидистиллированной воды с тем, чтобы за счет гидрофобных взаимодействий стабилизировать лецитиновую оболочку, а также отмыть несвязанный фосфатидилхолин. В результате получили водную суспензию капсул с клиноптилолитовым ядром и лецитиновым покрытием. Наличие оболочки проверяли следующим образом. Полученную суспензию центрифугировали (600 g, 10 мин), отбирали слой воды, а к осадку, содержащему К/Цкапсулы, добавляли 3 мл этилового спирта. В течение последующих 24 ч лецитин полностью выходит в раствор (рис. 3), что оценивали по увеличению оптической плотности раствора на длине волны 235 нм (рис. 4).

На диаграмме (рис. 4) приведены сравнительные данные. Можно видеть, что формирование К/Ц-комплекса (рис. 4, 2) снижает оптическую плотность исходного рабочего раствора лецитина (рис. 4, 1). В результате добавления к осадку К/Цкапсул этилового спирта наблюдается десорбция лецитина (рис. 4, 3), что свидетельствует о наличии оболочки. Отметим, что количество лецити-

на, потраченного на формирование К/Ц-комплекса (разница между значениями 1 и 2 на рис. 4), практически совпадает с его количеством, выделенным при растворении оболочки К/Цкапсулы (рис. 4, 3).

Важным критерием является размер частиц конечного продукта. К сожалению, трудно разработать адекватную методику подготовки препарата для визуализации К/Ц-комплекса методом сканирующей электронной микроскопии. Препятствием служит лецитин оболочки, который разрушается в вакуумной камере прибора под пучком ускоренных электронов. Поэтому линейный размер капсулы оценивали в водной суспензии методом динамического светорассеяния. Видно (рис. 4, врезка), что исследуемый параметр варьирует в диапазоне 140-260 нм с максимумом распределения в области 190 нм. Указанная величина близка по значению размеру синтетического нанокристалла L-цеолита после нанесения на его поверхность оболочки из поли-L-лизина, что также показано методом динамического светорассеяния [24].

Сочетание наноразмера и фосфолипидного покрытия является обязательным условием успешной диффузии частицы через барьерный слой слизи энтерального эпителия [31, 32]. Указанные критерии соблюдены при создании К/Цкапсулы, которая может служить многофункциональной платформой при создании нанотранспортера. Для этого можно использовать электростатическое взаимодействие лецитина оболочки с молекулой активного вещества или ее растворимость в фосфолипиде. Однако следует учитывать не только свойства лецитинового покрытия, но и положительные качества клиноптололитового ядра К/Ц-капсулы, например, антиоксидантную активность цеолита [14], его противовоспалительное действие [15] или ионообменные характеристики, что используют при детоксикации [16].

Завершая обсуждение результатов, можно сделать следующие выводы. В лабораторных условиях нами получены наночастицы природного клиноптилолита. Предложенная процедура не требует привлечения сложных технологий и больших затрат энергии. Однако обязательным условием является низкотемпературная обработка на завершающих стадиях подготовки препарата наночастиц. Нами разработан метод формирования наноразмерной капсулы с цеолитовым ядром и оболочкой из лецитина с использованием экстракта фосфатидилхолина в этиловом спирте. Учитывая физико-химические свойства структурных элементов капсулы, данная конструкция может быть использована в качестве многофункциональной платформы при создании наноконтейнера.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работу проводили в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00845-20-00. Развитие методов визуализации микрообъектов и подходов для УФ-спектрометрии фосфолипидов выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00019).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. M. Simonoska-Crcarevska, M. Glavas Dodov, and K. Goracinova, Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics **68**, 565 (2008).
- 2. D. Render, T. Samuel, H. King, et al., J. Nanomaterials **2016**, 1 (2016).
- 3. E. Allemann, J.-C. Leroux, and R. Gurny, Adv. Drug Delivery Rev. 34, 171 (1998).
- 4. Y. Hu, X. Jiang, Y. Ding, et al., Biomaterials 23, 3193 (2002).
- 5. A. Jintapattanakit, V.B. Junyaprasert, S. Maob, et al., Int. J. Pharmaceutics **342**, 240 (2007).
- J. Zhu and R.C. Hayward, Angew. Chem. Int. Ed. 47, 2113 (2008).
- 7. X. Yu, A. Khalil, P.N. Dang, et al., Adv. Funct. Mater. 24, 3082 (2014).
- 8. S. Kar, J. Biotechnol. Biomater. 6, 3 (2016).
- A. Stefanache, M. Ignat, C.A. Peptu, et al., Appl. Sci. 7, 237 (2017).
- D. Kojića, S. Pajevića, J A. Jovanović-Galovića, et al., J. Soil Sci. and Plant Nutrition 12, 113 (2012).
- 11. R.Y. Yada, N. Buck, R. Canady, et al., Food Science and Food Safety **13**, 730 (2014).
- K. Bohacs, J. Faitli, L. Bokanyi, and G. Mucsi, Metall. Mater. 62 (2B), 1399 (2017).
- 13. A. Mastinu, A. Kumar, G. Maccarinelli, et al., Molecules, **24**, 1517 (2019).
- 14. P. Pellegrino, B. Mallet, S. Delliaux, et al., Biochem. Biophys Res. Commun. **410**, 478.
- 15. L. Bacakova, M. Vandrovcova, I. Kopova, and I. Jirka, Biomaterials Sci. 6, 974 (2018).
- M. M. Selim, D. M. El-Mekkawi, R. M. M. Aboelenin, et al., J. of Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences 24, 19 (2017).
- 17. E. B. G. Johnson and S. E. Arshad, Appl. Clay Sci. 98, 215 (2014).
- M. A. Severance, Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Graduate School of The Ohio State University, 2014).

- 19. Y. Tian, Thesis for the Degree of PhD (University of St. Andrews, 2014).
- 20. S. Mintova, J. Grand, and V. Valtchev, Comptes Rendus Chimie 19, 183 (2016).
- 21. E. K. Tiburu, A. Salifu, E. O. Aidoo, et al., J. Nano Res. 48, 156 (2016).
- 22. L. Tosheva, S. Belkhair, M. Gackowski, et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **157**, 254 (2017).
- 23. A. M. Elhassan, Int. J. Cur. Adv. Res. 5, 1304 (2016).
- 24. A. Bertucci, H. Lülf, D. Septiadi, et al., Adv. Healthcare Mater. **3**, 1812 (2014).
- 25. L.-L. Li, R. Zhang, L. Yin, et al., Angew Chem. Int. Ed. Engl. 51, 6121 (2012).

- 26. L. E. Euliss, J. A. DuPont, S. Gratton, and J. DeSimone, Chem. Soc. Rev. 35, 1095 (2006).
- 27. A. Grenha, C. Remunan-Lopez, E. L. S. Carvalho, and B. Seijo, Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics **69**, 83 (2008).
- E. M. Shchukina and D. G. Shchukin, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 17, 281 (2012).
- 29. G. Fricker, T. Kromp, A. Wendel, et al., Pharm. Res. 27, 1469 (2010).
- 30. F. Baldassarre, C. Allegretti, D. Tessaro, et al., Chemistry Select 1, 6507 (2016).
- L. M. Ensign, R. Cone, and J. Hanes, Adv. Drug Delivery Rev. 64, 557 (2012).
- 32. S. Kotta, A. W. Khan, K. Pramod, et al., Expert Opin. Drug Deliv. 9, 585.

## A Clinoptilolite Natural Mineral-Based Nanocapsule Surrounded by a Shell Composed of Lecithin

A.G. Pogorelov\*, T.A. Stepanova\*, A.I. Panait\*, V.A. Balashov\*, A.A. Gulin\*\*, \*\*\*, and V.N. Pogorelova\*

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

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

\*\*\*Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskye Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

We propose a paper on the preparation procedure of zeolite clinoptilolite natural mineral-based nanocapsules in laboratory seting. The zeolite particle size distribution was determined in scanning electron microscopy images and the nanocapsule size distribution was measured by dynamic light scattering. The method for coating of the nanoparticle surface with alcohol soluble phosphatidylcholine (lecithin) is presented. UV spectrometry was used to study the adsorption of lecithin on clinoptilolite nanoparticles. The kinetics of clinoptilolite/ lecithin complex was shown to exhibit intricate behavior, when phospholipids adsorption is followed by its gradual desorption in ethanol solution.

Keywords: nanocapsule, phosphatidylcholine (lecithin), clinoptilolite (zeolite), UV spectrometry, scanning electron microscopy, dynamic light scattering

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 579.66

## МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ: МЕХАНИЗМЫ, ХАРАКТЕРИСТИКИ, ПРИМЕНЕНИЕ

## © 2020 г. Т.А. Воейкова\*, О.А. Журавлева\*, В.С. Кулигин\*, Е.И. Кожухова\*\*, Е.В. Иванов\*\*, В.Г. Дебабов\*

\*\*НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1 \*\*\*НИЦ «Курчатовский институт» — ИРЕА, 107076, Москва, ул. Богородский вал, 3

> *E-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru* Поступила в редакцию 26.11.2019 г. После доработки 05.06.2020 г. Принята к публикации 08.06.2020 г.

Биогенные наночастицы сульфидов кадмия и цинка NPsCdS и NPsZnS получены методом микробного синтеза при использовании бактерий различных таксономических групп — грамотрицательной *Shewanella oneidensis* MR-1 и грамположительной *Bacillus subtilis* 168 — в жидкой среде, в аэробных условиях, в присутствии солей соответствующих металлов и серы. Показано, что стабилизация наночастиц в водных суспензиях осуществляется за счет присутствия на поверхности наночастиц определенных белковых молекул наружной мембраны клеток — белков семейств различных рецепторов, поринов, флагеллина. Исследовано влияние белкового покрытия на стабильность, люминесценцию, ζ-потенциал, гидродинамический диаметр и другие физико-химические характеристики наночастиц. Фотокаталитические свойства NPsCdS продемонстрированы на модели деколоризации красителя метиленового синего при воздействии ультрафиолетового света, что открывает возможность применения биогенных наночастиц в фотокатализе при очистке промышленных отходов.

Ключевые слова: микробный синтез, биогенные наночастицы, флуоресценция, фотокатализ, метиленовый синий.

DOI: 10.31857/S0006302920050051

Халькогениды металлов, такие как CdS и ZnS, являются нанокристаллами полупроводников и квантовыми точками. Они обладают уникальными электронными и оптическими свойствами, находят применение в оптике, электронике, фотоэлектрохимии, преобразовании солнечной энергии, биомедицинских исследованиях, охране окружающей среды, как антимикробные агенты.

Биологический метод получения наночастиц металлов, сульфидов и оксидов с использованием биологических субстанций — бактерий, дрожжей, грибов, экстрактов растений — интенсивно разрабатывается в последние годы. Биосинтез наночастиц с помощью микроорганизмов экологически безопасен, осуществляется при оптимальной для биологического объекта температуре, атмосферном давлении, без образования токсичных отходов, масштабируем, позволяет получать дисперсные наночастицы различной формы с узким распределением по размеру, обеспечивает стабильность наночастиц в водных суспензиях и может являться дополнением к физико-химическим методам синтеза наноматериалов.

Стабильность биогенных наночастиц достигается за счет адсорбции на поверхности наноструктур биополимеров, в большинстве случаев, белков, синтезируемых клетками. Удаление белков с поверхности наночастиц приводит к их агломерации и седиментации.

Белки, покрывающие наночастицы, — белковая «корона» — определяют многие свойства, такие как взаимодействие с тканями и клетками живых организмов, судьбу частиц в окружающей среде [1], токсичность [2], влияют на оптикоэлектронные свойства [3].

Фотокаталитическая деградация органических соединений вызывает большой интерес, поскольку имеет экологическое преимущество по сравнению с традиционными методами. В последние десятилетия наночастицы, включающие халькогениды металлов, стали разрабатываться как эффективные катализаторы для фотохимической деградации органических красителей. Форма и размер нанокристаллов, их поверхностное

Сокращения: УФ – ультрафиолетовый, МС – метиленовый синий.

покрытие играют существенную роль в эффективности процесса фотокатализа [4].

Механизмы бактериального синтеза наночастиц и их стабилизации полностью не выяснены. В научной литературе рассматриваются два основных механизма биогенного образования наночастиц металлов и их солей. В первом случае при получении наночастиц металлов из соответствующих солей происходит восстановление ионов металлов различными редуктазами микроорганизмов и адсорбция на поверхности наночастиц гидрофильных молекул, в основном белков, поставляемых клетками бактерий и препятствующих агломерации и седиментации наноматериала. Второй механизм связан с образованием наночастиц сульфидов металлов в среде, содержащей источники ионов металлов и серы. В этом случае сульфидные соединения образуются в результате химической реакции, клетки не являются участниками процесса образования сульфид иона, но они участвуют в образовании наночастиц, предоставляя свои специфические белки и стабилизируя их в водной суспензии. Эти белки, находящиеся на поверхности клеток и в биополимерном матриксе, могут служить центрами адсорбции и последующего роста наночастиц. Нами было показано, что состав белкового слоя на поверхности наночастиц сульфидов металлов определяется штаммом, использованным при получении наноматериала, характеризуется избирательностью адсорбции на поверхность наночастиц определенных белков из общего пула белковых молекул, не строго зависит от химического состава наночастиц и состоит в основном из белковых молекул наружной мембраны клеток бактерий – белков семейств различных рецепторов, поринов, флагеллина [5].

Целью работы являлось исследование влияния белкового покрытия на стабильность, ζ-потенциал, люминесценцию, гидродинамический диаметр наночастиц NPsCdS и NPsZnS, имеющих на своей поверхности принципиально различные наборы белковых молекул, синтезированных в присутствии бактерий, принадлежащих к грамотрицательной (S. oneidensis MR-1) и грамположительной (B. subtilis 168) таксономическим группам. Также в задачи работы входили оценка фотокаталитических свойств NPsCdS на модели деколоризации метиленового синего при воздействии ультрафиолетового света и получение количественных характеристик процесса для возможного применения биогенных наночастиц сульфида кадмия в качестве фотокатализатора для очистки промышленных стоков от красителей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробный синтез наночастиц NPsCdS, NPsZnS в присутствии штаммов Shewanella oneidensis MR-1 и Bacillus subtilis 168. Оптимизированная нами методика была использована для биосинтеза наночастиц сульфида кадмия и сульфида цинка в присутствии бактерий S. oneidensis MR-1 (№ В-9861) и *В. subtilis* 168 (№ В-7360) из Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика. В дальнейшем будем использовать обозначения NPsCdS/S. oneidensis, NPsCdS/B. subtilis, NPsZnS/S. oneidensis и NPsZnS/B. subtilis.

Штаммы микроорганизмов выращивали в колбах, содержащих 100 мл жидкой питательной Luria-Bertani, на круговой качалке среды при 220 об/мин, в течение 24 ч при 30°С. Затем к культуральной жидкости, содержащей бактериальные клетки, приливали водные растворы солей источников ионов серы (Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O, квалификации «х.ч.», «Химмед», Россия) и металла  $(CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$  или ZnCl<sub>2</sub>, квалификации «ч.д.а.», «Химмед», Россия) до конечной концентрации 2 мМ для каждого. Реакционные смеси инкубировали аэробно при тех же условиях. Клетки удаляли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин (центрифуга High speed 18, MSE, Великобритания), надосадок (декантат) сливали и пропускали через мембранный фильтр Nucleроге с диаметром пор 200 нм (Whatman, Великобритания). Наночастицы NPsCdS, NPsZnS ocaждали и отмывали от остатков фильтрата центрифугированием при 32000 об/мин в течение 1 ч (центрифуга L5-50, Beckman, США), после чего осадки наночастиц ресуспендировали в 1.0 мл стерильной деионизированной воды Milli Q (Millipore, США) и хранили в микроцентрифужных пробирках типа Эппендорф при 4°С.

Электрофоретические характеристики биогенных NPsCdS, NPsZnS. Гидродинамический диаметр биогенных наночастиц с учетом белкового покрытия и ζ-потенциал поверхности NPsCdS и NPsZnS измеряли на анализаторе размера частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания) методом динамического и электрофоретического рассеяния света.

Оптические свойства биогенных наночастиц. Параметры флуоресценции водных суспензий биогенных NPsCdS, NPsZnS определяли с использованием ультрафиолетовой (УФ) лампы с длиной волны до 380 нм. Спектры флуоресценции для всех образцов и зависимость интенсивности флуоресценции NPsCdS/S. oneidensis от степени разведения водной суспензии наночастиц с концентрацией 1 мг/мл в 100, 400, 800 и 1000 раз регистрировали на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Люмекс, Россия) при

879

оптимальной длине волны возбуждения ( $\lambda_{\rm B} = 270$  нм).

Влияние органических растворителей на стабильность и флуоресценцию биогенных наночастиц NPsCdS/*B. subtilis.* Для решения вопроса дальнейшего применения биогенных наночастиц в композитных материалах требовалось оценить влияние универсальных промышленных растворителей N,N-диметилформамида, диметилсульфоксида, N-метилпирролидона и ацетона на стабильность коллоидной системы биогенных наночастиц и их оптические свойства. Для этого водную суспензию NPsCdS/*B. subtilis* вносили по 0.1 г в 5 г каждого растворителя. Поведение коллоидной системы NPsCdS/растворитель оценивали визуально и с помощью спектрофлуориметра (при  $\lambda_{\rm B} = 270$  нм).

Фотокаталитическая деградация метиленового синего NPsCdS/B. subtilis. В эксперименте использовали люминесцентный диагностический осветитель ОЛДД-01 (лампа Вуда) мощностью 9 Вт, основанный на длинноволновом УФ-излучении с рабочей длиной волны 356 нм и имеющий спектральный диапазон возбуждения флуоресценции 340-380 нм. Исходный раствор красителя метиленового синего (МС) (квалификация «ч.д.а.», «Реахим», Россия) готовили на деионизированной воде Milli Q в концентрации 50 ppm (0.05 мг/мл). В чашки Петри (диаметр 60 мм) были внесены растворы МС с различными концентрациями NPsCdS/B. subtilis в объеме 16 мл (концентрация 0.67 мг/мл – образец № 1; 0.33 мг/мл – № 2; 0.17 мг/мл — № 3). В качестве контрольных образцов использовали раствор МС без наночастиц, установленный в чашке Петри под УФ-лампу (№ 4) и раствор МС без наночастиц в чашке Петри, инкубированный в темноте (№ 5), поскольку известно, что длительное воздействие УФ-облучения приводит к обесцвечиванию и фотокаталитической деградации МС [6]. Все образцы облучали УФ-светом с длиной волны 365 нм в течение 3 ч, установив лампу Вуда на расстоянии 30 см над чашками Петри. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли каждый час на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 670 нм, близкой к пику поглощения раствора МС (~665 нм), в кюветах с длиной оптического пути 1 мм. По результатам трех экспериментов в программе Microsoft Excel строили графики зависимости оптической плотности образцов от времени воздействия УФ-облучения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика биогенных наночастиц NPsCdS, NPsZnS. Биогенные NPsCdS, NPsZnS были получены нами по оптимизированной методике [7], которая состоит в проведении реакции образования наночастиц сульфидов металлов непосредственно в жидкой питательной среде, содержащей клетки бактерий и обогащенной белковыми молекулами, синтезированными штаммами в процессе культивирования, а также соли – источники ионов металлов и серы. Используя оптимизированную методику получения биогенных наночастиц, мы увеличили количество белка в реакционном растворе в пять раз, что позволило повысить выход наночастиц на 15-20%. Разработанная нами оптимизированная схема получения биогенных наночастиц сульфида серебра оказалась наиболее эффективной по сравнению со стандартными процессами бактериального синтеза такого типа наноматериала [8, 9] и применяется в настоящее время для биосинтеза наночастиц различного химического состава. Концентрация биогенных NPsCdS, NPsZnS в водных суспензиях зависела от бактериального штамма и варьировала в диапазоне 1-3 мг/мл [10]. Нами было показано, что состав белкового покрытия наночастиц индивидуален и постоянен для каждого из применяемых для биосинтеза бактерий и не строго зависит от химического состава наночастиц сульфидов металлов [5]. На поверхности всех видов наночастиц, полученных при помощи штамма S. oneidensis, было выявлено более 15 видов белковых молекул различной молекулярной массы – от 170 до 20 кД, принадлежащих к внешней цитоплазматической мембране клетки. При этом состав белков был практически одинаков для различных по химическому составу наночастиц сульфидов металлов. При использовании для биосинтеза штамма B. subtilis на поверхности наночастиц выявлен только один белок - флагеллин с молекулярной массой ~36 кДа. Диаметр наночастиц, определенный с использованием просвечивающего электронного микроскопа, составляет для NPsCdS 5  $\pm$  1 нм, для NPsZnS -1-2 нм и не зависит от использованных для биосинтеза бактерий: S. oneidensis и B. subtilis. Форма наночастиц близка к сферической, они являются нанокристаллическими квантовыми точками [11, 12].

В настоящей работе исследовано влияние штаммов, определяющих состав белков на поверхности наночастиц, на электрофоретические характеристики биогенных NPsCdS и NPsZnS. В научной литературе представлены данные о том, что на спектр флуоресценции могут влиять органические молекулы, покрывающие наночастицы. Так, квантовые точки ZnS, полученные с использованием клеток *Clostridiaceae* sp., имели лучшее поглощение в видимой области и более высокую интенсивность флуоресценции по сравнению с их химическими аналогами [13]. Показано, что у биогенных наночастиц NPsZnS оптические спектры поглощения и ширина запрещенной зоны отличаются от аналогичных по-

#### МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ

Характеристика наночастицы	Штаммы, использованные для получения наночастиц			
	S. oneidensis MR-1		B. subtilis 168	
	NPsCdS	NPsZnS	NPsCdS	NPsZnS
Диаметр, нм	$5\pm 1$	1-2	$5\pm 1$	1-2
Гидродинамический диаметр, нм	$160 \pm 2$	$220 \pm 10$	$250 \pm 2$	$480 \pm 20$
ζ-потенциал, мВ	$-22.4\pm2.0$	$-27,8 \pm 2.0$	$-20.5 \pm 2.0$	$-11.1 \pm 1.0$
Относительная интенсивность флуоресценции	0.1	0.055	0.008	0.0075
Длина волны максимума полосы флуоресценции при λ <sub>в</sub> =270 нм	340	340	320	350

Основные характеристики биогенных наночастиц NPsCdS и NPsZnS

казателей для частиц, полученных химическими методами [14]. Продемонстрировано увеличение интенсивности флуоресценции NPsCdS, коррелирующее с продолжительностью культивирования бактерии *Desulforibrio caledoiensis* и, вероятно, с составом белков на поверхности наночастиц [15].

В таблице представлены основные характеристики наночастиц NPsCdS и NPsZnS, полученных с использованием S. oneidensis и B. subtilis. Как видно из таблицы, диаметр биогенных наночастиц сульфидов кадмия и цинка, определяемый с использованием просвечивающего электронного микроскопа, составляет  $5 \pm 1$  нм для NPsCdS и 1-2 нм для NPsZnS, полученных в присутствии как S. oneidensis, так и B. subtilis, т.е. существует различие по размеру, не зависящее от применяемого штамма. Важно, что для всех NPsCdS и NPsZnS биогенного происхождения свойственно наличие белкового покрытия, определяемого как величина гидродинамического диаметра, при этом грамположительная бактерия B. subtilis склонна к образованию более значительного по размеру белкового слоя на поверхности наночастиц NPsCdS и NPsZnS: 250 и 480 нм соответственно. Наночастицы NPsCdS/S. oneidensis и NPsZnS/S. oneidensis характеризуются меньшей величиной гидродинамического диаметра (~160 и ~220 нм соответственно), что говорит о влиянии бактериального штамма на данный электрофоретический параметр.

Биогенные наночастицы имеют отрицательный  $\zeta$ -потенциал поверхности, который варьирует в близких значениях для NPsCdS/S. oneidensis, NPsZnS/S. oneidensis и NPsCdS/B. subtilis (-22.4  $\pm$  2.0, -27.8  $\pm$  2.0 и -20.5  $\pm$  2.0 мВ соответственно). Поскольку величина  $\zeta$ -потенциала, достигающая  $\pm$ 30 мВ, характеризует коллоидный раствор как стабильный [16], можно заключить, что водные суспензии NPsCdS и NPsZnS, рассмотренные выше, относятся к метастабильным системам. Приведенные данные контрастируют с величинами электрофоретических характеристик

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

NPsZnS/*B. subtilis*: при низком значении ζ-потенциала ( $-11.1 \pm 1.0$  мВ) величина гидродинамического диаметра составляет 480 ± 20 нм, что почти в 2.2 раза превышает аналогичный параметр для NPsZnS/S. oneidensis (220 ± 10 нм при  $-27.8 \pm 2.0$  мВ). Такая разница величин свидетельствует о нестабильности коллоидной системы NPsZnS/*B. subtilis*, склонной к агломерации наночастиц и выпадению осадка. Возможно, что два параметра – гидродинамический диаметр и ζ-потенциал, – определяемые штаммом *B. subtilis* 168, связаны со структурой белка флагеллина, присутствующего на поверхности NPsZnS.

Анализ зависимости интенсивности флуоресценции биогенных наночастиц сульфидов металлов от применяемых для их получения штаммов показал, что при использовании бактерии B. subtilis наблюдается снижение интенсивности излучения как NPsCdS, так и для NPsZnS, содержащих на своей поверхности белок флагеллин. Возможными причинами этого феномена могут быть конформационные особенности флагеллина или наличие крупных агломератов наночастиц в образцах водных суспензий NPsCdS/B. subtilis, NPsZnS/B. subtilis. Определение механизма данного явления требует дополнительных исследований. При этом вне зависимости от бактериального штамма, определяющего белковое покрытие наночастиц, для всех образцов при  $\lambda_{\rm B} = 270$  нм наблюдается максимум полосы флуоресценции в схожем диапазоне длин волн 300-400 нм. В качестве примера на рис. 1 представлены спектры флуоресценции наночастиц сульфидов цинка, полученных с использованием разных штаммов, интенсивность флуоресценции гле для NPsZnS/S. oneidensis и NPsZnS/B. subtilis составляет 0.055 и 0.0075 единиц соответственно.

Оценка интенсивности флуоресценции NPsCdS/ S. oneidensis MR-1 в зависимости от концентраций наночастиц. Использование биогенных наночастиц для создания полимерных нанокомпозитных материалов и исследование параметров фотокаталитических процессов с участием наноча-



**Рис.** 1. Спектры флуоресценции NPsZnS, синтезированных с использованием штаммов *S. oneidensis* MR-1 (a) и *B. subtilis* 168 (6).

стиц предполагает оценку зависимости интенсивности флуоресценции NPsCdS от концентрации наночастиц в образцах. Установлено, что максимальное значение интенсивности испускаемого излучения биогенного флуорофора NPsCdS/S. oneidensis достигалось при длине волны возбуждения 270 нм [12]. Нами была определена интенсивность флуоресценции водной суспензии, содержащей NPsCdS в концентрации 1 мг/мл, при ее последовательных разведениях. Максимальные значения пика флуоресценции для NPsCdS наблюдались при длине волны излучения 340 нм. Для каждого разведения водной суспензии NPsCdS был построен график зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны излучения. Показано, что при разведениях в 10, 100, 800 и 1000 раз интенсивность флуоресценции NPsCdS достоверно определяется. В качестве примера на рис. 2 приведены общий график зависимости интенсивности флуоресценции NPsCdS от степени разведения водной суспензии наночастиц (рис. 2а), а также спектры флуоресценции для исходной суспензии и разведенной в 1000 раз (рис. 26,в). При дальнейших разведениях



**Рис.** 2. Интенсивность флуоресценции NPsCdS/ S. oneidensis MR-1: (a) — общий график зависимости от степени разведения водной суспензии наночастиц; (б) — спектр флуоресценции исходной суспензии NPsCdS; (в) — спектр флуоресценции NPsCdS при разведении суспензии в 1000 раз.

свыше 1 · 10<sup>3</sup> раз значение интенсивности флуоресценции являлось фоновым и не имело постоянного значения или тенденции к уменьшению. Таким образом, установлен диапазон концентраций наночастиц в водной суспензии, который может быть определен с помощью спектрофлуориметра, он составляет от 1.25 до 1000 мкг/мл.

Люминесценция и стабильность NPsCdS/B. sub*tilis* 168 при введении в органические растворители. При создании полимерных композитов, в которых наночастицы играют роль наполнителей, обязательным требованием является высокая устойчивость биогенных наночастиц к различным физико-химическим воздействиям. Длительная стабильность наночастиц в водных суспензиях достигается за счет наличия поверхностного белкового слоя, формируемого штаммами микроорганизмов [9]. Изменение конформации и количества белка, потеря заряда поверхности наночастиц приводят к агрегации и седиментации нанонаполнителя, что негативно сказывается на качестве полимерного нанокомпозита. Анализ влияния органических растворителей на стабильность и интенсивность флуоресценции биогенных NPsCdS является необходимым этапом технологического процесса создания нанокомпозита. Было показано, что при введении наночастиц в органические растворители N,N-диметилформамид, диметилсульфоксид, ацетон и N-метилпирролидон не происходило образования агломератов и выпадения осадка, т.е. коллоидная система оставалась стабильной. Во всех случаях были зарегистрированы спектры флуоресценции NPsCdS/растворитель в диапазоне длин волн 300-400 нм, имеющие различную интенсивность сигнала. Максимальными значениями интенсивности сигнала обладали системы, содержащие водную суспензию NPsCdS и растворители N-метилпирролидон и N,N-диметилформамид. Эти органические растворители часто используют при работе с полимерными матрицами, поэтому полученные результаты представляют интерес для конструирования и эксплуатации полимерных материалов, наполненных биогенными наночастицами.

Фотокаталитические характеристики NPsCdS/ B. subtilis на примере деколоризации метиленового синего. В последнее время для очистки промышленных стоков от красителей методом фотодеградации используют такие вещества, как полупроводниковые фотокатализаторы в форме наночастиц [17]. Так, наночастицы диоксида титана (TiO<sub>2</sub>) используют в технологических процессах очистки воды и воздуха от органических примесей, а также для фотодеградации красителей [18]. Показано, что деградация 90% исходного количества красителей метиленового синего и бриллиантового зеленого с использованием TiO<sub>2</sub> достигается за 6 ч УФ-облучения [19]. Продемонстрирован эффект фотодеградации метилового оранжевого наночастицами ТіО при облучении УФ-светом с предварительной обработкой наночастиц ультразвуком [20]. Оксид цинка (ZnO) в виде наночастиц катализировал фотодеградацию метиленового синего в концентрации 0,015 г/л в течение 2 ч до полного обесцвечивания красителя

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



Рис. 3. Фотокаталитическая деградация водного раствора MC NPsCdS/*B. subtilis* 168 при УФ-облучении: *1* – образец № 1 (NPsCdS, 0.67 мг/мл); *2* – № 2 (NPsCdS, 0.33 мг/мл); *3* – № 3 (NPsCdS, 0.17 мг/мл); *4* – раствор MC без наночастиц, но с УФ-облучением; *5* – раствор MC без наночастиц и УФ-облучения.

[21]. Наночастицы CdS катализировали обесцвечивание на 60% красителя малахитового зеленого при облучении УФ-светом в течение 3 ч [22]. В связи с этим, исследование возможности биогенных наночастиц катализировать процессы фотокаталитической деградации красителей представляет несомненный интерес.

Нами была проведена оценка способности NPsCdS/B. subtilis к фотокаталитической деградации раствора МС при воздействии УФ-света. Эксперименты были проведены в трех повторностях. На рис. 3 представлены результаты УФ-облучения водных растворов МС в присутствии NPsCdS/B. subtilis в различных концентрациях и раствора МС без наночастиц. Показано, что при концентрации биогенных наночастиц, составляющей 0,67 мг/мл, в течение 3 ч УФ-обработки исследуемого раствора МС (образец № 1) происходит снижение показателя оптической плотности и степень фотокаталитической деградации красителя в экспериментах варьирует в пределах 12-15% (рис. 3, кривая 1). Наночастицы с концентрациями 0,33 мг/мл (образец № 2) и 0,17 мг/мл (образец № 3), введенные в раствор МС, также оказывают влияние на оптическую плотность, однастепень деградации МС снижается KO составляет 6,0 - 7,5% и 5,0 - 5,5%, соответственно (рис. 3, кривые 2 и 3), что указывает на зависимость эффективности фотокатализа от концентрации биогенных наночастиц. УФ-облучение водного раствора МС в отсутствие наночастиц (образец № 4) приводит к снижению оптической плотности, деколоризация красителя составляет 2,5-3,0% (рис. 3, кривая 4). При отсутствии УФоблучения и выдерживании водного раствора МС в темноте (образец № 5, рис. 3, кривая 5) показатель деградации MC составляет 1,0–1,5%. Данные показатели фотокатализа были получены при использовании лампы Вуда мощностью 9 Вт и указанными рабочими длинами волн (350–380 нм), сходными с необходимым значением 365 нм. Использование другой УФ-лампы меньшей мощностью (4 Вт) и длиной волны излучения 365 нм (Cole-Parmer, США) не привело к фотокаталитической деградации MC – такой результат свидетельствует о существенной роли мощности УФоборудования, выбранного для экспериментов по фотокатализу.

## выводы

Установлено, что биогенные наночастицы сульфидов кадмия и цинка различаются по размеру (диаметру), определенному с использованием просвечивающего электронного микроскопа, однако этот параметр не зависит от применяемого при биосинтезе штамма – S. oneidensis MR-1 или B. subtilis 168. Штаммы оказывают влияние на величину гидродинамического диаметра, определяющего размер белкового слоя, адсорбированного на поверхности наночастиц. Показано, что биогенные наночастицы имеют отрицательный ζ-потенциал поверхности, при этом лля NPsCdS/S. oneidensis MR-1, NPsZnS/S. oneidensis MR-1 и NPsCdS/B. subtilis 168 ζ-потенциал варьирует от -27 до -20 мВ, что характеризует данные водные суспензии наночастиц как метастабильные. Для NPsZnS/B. subtilis 168 выявлено нестабильное состояние суспензии, коррелирующее с низким значением  $\zeta$ -потенциала,  $-11,1 \pm 1$  мВ. Показано, что интенсивность флуоресценции зависит от белкового покрытия, определяемого штаммом. Установлен диапазон концентраций NPsCdS/S. oneidensis MR-1 в водной суспензии, который может быть определен с помощью спектрофлуориметра. Показано, что в присутствии растворителей N-метилпирролидона и N,N-диметилформамида наночастицы NPsCdS/ B. subtilis 168 сохраняют стабильность и высокий уровень интенсивности сигнала флуоресценции. Определена способность NPsCdS/B. subtilis 168 к фотокаталитической деградации метиленового синего и зависимость данного процесса от концентрации биогенных наночастиц, мощности УФ-лампы и времени облучения.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00088.

## 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. J. Labille, J. Brant, Nanomedicine 5 (6), 985 (2010).
- 2. M. Kominkova, V. Milosavljevic, P. Vitek, et al., J. of Biotechnology **241**, 193 (2017).
- 3. M. Masab, H. Muhammed, F. Shah, et al., Materials Science in Semiconductor Processing **81**, 113 (2018).
- 4. U. Shamraiz, R. A. Hussain, A. Badshah, et al., J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology **159**, 33 (2016).
- 5. Т. А. Воейкова, О. А. Журавлева, Н. В. Булушова и др., Молекулярная генетика, микробиология и вирусология **35** (4), 151 (2017).
- R. J. Tayade, T. S. Natarajan, H. C. Bajaj, Ind. Eng. Chem. Res. 48 (23), 10262 (2009).
- 7. Т. А. Воейкова, О. А. Журавлева, Т. С. Грачева и др., Биотехнология **33** (3), 38 (2017).
- 8. M. R. Hosseini, M. N. Sarvi, Materials Science in Semiconductor Processing **40**, 293 (2015).
- 9. A. K. Suresh, M. J. Doktycz, W. Wang, et al., Acta Biomateriala 7, 4253 (2011).
- 10. О. А. Журавлева, Т. А. Воейкова, Н. В. Булушова и др., Вопросы материаловедения **1** (97), 110 (2019).
- О. А. Журавлева, Т. А. Воейкова, М. Х. Хаддаж и др., Молекулярная генетика, микробиология, вирусология 36 (4), 191 (2018).
- О. А. Журавлева, Т. А. Воейкова, С. А. Кедик и др., Тонкие химические технологии 14 (3), 50 (2019).
- 13. L. Yue, S. Qi, J. Wang, et al., Materials Science in Semiconductor Processing **56**, 115 (2016).
- 14. X. Xiao, X.-B. Ma, H. Yuan, et al., J. of Hazardous Materials **288**, 134 (2015).
- 15. P. Qi, D. Zhang, Y. Zeng, et al., Talanta 147, 142 (2016).
- С. И. Садовников, Полупроводниковые наноструктуры сульфидов свинца, кадмия и серебра (Физматлит, М., 2018).
- 17. X. Fang, Y. Wang, Z. Wang et al., Energies **12** (1), 190 (2019).
- 18. M. Rani, U. Shanker, *Handbook of Smart Photocatalytic Materials* (Elsevier Inc., UK, 2020).
- 19. С. О. Черкасова, В. В. Шаповалов, И. П. Дмитренко и др., Инженерный вестник Дона **2**, 1 (2017).
- 20. Р. Р. Мансуров, А. П. Сафронов, О. М. Саматов и др., Журнал прикладной химии **90** (2), 156 (2017).
- 21. Э. Т. Мурзабекова, Молодой ученый **20**, 13 (20z16).
- 22. А. Н. Колодин, Дисс. ... канд. хим. наук (ИНХ им. А. В. Николаева СО РАН, Новосибирск, 2018).

## Microbial Synthesis of Nanoparticles: Mechanisms, Characteristics, Application

T.A. Voeikova\*, O.A. Zhuravliova\*, V.S. Kuligin\*, E.I. Kozhukhova\*\*, E.V. Ivanov\*\*, and V.G. Debabov\*

\*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Centre «Kurchatov Institute», 1-iy Dorozhniy proezd 1, Moscow, 117545 Russia

\*\* Research Institute of Chemical Reagents and High-Purity Chemical Substances, National Research Centre «Kurchatov Institute», ul. Bogorodsky Val 3, Moscow, 107076 Russia

Cadmium sulfide (CdS) and zinc sulfide (ZnS) biogenic nanoparticles (NPs) were produced by microbial synthesis using bacteria of various taxonomic groups – Gram-negative, *Shewanella oneidensis* MR-1, and Gram-positive, *Bacillus subtilis* 168, bacteria in a liquid medium under aerobic conditions in the presence of salts of the corresponding metals and sulfur. It was shown that the stabilization of nanoparticles in aqueous suspensions is due to the presence of certain protein molecules of the outer membrane of cells – proteins of families of various receptors, porins, flagellin on the nanoparticle (NP) surface. The effect of the protein coating on stability, luminescence, zeta-potential, hydrodynamic diameter and other physicochemical characteristics of nanoparticles was studied. Decolorization of methylene blue dye using UV irradiation was used as a model to demonstrate the photocatalytic properties of CdSNPs. This opens up the possibility of using biogenic nanoparticles in photocatalysis for industrial wastewater treatment.

Keywords: microbial synthesis, biogenic nanoparticles, fluorescence, photocatalysis, methylene blue

**———— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ** —

УДК 577.3

## МОДЕЛИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА

## © 2020 г. Г.Ю. Ризниченко, Н.Е. Беляева, А.Н. Дьяконова, И.Б. Коваленко, А.С. Маслаков, Т.К. Антал, С.Н. Горячев, Т.Ю. Плюснина, В.А. Федоров, С.С. Хрущев, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

*E-mail: riznich@biophys.msu.ru* Поступила в редакцию 05.02.2020 г. После доработки 05.02.2020 г. Принята к публикации 15.06.2020 г.

Процессы в энергопреобразующей фотосинтетической мембране осуществляют первичный этап запасания солнечной энергии для дальнейшего использования в биосинтезе и других процессах в живых системах. Представлен обзор последних работ по моделированию фотосинтетического электронного транспорта, выполненных на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Для моделирования процессов на уровне макромолекул, их комплексов, молекулярных ансамблей, на субклеточном и клеточном уровне используются модели различного типа. Детальные кинетические модели путем фитирования модельных кривых по экспериментальным данным позволяют оценивать вклад отдельных процессов в наблюдаемые процессы и идентифицировать параметры системы. Метод Монте-Карло дает возможность имитировать процесса образования электрон-транспортных белок-белковых комплексов использованы методы броуновской и молекулярной динамики. Совокупность используемых методов позволяет изучать принципы организации мультимасштабной энергопреобразующей системы, каковой является система первичных процессов фотосинтеза.

Ключевые слова: фотосинтез, электронный транспорт, кинетические модели, броуновская динамика, молекулярная динамика, метод Монте-Карло.

DOI: 10.31857/S0006302920050063

Математические и компьютерные модели дают возможность интегрировать знания об отдельных компонентах системы, оценивать значения параметров по данным экспериментов и изучать механизмы регуляции процессов трансформации вещества и энергии при фотосинтезе. Возможность прямой регистрации кинетики редокс-превращений отдельных компонентов системы в ответ на короткие вспышки света позволяет корректно ставить задачу идентификации параметров модели по данным кинетических экспериментов. В этом состоит основное преимущество моделей фотосинтетической системы по сравнению с большинством феноменологических моделей метаболических сетей, где отсутствует возможность непосредственно следить за изменениями концентраций отдельных внутренних метаболитов системы в реальном времени.

Процессы поглощения света, первичного разделения зарядов и стабилизации этих зарядов

происходят во встроенных в мембрану мультиферментных комплексах фотосинтетических реакционных центров (РЦ) фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) [1-4]. Эксперименты на разных типах фотосинтетических РЦ свидетельствуют, что эти оптимизированные в процессе эволюции системы сохраняют постоянство своей функциональной и структурной организации при разных способах выделения в широком диапазоне внешних воздействий. Выделенные из хлоропластов комплексы переносчиков и частицы с фотосинтетическими РЦ сохраняют свои функциональные и кинетические характеристики, в том числе способность к разделению и стабилизации зарядов и к фотоиндуцированным конформационным переходам.

Перенос электрона между мультиферментными комплексами осуществляется подвижными переносчиками. Сопряженный перенос электронов и протонов от акцепторной части ФС II к цитохромному комплексу осуществляют молекулы пластохинонов (PQ), способные в электрически нейтральном состоянии (PQ или PQH<sub>2</sub>) диффун-

Сокращения: ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II, РЦ – реакционный центр, РQ – пластохинон, Рс – пластоцианин, Fd – ферредоксин.

дировать в липидной мембране. Посредниками между цитохромным комплексом и ФС I являются молекулы белка пластоцианина (Рс), диффундирующие в люмене. Связь первичных процессов фотосинтеза с биохимическими процессами в строме хлоропласта осуществляют молекулы небольшого белка ферредоксина (Fd), принимающие электрон с  $\Phi$ C I. За счет получаемых от Fd электронов белок ферредоксин:НАДФ-редуктаза восстанавливает молекулы НАДФ, необходимые в цикле фиксации углерода. Формирующийся на тилакоидной мембране протонный градиент (ДрН) используется АТФ-синтазой для синтеза  $AT\Phi$  из  $AД\Phi$  и неорганического фосфата. Регуляция соотношения синтезируемых восстановительных эквивалентов НАДФ Н и АТФ осуществляется за счет активации или дезактивации циклического электронного транспорта вокруг ФС I, в котором электрон с акцепторной части ФС I возвращается на цитохромный комплекс.

Кинетические параметры взаимодействия комплексов с подвижными переносчиками определяются как диффузией подвижного переносчика к соответствующему комплексу, так и вероятностью «правильной» посадки (докинга) подвижного переносчика на соответствующий сайт на донорной или акцепторной стороне комплекса. Важную роль здесь играют размеры, форма и электростатические свойства переносчика, подвижного в соответствующем компартменте (PQ – внутри мембраны, Pc – в люмене, Fd – в стромальном пространстве), а также геометрия реакционного объема. Именно эти участки, где скорость переноса электрона зависит от пространственной организации мембраны и характера диффузии переносчиков, могут быть объектом регуляции со стороны целой клетки. Эффективность взаимодействия в большой мере определяется электростатическими взаимодействиями локальных зарядов атомных групп на поверхности донора и акцептора.

Моделирование процессов различной природы в единой системе первичных процессов фотосинтеза требует разных математических и компьютерных подходов.

## КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА

Первые кинетические модели фотосинтеза [5, 6], как и модели других биохимических процессов, были основаны на законе действующих масс, который гласит, что скорость взаимодействия двух веществ пропорциональна произведению концентраций этих веществ. Этот закон справедлив только в случае полного перемешивания, когда достаточно большое число молекул каждого вещества свободно диффундируют в объеме. То-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

гда скорость реакции можно считать пропорциональной вероятности столкновений двух молекул разного типа.

В результате многочисленных экспериментальных исследований формировались представления о структуре фотосинтетической мембраны [1-3]. В конце 60-х годов ХХ века пришло понимание того факта, что компоненты фотосинтетической цепи не плавают свободно в цитоплазме. Фотосинтетические РЦ представляют собой мультиферментные комплексы, встроенные в мембрану, а взаимодействие фотосистем I и II осуществляют подвижные переносчики. Эти знания вызвали к жизни появление моделей, где фотосинтетический РЦ рассматривается как единое целое. В первых таких моделях [7, 8] перенос электрона в пределах фотосинтетического реакционного центра ФС II рассматривался как строго упорядоченный переход между состояниями комплекса, отличающимися зарядами на отдельных компонентах этого комплекса, при этом переход электрона с донорной на акцепторную сторону комплекса инициируется светом. В монографии [9] изложены математическое обоснование и методы анализа переноса электрона в мультиферментных комплексах. Применение этого метода для описания процессов в выделенных комплексах РЦ бактерий и фотосистем I и II описано в работах [10-15].

В основу большинства современных моделей переноса электрона в пределах ФС II положена модель обратимой радикальной пары [16-19], в которой предполагается, что при освещении молекула хлорофилла фотосинтетического реакционного центра Р680 находится в экситонном равновесии с молекулами хлорофилла антенны. В качестве переменных рассматриваются концентрации ФС II с уникальной комбинацией состояний отдельных сайтов [20-26]. Сравнение с экспериментом, как правило, проводится по индукционным кривым флуоресценции, регистрируемым при разных режимах освещения. В работах последних лет [27-33] моделируются процессы не только в ФС II, но и дальнейший путь электрона через ФС I, и сравниваются с экспериментом также кинетические кривые окислительно-восстановительных превращений Р700 (поглощение в области 820 нм).

В работах [30, 31, 34–39] при описании процессов переноса электрона в пределах мультиферментных комплексов, встроенных в фотосинтетическую мембрану, используются обыкновенные дифференциальные уравнения для вероятностей состояний этих комплексов. Состояния комплекса отличаются редокс-состояниями отдельных его компонентов, а также наличием пустых или заполненных сайтов, в которых могут «заякориваться» подвижные переносчики элек-



**Рис. 1.** Общая схема первичных процессов фотосинтеза. ССК – светособирающий комплекс, P680 и P700 – пигменты реакционных центров фотосистем II и I, Cytb<sub>6</sub>f – цитохромный  $b_6f$ -комплекс, ФНР – ферредоксин:НАД $\Phi^+$ -редуктаза, Q<sub>A</sub> и Q<sub>B</sub> – первичный и вторичный хинонные акцепторы электронов ФС II, FeS – акцепторный комплекс ФС I, PQ – пластохинон; PQH<sub>2</sub> – пластохинол; Fd – ферредоксин, Pc – пластоцианин. Сплошными темными стрелками показан перенос электронов по цепи электронного транспорта, пунктирными – потоки ионов H<sup>+</sup>.

трона (как в случае Q<sub>B</sub> сайта ФС II), и наличием протонированных групп. Переходы между состояниями системы характеризует ориентированный граф переходов между состояниями, для вероятностей которых записываются управляющие уравнения (master equation), линейные относительно вероятности нахождения комплекса в каждом из состояний. При этом константы скоростей переходов между состояниями комплекса могут быть различны для комплексов в различных конформационных состояниях, для комплексов, локализованных в гранальной или стромальной частях тилакоида, а также могут зависеть от других переменных и параметров системы: концентрации протонов в люмене и строме, концентрации подвижных переносчиков (молекул пула PQ на акцепторной стороне ФС II, Рс на люминальной стороне ФС I и Fd на стромальной стороне ФС I), температуры, трансмембранного электрического потенциала и т.д. Поэтому в общем случае уравнения, описывающие переходы между состояниями фотосинтетических мультиферментных комплексов, являются нелинейными. Концентрация каждого состояния мультиферментного комплекса равна произведению вероятности этого состояния на концентрацию комплекса.

Для сопоставления результатов моделирования с экспериментальными кривыми индукции флуоресценции традиционно интенсивность флуоресценции полагают пропорциональной концентрации «закрытых» РЦ. «Закрытым» называют РЦ, имеющий электрон на Q<sub>A</sub> и потому не способный принимать электроны от первичного донора Р680 через феофитин. Общепринятая гипотеза, согласно которой интенсивность флуоресценции полагали пропорциональной концентрации Q<sub>A</sub><sup>-</sup>, была предложена в работе [40], QA (quencher) исторически называли «тушителем» флуоресценции. Однако такой подход, давая в целом правильное феноменологическое описание, игнорирует физику моделируемых процессов. Физический процесс флуоресценции представляет собой испускание квантов соответствующей длины волны молекулами хлорофилла антенны. Поэтому в наших работах мы полагаем выход флуоресценции пропорциональным концентрации молекул хлорофилла антенны в возбужденном состоянии и сравниваем экспериментальные кривые индукции флуоресценции с динамикой суммы концентраций тех состояний комплекса ФС II, в которых хлорофилл антенны и реакционного центра находится в возбужденном состоянии. В ряде работ также учитывают флуоресценцию, исходящую от ФС I [27, 30, 31, 42].

## МОДЕЛЬ ПРОЦЕССОВ В ФОТОСИСТЕМЕ II

Основную информацию о процессах в фотосинтетической цепи представляет индукционная кривая флуоресценции, источником которой является фотосистема II. Индукционную кривую флуоресценции остроумно назвали «подписью» (signature) фотосинтеза [43].

На рис. 1 дана схема состояний комплекса ФС II, которая была использована для моделирования процессов как в микроводорослях [37, 38],

так и в хлоропластах высших растений [30, 31, 39]. Подробное описание переходов между состояниями схемы ФС II дано в работе [39].

Формирование возбужденного состояния хлорофилла в модели определяется «световыми» константами  $k_L = k_i$ , i = 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32, пропорциональными интенсивности действующего света. Интенсивность флуо $ресценции в модели задается константой <math>k_F = k_{-i}$ . Выход флуоресценции рассчитывается как произведение отношения  $k_F/k_L$  на сумму флуоресцирующих состояний:

$$F = \frac{k_F}{k_L} \cdot (x_2 + y_2 + z_2 + g_2 + x_6 + y_6 + z_6 + g_6).$$

Важной особенностью разрабатываемых нами моделей является учет влияния электрического и электрохимического потенциалов на мембране и процессов переноса электронов и ионов через мембрану [30].

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКОЙ КРИВОЙ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОСЛЕ ОСВЕЩЕНИЯ НАСЫЩАЮЩИМ ЛАЗЕРНЫМ ИМПУЛЬСОМ

Модель процессов в реакционном центре ФС II (схема представлена на рис. 2) содержит большое число параметров (констант скоростей переходов между состояниями), многие из которых известны из независимых экспериментов на выделенных фрагментах фотосистем. Часть параметров, например скорость туннелирования электрона между переносчиками, входящими в состав белковых комплексов, мало зависит от внешних условий и определяется в основном структурой этих комплексов. Эти параметры можно считать неизменными. Величины других, например, константы скоростей безызлучательной рекомбинации, не удается напрямую определить в эксперименте, однако имеются данные, что эти величины зависят от интенсивности освещения. В эксперименте не удается также однозначно оценить константы взаимодействия акцепторных компонентов ФС II с молекулами пластохинонного пула, которые могут существенно зависеть от условий эксперимента, так как на этих участках перенос электрона сопряжен с переносом протонов и подвижностью молекул. Кроме того, параметрами модели являются начальные значения переменных, т. е. состояние электрон-транспортной цепи в начале эксперимента, которое не всегда известно. Учитывая большое число уравнений в системе, строго и однозначно решить задачу идентификации параметров по экспериментальным данным не представляется возможным. Однако задача упрощается при некоторых специальных условиях эксперимента.

Применение ингибиторов позволяет блокировать некоторые процессы (переходы между состояниями в системе). Другой путь – задать освещение в виде короткой вспышки, однократно приводящей систему в возбужденное состояние, и затем наблюдать только процессы релаксации. При освещении объекта короткой лазерной вспышкой большая часть РЦ оказывается в возбужденном состоянии, после чего происходит перераспределение зарядов в ФС II, сопровождаюшееся изменением интенсивности флуоресценции. В лаборатории проф. Г. Ренгера (Берлин, Германия) разработана установка, использующая освещение образца насыщающим импульсом длительностью 10 нс. Импульс создает неравновесное состояние в образце, после его окончания измеряют сигнал флуоресценции в диапазоне времени от 100 нс до 10 с. Таким образом, регистрируются кинетические кривые выхода флуоресценции, вызываемые однократным импульсом (Single flash induced transient of fluorescence yield, SFITFY) [42].

С помощью кинетической модели изолированной ФС II выполнено фитирование данных измерений на препаратах термофильного штамма одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick [37, 44], а также листьях *Arabidopsis thaliana* [38] и шпината [39, 44]. Для каждого вида с помощью модели была проведена оценка констант скоростей отдельных реакций переноса электрона и энергетических потерь при безызлучательной рекомбинации разделенных зарядов в реакционном центре ФС II в зависимости от интенсивности светового импульса.

На рис. 3 представлены экспериментальные данные, полученные в работе [42] на листьях *Arabidopsis thaliana* (точки), и результаты фитирования (линии) для четырех различных интенсивностей лазерного импульса.

В кинетических моделях Н.Е. Беляевой с соавторами количественно воспроизводится кинетика процессов в ФС II микроводорослей [37, 38, 44] и высших растений [39, 44] после освещения наносекундной вспышкой и включения постоянного освещения. Фитирование позволило оценить параметры системы, недоступные оценке непосредственно из эксперимента. Параметры модели были разделены на две группы. Величины констант скоростей электронного транспорта в мультиферментном комплексе ФС II в модели оставались неизменными для всех четырех вели-



**Рис. 2.** (а) – Схема каталитического цикла ФС II. Каждый прямоугольник – кинетическое состояние ФС II, определяемое редокс-состониями включенных в ФС II переносчиков электрона.  $\langle {}^{Chl}_{P680} \rangle$  – весь хлорофилл ФС II, включая пигменты антенны и РЦ Р680;  $\langle {}^{Chl}_{P680} \rangle^*$  обозначает синглетные возбужденные состояния  ${}^{1}$ Chl\*, делокализованные на всех пигментах антенны и РЦ. Рhe – первичный акцептор электронов феофитин; Q<sub>A</sub> и Q<sub>B</sub> – первичный и вторичный хинонные акцепторы. PQ – пластохинон; PQH<sub>2</sub> – пластохинол; H<sup>+</sup><sub>L</sub> – протоны в люмене, а H<sup>+</sup><sub>S</sub> – протоны в строме тилакоида. Над прямоугольниками обозначены переменные модели ( $x_i, y_i, z_i, g_i, i = 1, ..., 7$ ). Затенены состояния, способные испускать квант флуоресценции. Пунктирными стрелками показаны быстрые (менее 1 мс) стадии цикла, жирными – световые стадии. Цифры над стрелками соответствуют номерам реакций. Пунктирные дуги показывают необратимые реакции безизлучательной рекомбинации Phe<sup>-</sup> с P680<sup>+</sup> (42–45), Q<sup>-</sup><sub>A</sub> с P680<sup>+</sup> (46–49) [37]. (б) – Переход <sup>1</sup>Chl\* в основное состояние: i) испускание флуоресценции ( $k_F$ ); ii) безызлучательная диссипация синглетны возбужденных молекул хлорофилла посредством тушения, обусловленного катион-радикалом P680<sup>+</sup> и/или триплетными состояниями каротиноидов с константами скоростей  $k_{P680+}$  и  $k_{3Car}$  соответственно; iii) безызлучательная диссипация возбужденных возбуждения в тепло ( $k_{HD}$ ) [37].



**Рис. 3.** Фитирование экспериментальных результатов выхода флуоресценции с помощью модели ФС II, представленной на рис. 2. Лазерная вспышка (10 нс) индуцирует изменения выхода флуоресценции в целых листьях дикого типа растений *Arabidopsis thaliana*. Результаты измерений показаны символами (кружки) для различных величин энергии вспышки лазера:  $7.5 \cdot 10^{16}$  фотон/(см<sup>2</sup> импульс) – черный,  $6.2 \cdot 10^{15}$  фотон/(см<sup>2</sup> импульс) – темно-серый,  $3.0 \cdot 10^{15}$  фотон/(см<sup>2</sup> импульс) – серый и  $5.4 \cdot 10^{14}$  фотон/(см<sup>2</sup> импульс) – светло-серый. Результаты численного моделирования представлены сплошными и пунктирными линиями, рассчитанными для величин констант скорости  $k_{L-Max}$ :  $7.2 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$  – черный (1),  $6.0 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$  – темно-серый (2),  $2.9 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$  – серый (3),  $5.2 \cdot 10^7 \text{ c}^{-1}$  – светло-серый (4). Точечные линии показывают ход во времени функции, определяющей константу скорости световой реакции  $k_L(t)$ , для соответствующих значений  $k_{L-Max}$  и нормализованной с коэффициентом  $10^{-7}$ . Измерительный свет низкой интенсивности использовали для регистрации величины  $F_0$  перед началом (–50 мкс) насыщающей вспышки и затем в интервале времени  $100 \text{ нс} - 10 \text{ с для регистрации изменений выхода флуоресценции кривых, задавая в модели ФС II световую константу$  $<math>k_{L-Min} = 0.2 \text{ c}^{-1}$  [38].

чин интенсивности действующего импульса, их задавали в соответствии с литературными данными.

Другую группу параметров варьировали для наилучшего соответствия модельных кривых экспериментальным данным. Наиболее критическим образом от интенсивности лазерного импульса зависят величины констант скоростей, определяющих процессы безызлучательного тушения, в частности тушения синглетного хлорофилла триплетами каротиноидов [38]. Модель позволяет изучать вклад отдельных флуоресцирующих состояний в общий уровень регистрируемой флуоресценции, этот вклад существенно зависит от энергии возбуждающего импульса. Так были оценены константы скоростей безызлучательной релаксации в реакционном центре ФС II, которые существенно зависят от интенсивности освещения. При больших интенсивностях поток энергии в тепло может составлять до 30% поглощенной фотосинтетических объектом энергии.

## ДЕТАЛЬНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПРОЦЕССОВ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ

Модель процессов в ФС II позволяет описать только нарастающий участок кривой индукции флуоресценции длительностью до 1 с. Для интерпретации изменений выхода флуоресценции на больших временах необходим учет и других процессов в фотосинтетической мембране. Схема процессов, учтенных в обобщенной кинетической модели [30, 31], приведена на рис. 4. В работе [31] для идентификации параметров модели наряду с кривыми индукции флуоресценции использованы экспериментальные кривые редокспревращений пигмента реакционного центра ФС I Р700 на временах от единиц миллисекунд до 30 секунд (рис. 5).

Помимо детального описания процессов переходов между состояниями ФС II (рис. 2) в модель включены блоки, описывающие взаимодействие пула PQ с акцепторной частью ФС II и цитохром-



**Рис. 4.** Схема процессов, рассматриваемых в обобщенной кинетической модели первичных процессов фотосинтеза [30, 31].  $b_6 f -$ Цитохромный  $b_6 f$ -комплекс, Chl – хлорофилл антенны, P680 и P700 – пигменты реакционных центров фотосистем II и I.  $Q_A$  – первичный хинонный акцептор электронов ФС II,  $b_L$  и  $b_H$  – низко- и высокопотенциальный гемы цитохрома b, FeS<sub>R</sub> – железо-серный центр Риске, f -цитохром f, FeS<sub>I</sub> – акцепторный комплекс ФС I, PQ – пластохинон; PQH<sub>2</sub> – пластохинол; Fd – ферредоксин, Pc – пластоцианин. R-COO<sup>-</sup> – буферные группы. Знаки «+» и «-» показывают, что в результате светоиндуцированных процессов люмен тилакоида заряжается положительно, а строма хлоропласта – отрицательно. Жирные стрелки обозначают потоки квантов падающего света и флуоресценции. Тонкими стрелками показан перенос электронов по цепи электронного транспорта и потоки ионов H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> после включения освещения.



**Рис. 5.** Экспериментальные кривые индукции флуоресценции и поглощения в полосе  $A_{810}$  (кружки) и модельные кривые выхода флуоресценции и редокс-превращений Р700 (линии) во временном диапазоне до 20 с. Ось времени представлена в логарифмическом масштабе [31].

ным комплексом, переходы между состояниями  $\Phi C I$  и цитохромного комплекса, реакции взаимодействия  $\Phi C I$  с акцептором Fd, циклический транспорт электронов вокруг  $\Phi C I$ , процессы нефотохимического тушения.

## ВЕРОЯТНОСТНЫЕ МОДЕЛИ ТИПА МОНТЕ-КАРЛО

В эксперименте сигнал регистрируется от совокупности процессов, происходящих в большом количестве клеток, каждая из которых содержит миллионы мультиферментных белковых комплексов и подвижных молекул, участвующих в электронном транспорте. Диффузия мобильных переносчиков электрона существенно ограничена сложной геометрией тилакоидных мембран, поэтому при описании функционирования фотосинтететического аппарата его можно представить в виде ансамбля отдельных слабо связанных друг с другом фотосинтетических единиц. В каждой из этих фотосинтетических единиц происходит перенос электрона между соответствующими переносчиками, высвечивание квантов флуоресценции, захват протонов. Для каждого из процессов можно определить вероятность, с которой он произойдет в каждой фотосинтетической единице за заданный промежуток времени. Моделирование процессов, происходящих в состоящих из сотен тысяч и миллионов фотосинтетических единиц ансамблях, стало возможным благодаря использованию мощностей современной вычислительной техники. Суммарный сигнал от моделируемого ансамбля имитирует сигнал, получаемый в эксперименте на суспензии клеток (хлоропластов) или от листа высших растений методами флуориметрии и спектрометрии. Метод построения модели позволяет легко модифицировать структуру моделируемых цепей переноса электрона, учитывать гетерогенность фотосинтетических единиц и объединение реакционных центров ФС II в группы (энергетический обмен). Отпри моделировании метим. ЧТО такого объединения традиционным способом с помощью систем дифференциальных уравнений для вероятностей (концентраций) возможных состояний системы требуется многократное увеличение числа уравнений системы.

Стохастический метод Монте-Карло, основанный на задании отдельных реакций в виде «правил» (rule-based modeling), использовали для описания процессов переноса электрона в ансамблях фотосинтетических электронных цепей в работах [26, 29, 33]. В работе [33] сравнение с экспериментом проводили по кривым индукции флуоресценции и кинетике редокс-превращений Р700 после включения света и кинетике релаксации флуоресценции после выключения света.

В модели воспроизводится работа нескольких миллионов фотосинтетических единиц, что сравнимо с их количеством в клетке микроводоросли. Перенос электрона между компонентами, протонирование, испускание кванта флуоресценции на каждом временном шаге расчета происходит с вероятностью, заданной в соответствии с экспериментальными данными о скоростях происходящих процессов, с использованием генератора случайных чисел. Количество однородных событий (испусканий кванта флуоресценции, или актов окисления фотоактивного пигмента) в определенном интервале времени суммируется. Таким образом, мы получаем кинетическую кривую для ансамбля фотосинтетических единиц (макросистемы), закладывая в модель данные о взаимодействии компонентов отдельных представителей этого ансамбля. Модельная кинетическая кривая соответствует кривой, наблюдаемой в эксперименте.

На рис. 6 представлена схема процессов, происходящих в каждой из фотосинтетических единиц, моделируемых в работе [33]. Пояснения даны в подписи к рисунку. Полученные на модели индукционные кривые флуоресценции для ансамбля фотосинтетических единиц при разных интенсивностях света представлены на рис. 7.

## МОДЕЛИ БРОУНОВСКОЙ ДИНАМИКИ

Как отмечалось выше, сложное устройство фотосинтетической мембраны (рис. 1) приводит к тому, что на участках, где электронный транспорт осуществляется подвижными переносчиками (молекулы пула PQ, Pc в люмене, Fd на стромальной стороне ФС I), их взаимодействие с мультиферментными комплексами не соответствует представлениям о свободной диффузии и случайных соударениях. Например, в узком люминальном пространстве молекулы пластоцианина, размеры которых сравнимы с шириной люминального пространства, не могут свободно перемещаться [45], их общее количество в объеме люмена одной граны и число фиксированных в мембране РЦ составляет десятки-сотни, что значительно меньше необходимого количества для реализации представлений о свободных соударениях. Движение молекул PQ/PQH<sub>2</sub> в мембране также далеко от свободной диффузии [46].

Для выяснения механизмов взаимодействия подвижных переносчиков с мультиферментными комплексами на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова при участии кафедры компьютерных методов в физике физического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова разработан метод «прямого многочастичного моделирования». Основы этого подхода



**Рис. 6.** Общая схема фотосинтетической цепи (a), реакций в фотосистеме II (б), цитохромном комплексе суt  $b_{k} f(\mathbf{B})$  и фотосистеме I (г), рассмотренных в модели типа Монте Карло [33]. В антенне ФС II возбуждение может дезактивироваться либо в фотохимических реакциях, либо путем тепловой диссипации или флуоресцентного излучения. Возбуждение Р680 дает начало электронному транспорту, при этом сначала восстанавливается феофитин (Фео), а затем первичный хинонный акцептор Q<sub>A</sub>. Окисленный P680<sup>+</sup> восстанавливается тирозином Z (Y<sub>Z</sub>), который получает электрон с марганецсодержащего водоразлагающего комплекса (OEC - oxygen evolving complex). Последний разлагает воду, проходя последовательно через четыре промежуточных состояния (S states). В ФС І возбуждение передается с антенны на Р700 который восстанавливает А0, затем электрон переходит через обобщенный акцепторный пул на ферредоксин (Fd), в случае, если имеется молекула Fd, связанная в Fd-связывающем сайте. Р700<sup>+</sup> восстанавливается от пластоцианина (Pc). Дважды восстановленный и протонированный Q<sub>B</sub> (Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub>) покидает ФС II, а PQ в окисленной форме связывается в  $Q_B$ -сайте  $\Phi C II. PQH_2$  окисляется цитохромным комплексом суt  $b_6 f$  в сайте Q0. Один из электронов идет через железо-серный центр белка Риске на Рс, в случае, если молекула Рс связана в Рссвязывающем сайте сут b<sub>6</sub>f (C). Затем восстановленный Рс связывается в Рс-связывающем сайте ФС I и передает электрон на  $P700^+$ . Второй электрон переходит на гемы типа b (b<sub>H</sub> и b<sub>L</sub>), которые восстанавливают молекулу PQ на Q1-стороне суtb6f-комплекса. Пул PQ представлен двумя суб-пулами, один из которых взаимодействует с ФС II, а второй – с суtb<sub>6</sub>f. Субпул 2 может взаимодействовать с внешними донорами и акцепторами (пути хлородыхания) и с пулом Fd через реакции циклического транспорта вокруг ФС I. Кроме того, акцепторная часть ФС I может быть окислена молекулярным кислородом в ходе реакции Меллера.

## и полученные результаты изложены в работах [47-60].

Молекулы белков-переносчиков электронов осуществляют броуновское движение в среде и испытывают электростатические взаимодействия друг с другом и с поверхностью фотосинтетической мембраны. При сближении молекулы донора и акцептора способны образовывать окислительно-восстановительный комплекс, в результате конформационных изменений которого образуется электронная тропа, обеспечивающая туннельный перенос электрона с молекулы-донора на молекулу-акцептор. Для описания конформационных движений в таком реакционном

894



**Рис.** 7. Модельные кривые индукции флуоресценции для разных интенсивностей действующего света – 120, 1000, 2000, 6000, и 12000 М фотон  $m^{-2}$  с<sup>-1</sup> (кривые *1, 2, 3, 4* и *5* соответственно). На врезке показаны соответствующие светоиндуцированные изменения P680 – фотоактивного пигмента ФС II [33].

комплексе необходимо применение методов молекулярной динамики, а для описания собственно переноса электрона с реакционного центра молекулы-донора на реакционный центр молекулы-акцептора — применение методов квантовой химии.

В обзоре [57] обсуждаются существующие модели броуновской динамики, в которых рассматриваются диффузия и взаимная ориентация белковых молекул при образовании диффузионностолкновительного комплекса. Отличие наших моделей от классических моделей броуновской динамики [61–63] состоит в том, что они являются многочастичными и позволяют моделировать не только процессы взаимодействия белков в растворе, но и рассматривать поведение ансамблей взаимодействующих макромолекул в сложном интерьере фотосинтетической мембраны с учетом структурных особенностей организации мембраны [50, 53, 60].

С помощью метода многочастичной броуновской динамики нами были воспроизведены процессы взаимодействия молекулы Рс с кофактором цитохромного комплекса цитохромом f в растворе [47], взаимодействия Рс с цитохромом f и с донорной частью ФС I в люмене тилакоида [60,

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

60], взаимодействия Fd с акцепторной частью ФС I и дальнейшими акцепторами электронов – ферредоксин:НАДФ-редуктазой и гидрогеназой [52, 58, 59].

Наряду с кинетическими характеристиками, которые можно получить на традиционной кинетической модели, прямая модель дает трехмерное визуальное представление динамики процессов в системе на разных пространственных и временных масштабах, дает возможность наблюдать за поведением индивидуальных компонентов и получать статистические сведения о системе.

## ПРОДУКТИВНЫЕ И НЕПРОДУКТИВНЫЕ СТОЛКНОВИТЕЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Образованию финального реакционного комплекса предшествует сложная последовательность процессов, обеспечивающих конформационное соответствие молекул донора и акцептора. Для создания условий туннелирования электрона с молекулы-донора на молекулу-акцептор взаимодействующие белки, обладающие сложной пространственной структурой, должны правильно сориентироваться друг относительно друга, как бы «притереться» друг к другу. Наличие зави-



**Рис. 8.** Структура комплекса Pc–Cyt *f* по данным ЯМР (PDB ID: 2PCF) (слева) и кластеров, полученных в ходе вычислительных экспериментов броуновской динамики. В центре – кластер продуктивных комплексов, справа – кластер непродуктивных комплексов [56]. На графике показано расстояние доступности для отдельных структур, вычисленное с помощью основанного на частоте встречаемости похожих структур метода иерархического кластерного анализа.

симости скорости реакции от ионной силы свидетельствует о важной роли электростатических взаимодействий в образовании такого предварительного диффузионно-столкновительного комплекса (preliminary, encounter complex).

В работах [56, 64] были изучены конформации образующихся в процессе сближения и взаимной ориентации продуктивных (в которых возможен перенос электрона) и непродуктивных (в которых перенос электрона невозможен) комплексов молекул донора и акцептора электронов. Для детального изучения роли электростатических взаимодействий использовали классический подход броуновской динамики - многократные вычислительные эксперименты по сближению двух молекул. Анализ траекторий движения молекул в таких экспериментах позволяет выявить наиболее часто возникающие при сближении молекул в процессе диффузии варианты их взаимного расположения, оценить энергию взаимодействия между молекулами и сделать оценку константы скорости реакции ассоциации белков.

Вопрос о роли электростатических взаимодействий в образовании окислительно-восстановительного комплекса двух белков исследовали на модели взаимодействия наиболее хорошо изученной пары фотосинтетических белков-переносчиков электрона — пластоцианина и цитохрома f [47, 56, 64]. Физиологическая функция белка Рс состоит в челночном переносе электрона между субъединицей f цитохромного комплекса  $b_6 f$  и фотосистемой I у всех высших растений и некоторых водорослей. Цитохром *f* – самая крупная субъединица цитохромного b<sub>6</sub>f-комплекса, содержащая сайт связывания пластоцианина. Белки Рс и цитохром f являются окислительно-восстановительными партнерами с четко локализованными реакционными центрами атомами меди и железа соответственно. Эта пара белков является классическим объектом экспериментального исследования (обзор [65]) и изучения методом броуновской динамики [61-64, 66, 67]. Для анализа взаимного расположения макромолекул в ансамбле финальных конфигураций, полученных методом броуновской динамики, использовали метод кластерного анализа [56].

Анализ нескольких тысяч структур показал, что в процессе диффузии образуются два типа столкновительных комплексов (рис. 8). В кластере «правильных» конфигураций (рис. 8, в центре) взаимная ориентация молекул Рс и цитохрома f в целом соответствует ориентации в функционально активном комплексе (данные ЯМР, PDB ID: 2PCF [63]), и электростатические взаимодействия не препятствуют такому повороту молекул друг относительно друга, при котором осуществляется дальнейшее сближение их активных цен-

тров. В кластере «неправильных» конфигураций (слева) взаимная ориентация молекул Рс развернут наоборот по сравнению с его ориентацией в функционально активном комплексе, и сближение РЦ молекул оказывается возможным только за счет разрыва существующих в этом комплексе электростатических связей.

## ГИБРИДНЫЕ БРОУНОВСКИЕ/МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Во многих случаях образование диффузионностолкновительного комплекса, которое мы моделируем с помощью броуновской динамики, представляет собой необходимое, но не достаточное условие окислительно-восстановительной реакции. Для сближения РЦ белков до расстояния, достаточно близкого для туннельного переноса электрона с молекулы-донора на молекулу-акцептор, необходимо, чтобы в процессе конформационных изменений образовался финальный комплекс. Средства для моделирования конформационных движений молекул предоставляет молекулярная динамика.

Современные методы молекулярной динамики являются достаточно ресурсоемкими, это накладывает ограничения на размер моделируемой системы и время расчета. Поэтому последовательные процессы диффузионного сближения белков, их взаимную ориентацию и дальнейшую конформационнонную «подстройку», приводящую к образованию финального комплекса, целесообразно моделировать поэтапно. В работе [68] мы провели компьютерное моделирование поэтапного процесса образования комплекса фотосинтезирующих белков Pc и цитохрома f для разных видов организмов: высших растений, зеленых микроводорослей и циановых бактерий. Методом броуновской динамики мы промоделировали процессы сближения и взаимной ориентации молекул, аналогично описанному в разделе «Продуктивные и непродуктивные столкновительные комплексы». Кластерный анализ большого ансамбля из десятков тысяч траекторий броуновского движения позволил выявить различные энергетически выгодные метастабильные состояния в процессе формирования комплекса белков Рс и цитохрома f. Центральные структуры кластеров, соответствующие наиболее часто образующимся при сближении молекул взаимным ориентациям, были использованы в качестве начальных конфигураций для молекулярной динамики. В ходе молекулярно-динамической симуляции молекулы донора и акцептора претерпеваконформационные изменения. ли либо сближаясь своими РЦ и образуя финальный комплекс, где атом меди пластоцианина и атом железа цитохрома f были сближены до расстояний, на которых возможен туннельный перенос электрона, либо отдаляясь друг от друга. Сам процесс переноса электрона с атома железа цитохрома на атом меди пластоцианина в данной работе не моделировали, однако предлагаемый подход позволяет это сделать, введя дополнительные стадии, использующие методы квантовой химии.

Исследование [68] показало, что роль электростатических взаимодействий и конформационных изменений при формировании комплексов белков Pc и цитохрома f у организмов, принадлежащих к далеко отстоящим друг от друга систематическим группам, может существенно различаться, несмотря на то, что трехмерная организа-ЦИЯ этих белков весьма схожа у всех исследованных организмов. В высших растениях и зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardtii электростатические взаимодействия способствуют занятию молекулой Рс положения вблизи гема цитохрома f, при этом ориентация пластоцианина оказывается практически случайной. После такого «диффузионного захвата» электростатические взаимодействия не препятствуют вращению молекулы Рс вокруг ее центра масс, и дальнейшее сближение кофакторов белков и формирование финального комплекса происходит в результате такого вращения без существенных конформационных изменений молекул белков. На рис. 9в приведен график изменения расстояния между реакционными центрами пластоцианина И цитохрома f в ходе трансформации предварительного комплекса в финальный. Видно, что за 150 нс происходит сближение РЦ до расстояния 1,5 нм, после чего комплекс остается стабильным в течение всего времени моделирования (900 нс).

Центральная структура «непродуктивного» кластера (рис. 9б) в ходе молекулярной динамики также приводит к довольно стабильной структуре комплекса с расстоянием между кофакторами около 3.7 нм. В полученной структуре пластоцианин находится в перевернутом положении относительно ориентации, которую он имеет в комплексах, полученных при помощи ЯМР. Очевидно, что структуры этого кластера являются непродуктивными метастабильными состояниями, которые нельзя легко разрушить действием случайной броуновской силы. В условиях низкой ионной силы, где имеет место слабое экранирование электрических зарядов на поверхностях белков, стабильность таких непродуктивных состояний возрастает. Существование таких неактивных состояний может быть основной причиной снижения скорости образования активных белок-белковых комплексов, наблюдаемого в экспериментах [69, 50] при низких значениях ионной силы.



**Рис. 9.** Центральные структуры «продуктивного» (а) и «непродуктивного» (б) кластеров диффузионностолкновительных комплексов пластоцианина и цитохрома *f* из высших растений с энергией электростатического притяжения более 8 кТл. Расстояние между атомами меди и железа пластоцианина и цитохрома *f*, полученное из расчетов молекулярной динамики, имеющих в качестве начальных центральную структуру кластеров (в) и (г). Структуры «продуктивного» (д) и «непродуктивного» (е) финальных комплексов, полученных из молекулярнодинамических расчетов. Толщина линий белковых структур пропорциональна значению *B*-фактора [68].

Сценарий образования функционально активного комплекса значительно отличается у гетероцистной цианобактерии *Nostoc* sp. За счет другого распределения зарядов на поверхности белков пластоцианин уже на ранних стадиях сближения с цитохромом f ориентируется атомом меди в направлении своего реакционного партнера. Благодаря этому все образующиеся предварительные



**Рис. 10.** Схема образования белок-белкового комплекса для электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* на примере белков из высших растений [68]: *1* – свободная диффузия молекул; *2* – взаимная ориентация, обусловленная электростатическими взаимодействиями; *3* – формирование энергетически-выгодных конформаций; *4* – трансформация дифузионно-столкновительного комплекса в метастабильное энергетически выгодное состояние; *5* – формирование финального комплекса (функционально активная конфигурация) путем конформационных изменений в рамках белок-белкового интерфейса.

комплексы имеют возможность перейти в состояние с тесно сближенными кофакторами, что позволяет охарактеризовать их как продуктивные. Моделирование методом молекулярной динамики показало, что в отличие от белка высших растений и зеленой водоросли цитохром f цианобактерии Nostoc sp. имеет заметную подвижность малого домена относительного большого. В процессе стыковки с пластоцианином амплитуда колебаний малого домена существенно уменьшается, и он сдвигается по сравнению с его положением в свободном белке. Мы полагаем, что такие конформационные изменения способствуют стабилизации образующегося финального комплекса.

Исследование взаимодействия белков цитохрома f и пластоцианина безгетероцистной цианобактерии *Phormidium laminosum* не выявило каких-либо энергетически выгодных взаимных расположений этих белков, обусловленных дальнодействующими электростатическими взаимо-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

действиями. Это согласуется с экспериментальными данными о слабой зависимости константы скорости ассоциации этих белков от ионной силы раствора [70]. Вследствие этого мы полагаем, что в данном случае образование комплекса происходит по «столкновительному» типу без предварительной взаимной ориентации молекул.

Последовательность стадий образования белокбелкового электрон-транспортного комплекса в растворе для белков пластоцианина и цитохромом f из высших растений и зеленых водорослей схематически представлена на рис. 10.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первичные процессы фотосинтеза представляют собой базовую систему запасания энергии света, создания органического вещества и обеспечения энергией жизнедеятельности живых систем. В ходе процессов в фотосинтетических мембране запасаются молекулы АТФ – энергетической валю-

ты клетки — и создаются востановительные эквиваленты, используемые в цикле фиксации CO<sub>2</sub> и других метаболических циклах. Методы математического моделирования дополняют экспериментальные исследования по нескольким направлениям.

Модели квантовой химии позволяют воспроизводить акты переноса электрона между атомами и движения протона внутри макромолекул. Молекулярная динамика имитирует конформационные движения молекул и молекулярных комплексов в акте взаимодействия, броуновская динамика позволяет изучать динамику образования комплекса между компонентами фотосинтетической цепи, когда один из них, или оба, являются подвижными переносчиками. Комплексные модели броуновской/молекулярной динамики позволяют наряду с процессами сближения и взаимной ориентации молекул описать конформационные изменения в реакционном комплексе, подготавливающие условия для осуществления самого акта передачи электрона с активного центра молекулы-донора на активный центр молекулы-акцептора.

Очевидно, что для понимания механизмов функционирования сложной многоуровневой системы, каковой является система первичных процессов фотосинтеза, необходимо использование как системно-динамических (кинетических) моделей разной степени сложности, так и агентных моделей. При этом в роли «агентов» на разных временных и пространственных масштабах выступают электроны и протоны (модели квантовой химии), атомы (модели классической молекулярной динамики), аминокислоты или другие агрегаты атомов (крупнозернистые (course-grain модели), белковые молекулы (броуновская многочастичная динамика), отдельные фотосинтетические цепи (вероятностные rule-based Монте Карло модели). Включение знаний, получаемых при исследовании моделей систем более низкого уровня организации в более агрегированные модели, представляет особую проблему.

Данные флуоресценции и других методов регистрации изменений в фотосинтетическом аппарате могут быть эффективно использованы для экспресс-оценки изменений в метаболизме фотосинтезирующих организмов, в частности микроводорослей, для получения целевого продукта (молекулярного водорода, обогащенной липидами биомассы и др.). Методы автоматической регистрации и обработки с помощью математических моделей больших массивов экспериментальных данных позволяют определять изменения в фотосинтетическом аппарате фотосинтезирующих организмов в процессе роста, при воздействии стресса и др. для целей биотехнологического производства и экологического мониторинга [71-73]. Для этого используются кинетические модели разной степени детализации, а также потоковые модели для описания сопряжения процессов фотосинтеза и процессов в метаболических сетях [74].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № № 17-04-00-676, 18-07-01219, 18-34-00406, 19-04-00999, 20-54-44004), а также Российского научного фонда (проект № 20-64-46018).

## 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. Современные проблемы фотосинтеза (изд-во ИКИ, М-Ижевск, 2014), т. 1–2.
- 2. D. Shevela, L. O. Bjorn, and Govindjee, *Photosynthesis: Solar Energy for Life* (World Scientific, 2019).
- 3. R. E. Blenkenship. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, 2<sup>nd</sup> ed. (John Wiley and Sons, 2014).
- 4. А. Б. Рубин. *Биофизика* (изд-во ИКИ, М-Ижевск, 2014), т. 3.
- C. Holzapfel and R. Z. Bauer, Z. Naturforsch. 30, 489 (1975).
- А. К. Кукушкин, А. Н. Тихонов, Л. А. Блюменфельд и Э. К. Рууге, Физиология растений 22, 241 (1975).
- 7. S. Malkin, Biochim. Biophys. Acta 234, 425 (1971).
- 8. Е. М. Сорокин, Физиология растений **20** (4), 733 (1972).
- 9. А. Б. Рубин и В. П. Шинкарев, Транспорт электронов в биологических системах (М., Наука, 1984).
- Г. Ю. Ризниченко Т. Н. Воробьева, Е. Н. Храброва, и А. Б. Рубин, Биофизика **31** (1), 793 (1986).
- 11. G. Yu. Riznichenko, T. N. Vorobjeva, E. N. Khrabrova, and A. B. Rubin, Photosynthetica **24**, 37 (1990).
- Г. Ю. Ризниченко, Математические модели первичных процессов фотосинтеза, Успехи науки и техники. Сер. биофизика (ВИНИТИ, М., 1991), т. 31.

- Г. Ю. Ризниченко, Лекции по математическим моделям в биологии (РХД, М-Ижевск, 2011).
- A. B. Rubin, G. Yu. Riznichenko, In *Photosynthesis in silico: Understanding Complexity from Molecules to Ecosystems. Advances in Photosynthesis and Respiration*, Ed. by A. Laisk, L. Nedbal, and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2009), v. 29, pp. 151–176.
- 15. A. B. Rubin and G. Yu. Riznichenko. *Mathematical biophysics* (Springer, New York, 2014).
- G. H. Schatz, H. Brock, and A. R. Holzwarth, Biophys. J. 54, 397 (1988).
- T. A. Roelofs, C. H. Lee, and A. R. Holzwarth, Biophys. J. 61, 1147 (1992).
- 18. E. Baake, J. P. Schloder, Bull. Math. Biol. 54, 999 (1992).
- 19. H. Dau, Photochem. Photobiol. 60, 1 (1994).
- A. Stirbet, Govindjee, B. J. Strasser, and R. J. Strasser, J. Theor. Biol. **193**, 131 (1998).
- 21. A. D. Stirbet, Ph. Rosenau, A. C. Ströder, and R. J. Strasser, Math. Comp. Sim. **56**, 443 (2001).
- 22. R. J. Strasser and A. D. Stirbet, Math. Comp. Sim. 56, 451 (2001).
- 23. D. Lazár, J. Theor. Biol. 220, 469 (2003).
- 24. D. Lazár, Photosynthetica 47(4), 483 (2009).
- 25. X-G. Zhu, Govindjee, N. R. Baker, et al., Planta 223, 114 (2005).
- 26. C.-P. Xin, J. Yang, and X-G. Zhu, Photosynth. Res 117, 339 (2013).
- 27. 27. D. Lazár, J. Theor. Biol. 335, 249 (2013).
- O. Ebenhöh, G. Fucile, G. Finazzi, J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, Philos. Trans. R. Soc. B. 369, 20130223 (2014).
- 29. А. С. Маслаков, Т. К. Антал, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, Биофизика, **61**(3), 464 (2016).
- 30. N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, G. Yu. Riznichenko, and A. B. Rubin, Photosynth. Res. **130**, 491 (2016).
- 31. N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, G. Yu. Riznichenko, and A. B. Rubin, Photosynth. Res. **140** (1), 1 (2019).
- 32. A. Stirbet and Govindjee, Photosynth. Res. 130, 193 (2016).
- T. K. Antal, A. Maslakov, O. V. Yakovleva, T. E. Krendeleva, G. Yu. Riznichenko, A. B. Rubin, Photosynth. Res. 138(2), 191–206 (2018).
- G. Yu. Riznichenko, G. V. Lebedeva, O. V. Demin, and A. B. Rubin, J. Biol. Phys. 25, 177 (1999).
- 35. Г. В. Лебедева, Н. Е. Беляева, Г. Ю. Ризниченко и др., Журн. физ. химии **74**, 1874 (2000).
- Г. В. Лебедева, Н. Е. Беляева, О. В. Демин и др., Биофизика 47, 1044 (2002).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, R. Steffen, et al., Photosynth. Res. 98, 105 (2008).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., BioSystems 103 (2), 188 (2011).
- Н. Е. Беляева, А. А Булычев, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, Биофизика 56 (3), 489 (2011).
- L. M. N. Duysens and H. E. Sweers, In Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Ed. by A. Takamia and K. Shobata (University of Tokyo Press, Tokyo, 1963), pp. 353–372.

- А. Штирбет, Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин и Говинджи, Биохимия 79 (4), 379 (2014).
- 42. R. Steffen, H.-J. Eckert, A. A. Kelly, et al., Biochemistry **44**, 3123 (2005).
- 43. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, 2004).
- 44. N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., Plant Physiol. Biochem. 77, 49 (2014).
- 45. W. Haehnel, R. Ratajczak, and H. Robenek, J. Cell Biol. **108**, 1397 (1989).
- 46. H. Kirchhoff, U. Mukherjee, and H.-J. Galla, Biochemistry **41**, 4872 (2002).
- 47. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, P. A. Gromov, et al., Phys. Biol. **3**, 121 (2006).
- I. B. Kovalenko, A. N. Diakonova, A. M. Abaturova, et al., Phys. Biol. 7 (2), 026001 (2010). DOI: 10/1088/1478-3975/7/2/026001
- 49. G. Yu. Riznichenko, I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, et al., Biophys. Rev. 2 (3), 101 (2010)
- 50. О. С. Князева, И. Б. Коваленко, А. М. Абатурова и др., Биофизика **55** (2), 259 (2010).
- 51. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, A. N. Diakonova, et al., Math. Model. Nat. Phenom. 6, 39–54 (2011).
- I. B. Kovalenko, A. N. Diakonova, A. M. Riznichenko, and A. B. Rubin, BioSystems 103, 180 (2011).
- Д. М. Устинин, И. Б. Коваленко, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, Компьютерные исследования и моделирование 5 (1), 65 (2013).
- С. С. Хрущев, А. М. Абатурова, А. Н. Дьяконова и др., Компьютерные исследования и моделирование 5 (1) 47 (2013).
- 55. И. Б. Коваленко, О. С. Князева, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, Биофизика **59** (1), 5 (2014).
- 56. С. С. Хрущев, А. М. Абатурова, А. Н. Дьяконова и др., Биофизика **60**, 270 (2015).
- 57. С. С. Хрущев, А. М. Абатурова, В. А. Федоров и др., Биофизика **60**, 629 (2015).
- 58. А. Н. Дьяконова, С. С. Хрущев, И. Б. Коваленко и др., Биофизика **61** (4), 677 (2016).
- 59. A. N. Diakonova, S. S. Khrushchev, I. B. Kovalenko, et al., Phys. Biol. **13** (5), 056004 (2016).
- 60. I. B. Kovalenko, O. S. Knyaseva, T. K. Antal, et al., Physiol. Plantarum **161**, 88 (2017).
- 61. D. C. Pearson and E. L. Gross, Bioph. J. **75**, 2698 (1998).
- E. L. Gross and D. C. Pearson, Biophys. J. 85, 2055 (2003).
- 63. E. L. Gross and I. Rosenberg, Biophys. J. 90, 366 (2006).
- 64. И. Б. Коваленко, С. С. Хрущев, В. А. Федоров и др., Докл. РАН **468** (2), 220 (2016).
- 65. I. Cruz-Gallardo, I. Díaz-Moreno, A. Díaz-Quintana, and M. A. De la Rosa, FEBS Lett. **586** (5), 646 (2012).
- M. Ubbink, M. Ejdebeck, B. G. Karlsson, and D. S. Bendall, Structure 6, 323 (1998).

- 67. G. M. Ullmann, E. -W. Knapp, and N. M. Kostic, J. Am. Chem. Soc. **119**, 42 (1997).
- V. A. Fedorov, I. B. Kovalenko, S. S. Khruschev, et al., Physiol. Plantarum 166 (1), 320 (2019).
- 69. T. E. Meyer Z. G. Zhao, M. A. Cusanovich, and G. Tollin, Biochemistry **32**, 4552 (1993).
- B. G. Schlarb-Ridley, D. S. Bendall, and C. J. Howe, Biochemistry 41 (10), 3279 (2002).
- Т. Ю. Плюснина, С. С. Хрущев, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, Биофизика 60 (3) 487 (2015).
- 72. Т. Ю. Плюснина, С. С. Хрущев, А. Е. Фролов и др., Биофизика **64 (**3), 468 (2019).
- 73. T. Antal, I. Konyukhov, A. Volgusheva, et al., Physiol. Plantarum **165** (3), 476 (2019).
- Т. Ю. Плюснина, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, Биофизика 62 (3), 485 (2017).

## Models of Photosynthetic Electron Transport

# G.Yu. Riznichenko, N.E. Belyaeva, A.N. Diakonova, I.B. Kovalenko, A.S. Maslakov, T.K. Antal, S.N. Goryachev, T.Yu. Plyusnina, V.A. Fedorov, S.S. Khruschev, and A.B. Rubin

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskye Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

Energy transduction reactions in the photosynthetic membrane perform a primary step in storage of solar energy that can be used later in biosynthesis and other reactions in the living systems. This paper presents a review of recent research in modeling of photosynthetic electron transport which was undertaken at the Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University. Various types of mathematical models are used to simulate processes at the level of macromolecules, their complexes, molecular ensembles, at the subcellular and cellular levels. Detailed kinetic models allow for the estimation of the contribution of individual processes to the observed processes identifying system parameters. With the use of the Monte Carlo method it is possible to simulate processes in ensembles consisting of millions of photosynthetic chains. Brownian and molecular dynamics have been used to study the formation of electron-transport protein-protein complexes. The combination of the mentioned methods provides the possibility of studying the basic mechanisms of energy conversion in a multiscale system of primary photosynthesis processes.

Keywords: photosynthesis, electron transport, kinetic models, Brownian dynamics, molecular dynamics, Monte Carlo method

УДК 581.132:576.311.348.7

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ДЕСТРУКЦИИ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА

© 2020 г. И.Ю. Макеева, Т.И. Пузина

Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, 302026, Орел, ул.Комсомольская, 95

*E-mail: makeevainna@inbox.ru* Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 28.05.2020 г. Принята к публикации 02.06.2020 г.

Изучено влияние колхицина – деструктурирующего агента тубулинового цитоскелета – на параметры флуоресценции хлорофилла, реакцию Хилла, нециклическое фотофосфорилирование и реакцию перекисного окисления липидов у Solanum tuberosum, выращенных в почвенной культуре в условиях вегетационного домика. Деструкция микротрубочек увеличила содержание гидроперекисей жирных кислот липидов – первичного продукта перекисного окисления липидов, изменила параметры флуоресценции: увеличила  $F_0$ , снизила  $F_m$  и максимальную квантовую эффективность ФС II ( $F_v/F_m$ ), повысила диссипацию энергии электронного возбуждения в тепло. Одновременно выявлено уменьшение скорости реакции Хилла и интенсивности процесса нециклического фотофосфорилирования. Полученные в работе результаты обсуждаются в связи с нарушением целостности мембран хлоропластов, изменением параметров флуоресценции хлорофилла при действии колхицина, а также с ранее полученными нами данными по изменению содержания и соотношения фитогормонов в листьях картофеля в условиях деструкции микротрубочек.

Ключевые слова: флуоресценция хлорофилла, фотохимическая активность хлоропластов, нециклическое фотофосфорилирование, перекисное окисление липидов, тубулиновый цитоскелет, колхицин, картофель.

DOI: 10.31857/S0006302920050075

Одним из направлений современной фотобиологии является изучение состояния фотосинтетического аппарата растений в стрессовых условиях [1—4]. При этом основное внимание исследователи уделяют изменению фотохимических реакций в процессе фотосинтеза в ответ на действие неблагоприятных факторов. Однако любой ответ растения на стресс начинается с физико-химических реакций [5]. Поэтому при оценке физиологического состояния растений важно использовать биофизические методы. Одним из таких методов является индукция флуоресценции. Ее параметры все чаще применяются при мониторинге действия стрессовых условий на растительный организм [2, 6].

Для объективного анализа работы фотосинтетического аппарата растений и его реакции на стрессовое воздействие необходимо сопоставлять параметры флуоресценции с интенсивностью энергии квантов света, которые были использованы на фотохимическую работу, в частности на процесс фотофосфорилирования. Это позволит расширить наши знания о фотосинтетических процессах в условиях стресса, изучаемых как на уровне целого листа, так и на уровне хлоропластов.

Мишенью стрессовых воздействий наряду с белками и нуклеиновыми кислотами являются клеточные мембраны. Известно, что элементы цитоскелета образуют с мембранами цитоскелетмембранный континуум [7]. Поэтому их структурное состояние, по-видимому, является важным условием, необходимым для протекания мембранных процессов. Так, в работе [8] было показано, что деструкция микротрубочек оризалином или колхицином нарушала транспорт аквапоринсодержащих везикул, изменяла структуру аквапоринов - водных каналов, регулирующих трансмембранный поток воды, а также снижала водоудерживающую способность, являющуюся показателем термодинамического состояния воды в клетке. Было выявлено, что ингибиторы тубулинового цитоскелета препятствуют открытию устьиц на свету у Vicia faba, что может

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, ФС II – фотосистема II.

затруднять поступление СО2 [9]. В работе [10] показано значительное снижение общего дыхания и активности цитохромного пути транспорта электронов, но увеличение цианидрезистентного пути при обработке проростков пшеницы колхицином. Другой антимикротрубочковый агент - оризалин – изменял форму и ультраструктуру митохондрий, они становились округлыми и имели меньшее количество крист. Деполимеризация микротрубочек нарушала белоксинтезирующий аппарат в клетках мезофилла листьев и в корнях пшеницы, а именно, вызывала распад полисом, что приводило к снижению содержания растворимых белков [11]. По данным работы [12], амипрофосметил – специфический деструктор микротрубочек - останавливал митоз у каллуса корней гусиной травки. Нарушение тубулинового цитоскелета динитроанилиновыми деструкторами вызывало увеличение диаметра кончиков корней пшеницы из-за появления луковицеобразных утолщений - свэллингов [13]. По мнению авторов работы [14], дезорганизация кортикальных микротрубочек приводит к «расшатыванию» рецепторной системы плазмалеммы и изменению эффективности гормонального сигнала с участием Ca<sup>2+</sup>-сигнальной системы. Имеются сведения, что от структурного состояния микротрубочек зависит как транспорт белка-рецептора ауксина (АВР1), так и латеральный транспорт данных фитогормонов [15]. Информация о зависимости фотосинтетической деятельности растений от целостности элементов цитоскелета крайне ограничена. Ранее мы показали, что цитохалазин Б – деполимеризатор актинового цитоскелета – оказывает негативное воздействие на процесс фотофосфорилирования у Solanum tuberosum [16]. Сведений о зависимости световых реакций фотосинтеза от структурного состояния тубулинового цитоскелета в литературе не найдено. Имеются лишь указания [17, 18] о действии деструкторов микротрубочек амипрофосметила и колхицина на движение и ориентацию хлоропластов у водорослей Dichotomosiphon tuberosus и Vaucheria terrestris, что может иметь значение для регуляции процесса фотосинтеза.

Целью нашей работы было исследование некоторых параметров флуоресценции хлорофилла, реакции Хилла, интенсивности процесса фотофосфорилирования, реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях деструкции микротрубочек колхицином.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований были растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта «Жуковский ранний» селекции ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха (Коренёво Московской области). Растения выращивали в почвенной культуре в условиях вегетационного домика на агробиостанции Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Для почвенной культуры использовали серую лесную среднесуглинистую почву. В сосуде с 10 кг почвы выращивали одно растение, поддерживая влажность почвы на уровне 60% от полной влагоемкости. В период закладки опытов в почву вносили оптимальные количества азота, фосфора и калия в количестве соответственно 230, 70, 310 мг элемента на 1 кг почвы.

Деструкцию тубулинового цитоскелета проводили через 15 сут после появления всходов путем двукратного опрыскивания растения (с интервалом 6 ч) раствором алкалоида трополонового ряда колхицина (Fluka, Швейцария) в концентрации 1 мМ. Известно, что в этой концентрации колхицин связывается с гетеродимером тубулина и предотвращает его полимеризацию, а также вызывает быструю разборку микротрубочек [7]. Контрольные растения опрыскивали водой.

Регистрацию параметров флуоресценции листьев седьмого яруса срединной формации у интактных растений проводили по методике, описанной в работе [19], с использованием портативного прибора MINI-PAM (Walz, Германия). Перед измерением листья были адаптированы к темноте. Математическую обработку данных осуществляли с помощью приложения CXSTAT к компьютерной программе Excel.

Фотохимическую активность изолированных хлоропластов определяли по количеству восстановленного на свету феррицианида калия [20]. Среда выделения хлоропластов содержала 0.35 М NaCl и 0.05 М трис-HCl-буфер (pH 8.0). Гомогенат фильтровали и дважды центрифугировали при 2000 и 8000 об/мин. Хлоропласты, полученные по данной методике, по степени интактности относятся к классу С. После ресуспендирования в 0.035 M NaCl с 0.05М трис-HCl-буфером (рН 8.0) суспензию хлоропластов с 0.002М К<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] помещали в бюксы. Суспензия хлоропластов была эквивалентна 0.05-0.10 мг хлорофилла. Часть бюксов выставляли на свет (белый свет, интенсивность освещения 340 мкмоль фотонов  ${\rm m}^{-2} {\rm c}^{-1}$ ) в специально смонтированную установку с охлаждением (18°С), другую часть бюксов держали в темноте. Экспозиция составляла 10 мин. Реакцию гасили 5%-й трихлоруксусной кислотой. Оптическую плотность измеряли на фотометре КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия) при длине волны 420 нм.

Интенсивность нециклического фотофосфорилирования изолированных хлоропластов определяли по убыли неорганического фосфата [20]. Среда инкубации содержала: 12.5 мкмоль трис-HCl-буфер (рН 7.8), 3.5 мкмоль K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>],


Рис. 1. Влияние колхицина на начальную (а) и максимальную (б) флуоресценцию.

3.5 мкмоль NaCl, 5 мкмоль  $KH_2PO_4$ , 5 мкмоль AД $\Phi$ , 2.5 мкмоль MgCl<sub>2</sub>. Суспензия хлоропластов была эквивалентна 0.07–0.14 мг хлорофилла. Инкубацию начинали путем включения света (интенсивность освещения 340 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> c<sup>-1</sup>), она проходила в течение 10 мин на расстоянии 20 см от лампы, при температуре 18–20°С. Реакцию гасили 5%-й трихлоруксусной кислотой.

Содержание фосфора определяли на полуавтоматическом мультикюветном спектрофотометре Clima MC-15 (RAL, Испания) при  $\lambda = 340$  нм по реакции с молибдатом в кислой среде с образованием фосфомолибдатного комплекса. Использовали реактивы фирмы BioSistems (Испания)

Содержание гидроперекисей жирных кислот липидов оценивали по реакции их взаимодействия с роданистым аммонием [21]. Навеску листьев растирали в 0.1 М буферном растворе трис-HCl (pH 7.6), содержащем 0.35 M NaCl, затем в течение 1 МИН центрифугировали при 2000 об/мин. К осажденному белку добавляли 0.4 мл 50%-го раствора трихлоруксусной кислоты, фильтровали и доводили объем экстракта до 10 мл этанолом. Затем добавляли концентрированную HCl и 5%-й раствор соли Мора в 3%-й HCl. Пробу интенсивно встряхивали и приливали 20%-й раствор роданистого аммония. Через 10 мин определяли оптическую плотность раствора при  $\lambda = 480$  нм.

Для анализов отбирали листья растений срединной формации через 7 сут после обработки колхицином. На рисунках представлены средние арифметические из пяти-десяти биологических повторностей и их стандартные ошибки. Аналитическая повторность пятикратная. Достоверность результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента, считая достоверными различия при уровне доверительной вероятности выше 0.95.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработка растений картофеля 1 мМ раствором колхицина на 20% повысила начальную флуоресценцию  $F_0$  (рис. 1), которая характеризует уровень флуоресценции хлорофилла в условиях, когда все реакционные центры фотосистемы II находятся в «открытом» рабочем состоянии, и является индикатором энергетических потерь при переходе энергии возбуждения в антенне и от антенны к реакционному центру фотосистемы II (ФС II) [3, 22]. Максимальная флуоресценция хлорофилла  $F_m$  несколько снизилась (на 16%). Это означает, что не все акцепторы электронов ФС II полностью восстановлены, и растение находится в состоянии стресса [3].

Расчет максимальной квантовой эффективности ФС II ( $F_v/F_m$ ) показал уменьшение данного параметра флуоресценции на 23% в варианте с колхицином (рис. 2). Одновременно отмечено увеличение на 25% нефотохимического тушения флуоресценции, связанного с тепловыми потерями в фотосинтезе.

Фотосинтетическую активность растений оценивают не только по параметрам флуоресценции хлорофилла на уровне целого листа, но и по интенсивности фотохимических реакций, в частности реакции Хилла. Так, полученные результаты (рис. 3) свидетельствуют о существенном снижении (в 1.8 раза) под влиянием колхицина скорости восстановления акцептора электронов феррицианида калия.

Процесс переноса электронов по электронтранспортной цепи хлоропластов обычно сопряжен с синтезом АТФ. Определение интенсивно-



**Рис. 2**. Влияние колхицина на максимальную квантовую эффективность ФС II (а) и нефотохимическое тушение флуоресценции (б).

сти процесса фотофосфорилирования в нециклическом потоке электронов выявило уменьшение в 1.7 раза утилизации неорганического фосфата при деструкции микротрубочек колхицином (рис. 3). Это сопровождалось повышением содержания фосфора в листьях на 28%.

Определение целостности мембран по первичным продуктам ПОЛ свидетельствует о накоплении гидроперекисей жирных кислот липидов под влиянием колхицина. Их содержание в листьях увеличилось на 27% (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что действие колхицина на тубулиновый цитоскелет является фармакологическим стрессом, о чем свидетельствует накопление гидроперекисей жирных кислот липидов — первичных продуктов ПОЛ. Как известно, активизация реакций ПОЛ связана с нарушением в работе антиоксидантной системы. Вместе с тем практически отсутствуют экспериментальные доказательства взаимосвязи активности антиоксидантной системы и состояния цитоскелета. Ранее нами выяснено, что деструкция микротрубочек снижает активность пероксидазы на фоне резкого падения уровня фитогормонов ауксинов и соотношения индолилуксусной и абсцизовой кислот в листьях картофеля [23]. Отметим, что в литературе имеются сведения, касающиеся действия отдельных групп экзогенных фитогормонов на экспрессию генов антиоксидантных ферментов [24].

Следует заметить, что фитогормоны влияют не только на работу антиоксидантной системы и реакции ПОЛ, но и на процесс фотосинтеза. В литературе накоплен большой экспериментальный материал, касающийся стимулирующего влияния



**Рис. 3**. Влияние колхицина на фотохимическую активность хлоропластов (а), нециклическое фотофосфорилирование (б) и содержание фосфора в листьях растений картофеля (в).

цитокининов на содержание основного фотосинтетического пигмента – хлорофилла [25]. Сведения о влиянии ауксинов на содержание хлорофилла противоречивы и весьма малочисленны [26]. При определении потенциальных возможностей фотосинтетического аппарата все чаще прибегают к характеристике функциональной активности хлоропластов на уровне световых реакций и их регуляции [5]. Имеются данные, показывающие влияние экзогенных фитогормонов на реакцию Хилла. При этом отмечается неоднозначное действие цитокининов, стимулирование под влиянием ауксинов и отсутствие эффекта при обработке абсцизовой кислотой [27, 28]. Наши предыдущие исследования свидетельствуют о зависимости нециклического фотофосфорилирования от эндогенного содержания ауксинов в листьях картофеля [29]. Ингибирование синтеза АТФ в хлоропластах отмечено при действии абсцизовой кислоты [27].

Интегральным показателем фотосинтетической деятельности растений является интенсивность ассимиляции CO<sub>2</sub>. В большинстве работ отмечается стимулирующее действие ауксинов, гиббереллинов, цитокининов и ингибирующее – абсцизовой кислоты на усвоение растениями CO<sub>2</sub> [25, 30]. В наших ранних исследованиях [31] выявлено, что максимальная ассимиляция <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> в фазе бутонизации растений картофеля соответствовала наибольшему содержанию индолилуксусной кислоты. Ряд авторов связывает действие фитогормонов на усвоение CO<sub>2</sub> с регуляцией работы устьичного аппарата, а также с активностью ключевого фермента цикла Кальвина – рибулозобисфосфаткарбоксилазы [25, 30, 32].

В литературе имеются некоторые сведения о влиянии экзогенных фитогормонов на параметры флуоресценции хлорофилла. В частности, показано, что обработка проростков ячменя абсцизовой кислотой в условиях гипертермии увеличивала  $F_0$  [33], но снижала  $F_v/F_m$  у *Ceratotheca triloba* в условиях засухи [34]. Вместе с тем в условиях засухи абсцизовая кислота повышала  $F_v/F_m$  в листьях батата [35]. Увеличение  $F_v/F_m$  выявлено при обогащении проростков томатов гиббереллином в условиях дефицита света [36]. Экзогенное применение 24-эпибрассинолида увеличивало скорость потока электронов у сои в условиях водного дефицита [37].

Полученные в настоящей работе результаты по параметрам флуоресценции хлорофилла в варианте с деструктурированным тубулиновым цитоскелетом, в частности, снижение  $F_{\rm m}$  и  $F_{\rm v}/F_{\rm m}$ , а также увеличение нефотохимического тушения флуоресценции (рис. 1 и 2) свидетельствуют об изменении функциональной активности фотосинтетического аппарата. Уменьшение  $F_{\rm v}/F_{\rm m}$ 

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



**Рис.** 4. Влияние колхицина на содержание гидроперекисей жирных кислот липидов в листьях растений картофеля.

означает, что перед измерением растение было подвергнуто влиянию стресса [3]. В исследованиях, проведенных на растениях картофеля в условиях засухи [38], также отмечено снижение данного параметра. На других видах растений в условиях действия абиотических и биотических стрессоров выявлены аналогичные изменения в максимальной квантовой эффективности ФС II [39, 40].

Изменения показателей флуоресценции хлорофилла происходили в условиях нарушения целостности мембран хлоропластов, о чем свидетельствует накопление первичных продуктов ПОЛ (рис. 4). Как уже отмечалось, деструктурирующие агенты микротрубочек существенно изменяют процессы, происходящие на мембранах, в том числе и связанные с транспортом электронов. Нарушение целостности тубулинового цитоскелета негативно сказалось на фотохимической активности изолированных хлоропластов и на процессе нециклического фотофосфорилирования (рис. 3). Это может быть следствием деградации мембран хлоропластов, изменения флуориметрических показателей хлорофилла, а также нарушений в фитогормональной системе. Известно, что фитогормоны, как эндогенные регуляторы роста и развития растений, во многом определяют интенсивность реакций световой фазы фотосинтеза [27-29].

Вопрос участия элементов цитоскелета в формировании гормонального статуса растений остается до сих пор открытым. Имеющиеся в литературе сведения не позволяют объяснить механизм действия элементов цитоскелета на содержание фитогормонов. Можно лишь отметить, что снижение уровня ауксинов в листьях, возможно, связано с нарушением транспорта данного фитогормона и его рецепторов [15]. Показано также, что разборка тубулинового цитоскелета влияет на экспрессию генов биосинтеза гиббереллина и абсцизовой кислоты [41]. Ранее опубликованные данные наших исследований [23] показывают существенное изменение содержания и соотношения фитогормонов в листьях картофеля при деструкции микротрубочек колхицином, а именно снижение количества индолилуксусной кислоты и зеатина, увеличение содержания абсцизовой кислоты и неизменный уровень гибберелловой кислоты.

Полученные в работе результаты позволяют заключить, что деструкция тубулинового цитоскелета колхицином способствует накоплению гидроперекисей жирных кислот липидов - первичных продуктов ПОЛ, изменяет параметры флуоресценции хлорофилла — уменьшает  $F_v/F_m$  и увеличивает нефотохимическое тушение флуоресценции, что указывает на нарушение функционирования электрон-транспортной цепи хлоропластов. Полученные нами ранее экспериментальные данные по изменению гормонального статуса листьев растений картофеля в условиях деструктурированных микротрубочек [23] позволяют полагать, что снижение интенсивности фотохимической активности хлоропластов и процесса нециклического фотофосфорилирования в варианте с колхицином может быть связано не только с нарушением целостности мембран и изменением параметров флуоресценции хлорофилла, но и с изменением содержания и соотношения фитогормонов.

### 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. N. R. Baker, Annu. Rev. Plant Biol. 59, 89 (2008).
- В. С. Лысенко, Т. В. Вардуни, В. Г. Сойер и В. П. Краснов, Фундаментальные исследования 4, 112 (2013).
- В. Н. Гольцев, Х. М. Каладжи, М. Паунова и др., Физиология растений 63 (6), 881 (2016).
- В. Н. Попов, О. В. Антипина, А. А.Селиванов и др., Физиология растений 66 (1), 73 (2019).
- 5. А. Б. Рубин, Принципы организации и регуляции первичных процессов фотосинтеза. LV Тимирязевские чтения (ОНТИ ПНЦ РАН, Пущино, 1995).
- J. Flexas, J. M. Escalona, S. Evain, et al., Physiol. Plantarum 114 (2), 231 (2002).

- А. Фултон, Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки (Мир, М., 1987).
- Л. П. Хохлова, Э. Палих и О. В. Олиневич, Цитология **39** (4–5), 294 (1997).
- 9. M. Fukuda, S. Hasezawa, N. Asai, et al., Plant Cell Physiol. **39**, 80 (1998).
- Й. Р. Абдрахимова, Ф. А. Абдрахимов, А. Ф. Абдрахманова и др., Физиология растений **50** (5), 653 (2003).
- О. А. Тимофеева, Л. Д. Гараева, Ю. Ю. Чулкова и др., Физиология растений 55 (3), 368 (2008).
- А. Ю. Ныпорко, А. И. Емец, Л. А. Климкина и др., Физиология растений 49 (3), 459 (2002).
- Л. П. Хохлова и М. В. Макарова, Ученые записки Казанского государственного университета. Естественные науки 148 (3), 65 (2004).
- Л. П. Хохлова и Ю. Ю. Невмержицкая, Ученые записки Казанского государственного университета. Естественные науки 153 (2), 147 (2011).
- 15. R. Godbole, W. Michalke, P. Nick, et al., Plant Biol. 2, 176 (2000).
- Т. И. Пузина, В. Л. Ланцев и Н. С. Власова, Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки 5, 228 (2011).
- 17. T. Maekawa, I. Tsutsui, and R. Nagai, Plant Cell Physiol. **27** (5), 837 (1986).
- 18. F. Takahashi, T. Hishinuma, and H. Kataoka, Plant Cell Physiol. 42 (3), 274 (2001).
- W. Bilger, U. Schreiber, M. Bock, Oecologia 102, 425 (1995).
- 20. В. Ф. Гавриленко и Т. В. Жигалова, *Большой практикум по фотосинтезу* (Академия, М., 2003).
- 21. Л. А. Романова и И. Д. Стальная, *Современные методы в биохимии* (Медицина, М., 1977).
- 22. N. R. Baker and E. Rosenquist, J. Exp. Bot. 55, 1607 (2004).
- 23. Т. И. Пузина, Н. С. Власова, И. Ю. Макеева и др., Цитология **58** (7), 555 (2016).
- L. M. Guan and J. G. Scandalios, Physiol. Plantarum 114, 288 (2002).
- 25. И. И. Чернядьев, Прикладная биохимия и микробиология **29** (5), 644 (1993).
- Л. П. Жданова и Т. Б. Корягина, Физиология растений 44 (2), 242 (1997).
- 27. Т. Е. Кренделева, А. В. Макеев и А. Т. Мокроносов, Физиология растений **34** (5), 988 (1987).
- J. Catsky, J. Pospisilova, I. Machackova, et al., Biol. Plantarum 35, 393 (1993).
- 29. Т. И. Пузина, И. Г. Кириллова и Н. И. Якушкина, Докл. РАСХН **6**, 29 (1998).
- Р. А. Борзенкова и М. В. Зорина, Физиология растений 37 (3), 546 (1990).
- Т. И. Пузина, И. Г. Кириллова и Н. И. Якушкина, Изв. РАН. Сер. биол. 2, 170 (2000).
- 32. T. Taybi, R. Sotta, H. Gehrig, et al., Bot. Acta **108** (3), 240 (1995).
- A. G. Ivanov, M. I. Kitcheva, A. M. Christov, et al., Plant Physiol. 98, 1228 (1992).
- N. A. Masondo, A. D. Aremu, M. G. Kulkarni, et al., J. Plant Growth Regulation 38 (2), 385 (2019).

- 35. 35. J. Q. Wang, H. Li, Q. Liu, et al., J. Appl. Ecol. **31** (1), 189 (2020).
- 36. L. Tao, Y. Hongjun, L. Qiang, C. Lin, et al., Frontiers in Plant **10**, 490 (2019).
- 37. Y. C. Pereira, W. S. Rodrigues, E. J. A. Lima, et al., Photosynthetica **57** (1), 11(2019).
- 38. P. S. Basu, A. Sharma, and N. P. Sukumaran, Photosyntetica **35**, 13 (1998).
- 39. O. H. Sayed, Photosynthetica 41 (3), 321 (2003).
- О. В. Яковлева, Е. В. Талипова, Г. П. Кукарских и др., Биофизика 50 (6), 1112 (2005).
- 41. M. Komorisono, M. Ueguchi-Tanaka, I. Aichi, et al., Plant Physiol. **138** (4), 1982 (2005).

# The Functional State of the Photosynthetic Apparatus of Potato Plants upon Destruction of the Tubulin Cytoskeleton

### I.Yu. Makeeva and T.I. Puzina

Turgenev Orel State University, Komsomolskaya ul. 95, Orel, 302026 Russia

In our research we have investigated the effect of colchicine, a disrupting agent of the tubulin cytoskeleton, on chlorophyll fluorescence parameters, Hill reaction, non-cyclic photophosphorylation and lipid peroxidation reaction in *Solanum tuberosum* grown in soil in a greenhouse environment. The destruction of microtubules caused an increase in the content of lipid fatty acid hydroperoxides, the primary product of lipid peroxidation, led to changes in fluorescence parameters:  $F_0$  increased, Fm and the maximum quantum efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ) decreased, the dissipation of electronic excitation energy as heat enhanced. Simultaneously, it was found that the Hill reaction rate and the intensity of the process of non-cyclic photophosphorylation decreased. The results obtained in this work are discussed in view of destruction of chloroplast membrane integrity, changes in chlorophyll fluorescence parameters due to colchicine application as well as in light of our previously obtained data on the change in the content of phytohormones and their concentration ratios in potato leaves when microtubules are destroved.

Keywords: chlorophyll fluorescence, chloroplast photochemical activity, non-cyclic photophosphorylation, lipid peroxidation, tubulin cytoskeleton, colchicine, potato

———— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ —

УДК 576.32: 576.36

# ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА *in vitro*

© 2020 г. Е.А. Сладкова

Белгородский национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, ул. Победы, 85 E-mail: sladkova@bsu.edu.ru Поступила в редакцию 18.11.2019 г. После доработки 20.04.2020 г.

Принята к публикации 22.05.2020 г.

Изучены электрические свойства форменных элементов крови в условиях моделирования механического «стресса» *in vitro*. Показано увеличение концентрации молекул АТФ в межклеточном пространстве в ответ на механическое воздействие движущихся слоев плазмы как в крови здоровых людей, так и больных острым лимфобластным лейкозом. Установлено, что потенциал поверхности эритроцитов и тромбоцитов становится более положительным как в крови здоровых людей, так и больных лейкозом. Напротив, для лимфоцитов характерно понижение отрицательного заряда у здоровых людей и повышение в крови больных острым лимфобластным лейкозом в ответ на механический стресс.

Ключевые слова: механический стресс, пуринергическая сигнальная система, поверхностный потенциал, лимфоциты, эритроциты, тромбоциты. **DOI:** 10.31857/S0006302920050087

Пуринергическая сигнализация представляет собой сложную систему элементов, в которой молекула АТФ и родственные ей молекулы функционируют как межклеточные мессенджеры. Когда АТФ высвобождается во внеклеточное пространство, он активирует специфические рецепторы, принадлежащие к семейству Р2 [1]. Параллельно эктонуклеотидазы превращают АТФ в его дефосфорилированные метаболиты, в том числе аденозин, который стимулирует рецепторы Р1. Активность обоих рецепторов влияет на различные клеточные процессы [2]. Известны четыре подтипа рецепторов P1 (P1R) (A1, A2A, A2B и A3), восемь подтипов Р2Ү (Р2Ү1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) и семь подтипов Р2Х (Р2Х1-7) [1]. В основном все подтипы рецепторов Р1 и Р2 экспрессируются иммунными клетками в зависимости от типа клеток и дифференцировки и играют значительную роль в воспалительных процессах.

В последние годы был проведен ряд исследований патофизиологической роли пуринергической сигнализации и ее терапевтического потенциала при различных заболеваниях [3–5]. Имеются доказательства того, что опухолевые клетки различных видов выделяют значительное количе-

Сокращение: ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз.

ство АТФ в ответ на механическую деформацию, гипоксию и некоторые агенты, а также на последующий некроз и ишемию [4]. Рецепторы Р2Х7 были описаны в лейкозных лимфоцитах человека. Имеются данные, свидетельствующие о том, что экспрессия и функция рецепторов Р2Х7, которые могут опосредовать гибель или пролиферацию клеток в зависимости от уровня активации, могут коррелировать с тяжестью лимфобластного лейкоза [6].

В ряде работ показано, что при прохождении эритроцитов через узкие просветы капилляров в условиях механической деформации они освобождают молекулы АТФ, которые в межклеточном пространстве деградируют в течение нескольких секунд, расщепляясь семейством эктонуклеотидаз [7] с образованием метаболитов. АДФ и аденозин активно взаимодействуют с рецепторами А2-семейства на эритроцитарной поверхности, что приводит к еще более выраженному выбросу АТФ через канал паннексин-1 [8].

Учитывая тот факт, что механическое воздействие на клетки крови может стимулировать работу пуринергической сигнальной системы, а пуриновые рецепторы выполняют роль ионных каналов [9, 10], актуальным является изучение электрических свойств различных клеточных популяций в норме и при развитии патологических процессов в условиях механического стресса.

Цель работы — изучить изменение электрических свойств форменных элементов крови в условиях механического стресса *in vitro*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была периферическая кровь здоровых людей зрелого возраста (n = 30) и людей больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (n = 30). Забор периферической крови проводили из локтевой вены с участием специализированного медперсонала лаборатории Белгородской областной клинической больницы имени Святителя Иоасафа в одноразовые стерильные вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА-К2 в концентрации 2.0 мг (0.006843 моль/литр) на 1 мл крови.

Венозную кровь здоровых доноров и больных ОЛЛ делили на две части: в опытной пробирке проводили активацию пуринергических сигнальных путей посредством модели «механического стресса», контрольную пробирку оставляли интактной. Механический стресс осуществляли согласно методу, описанному в работе [10].

Концентрацию АТФ в крови определяли колориметрическим методом [11, 12]. Метод основан на отщеплении от АТФ двух остатков фосфорной кислоты при непродолжительном гидролизе в кислой среде. Сравнение содержания органического фосфора в пробах до и после гидролиза дает представление о количестве лабильно связанного с АТФ фосфора, находящегося в крови. Цельную кровь (0.1 мл) помещали в пробирку, стоящую на ледяной бане, гомогенизируя 2.5%-м раствором ТХУ (1 мл) в течение 5 мин. Затем добавляли 1 мл физиологического раствора (0.9%) и продолжали экстракцию на холоде в течение того же времени. В две пробирки, контрольную и опытную, отбирали по 0.5 мл полученного раствора. В опытную пробирку добавляли 1 мл 1 М раствора соляной кислоты и помещали в кипящую водяную баню на 10 мин для гидролиза фосфатных связей. Затем раствор охлаждали, добавляли 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия. В контрольную пробирку (без кипячения) добавляли 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия и 1 мл 1 М раствора соляной кислоты. В обе пробирки добавляли по 7.5 мл физиологического раствора. Для проведения качественной реакции из обеих проб отбирали по 5 мл жидкости в новые пробирки. К каждой добавляли 0.5 мл 1 М раствора молибдата аммония, 0.5 мл 1%-го раствора аскорбиновой кислоты и 2 мл физиологического раствора. Содержимое пробирок быстро перемешивали и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 10 мин.

Контрольную и опытную пробы колориметрировали на фотометре КФК-3 (Россия) против физиологического раствора при длине волны 670 нм. Концентрацию АТФ рассчитывали по разности оптических плотностей между раствором в контрольной пробирке (без гидролиза в кислой среде) и опытной пробирке по калибровочному графику. Калибровочный график строили, используя раствор фосфат-ионов (ГСО 7791-2000) в концентрациях от 50 до 500 мкг/мл с шагом в 50 мкг/мл. Измерение АТФ выполняли в трех повторностях для каждой пробы.

Подготовку образцов клеток крови контрольных и опытных групп выполняли по следующей схеме. Для разделения форменных элементов на эритроциты, лейкоциты и тромбоциты контрольную и опытную пробирку с кровью центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. Затем нижнюю часть плазмы и лейкоцитарное кольцо отбирали в другую пробирку и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, убирали надосадочную жидкость. Получали суспензию лейкоцитов, которую с помощью магнита для клеточной сепарации Easy-Sep Magnet и набора для выделения лимфоцитов EasySep/EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (StemCell) (Thermo Scientific, CIIIA) разделяли на гранулоциты и лимфоциты. Суспензию тромбоцитов получали согласно методу, описанному в работе [13].

Исследование потенциала поверхности клеток осуществляли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель ЗАО «NT-MDT», Зеленоград). Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме методом зонда Кельвина. Из каждой пробы сканировали не менее 15 клеток. Для сканирования использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, США). Суспензию клеток для измерения потенциала поверхности и процедуру его измерения осуществляли согласно способу, изложенному в работе [14]. Обработку полученных изображений проводили в программе Nova (ЗАО «НТ-МДТ», Зеленоград) с использованием инструмента «Point Instruments». На каждой клетке определяли значение потенциала поверхности в 20 участках и рассчитывали среднее значение.

Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента при p < 0,05 с учетом нормального распределения данных. В рабо-



**Рис. 1.** Поверхностный потенциал клеток крови здоровых людей. Опыт — под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль — интактная кровь; \* — статистически достоверные различия между контрольной и опытной группами по критерию Стьюдента при p < 0.05.

те приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки средней (m).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условия механического стресса уровень АТФ в крови здоровых людей увеличился в 2.3 раза (p < 0.05) по сравнению с интактной кровью. У больных ОЛЛ в условиях сдвиговой деформации концентрация АТФ повысилась в 1.8 раза (p < 0.05) по сравнению с контрольной группой.

Показано, что при механическом воздействии потенциал поверхности эритроцитов и тромбоцитов стал более положительным. Значение заряда эритроцитов увеличилось на 44% (p < 0.05), тромбоцитов на 40% (p < 0.05). Потенциал поверхности лимфоцитов напротив стал более отрицательным на 47% (p < 0.05) по сравнению с контролем (рис. 1). У больных ОЛЛ в условиях механического воздействия потенциал поверхности клеток крови стал более положительным по сравнению с контролем. Так, потенциал поверхности эритроцитов был выше на 34% (p < 0.05), лимфоцитов – на 27% (p < 0.05) и тромбоцитов на 34% (p < 0.05) (рис. 2).

Установлено, что в условиях механической деформации клеток крови концентрация АТФ в крови возросла по сравнению с пробами без нагрузки. Полученные данные свидетельствуют о выделении в межклеточное пространство молекул АТФ при механической стимуляции, что согласуется с результатами, представленными рядом авторов [7, 15].



**Рис. 2.** Поверхностный потенциал клеток крови больных острым лимфобластным лейкозом. Опыт — под влиянием механического стресса *in vitro*, контроль — интактная кровь; \* — статистически достоверные различия между показателями по критерию Стьюдента при p < 0.05.

Смоделированный механоиндуцированный выброс АТФ клетками крови повлиял на их электрические свойства. Изменение потенциала клеточной поверхности мы связываем с запуском и реализацией пуринергического сигнального каскада под влиянием механического стресса [7]. В настоящее время доказано, что на мембране эритроцитов нет специфических Р-рецепторов непосредственно для молекулы АТФ, но были идентифицированы рецепторы для АДФ и аденозина [16]. Ввиду этого мы предполагаем, что продукты распада молекул АТФ могли оказать влияние на изменение электрических свойств красных клеток крови за счет входа ионизированного кальция через ионную пору [17], так как пуриновые рецепторы выполняют роль ионных каналов [9, 10]. В ряде работ описаны рецепторы Р2Х-семейства, локализованные на поверхности лимфоцитов, взаимодействие молекул АТФ с этими рецепторами влечет за собой открытие Ca<sup>2+</sup>-ионных каналов [18], что может быть связано с установленным изменением потенциала поверхности лимфоцитов. Мы склонны предположить, что повышение заряда поверхности тромбоцитов возможно посредством взаимодействия продуктов распада АТФ с Р2У-рецепторами на их поверхности [19].

В условиях лейкоза заряд эритроцитов и тромбоцитов повышается по аналогии с клетками здоровых людей, в то время как для опухолевых лимфоцитов больных ОЛЛ характерно противоположное изменение потенциала поверхности по сравнению с клетками здоровых людей. Полученные данные могут быть связаны с повышенной

экспрессией рецептора P2X7R на поверхности лейкозных клеток [6], вероятно который может быть активирован при силовом воздействии на клетки. Увеличение концентрация АТФ способствует активации пуринергического рецептора P2X7R, что ведет к одновременному увеличению содержания внутриклеточного  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  в опухолевых лимфоцитах, а не только ионов  $Ca^{2+}$  [9]. Учитывая данный факт, мы предполагаем, что приобретение лейкозными лимфоцитами более положительного заряда может быть результатом открытия ионных каналов одновременно для Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>. Увеличение заряда тромбоцитов у больных ОЛЛ может быть связано как с активацией рецепторов Р2Ү12 и Р2Ү1 посредством молекулы АТФ, так и с непосредственным влиянием метаболических продуктов опухолевых клеток, вызывающих деполяризацию мембраны тромбоцитов [20, 21].

Таким образом, показано увеличение концентрации молекул  $AT\Phi$  в межклеточное пространство в ответ на механическое воздействие *in vitro*. В крови больных ОЛЛ концентрация  $AT\Phi$  ниже как в интактной крови, так и при механическом стрессе, что может быть связано с изменением функциональной активности эритроцитов в условиях опухолевого процесса.

Полученные данные позволяют предположить, что механическое воздействие может оказывать влияние на электрические свойства плазмалеммы форменных элементов крови как у здоровых людей, так и у больных острым лимфобластным лейкозом. Важным моментом является установление разнонаправленного изменения потенциала поверхности лимфоцитов здоровых людей и больных ОЛЛ. Так, в норме заряд поверхности лимфоцитов становится более отрицательным, а при развитии лейкоза - более положительным. Выявленные нами закономерности могут иметь значение в изучении механизмов межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле. Также они могут быть учтены при поиске фармакологических регуляторных мишеней с целью поддержания функциональной активности иммунокомпетентных клеток в условиях патологического процесса.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ по мероприятию «Проведение инициативных исследований молодыми учеными», 2018-2020 гг., соглашение № 18-75-00041.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. D. Malec, Polish J. Pharmacol. Pharmacy **48** (5), 457 (1996).
- 2. C. Cekic and J. Linden, Nature Rev. Immunol. 16 (3), 177 (2016).
- H. K. Eltzschig, M. V. Sitkovsky, and S. C. Robson, New Engl. J. Med. 367 (24), 2322 (2012).
- G. Burnstock and D. V. Francesco, Purinergic signalling 9 (4), 491 (2013).
- 5. M. Yang and W. J. Brackenbury, Frontiers Physiol. 4, 121 (2013).
- 6. X. Zhang, Acta Biochim. Biophys. Sin. 41, 362 (2009).
- N. Montalbetti, M. F. L. Denis, O. P. Pignataro, and E. Kobatake, J. Biol. Chem. 286 (44), 38397 (2011).
- 8. A. Baroja-Mazo, H. Barbero-Gremades, and P. Pelegrini, Biochem. Biophys. Acta **828**, 79 (2013).
- 9. F. Virgilio, Nature Rev. Cancer 18 (10), 601 (2018).
- T. Oonishi, K. Sakashita, and N. Uyesaka, Am. J. Physiol. Soc. 273, 1828 (1997).
- Н. М. Титова, Т. Н. Замай и Г. И. Боровкова, Биохимия и молекулярная биология: лаб. практикум (ИПК СФУ, Красноярск, 2008).
- 12. Т. Л. Алейникова и Г. В. Рубцова, Руководство к практическим занятиям по биологической химии (Высш. школа, М., 1988).
- К. И. Таборская, М. Ю. Фролова и Н. В. Кулева, Цитология 58 (2), 115 (2016).
- Е. А. Сладкова и М. Ю. Скоркина, Биофизика 59 (2), 310 (2014).
- J. Evans, W. Gratzer, N. Mohandas, et al., Biophys. J. 94 (10), 4134 (2008).
- D. E. Pafundo, C. I. Alvarez, C. A. Krumschnabel, and P. J. Schwarzbaum, J. Biol. Chem. 285, 6134 (2010).
- 17. A. Kusumi, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure 34, 351 (2005).
- K. Kaczmarek-Hájek, E. Lörinczi, R. Hausmann, and A. Nicke, Purinergic Signal. 8 (3), 375 (2012).
- 19. 19. S. N. Orlov, Purinergic Signal. 3 (3), 231 (2007).
- X. Qian and L. Wen-jun, Cell Biochem. Biophys. 67 (3), 1473 (2013).
- 21. T. Bose, A. Cieslar-Pobuda, and E. Wiechec, Cell Death Disease 6 (2), 101 (2015).

#### СЛАДКОВА

# Change of Electrical Properties of Formed Blood Elements under *in vitro* Mechanical Stress

### E.A. Sladkova

Belgorod National Research University, ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015 Russia

In the present study, electrical properties of blood cells were studied by modelling *in vitro* mechanical stress. An increase in the concentration of ATP molecules in the intercellular space in response to the mechanical effect of moving plasma layers both in the blood of healthy people and patients with acute lymphoblastic leukemia has been shown. It has been established that the surface potential of red blood cells and platelets becomes more positive both in the blood of healthy people and patients with leukemia. On the contrary, lymphocytes are characterized by a decrease in the negative charge in healthy people, and its increase in the blood of patients with acute lymphoblastic leukemia in response to mechanical stress.

Keywords: mechanical stress, purinergic signaling system, surface potential, lymphocytes, red blood cells, platelets

——— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ =

УДК [612.223.12: 615.834]: 612.127]-092.4

# ЭФФЕКТ ОЗОНА НА КИСЛОРОДТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ВОЗДЕЙСТВИЯ В ОПЫТАХ *in vitro*

© 2020 г. В.В. Зинчук, Е.С. Билецкая

Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Гродно, ул. М. Горького, 80, Беларусь E-mail: zinchuk@grsmu.by

Поступила в редакцию 02.04.2018 г. После доработки 30.10.2019 г. Принята к публикации 16.06.2020 г.

Изучен эффект озона на кислородтранспортную функцию крови экспериментальных животных в опытах *in vitro*. Инкубация крови с озонированным физиологическим раствором (концентрация  $O_3 - 2$ , 6, 10 мг/л) в течение 30 и 60 мин обуславливает изменение кислородтранспортной функции крови, проявляющееся в увеличении напряжения кислорода, степени оксигенации и уменьшении сродства гемоглобина к кислороду. Действие данного фактора увеличивает содержание таких газотрансмиттеров, как монооксид азота и сероводород, что имеет значение для модификации кислородсвязующих свойств крови.

Ключевые слова: озон, кровь, кислород, газотрансмиттеры.

DOI: 10.31857/S0006302920050099

Фармакологическая терапия в ряде случаев имеет негативные последствия, что определяет интерес к альтернативным немедикаментозным методам лечения, в частности к озонотерапии, нашедшей в последние годы широкое применение в клинической практике [1]. Озон (О<sub>3</sub>) обладает большим разнообразием физиологических эффектов, в том числе влияет на систему крови. Воздействие озоно-кислородной смесью с концентрацией озона 10-100 мкг/л на кровь собак обуславливало выраженное увеличение уровня напряжения кислорода [2]. Установлено, что инкубация озона в интервале доз 1-3 мг/л с эритроцитарной массой приводит к увеличению содержания АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), в то время как высокие концентрации озона (5-11 мг/л) не вызывают подобного эффекта [3]. При введении крысам после кровопотери отмытых эритроцитов (0.5 мл) и озонированного физиологического раствора (2 мл с концентрацией озона 2 мг/л) происходит увеличение электрофоретической подвижности красных клеток крови, улучшаются реологическое состояние крови и микроциркуляция, что позволяет оптимизировать процесс транспорта кислорода в ткани [4]. Однако эффект озона непосредственно на кислородсвязующие свойства крови недостаточно изучен.

Целью данного исследования являлось изучение эффекта озона на кислородтранспортную функцию

крови экспериментальных животных в опытах *in vitro* при различных режимах воздействия.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты выполняли на двадцати белых крысахсамцах массой 250—300 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария. Под адекватным наркозом (50 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) проводили забор смешанной венозной крови из правого предсердия в объеме 8 мл в предварительно подготовленный шприц с гепарином из расчета 50 ЕД на 1 мл крови.

Объектом исследования явилась кровь, которая была разделена на четыре экспериментальные группы по 10 проб в каждой. Во всех группах к 3 мл крови добавляли 1 мл изотонического (0.9%) раствора хлорида натрия: в первую (контрольную) группу вводили 0.9%-й раствор NaCl без озонирования, в кровь остальных групп озонированный NaCl с О<sub>3</sub> в концентрации 2 мг/л (вторая группа), 6 мг/л (третья группа) и 10 мг/л (четвертая группа), после чего пробы перемешивали. Время инкубации составило 30 и 60 мин. Физиологический раствор барботировали озонокислородной смесью при помощи озонотерапевтической установки УОТА-60-01 (ООО «Медозон», Россия), в которой предусмотрено измерение концентрации озона оптическим методом в ультрафиолетовом диапазоне. Его содержание в изотоническом растворе хлорида натрия через 30 мин составляло 0.86, 2.78, 5.26 мг/л при исходной концентрации 2, 6 и 10 мг/л соответственно; через 60 мин его концентрация равнялась нулю.

Сокращения: 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат, СГК – показатель сродства гемоглобина к кислороду.

Показатели кислородтранспортной функции крови, такие как напряжение кислорода ( $pO_2$ ) и степень оксигенации  $(SO_2)$ , и кислотно-основного состояния (напряжение углекислого газа  $(pCO_2)$ , стандартный бикарбонат (SBC), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований (ABE/SBE), гидрокарбонат  $(HCO_{\overline{3}})$ , концентрация водородных ионов (pH), общая углекислота плазмы крови (TCO<sub>2</sub>)) определяли при 37°C на газоанализаторе Stat Profile pHOx plus L (NOVA Biomedical Corporation, США). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) оценивали спектрофотометрическим методом по показателю р50 (рО2 крови при 50%-м насыщении ее кислородом). По формулам, приведенным в работе [5], рассчитывали значение *р*50<sub>станд</sub> и положение кривой диссоциации оксигемоглобина.

Продукцию NO измеряли по содержанию нитрат/нитритов (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) в плазме крови с помощью реактива Грисса на спектрофотометре PV1251C (ЗАО «СОЛАР», Беларусь) при длине волны 540 нм. Содержание сероводорода (H<sub>2</sub>S) определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и кислым раствором солянокислого N,N-диметил-парафенилендиамина в присутствии хлорного железа при длине волны 670 нм [6].

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого были использованы методы непараметрической статистики с применением программы Statistica 10.0. Сравнение трех и более независимых групп проводили с помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки и множественных сравнений, оценивали с использованием И-критерия Манна-Уитни. Результаты представлены как медиана (Ме), 25-й и 75-й процентили. При проведении множественных сравнений применяли поправку Бонферрони-Холма для определения критического уровня значимости.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице представлены данные о характере изменения кислородтранспортной функции под воздействием озона. В опытных группах при каждом последующем увеличении концентрации данного фактора отмечается уменьшение  $pCO_2$  при экспозиции 30 и 60 мин. Так, в группе с концентрацией озона 2 мг/л наблюдается уменьшение данного показателя по сравнению с контролем при двух рассматриваемых экспозициях соответственно. В крови животных, которую подвергали воздействию озонированного 0.9%-го NaCl, наблюдается сдвиг реакции крови в щелочную сторону, что подтверждается ростом значения pH при экспозиции 30 и 60 мин в группе с ми-

нимальной концентрацией озона по сравнению с контролем. Также установлено значимое снижение значения концентрации  $HCO_3^-$  в группе с концентрацией озона 2 мг/л при экспозиции 30 и 60 мин. Подобная динамика изменений наблюдалась и по отношению к показателям  $TCO_2$ , SBC. При этом значительно повышается уровень ABE/SBE по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о сдвиге кислотно-основного состояния в щелочную сторону, усиливающемся с увеличением концентраций озона, но с сохранением его в диапазоне нормальных значений.

При инкубации крови с озонированным физиологическим раствором с различной концентрацией озона отмечается выраженный рост напряжения кислорода. Так, в группе с концентрацией озона 2 мг/л этот параметр возрастает при экспозиции 30 и 60 мин. При наибольшей концентрации озона (10 мг/л) отмечается наибольший прирост  $pO_2$ . Подобная тенденция наблюдается и по отношению к степени насышения крови кислородом, которая возрастает при экспозиции 30 и 60 мин в сравнении с контролем. Показатель значения СГК р50<sub>реал</sub> при воздействии данным фактором возрастает (рис. 1а). При концентрации озона 2 мг/л отмечается его увеличение до 31.6 мм рт. ст. (28.6, 36.1; *p* = 0.049) при экспозиции 30 мин и до 32.2 мм рт. ст. (28.5, 37.9; p = 0.043) при экспозиции 60 мин в сравнении с контролем, что свидетельствует о сдвиге кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 2). Схожая динамика изменений была и по показателю *р*50<sub>станд</sub> (рис. 16). С увеличением концентрации озона отмечается уменьшение СГК и соответственно большая степень сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 2). Как видим, полученные данные свидетельствуют об увеличении таких показателей кислородтранспортной функции крови, как p50,  $pO_2$ ,  $SO_2$ .

Суммарное содержание  $NO_3^-/NO_2^-$  в плазме крови (рис. 3) в группах с концентрацией озона 2, 6 и 10 мг/л увеличивается по сравнению с контролем. Уровень другого газотрансмиттера (H<sub>2</sub>S) также возрастает (рис. 4).

Использование озона демонстрирует широкую вариабельность эффектов его применения, что может быть обусловлено особенностью реализации этого воздействия, различием в дозах и условиях, в которых он вводится. Активация метаболизма организма наблюдается даже при введении очень низких доз озона, сопровождающемся повышением содержания в крови свободного и растворенного кислорода, интенсификацией активности ферментов, катализирующих аэробные процессы окисления углеводов, липидов и белков с образованием энергетического субстрата АТФ [7]. Озон обладает выраженным противогипоксическим эффектом, который объясняют улучше-

Показатель	Контроль	Концентрация озона		
		2 мг/л	6 мг/л	10 мг/л
n	10	10	10	10
Экспозиция 30 мин				
<i>S</i> O <sub>2</sub> , %	32.3 (30.8, 33.8)	34.1 (32.4, 35.2)*	37.6 (34.8, 38.6)*	39.2 (37.6, 40.7)*
<i>p</i> O <sub>2,</sub> мм рт.ст.	22.2 (19.6, 23.3)	24.7 (21.9, 28.7)*	27.5 (26.7, 31.4)*	31.4 (29.2, 33.4)*
рН, ед	7.351 (7.325, 7.372)	7.371 (7.362, 7.391)*	7.393 (7.381, 7.402)*	7.411 (7.390, 7.433)*
<i>p</i> CO <sub>2</sub> , мм рт.ст.	39.6 (38.4, 40.2)	37.1 (36.1, 39.4)*	35.4 (34.6, 36.7)*	33.7 (32.8, 35.7)*
HCO <sub>3</sub> <sup></sup> , ммоль/л	21.6 (20.8, 23.5)	20.2 (18.9, 21.3)*	18.15 (18.1, 19.3)*	17.7 (17.4, 18.2)*
<i>Т</i> СО <sub>2</sub> , ммоль/л	22.75 (21.7, 24.7)	21.4 (20.3, 22.4)*	20.25 (19.5, 20.6)*	19.25 (18.5, 19.7)*
<i>АВЕ</i> , ммоль/л	-4.05 (-4.7, -3.1)	-5.15 (-7.0, -4.2)*	-6.9 (-7.8, -6.6)*	-7.9 (-9.4, -7.1)*
<i>SBE</i> , ммоль/л	-2.7 (-2.9, -1.4)	-3.45 (-4.4, -2.3)*	-4.2 (-5.6, -3.8)*	-5.5 (-6.1, -5.1)*
<i>SBC</i> , ммоль/л	21.5 (20.7, 21.7)	20.5 (19.0, 21.1)*	19.0 (18.6, 19.4)*	18.2 (17.2, 18.7)*
Экспозиция 30 мин				
<i>S</i> O <sub>2</sub> , %	30.6 (28.9, 32.4)	32.7 (32.3, 33.9)*	35.8 (33.4, 37.9)*	38.7 (36.8, 40.8)*
<i>р</i> О <sub>2,</sub> мм рт.ст.	22.1 (19.0, 23.1)	24.7 (21.4, 28.5)*	28.2 (26.9, 30.6)*	30.9 (28.6, 32.9)*
рН, ед	7.332 (7.330, 7.361)	7.394 (7.382, 7.421)*	7.415 (7.401, 7.432)*	7.433 (7.422, 7.443)*
<i>p</i> CO <sub>2</sub> , мм рт.ст.	39.9 (37.3, 41.9)	33.9 (31.1, 39.2)*	30.1 (29.3, 33.6)*	27.5 (27.1, 30.1)*
HCO <sub>3</sub> <sup></sup> , ммоль/л	21.5 (20.7, 23.4)	20.45 (19.7, 21.2)*	19.0 (18.5, 19.3)*	17.8 (17.4, 18.3)*
<i>Т</i> СО <sub>2</sub> , ммоль/л	22.75 (22.6, 24.6)	21.3 (21, 22.7)*	20.1 (19.4, 20.3)*	18.9 (18.4, 19.3)*
<i>АВЕ</i> , ммоль/л	-3.95 (-4.4, -3.3)	-5.2 (-7.1, -3.8)*	-7.05 (-7.5, -6.5)*	-7.55 (-8.2, -7.4)*
<i>SBE</i> , ммоль/л	-2.85 (-3.1, -2.2)	-3.4 (-5.7, -2.8)*	-4.7 (-6.5, -4.3)*	-6.3 (-6.5, -5.8)*
<i>SBC</i> , ммоль/л	21.55 (21.3, 22.1)	20.7 (18.8, 21.3)*	19.0 (18.3, 19.6)*	18.0 (17.6, 18.5)*

Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах экспозиции

Примечание. Данные представлены как *Me* (25, 75); \* – достоверные изменения в сравнении с контролем; величина *p* рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.

нием реологических свойств крови, повышенной отдачей оксигемоглобином кислорода тканям и увеличением скорости микроциркуляции [8]. Сеанс озонотерапии приводит к улучшению реологии крови у пациентов с комплексной патологией не только непосредственно после процедур, но и в течение двух месяцев после курса, что обусловлено снижением микровязкости мембран, минимальной прочности агрегатов и скорости спонтанной агрегации эритроцитов, возрастанием их деформируемости [9].

В организме СГК в значительной степени определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров в ткань [10]. Сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо направлен на компенсирование кислородной недостаточности, а в условиях окислительного стресса, когда нарушена утилизация кислорода тканями, может усиливаться активность процессов свободнорадикального окисления [11]. Имеются единичные работы о непосредственном эффекте озона на СГК. Так,

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

воздействие озоном (1 или 3‰) на кровь не изменяло доставку кислорода, включая СГК и концентрацию 2,3-ДФГ в эритроцитах [12]. Однако при исследовании пациентов с периферической окклюзией артерий озонированная аутогемотрансфузия (реинфузия 100 мл аутологичной крови, предварительно подвергнутой воздействию  $O_3$  в течение 10 мин) повышала значение  $p50_{crann}$ , а уровень 2,3-ДФГ существенно не менялся [13]. Использование озона в опытах in vitro (в концентрации 6.5. 13, 26 и 78 мкг/л) с кровью, взятой от пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов (стадия II-IV по классификации Фонтане) и сахарным диабетом второго типа, приводит к снижению СГК [14]. Применение данного фактора при кровопотере у крыс приводит к росту активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы, что обусловлено развитием компенсаторных процессов за счет роста концентрации 2,3-ДФГ, уменьшающей СГК, а также за счет снижения концентрации АТФ [15]. В результате озонолиза индуцируется каскад реакций, которые в конечном итоге приводят к по-



**Рис.** 1. Эффект озона на показатели  $p50_{\text{реал}}$  (а) и  $p50_{\text{станд}}$  (б); \* – достоверные изменения в сравнении с контролем, величина р рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.

вышению уровня 2,3-ДФГ, облегчая высвобождение кислорода из оксигемоглобина [16]. Данный промежуточный метаболит гликолиза является важным фактором внутриэритроцитарной системы регуляции кислородсвязующих свойств крови, обеспечивающих ее адаптивные изменения. Можно предположить, что отмечаемый в ряде работ положительный клинический эффект озонотерапии [17] обусловлен, как это наблюдалось в наших опытах, сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, способствующим улучшению потока кислорода в ткани.

Механизм выявленной нами модификации СГК связан с изменением содержания таких газотрансмиттеров, как монооксид азота и сероводород. Эффект озона на СГК реализуется как непосредственно через вклад в функционирование систем цистеин/цистин и L-аргинин-NO, так и через модификацию функциональных свойств гемоглобина. Газотрансмиттер NO является аллостерическим эффектором СГК [18]. Образуемые им при взаимодействии с гемопротеидом метгемоглобин и нитрозогемоглобин повышают



**Рис.** 2. Эффект озонированного изотонического раствора на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH и  $pCO_2$  при экспозиции 60 мин: контроль (темные квадраты), концентрация  $O_3$  равна 2 мг/л (треугольники), 6 мг/л (ромбы), 10 мг/л (светлые квадраты).

его сродство к кислороду, а нитрозилгемоглобин его снижает, положение кривой диссоциации оксигемоглобина определяется соотношением этих производных [19]. Газотрансмиттеры представляют собой класс физиологически активных веществ, выполняющих в клетках сигнальную функцию и с высокой специфичностью участвующих в межклеточной и внутриклеточной коммуникации [20]. Взаимодействие NO и H<sub>2</sub>S имеет значение для модификации СГК через образование различных дериватов гемоглобина (мет-, нитрозо-, нитрозил- и сульфогемоглобины), модулирование внутриэритроцитарной системы формирования кислородсвязывающих свойств крови, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина [21]. Наблюдаемый рост газотрансмиттеров (NO, H<sub>2</sub>S), отмечаемый в наших



Рис. 3. Концентрация нитрат/нитритов в плазме при инкубации крови с озонированным изотоническим раствором: 1 -контроль, 2 - 2 мг/л O<sub>3</sub>, 3 - 6 мг/л O<sub>3</sub>, 4 - 10 мг/л O<sub>3</sub>; \* – достоверные изменения в сравнении с контролем; величина р рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.



**Рис.** 4. Содержание сероводорода в плазме при инкубации крови с озонированным изотоническим раствором: 1 -контроль, 2 - 2 мг/л O<sub>3</sub>, 3 - 6 мг/л O<sub>3</sub>, 4 - 10 мг/л O<sub>3</sub>; \* – достоверные изменения в сравнении с контролем; величина р рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.

опытах, несомненно вносит вклад в изменение кислородтранспортной функции крови.

#### выводы

Таким образом, инкубация крови с озонированным физиологическим раствором в диапазоне концентраций от 2 до 10 мг/л обуславливает изменение кислородтранспортной функции крови, проявляющееся в увеличении  $pO_2$ ,  $SO_2$  и уменьшении СГК, выраженность которых усиливается с увеличением концентрации озона. Действие данного фактора увеличивает содержание таких газотрансмиттеров, как NO и H<sub>2</sub>S, что имеет значение для модификации кислородсвязывающих свойств крови. Очевидно, противогипоксическое действие озона реализуется через механизмы, изменяющие кислородтранспортную функцию крови.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции на животных были выполнены в соответствии с рекомендациями и разрешением

региональной комиссии по биомедицинской этике.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- А. В. Змызгова и В. А. Максимов, Клинические аспекты озонотерании (Первая образцовая типография, М., 2003).
- 2. С. П. Перетягин, К. Н. Конторщикова и А. А. Мартусевич, Медицинский альманах 2, 101 (2012).
- В. Н. Крылов, И. С. Дерюгина, А. В. Симутис и др., Биомедицина 2, 37 (2014).
- А. В. Дерюгина, Я. В. Галкина, И. С. Симутис и др., Изв. Уфимского научного центра РАН 1, 41 (2017).
- 5. J. W. Severinghaus, J Appl. Physiol. 21 (5), 1108 (1966).
- E. J. Norris, C. R. Culberson, S. Narasimhan, et al., Shock. 36 (3), 242 (2011).
- 7. Н. А. Шаназарова, Н. Ю. Лисовская, Е. В. Лисовский и др., Медицинские науки **2**, 113 (2016).
- Р. Р. Исхакова и Ф. Р. Сайфуллина, Казанский мед. журн. 94 (4), 510 (2013).
- 9. Л. Н. Катюхин, Физиология человека **6**, 100 (2016).
- 10. В. В. Зинчук и Н. В. Глуткина, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **99** (5), 537 (2013).
- A. David, Blood, Cells, Molecules and Diseases 70, 2017). DOI: 10.1016/j.bcmd.2017.10.006
- 12. B. K. Ross, M. P. Hlastala, and R. Frank, Arch. Environ. Health **34** (3), 161 (1979).
- R. Giunta, A. Coppola, C. Luongo, et al., Ann. Hematol. 80 (12), 745 (2001).
- 14. L. Coppola, R. Giunta, G. Verrazzo, et al., Diabete Metab. **21** (4), 252 (1995).
- 15. А. В. Дерюгина, Я. В. Галкина и А. А. Мартусевич, Биорадикалы и антиоксиданты **3** (3), 33 (2016).
- Л. С. Ковальчук, Проблемы здоровья и экологии 2 (12), 93 (2007).
- И. С. Чекман, А. О. Сыровая, В. А. Макаров и др., Озон и озонотерания (Цифрова друкарня № 1, Харьков, 2013).
- V. V. Zinchuk and L. V. Dorokhina, Nitric Oxide 6 (1), 29 (2002).
- 19. В. В. Зинчук и Т. Л. Степуро, Биофизика **131** (1), 32 (2006).
- О. И. Сукманский и В. П. Реутов, Успехи физиол. наук 3, 30 (2016).
- В. В. Зинчук, М. Э. Фираго и И. Э. Гуляй, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **99** (8), 890 (2017).

### Different Ozone Dosage Effects on Oxygen Transport in Blood, in vitro Experiments

### V.V. Zinchuk and E.S. Biletskaya

Grodno State Medical University, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230009 Belarus

The effects of ozone on oxygen transport in blood from the experimental animals were studied in vitro. Incubation of blood with ozonated water ( $O_3$  concentration of 2, 6, 10 mg/L) for 30 and 60 minutes caused a change in oxygen transport by blood, resulting in raised oxygen tension, increased oxygenation and a reduced affinity of hemoglobin for oxygen. As a result, the amounts of the gaseous transmitters such as nitric oxide and hydrogen sulfide, increase significantly contributing to modification of the blood oxygen binding properties.

*Keywords: ozone, blood, oxygen, gaseous transmitters* 

——— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ =

УДК 576.32/.36

# ЛИГАНДЫ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 – ХЛОРПРОМАЗИН И ТРИФЛУОПЕРАЗИН – ИНГИБИРУЮТ ТРАНСПОРТ Na<sup>+</sup> В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

© 2020 г. А.В. Мельницкая\*, З.И. Крутецкая\*, В.Г. Антонов\*\*, Н.И. Крутецкая\*

\*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9 \*\*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6 E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru, avmelnitskaya@vandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г. После доработки 30.11.2019 г. Принята к публикации 04.06.2020 г.

С использованием метода фиксации потенциала впервые показано, что антагонисты рецепторов сигма-1 – нейролептики хлорпромазин и трифлуоперазин – подавляют транспорт Na<sup>+</sup> в эпителии кожи лягушки. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции трансэпителиального транспорта Na<sup>+</sup> в коже лягушки.

Ключевые слова: рецепторы сигма-1, транспорт Na<sup>+</sup>, хлорпромазин, трифлуоперазин. **DOI:** 10.31857/S0006302920050105

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки [1]. Транспорт Na<sup>+</sup> в эпителиальных тканях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na<sup>+</sup>-транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы являются мишенью для действия широкого спектра гормонов и фармакологических агентов.

Ключевую роль в транспорте Na<sup>+</sup> в реабсорбирующих эпителиях играют амилорид-чувствительные эпителиальные Na<sup>+</sup>-каналы (ENaC). ENaC являются представителями обширного суперсемейства дегенерин/эпителиальные Na<sup>+</sup>-каналы (Deg/ENaC), объединяющего лигандуправляемые Na<sup>+</sup>-проводящие каналы, блокируемые диуретиком амилоридом. Deg/ENaC универсальны для всех многоклеточных организмов; экспрессируются в различных возбудимых и невозбудимых тканях; участвуют в процессах болевой чувствительности, механочувствительности и направленного переноса Na<sup>+</sup> [2]. Несмотря на то что представители суперсемейства Deg/ENaC функционально гетерогенны, они обладают сходными биофизическими свойствами и структурной организацией.

Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [3, 4]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [5, 6]. Рецепторы сигма-1 взаимодействуют с многочислен-ными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [7]. Обнаружено, что в нейронах рецепторы сигма-1 модулируют активность потенциалзависимых ионных каналов различных типов [8]. В последнее время появляются данные о том, что рецепторы данного типа участвуют в модуляции активности протон-активируемых ион-

Сокращения: ENaC – амилорид-чувствительные эпителиальные Na<sup>+</sup>-каналы, Deg/ENaC – суперсемейство дегенерин/эпителиальные Na+-каналы, ASICs – протон-активируемые ионные каналы, XП – хлорпромазин, ТФП – трифлуоперазин.



Кинетика изменения тока короткого замыкания ISC через кожу лягушки в ответ на приложение антагонистов рецепторов сигма-1 – 50 мкг/мл хлорпромазина (1) и 20 мкг/мл трифлуоперазина (2), добавленных со стороны апикальной (а) и базолатеральной (б) поверхности кожи лягушки. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилоридчувствительных эпителиальных Na<sup>+</sup>-ка-налов – амилорид (20 мкМ).

ных каналов (ASICs) — одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC [9]. В то же время роль рецепторов сигма-1 в процессах трансэпителиального транспорта Na<sup>+</sup> практически не изучена. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать участие рецепторов сигма-1 в регуляции транспорта Na<sup>+</sup> в эпителии кожи лягушки. В экспериментах были использованы антагонисты рецепторов сигма-1 — типичные антипсихотические средства — нейролептики фенотиазинового ряда хлорпромазин (аминазин, XП) и трифлуоперазин (трифтазин, TФП) [5, 6].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга (World Precision Instruments Inc., Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): NaCl – 110, KCl – 2.5, CaCl<sub>2</sub> – 3, Tris-HCl –5, pH 7.4. Опыты проводили при комнатной температуре (22– 23°C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик [10]. Для измерения вольт-амперных характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение со скоростью изменения 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал (V<sub>T</sub>) кожи под-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

держивали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи  $V_{\rm OC}$  ( $V_{\rm OC} = V_{\rm T}$  при трансэпителиальном токе  $I_{\rm T} = 0$ ). Из вольт-амперных характеристик определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания  $I_{\rm SC}$  ( $I_{\rm SC} = I_{\rm T}$  при  $V_{\rm T} = 0$ ),  $V_{\rm OC}$  и трансэпителиальную проводимость  $g_{\rm T}$ .

Транспорт Na<sup>+</sup> оценивали как амилоридчувствительный ток  $I_{SC}$ . В связи с этим в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ).

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы ХП (25 мг/мл), ТФП (5 мг/мл) и амилорида (10 мМ) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде  $x \pm s_x$ . На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным десяти экспериментов) составили:  $I_{\rm SC} = 9.5 \pm 2.34$  мкA,  $V_{\rm OC} = -11.71 \pm 3.85$  мB,  $g_{\rm T} = 0.79 \pm 0.27$  мCм.

Мы обнаружили, что обработка кожи лягушки ТФП или ХП снижает в ней транспорт Na<sup>+</sup>. В среднем, изменение электрических характеристик кожи лягушки (здесь и далее по тексту  $x \pm s_x$ , *п* (число опытов) = 10) после добавления 20 мкг/мл ТФП было следующим: I<sub>SC</sub> уменьшился на 10.34  $\pm$  3.82 или 31.24  $\pm$  13.11%,  $V_{\rm OC}$  уменьшился на 26.35  $\pm$  12.24 или 34.18  $\pm$  16.22%, а  $g_{T}$ уменьшилась на  $21.12 \pm 8.74$  или увеличилась на  $5.21 \pm 1.14\%$  при приложении ТФП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи соответственно. В случае обработки кожи лягушки 50 мкг/мл ХП изменение электрических характеристик в среднем было следующим:  $I_{\rm SC}$  уменьшился на 18.34 ± 6.19 или 39.25 ± 7.18%,  $V_{\rm OC}$  уменьшился на 20.02  $\pm$  7.35 или 40.18  $\pm$ ± 12.34%, а g<sub>T</sub> не изменялась или уменьшилась на  $10.34 \pm 3.85 \%$  при приложении XП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что степень и кинетика ингибирующего действия нейролептиков фенотиазинового ряда на транспорт Na<sup>+</sup> различаются в зависимости от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (см. рисунок). Так, приложение ХП или ТФП к апикальной поверхности кожи вызывает двухфазное изменение  $I_{SC}$ : подавление I<sub>SC</sub>, наблюдаемое в течение 30-40 мин после приложения агентов, сменяющееся некоторым увеличением I<sub>SC</sub>, наблюдаемым в течение второго часа после приложения ТФП или ХП. В случае добавления ТФП или ХП со стороны базолатеральной поверхности кожи наблюдается постепенное снижение  $I_{\rm SC}$  в течение первого часа после приложения агентов. Фаза увеличения I<sub>SC</sub> в этом случае не наблюдалась. Можно предположить, что влияние антагонистов рецепторов сигма-1 на транспорт Na<sup>+</sup> в коже лягушки осушествляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Так, способность ХП ингибировать активность Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазы [11] и снижать внутриклеточную концентрацию Na<sup>+</sup> обнаружена в клетках печени крысы (Rattus norwegicus) и жабы (Bufo marinus) [12]. Было показано, что XП ингибирует активность ENaC, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus* [13]. Обнаружено также, что приложение 100 мкМ ТФП со стороны базолатеральной мембраны, вызывает снижение *I*<sub>SC</sub> и *V*<sub>OC</sub> в мочевом пузыре жабы [14]. Двухфазное дозозависимое изменение ISC при воздействии ТФП показано для изолированной кожи лягушки Rana esculenta [15, 16]. Однако в этом случае добавление ТФП вызывало стимуляцию транспорта Na<sup>+</sup> через кожу лягушки.

В цитируемых работах также высказывалось предположение о том, что молекулярные механизмы, вовлеченные в регуляцию ТФП транспорта Na<sup>+</sup> в коже лягушки, различаются в зависимости от приложения агента к апикальному или базолатеральному домену полярных клеток эпителия. Так, наиболее вероятно, что влияние ТФП на I<sub>SC</sub> в случае приложения агента к апикальной поверхности кожи связано с модуляцией активности ENaC [16] или с изменением внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  [15], тогда как влияние ТФП на  $I_{SC}$  при приложении агента к базолатеральной поверхности кожи опосредуется Ca<sup>2+</sup>-зависимым синтезом и последующим выделением из базолатеральной мембраны простагландина Е2, что в свою очередь приводит к стимуляции транспорта Na<sup>+</sup> через кожу лягушки [15, 16]. Известно, что ТФП является антагонистом Ca<sup>2+</sup>-связывающего белка кальмодулина, играющего ключевую роль в регуляции процессов Ca<sup>2+</sup>-сигнализации [17]. Однако имеются данные о сходном влиянии на I<sub>SC</sub> различных производных фенотиазина (ХП и ТФП), что свидетельствует о том, что влияние Т $\Phi\Pi$  на транспорт Na<sup>+</sup> в коже лягушки осуществляется, по-видимому, без участия комплекса «Са<sup>2+</sup>-кальмодулин» [16].

Известно, что транспорт Na<sup>+</sup> в эпителиях представляет собой сложную многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na<sup>+</sup>-транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах клетки. Введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление I<sub>SC</sub> (см. рисунок), что свидетельствует о том, что влияние антагонистов рецепторов сигма-1 ХП или ТФП на транспорт Na<sup>+</sup> связано преимущественно с модуляцией активности ENaC. Полученные результаты могут представлять интерес в связи с литературными данными о способности рецепторов сигма-1 модулировать активность ионных каналов ASICs – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC, играющие кючевую роль в транспорте Na<sup>+</sup> в реабсорбирующих эпителиях. Так, на клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК-293) обнаружено, что возможно как прямое взаимодействие между рецепторами сигма-1 и ASICs, с образованием комплекса со стехиометрией 1 рецептор сигма-1:1 субъединица ASIC [9], так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов рецепторов сигма-1 на ASICs при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как

гетеротримерные G-белки и комплекс кальцинейрина с адаптерным белком AKAP150 [18].

Таким образом, как ранее [19], так и в настоящей работе нами показано, что различные антагонисты рецепторов сигма-1, в том числе нейролептики фенотиазинового ряда ХП и ТФП, модулируют транспорт Na<sup>+</sup> в коже лягушки, что свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в регуляции транспорта Na<sup>+</sup> в эпителии кожи лягушки. Полученные нами данные о влиянии антагонистов рецепторов сигма-1 на трансэпителиальный транспорт Na<sup>+</sup> способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенотиазина, широко применяемых в клинической практике в качестве антипсихотических, миорелаксирующих и седативных средств, а также для лечения шизофрении и других психических заболеваний.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановых тем кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военномедицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург), а также Договора на выполнение научно-исследовательских работ № 28-12-38.

#### 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. Ю. В. Наточин, Основы физиологии почки (Наука, Л., 1982).
- 2. S. Kellenberger and L. Schild, Physiol. Rev. 82, 735 (2002).
- C. G. Rousseaux and S. F. Greene, J. Recept. Signal. Trans. 36, 327 (2016).
- 4. S. B. Hellewell, A. Bruce, G. Feinstein, et al., Eur. J. Pharmacol. **268**, 9 (1994).
- 5. E. J. Cobos, J. M. Entrena, F. R. Nieto, et al., Curr. Neuropharmacol. 6, 344 (2008).
- 6. Y. Itzhak, M. Ruhland, and H. Krahling, Neuropharmacol. 29, 181 (1990).
- B. Penke, L. Fulop, M. Szucs, et al., Curr. Neuropharmacol. 16, 97 (2018).
- T.-P. Su, T. Hayashi, T. Maurice, et al., Trends Pharmacol. Sci. 31, 557 (2010).
- 9. S. M. Carnally, M. Johannessen, R. M. Henderson, et al., Biophys. J. **98**, 1182 (2010).
- Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev, A. V. Melnitskaya, et al., Dokl. Akad. Nauk **421** (5), 709 (2008).
- 11. R. W. Van Dyke and B. F. Scharschmidt, Am. J. Physiol. 253, 613 (1987).
- 12. P. Else and K. Mansfield, Biochem. Pharmacol. 54, 275 (1997).
- M. S. Awayda, W. Shao, F. Guo, et al., J. Gen. Physiol. 123, 709 (2004).
- S. D. Levine, W. A. Kachadorian, D. N. Levin, et al., J. Clin. Invest. 67 (3), 662 (1981).
- H. F. Bjerregaard and R. Nielsen, Acta Physiol. Scand. 127 (1), 75 (1986).
- H. F. Bjerregaard and R. Nielsen, Acta Physiol. Scand. 134 (1), 43 (1988).
- M. D. Feldkamp, S. E. O'Donnell, L. Yu, et al., Proteins 78 (10), 2265 (2010).
- Y. Herrera, C. Katnik, J. D. Rodriguez, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 327, 491 (2008).
- А. В. Мельницкая, З. И. Крутецкая, С. Н. Бутов и др., в кн. *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*, под ред. В. П. Зинченко и А. В. Бережнова (Fix-Print, Пущино, 2017), т. 1, сс. 55–58.

# Sigma-1 Receptor Ligands Chlorpromazine and Trifluoperazine Inhibit Na<sup>+</sup> Transport in Frog Skin Epithelium

### A.V. Melnitskaya\*, Z.I. Krutetskaya\*, V.G. Antonov\*\*, and N.I. Krutetskaya\*

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

\*\*Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

Using voltage-clamp technique, we have shown for the first time that sigma-1 receptor antagonists – neuroleptics chlorpromazine and trifluoperazine – attenuate  $Na^+$  transport in the frog skin epithelium. The results suggest the possible involvement of sigma-1 receptors in the regulation of transepithelial  $Na^+$  transport in frog skin.

Keywords: sigma-1 receptors, Na<sup>+</sup> transport, chlorpromazine, trifluoperazine

———— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ —

УДК 557.18.04:34.17.23

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНСЕРВАЦИИ В ЖИДКОМ АЗОТЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА КРИОЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ

© 2020 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, ул. Погодинская, 10/1 E-mail: zalomova.91@mail.ru Поступила в редакцию 30.06.2020 г. После доработки 23.07.2020 г. Принята к публикации 24.07.2020 г.

Проведен сравнительный анализ выживаемости микробиоты кишечника человека после низкотемпературной консервации под защитой проникающих (диметилсульфоксида и глицерина), непроникающих (желатин) и газовых (гелий) протекторов. Выявлена повышенная устойчивость кишечных бактерий к действию низких температур. Значительная часть бактерий ( $50.0 \pm 3.0\%$ ) сохраняет жизнеспособность после замораживания в жидком азоте без криопротектора(ов). Наибольшая сохранность достигается под защитой 5% диметилсульфоксида ( $86.0 \pm 4.0\%$ ), 5% глицерина ( $82.0 \pm 5.2\%$ ) или 10% желатина ( $75.0 \pm 5.0\%$ ). Сочетание проникающих в клетку (диметилсульфоксид, глицерин) и непроникающего (желатин) протекторов не приводит к синергическому эффекту. Применение атмосферного гелия для криозащиты гетерогенной микробиоты кишечника человека не повышает ее сохранность даже в сочетании с такими мощными протекторами, как диметилсульфоксид и глицерин, что указывает на необходимость оптимизации криозащитных сред, в частности, для строгих анаэробов.

Ключевые слова: микробиота кишечника, криоконсервация, криопротекторы, жизнеспособность микробных клеток, флуоресцентный анализ.

DOI: 10.31857/S0006302920050117

Кишечная микробиота как сложное симбиотическое сообщество имеет важное значение для здоровья, продолжительности и качества жизни человека. Многие болезни тесно связаны с изменением баланса микробиоты кишечника [1, 2]. Современный образ жизни включает развитие урбанизации, стрессы, изменение качества продуктов питания, прием антибиотиков и многое другое, что оказывает негативное влияние на бактериальные сообщества, заставляя их изменять свою численность, состав, биохимические свойства в организме человека [3, 4]. В настоящее время встает вопрос о необходимости сохранения эволюционно сложившихся представителей кишечной микрофлоры для восстановления состава и функций микробиоты путем ауто-либо аллопересадок [5, 6].

В этой связи особую актуальность приобретает возможность сохранения микробиоты кишечника человека на длительное время (годы, десятилетия), что достижимо только при температуре жидкого азота (–196°С). Подробные сведения о потенциальном применении микробиоты кишечника в медицине и биотехнологии, а также анализ используемых методов консервации микробиоты были представлены в нашей обзорной работе [7]. На сегодняшний день проблема долговременного хранения сложных микробных сообществ, населяющих желудочно-кишечный тракт человека, еще не решена.

Исследования проводятся в основном на микробиоте кишечника человека, замороженной до температуры –20°С и/или –80°С [8–13]. Срок хранения биоматериала при таких температурах ограничен несколькими месяцами, в течение которых осуществляется мониторинг генотипической и фенотипической изменчивости микроор-

Сокращение: ДМСО – диметилсульфоксид.

ганизмов. Очевидно, что для более пролонгированного хранения кишечной микрофлоры требуется температура жидкого азота [5, 13, 14]. Исследований по низкотемпературной консервации сложных бактериальных сообществ не так много. Тем не менее есть сообщение о сохранности анаэробных и аэробных представителей микрофлоры кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте [15]. Для защиты микробных клеток были использованы такие природные вещества, как желатин, муцин, леван или агароза. Для индивидуальных штаммов бактерий применяют в основном проникающие (диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, этиленгликоль и др.) и/или не проникающие (сахароза, желатин, трегалоза, инулин, полиэтиленгликоль и др.) протекторы [12, 13, 16, 17].

Наибольшее распространение получили протоколы консервации для большинства бактерий с использованием 10-15% ДМСО или глицерина [18, 19]. Непроникающие высокомолекулярные полимеры природного и синтетического происхождения (сахара, полиэлектролиты, мукополисахариды) считаются менее эффективными и реже используются для криозащиты микроорганизмов. Однако недавно в исследовании, проведенном с целью разработки метода сохранения кишечной микробиоты, было установлено, что наибольшая выживаемость бактериальных клеток достигается при совместном использовании полиэтиленгликоля и поливинилового спирта [20]. Важными факторами помимо подбора криопротекторов, которые необходимо учитывать при разработке протоколов криоконсервации, являются скорости замораживания и оттаивания, состав базовых растворов, используемых в криозащитных средах, индивидуальные морфологические и физиологические свойства самих клеток [17, 21, 22].

Целью данного исследования была оценка эффективности криоконсервации микробиоты кишечника человека в жидком азоте под защитой универсальных проникающих протекторов ДМСО и глицерина, непроникающего протектора желатина, а также газовой атмосферы гелия. Исследуемые протекторы использовали в разных концентрациях и сочетаниях, полагая, что симбиотические бактерии желудочно-кишечного тракта могут существенно различаться по чувствительности/устойчивости к действию низких температур и молекулярным механизмам криопротекции. Выбор гелия в качестве защитного агента для микробиоты человека был обусловлен тем, что этот газ, во-первых, не оказывает цитотоксических эффектов [23], что актуально для любого биоматериала медицинского назначения. Во-вторых, потенциальное преимущество применения гелия заключается в снижении концентрации (и, следовательно, токсичности) классических протекторов в составе криозащитной среды [23].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — микробиота кишечника человека в виде бактериальной суспензии. В экспериментах использованы образцы микробиоты (просветная микробиота) от взрослых доноров.

Выделение бактериальных клеток. Клеточную суспензию готовили из расчета 0.1 г фекальной массы в 0.9 мл стерильного солевого изотонического раствора 0.9% NaCl (1 мл), тщательно перемешивали до гомогенной консистенции. Для отделения бактерий от посторонних примесей использовали двукратное центрифугирование: сначала в 0.9% NaCl при 1200 об/мин в течение 5 мин, затем в 0.9% NaCl при 10000 об/мин в течение 10 мин; далее подсчитывали общее количество клеток в суспензии для каждого образца микробиоты.

Определение количества бактериальных клеток в суспензии. Подсчет клеток проводили по методу Виноградского—Брида для определения численности микроорганизмов в естественных микробиоценозах [24]. Общее количество клеток подсчитывали в 1 мл бактериальной суспензии под микроскопом с иммерсионным объективом (Axioscop 40, Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 40×.

В экспериментах использовали клеточные суспензии в концентрации  $(2.0-2.5) \cdot 10^8$  клеток в 1 мл среды. Образцы индивидуальной микробиоты человека различались между собой по общему содержанию клеток в пределах от 0 до  $2 \cdot 10^8$  клеток в 1 мл.

Криоконсервация микробиоты в жидком азоте. Бактериальные суспензии переносили в криопробирки в объеме 1 мл среды с добавлением криопротектора(ов), после чего образцы замораживали путем прямого погружения криопробирок в жидкий азот. Охлаждение суспензии в таких условиях происходит со средней скоростью  $88 \pm 1.5^{\circ}$ С/мин. Время между добавлением криопротекторов в пробирки и их погружением в жидкий азот составляло примерно 5-10 мин. Длительность хранения образцов в жидком азоте продолжалась от двух до семи суток. По истечении этого времени образцы размораживали на водяной бане 37°С. После размораживания клетки бактерий осаждали путем центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин, затем ресуспендировали в 0.9% NaCl для определения их жизнеспособности.

Криопротекторы. Для криопротекции использовали 5% и 10% растворы ДМСО, глицерина (Sigma, США) и желатина (PanReac AppliChem,

Китай), как по отдельности, так и в различных сочетаниях. Криозащитные среды готовили на 0.9% NaCl. Этот же раствор применяли для приготовления бактериальных суспензий и для их замораживания (отрицательный контроль без использования криопротекторов). Для изучения влияния газовой атмосферы на выживаемость микробиоты кишечника в процессе замораживания-оттаивания использовали гелий. Бактериальные суспензии, содержащие классические протекторы, а также контрольные образцы выдерживали в атмосфере гелия в специальных пластиковых шприцах на шейкере при температуре 20°С, как это описано в нашей работе [23]. В первой серии экспериментов образцы микробиоты насыщали в атмосфере воздуха и гелия в течение 1 ч. Во второй серии экспериментов продолжительность насыщения в газах при постоянном покачивании составила 3 ч.

Исследование токсических эффектов криопротекторов. Исследование цитотоксичности защитных агентов (ДМСО и глицерин) проводили при помощи эквилибрации бактериальных суспензий с 5% и 10% ДМСО и глицерина без замораживания в жидком азоте. Экспозиция образцов длилась от 30 до 60 мин. После этого определяли количество живых клеток с помощью флуоресцентного теста.

Оценка жизнеспособности микробиоты. Сравнительный анализ жизнеспособности бактерий до и после криоконсервации проводили флуоресцентным методом с использованием LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 7007 (Molecular Probe, США), обеспечивающим высокий уровень корреляции результатов с данными микробиологического культивирования [15, 25, 26]. Оценку проводили по соотношению живых и мертвых клеток по интенсивности флуоресценции красителей SITO9 и пропидиум йодида, дающих зеленый и красный спектры при длине волны 480-500 и 490-635 нм соответственно. Бактериальные суспензии перед анализом центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин для удаления белков и нуклеиновых кислот, которые могут связывать флуоресцентные красители SYTO9 и пропидиум йодид и влиять на результаты тестирования. После центрифугирования супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в 1 мл 0.9% NaCl. Перед тестированием бактериальные клетки инкубировали с флуоресцентными красителями при комнатной температуре 20°С в течение 15 мин, затем анализировали с помощью микропланшетного фотометра FilterMax F5 (Molecular Devices, CIIIA).

Количественное определение живых и мертвых бактерий по интенсивности флуоресценции. 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 и 100:0. Для получения суспензии мертвых клеток использовали 96% этиловый спирт (30–40 мин экспозиции при комнатной температуре). Все варианты разведений раскапывали по 100 мкл на 96-луночный планшет, затем в каждую заполненную лунку добавляли по 100 мкл флуоресцентных красителей LIVE/DEAD BacLight и через 15 мин измеряли интенсивность флуоресценции на фотометре FilterMax F5 для построения калибровочной кривой с целью определения процента живых бактерий по следующей формуле:

$$Ratio_{G/R} = \frac{Fcell, em_1}{Fcell, em_2}.$$
 (1)

Это соотношение отражает зависимость интенсивности флуоресцентного излучения от содержания активного флуоресцентного красителя в бактериальных клетках и позволяет определить процент жизнеспособных бактерий до и после криоконсервации.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли при помощи программы SigmaPlot 14.0, вычисляя общее значение флуоресценции клеток, среднее значение и стандартную ошибку. Достоверность различий между разными группами сравнения проводили с применением непараметрического критерия Манна– Уитни.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сохранность микробных сообществ при низкотемпературной консервации под защитой классических криопротекторов. Исследование цитотоксических эффектов диметилсульфоксида и глицерина на бактериальные клетки. В ходе проведения экспериментов было показано (рис. 1), что  $50.0 \pm 3.0\%$ бактерий, составляющих микробиоту кишечника человека, сохраняют жизнеспособность при быстром замораживании в растворе 0.9% NaCl без добавления каких-либо криопротекторов при сроках хранения образцов до семи суток.

Сравнительный анализ результатов флуоресцентного тестирования на жизнеспособность образцов микробиоты, замороженных в растворах проникающих (ДМСО и глицерин) и непроникающих (желатин) криопротекторов показал, что максимальный процент жизнеспособных клеток кишечной микрофлоры достигается в случае использования 5% и 10% растворов ДМСО, 5% раствора глицерина или 10% раствора желатина (рис. 1). Данные протекторы обеспечивали сохранность бактериальных клеток после замораживания и трехсуточного хранения в жидком азоте на уровне  $86.0 \pm 4.0$ ,  $76.0 \pm 4.0\%$ ,  $82.0 \pm 5.2$  и



Рис. 1. Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте (температура –196°С, срок хранения 72 ч) в 0.9% NaCl (отрицательный контроль), 5% и 10% криозащитных растворах ДМСО, глицерина и желатина (n = 25). \* – Достоверность различий жизнеспособности (P < 0.05) микробиоты кишечника при использовании криозащитных растворов в различных концентрациях согласно непараметрическому критерию оценки достоверности результатов Манна– Уитни.

 $75.0 \pm 5.0\%$  соответственно. При этом исходный уровень сохранности бактериальных клеток в образцах кишечной микробиоты до криоконсервации составлял 82-90% жизнеспособных бактерий.

Исследование уровня выживаемости клеток в зависимости от использования 5%-х или 10%-х растворов проникающих и непроникающих криопротекторов показал различную картину. Так, увеличение концентрации желатина с 5 до 10% повышало процент жизнеспособных клеток с 60.0  $\pm$  0.8 до 75.0  $\pm$  5.0%. В отличие от желатина, ДМСО и глицерин в более низкой концентрации, напротив, оказывали более выраженный криозащитный эффект (рис. 1). Повышение концентрации этих криопротекторов с 5% до 10% достоверно снижало процент жизнеспособных клеток после размораживания с 86.0  $\pm$  4.0 до 76.0  $\pm$  4.0% и с 82.0  $\pm$  5.0 до 64.0  $\pm$  4.0% для ДМСО и глицерина соответственно.

Данные различия можно объяснить разным механизмом действия рассматриваемых криозащитных агентов. Желатин относится к числу слабых по своим свойствам непроникаюших криопротекторов [11]. Повышение его концентрации в среде замораживания до 10% положительно влияет на общую сохранность микробных клеток. Более низкие показатели жизнеспособности микробиоты в 10%-х растворах ДМСО и глицерина по сравнению с 5%-ми растворами, как мы полагаем, связаны с токсичностью этих проникаю-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



**Рис. 2.** Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после эквилибрации в 5% и 10% растворах ДМСО, глицерина в течение 30 и 60 мин (n = 20). \* – Достоверность различий жизнеспособности кишечных бактерий ( $P \le 0.05$ ) по времени экспозиции в ДМСО согласно критерию Манна–Уитни; \*\* – достоверность различий жизнеспособности кишечных бактерий ( $P \le 0.05$ ) после эквилибрации при сравнении разных концентраций растворов ДМСО и глицерина согласно критерию Манна–Уитни.

щих протекторов для некоторых кишечных микроорганизмов.

Исследование зависимости цитотоксического эффекта от концентрации криопротекторов и времени эквилибрации приведены на рис. 2. Повышение концентрации криопротекторов с 5% до 10% в условиях эквилибрации с бактериями при температуре 20°С достоверно снижало процент жизнеспособных бактериальных клеток С  $88.0 \pm 1.0\%$  и  $84.0 \pm 1.0\%$  до  $79.0 \pm 2.0\%$  и 64.0 ± 2.0% для ДМСО и глицерина соответственно. Кроме того, увеличение времени экспозиции с 30 до 60 мин также снижало выживаемость бактериальных клеток как для 5%-го, так и для 10%-го ДМСО. Однако при использовании глицерина увеличение времени экспозиции при комнатной температуре не приводило к снижению процента живых клеток: 84.0 ± 1.0% и  $85.0 \pm 2.0\%$ для 5%-го глицерина и 64.0 ± 2.0 и  $67.0 \pm 1.0\%$  для 10%-го глицерина. Как 30-, так и 60-минутная экспозиция в 10%-м растворе глицерина при комнатной температуре снижали долю живых микробных клеток до 60%. Сравнение ДМСО и глицерина продемонстрировало большую токсичность последнего при увеличении концентрации до 10%.



**Рис. 3.** Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте (температура – 196°С, срок хранения 72 ч) в 0.9% NaCl (отрицательный контроль), 5% и 10% растворах ДМСО, глицерина в комбинации с 10%-м желатином (n = 15). \* – Достоверное повышение жизнеспособности микробных сообществ ( $P \le 0.05$ ) после криоконсервации с 5% ДМСО и 10% желатина, а также с 5% глицерина и 10% делатина по сравнению с замораживанием в 10% ДМСО и 10% желатина, а также в 10%-м глицерине и 10%-м желатине.

Сохранность микробных сообществ при низкотемпературной консервации под защитой комбинации проникающих и непроникающих криопротекторов. Для надежного сохранения микробного сообщества кишечника человека, характеризующегося широким спектром разных типов бактерий в своем составе, перспективным представляется использование криозащитных смесей, состоящих из нескольких защитных агентов разного механизма действия. В поисках синергического эффекта мы оценили эффективность криоконсервации микробиоты кишечника человека при совместном использовании ДМСО с желатином и глицерина с желатином, рассчитывая достигнуть значимого подавления как внеклеточной, так и внутриклеточной кристаллизации. Результаты этих исследований представлены на рис. 3.

Как следует из рис. 3, показатели сохранности бактериальных клеток при использовании комбинации 5% ДМСО с 10%-м желатином, а также 5% глицерина с 10%-м желатином составили 74.0  $\pm$  4.0 и 72.0  $\pm$  3.0% соответственно и тем самым не превысили уровень жизнеспособных клеток, достигнутый при использовании этих же криопротекторов в монорежиме: 86.0  $\pm$  4.0% в 5% ДМСО, 82.0  $\pm$  5.2% в 5% глицерине, 75.0  $\pm$  5.0 – в 10% желатине. При этом 10% ДМСО и 10% глицерин в сочетании с 10% желатином продемонстри-



**Рис. 4.** Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте (температура – 196° С, срок хранения 72 ч) в 0.9% Na-Cl (отрицательный контроль), 5% растворах ДМСО и глицерина и 10% растворе желатина, насыщенной в атмосфере воздуха и гелия (n = 13).

ровали более слабые криозащитные эффекты —  $58.0 \pm 3.0\%$  и  $59.0 \pm 4.0\%$  живых клеток соответственно, соизмеримые с показателями жизнеспособности бактерий после криоконсервации в 0.9% растворе NaCl без протекторов. Таким образом, ожидаемый синергический эффект не наблюдался.

Сохранность микробных сообществ при низкотемпературной консервации под защитой гелия. Проведенные эксперименты по исследованию влияния газовой атмосферы гелия на сохранность бактериальных клеток микробиоты кишечника человека в процессе криоконсервации выявили отсутствие положительного криозащитного эффекта инертного газа. Процесс криоконсервации в данных экспериментах предусматривал эквилибрацию в атмосфере гелия или воздуха в течение 1 ч перед погружением в жидкий азот. Ввиду того, что половина бактерий микрофлоры кишечника остается жизнеспособной после криоконсервации в 0.9% NaCl, контролем в данном эксперименте была атмосфера воздуха, несмотря на преобладание анаэробных представителей в кишечнике человека. На рис. 4 приведены усредненные данные количества живых клеток после размораживания:  $54.0 \pm 3.0\%$  и  $52.0 \pm 4.0\%$ для отрицательного контроля, 83.0 ± 2.0 и  $80.0 \pm 3\%$  – для ДМСО, 76.0  $\pm 3.0\%$  и 79.0  $\pm 2\%$  – для глицерина, 77.0 ± 1.0% и 75.0 ± 3.0% – для желатина в среде воздуха и гелия соответственно. Увеличение времени эквилибрации в газовой среде с 1 до 3 ч также не выявило криозащитного эффекта гелия (данные не приведены).

В процессе работы основной целью ставился поиск криозащитных составов, обеспечивающих оптимальные условия для замораживания, подходящие для большинства представителей микрофлоры кишечника человека.

Весьма интересные результаты были получены при исследовании выживаемости клеток с помощью флуоресцентного анализа LIVE/DEAD BacLight. Они показывают, что в процессе криоконсервации микробиоты человека половина общего числа симбиотических микроорганизмов выживает без использования криопротекторов (рис. 1). Скорее всего, такая криоустойчивость бактерий связана с различиями в строении клеток по сравнению с эукариотами, а именно наличием особой клеточной стенки у бактерий. Известно, что в состав микробиоты кишечника входят как грамположительные, так и грамотрицательные виды микрорганизмов. Грамотрицательные бактерии с непроницаемой клеточной стенкой имеют меньшую устойчивость к низкотемпературной криоконсервации и лиофилизации, чем грамположительные микроорганизмы [27]. В результате этого они погибают из-за повреждения плазматических мембран. По отношению к кислороду примерно 95% приходится на анаэробную составляющую микрофлоры кишечника человека. Следовательно, эта группа бактерий является особо уязвимой при криоконсервации микробиоты. Это служит важным доводом для обязательного использования в низкотемпературном замораживании микробиоты криопротекторов с целью сохранения количественного и видового разнообразия кишечной микрофлоры при температуре жидкого азота в течение длительного периода времени.

К настоящему времени известно, что проникающие протекторы действуют на клеточные мембраны бактерий. Они способны связывать внутриклеточную воду, защищая клетки от образующихся во время криоконсервации кристаллов льда [28, 29]. Анализ многих публикаций, касающихся криоконсервации микроорганизмов, показывает, что наиболее эффективными для криозащиты бактериальных клеток являются растворы ДМСО и глицерина [23, 28]. В основном их используют в высоких концентрациях – 10–15%. Однако главным недостатком этих криопротекторов при таких концентрациях является их токсичность по отношению к клеткам. Это подтверждают наши экспериментальные данные флуореспентного тестирования и исследования цитотоксичности, из которых следует, что под защитой 5% ДМСО и глицерина бактериальные клетки сохранялись на уровне интактных образцов. В ряде других исследований также было обнаружено, что после замораживания микробиоты кишечника человека до криогенных температур (-80°С и −196°С) в растворах 10% ДМСО жизнеспособность бактерий распределяется в порядке

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

убывания следующим образом: Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Lactobacillus casei, Klebsiella pneumonie u Salmonella enterica [17]. Данная концентрация раствора ДМСО может снижать пролиферативную активность некоторых видов аэробных бактерий [18, 22]. В случае с глицерином наиболее чувствительными к его 10%-й концентрации являются Chlamydia spp. [30], Staphylococcus, Micrococcus, Lactococcus, Streptococcus, Pseudomonas u E. coli [31]. К тому же показано, что глицерин в концентрации 10-25% токсичен для грамотрицательных (Escherichia coli) и грамположительных (Bacillus subtilis) бактерий и микобактерий (Mycobacterium smegmatis), входящих в состав микробиоты кишечника человека [15]. В отличие от ДМСО, глицерин медленно проникает через клеточные стенки и плазматические мембраны бактерий при низких значениях температур, и это также может влиять на результаты более слабого криозащитного действия глицерина по сравнению с ДМСО для некоторых видов микроорганизмов [14].

Желатин как непроникающий протектор имеет другой механизм криозащитного действия, направленный на стабилизацию клеточных мембран и предотвращение образования внеклеточного льда [32, 33]. Он совершенно нетоксичен для бактериальных клеток, что позволяет использовать его в концентрации 10%. Однако сочетание 5%-го и 10%-го ДМСО или глицерина с 10% желатина не дает заметного преимущества в сохранности бактериальных сообществ после криоконсервации. Комбинация 10% желатина с 10% ДМСО или глицерина приводит к нивелированию криозащитных свойств проникающих протекторов, хотя каждый из этих по отдельности обеспечивает хорошую и надежную криозащиту как симбиотических микробных сообществ кишечника (рис. 1), так и коллекций микробиологических культур [14, 22]. По-видимому, это связано с инактивацией белковых молекул желатина в результате взаимодействия с ДМСО и глицерином.

Таким образом, несмотря на различия между ДМСО, глицерином и желатином по механизмам криозащитного действия, при совместном их использовании в концентрациях 5-10% они обеспечивают примерно одинаковый уровень сохранности кишечной микрофлоры после криоконсервации в жидком азоте (60-75%). Использование газовой атмосферы гелия, как показали наши исследования, оказалось не эффективным. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при насыщении бактериальных суспензий гелием в течение 1 ч (рис. 4). Аналогичная картина наблюдалась при обработке клеточных суспензий гелием в течение 3 ч. Вероятно, при криоконсервации бактериальных клеток гелий не оказывает заметного влияния, подобного наблюдаемому при

криоконсервации клеточных культур Hela и L929, в связи с различием в механизме криоповреждений эукариотических и прокариотических клеток. На клеточных культурах теплокровных животных такой прием, наоборот, приводит к улучшению сохранности биоматериала после криоконсервации в жидком азоте [23]. Молекулярные механизмы криозащитного действия газов на сегодняшний день еще малоизучены и требуют дальнейших разработок.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение хотелось еще раз отметить высокие криозащитные свойства 5%-х растворов ДМСО и глицерина, а также 10%-го желатина. Наши исследования оценивали жизнеспособность микробиоты кишечника человека в целом после криоконсервации в жидком азоте наряду со скринингом протекторов. При таком подходе неизбежны преимущественные потери определенных типов бактерий. Поэтому в дальнейших экспериментах планируется провести дополнительные исследования по выживаемости наиболее представительных видов микрофлоры кишечника, в частности строгих анаэробов, с использованием других методов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ 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. S. Possemiers, C. Grootaert, J. Vermeiren, et al., Cur. Pharmaceut. Design **15**, 2051 (2009).
- Y. A. Poluektova, O. S. Lyashenko, O. S. Shifrin, et al., Rus. J. Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology 24, 85 (2014).
- 3. M. J. Blaser and S.Falkow, Nature Rev. Microbiol. 7, 887 (2009).
- A. Barzegari, S. Eslami, Gh. Elham, and O. Yadollah, Front. Microbiol. **31** (5), 393 (2014). DOI: 10.3389/fmicb.2014.00393
- A. Barzegari, N. Saeedi, and A. Saei, Future Microbiol. 9 (5), 639 (2014).

- 6. D. P. Bojanova and S. R. Bardenstein, PLoS Biol. 14, e1002503 (2016).
- D. V. Smirnova, L. V. Zalomova, A. V. Zagainova, et al, Int. J. Med. Microbiol. **309**, 259 (2019).
- C. L. Lauber, N. Zhou, J. I. Gordon, et al., FEMS Microbiol. Lett. **307** (1), 80 (2010).
- 9. M. I. Bahl, A. Bergstrom, and T. R. Licht, FEMS Microbiol. Lett. **329**, 193 (2012).
- I. M. Carroll, T. Ringel-Kulka, J. P. Siddle, et al., PLoS One 7 (10), e46953 (2012).
- F. Fouhy, J. Deane, M. C. Rea., et al., PLoS One 10 (3), e0119355 (2015).
- N. Gaci, P. P. Chaudhary, W. Tottey, et al., Microb. Ecol. Health and Disease 28, 1308070 (2017). DOI: 10.1080/16512235.2017.1308070.
- 13. L. Bircher, C. Schwab, A. Geirnaert, and C. Ch. Lacroix, Microb. Biotechnol. **11** (1), 163 (2018).
- 14. O. Plakash, Y. Nimonkar, and Y. Shouche, FEMS Microbiol. Lett. **339**, 1 (2013).
- 15. Б. А. Шендеров, Э. Н. Гахова, М. А. Манвелова и др., Патент RU 2123044 (1998).
- 16. F.-M. Kerckhof, E. N. P. Courtens, A. A. Geirnaert, et al., PLoS One 9 (6), e99517 (2014).
- 17. A. Criste, M. Giuburuncă, O. Negrea, et al., Animal Sci. Biotechnol. **47** (2), 73 (2014).
- 18. B. J. Fuller, CryoLetters 25, 375 (2004).
- 19. R. C. Chian, in *Fertility Cryopreservation*, Ed. by R.-C. Chian and R. Quinn (Cambridge University Press, Cambridge, 2010), pp. 1–9.
- M. Hasan, A. E. R. Fayter, and M. I. Gibson, Biomacromolecules 19 (8), 3371 (2018). DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00660.
- 21. Z. Hubalek, Cryobiology 46, 205 (2003).
- D. Smith, M. J. Ryan, and E. Stackebrandt, in *Encyclopedia of Life Support Systems. Biotechnology*, Ed. by H. W. Doelle and E. J. DaSilva (EOLSS Publisher, Oxford, UK, 2012).
- С. В. Уграицкая, Н. В. Шишова, Е. Л. Гагаринский и др., Биофизика 63 (3), 510 (2018).
- А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и. др., Практикум по микробиологии (Академия, М., 2005), сс. 103–104.
- D. B. Roszak and R. R. Colwell, Microbiol. Rev. 51 (3), 365 (1987).
- 26. V. A. Gant, G. Warres, I. Philips, and G. F. Savidge, J. Med. Microbiol. **39** (2), 147 (1993).
- 27. T. Chen, A. Fowler, and M. Toner, Cryobiology **40**, 277 (2000).
- 28. F. W. Kleinhans, Cryobiology 37, 271 (1989).
- 29. T. Nei., T. Araki, and T. Matsusaka, in *Freezing and Drying of Microorganisms*, Ed. by T. Nei (Tokyo: University of Tokyo Press, 1969).
- H. T. Meryman, R. J. Williams, and M. S. J. Douglas, Cryobiology 14, 287 (1977).
- P. Mazur, in *Principles of cryobiology in Life in the Fro*zen State, Ed. by B. J. Fuller, N. J. Lane and E. E. Benson (CRC Press, Boca Raton, FL, 2004), pp. 3–65.
- 32. M. J. Prentice and J. Farrant, J. Clin. Microbiol. 6, 4 (1977).
- 33. H. T. Meryman, Annu. Rev. Bioph. Bioeng. 3, 341 (1974).

## Efficiency of Preservation of Human Gut Microbiota in Liquid Nitrogen Depending on the Composition of the Cryoprotective Medium

# 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

This paper presents a comparative analysis of the survival of the human intestinal microbiota after low-temperature conservation under protection of penetrating (dimethyl sulfoxide, glycerol), non-penetrating (gelatin) and gas (helium) cryprotectants. Increased resistance of intestinal bacteria was revealed in response to low temperatures. A considerable part of bacteria ( $50.0 \pm 3.0\%$ ) remain viable after freezing of liquid nitrogen temperature without cryportectant (s). 5% dimethyl sulfoxide ( $86.0 \pm 4.0\%$ ), 5% glycerol ( $82.0 \pm 5.2\%$ ), or 10% gelatin ( $75/0 \pm 5.0\%$ ) showed highest viability of gut microbiota. No synergistic effect was observed in the crypreservation medium combining cell-penetrating (dimethyl sulfoxide, glycerol) and non-penetrating (gelatin) protectants. Use of atmospheric helium even in combination with powerful cryportectants such as dimethyl sulfoxide and glycerol for protecting heterogeneous human gut microbiota did not improve cryopreservation, indicating that there is a need to optimize cryoprotective media, especially, for obligate anaerobes.

Keywords: intestinal microbiota, cryopreservation, cryoprotectants, microbial cell viability, fluorescence analysis

### **—— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —**

УДК 577.3

# МОДЕЛЬ ПРЕДПОСЫЛОК ВИДООБРАЗОВАНИЯ В ПРЕДСТАВЛЕНИЯХ ТЕОРИЙ ПЕРКОЛЯЦИЙ И САМООРГАНИЗОВАННОЙ КРИТИЧНОСТИ

© 2020 г. А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, В.А. Твердислов, Н.Т. Левашова

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

*E-mail: sky314bone@mail.ru* Поступила в редакцию 15.02.2020 г. После доработки 13.05.2020 г. Принята к публикации 20.05.2020 г.

Рассмотрены модели фиксации мутаций в ходе видообразования для бесполого и полового размножения под управлением случайных процессов, а также модель перколяционной решетки отбора мутаций в поколениях и триггерная модель фиксации мутаций в популяционном кластере, основанные на случайных и детерминированных процессах. Показано, что для процесса фиксации мутаций через перколяционную решетку отбора характерно наличие порогов протекания — нижнего (обратимые процессы) и верхнего (необратимые процессы), где верхний порог — это эволюционный шаг видообразования, соответствующий самоорганизованной критичности. В результате кооперативного эффекта взаимодействия особей-мутантов формируется качественно новое устойчивое состояние (в зависимости от знака мутаций): популяция с новыми признаками как шаг видообразования или же вымирание популяции.

Ключевые слова: самоорганизованная критичность, флуктуации, бифуркации, перколяции, запрещающие и разрешающие мутации.

DOI: 10.31857/S0006302920050129

Теория самоорганизованной критичности П. Бака [1, 2], возникшая на основе теории конденсата [3, 4], получила развитие в различных областях науки: сейсмологии ([5] и др.), материаловедении ([6] и др.), астрофизике и физике плазмы ([7–9] и др.), биологической эволюции [10]. Самоорганизованная критичность — это закономерность поведения сложных динамических систем, способных в результате кооперативного поведения неустойчивых элементов системы (взаимодействия) в окрестности точки бифуркации при малых флуктуациях самопроизвольно перейти в критическое состояние, характеризуемое качественно новой структурой, связанной с формированием гигантской флуктуации. В биологической эволюции основным условием формирования «лавин видообразования» [10] является кооперативный эффект взаимодействий между особями в популяции в результате закрепления мутаций. В ходе «лавины видообразования», размер которой определяется количеством успешных эволюционных шагов [10], происходят множественные мутации [11] в сторону более высокой приспособленности. При этом ландшафт «пригодности» [12] определяется генотипом [13] и фенотипом, а также зависит от характеристик других видов в рассматриваемом биоценозе [14, 15]. В результате

кооперативного когерентного взаимодействия носителей мутаций происходит цепная реакция видообразования – флуктуационно-бифуркационная траектория биологической эволюции. Очевидно, что переход системы в критическое состояние определяется случайными и детерминированными процессами. Поэтому в данной работе рассмотрены модели фиксации мутаций в ходе видообразования в режиме случайных процессов для бесполого и полового размножения, а также модель, включающая случайные и детерминированные процессы, где эффект новых мутаций зависит от спектра ранее закрепившихся «разрешающих» и «запрещающих» мутаций [16], а их последовательность определяет «вектор отбора» обратимость или необратимость случайных процессов после прохождения точки бифуркации.

### САМООРГАНИЗОВАННАЯ КРИТИЧНОСТЬ В МОДЕЛЯХ СЛУЧАЙНЫХ ПРОЦЕССОВ ФИКСАЦИИ МУТАЦИЙ

Самоорганизованная критичность как явление с необходимостью сочетает взаимодействие детерминированных и случайных процессов. В целом детерминированные процессы определяют направление эволюции системы, тогда как случайные процессы – фронтальную структуру ее развития. Так, суперпозиция флуктуаций в неравновесной системе может привести к формированию гигантских флуктуаций, связанных с формированием качественно новой структуры. Подобный подход может быть распространен на изучение проблем и механизмов биологической эволюции, в частности, видообразования. В нашем случае это формирование устойчивой популяции, способной перейти к созданию вида, а с точки зрения самоорганизованной критичности мы наблюдаем «лавину видообразования» [1, 2]. Нашей задачей является рассмотрение закономерностей формирования самоорганизованной критичности как результата случайных процессов в ходе фиксации мутаций.

Широко применяемые рандомные модели позволяют рассмотреть характерные закономерности фиксации мутаций на основе случайных процессов. Модель Морана – простой стохастический процесс, широко используемый для описания вероятностной динамики процесса конкуренции двух аллелей (носители способны воспроизводить свои копии) в популяции конечной численности (постоянного размера N) [17]. На каждом временном шаге случайным образом выбираются одна особь для воспроизведения себе подобной и одна особь для элиминации, что гарантирует постоянную численность популяции: если в одном клоне одна особь получает в определенном поколении 100%-е доминирование, то в том же поколении в другом клоне из эксперимента удаляется особь. В случае бесполого размножения «простое рандомизирование» аналогично «подбрасыванию монет» [18].

Рассмотрим процесс фиксации мутаций в соответствии с моделью Морана [17] для популяции постоянной численности (N = 100), размножающейся бесполым способом, где особи представлены клонами двух типов — мутанты и не-мутанты. Рассмотрены следующие варианты соотношения мутантов и не-мутантов в исходном поколении (в долях от общей численности популяции): 10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 90/10. На каждом временном шаге количество мутантов может:

а) остаться неизменным (если для воспроизведения и элиминации будут выбраны особи одинакового типа, в этом случае количество не-мутантов также останется неизменным);

б) уменьшиться на единицу (если для элиминации случайным образом будет выбрана мутантная особь, а для размножения не-мутантная, в этом случае количество не-мутантов увеличится на единицу);

в) увеличиться на единицу (если для размножения будет выбрана мутантная особь, а для элиминации — не-мутантная, в этом случае количество не-мутантов уменьшится на единицу).

Для выявления закономерностей в процессе фиксации мутации в модели Морана было проведено 10000 численных экспериментов. В результате каждого эксперимента мы получаем пару симметричных относительно значения N/2 графиков динамики мутантов и не-мутантов по поколениям в популяции. Каждый эксперимент останавливается, когда популяция полностью состоит из особей одного типа - клона мутантов или не-мутантов. Для иллюстрации случайных процессов в модели Морана на рис. 1 представлены графики динамики численности мутантов и не-мутантов при различных вариантах соотношения мутанты/не-мутанты в исходном поколении по поколениям для десяти экспериментов. Очевидно, что графики динамики численности мутантов и не-мутантов по поколениям (n) для соотношений 10/90 и 90/10, а также 30/70 и 70/30 симметричны относительно N/2. Графики демонстрируют следующие закономерности между поколениями и долей мутантов в исходном поколении: по мере увеличения доли мутантов возрастает количество клонов мутантов и уменьшается минимальное количество поколений, в которых достигается 100%-е доминирование клона.

Аналогично протекают процессы для 10000 экспериментов. Для постоянной численности популяции (N = 100) получены значения поколений (n), в которых мутанты достигают 100%-го доминирования в популяции в зависимости от увеличения доли мутантов в исходном поколении ( $N_{mut0}$ ). Так, если в исходном поколении соотношение «мутанты/не-мутанты» составляет 10/90, доминирование мутантов в популяции достигается к 1719-му поколению  $(n_{\min})$ , а при увеличении доли мутантов/не-мутантов до 90/10 - к 39-му поколению (рис. 2а). Медианное значение поколений (n<sub>median</sub>, половина экспериментов заканчивалась доминированием мутантов до этого значения, половина – после), необходимое для закрепления нового признака, также падает с увеличением N<sub>mut0</sub> (рис. 26). При этом максимальные количества поколений, в которых достигается 100% доминирование (n<sub>max</sub>, максимальное количество поколений, за которое проходило закрепление мутации в экспериментах), сравнимы, что связано с большим количеством экспериментов (рис. 2в). Мы приводим минимальное, медианное и максимальное количество поколений, чтобы показать, что распределение количества поколений, необходимых для закрепления нового признака, имеет очень длинный «хвост» справа (распределение ассиметрично и даже при высокой доле мутантов/не-мутантов (90/10), 100%-е доминирование мутантов в половине из 10000 экспериментов достигается в диа-



Рис. 1. Результаты численного эксперимента для бесполой популяции (десять экспериментов) в соответствии с моделью Морана для трех вариантов соотношения «мутанты/не-мутанты»: (а) — 30/70; (б) — 50/50; (в) — 70/30. Светло-серые линии — мутанты, темно-серые линии — не-мутанты. Размер популяции N = 100. Звездочками на графиках отмечены поколения, в которых клоны достигают 100%-го доминирования. Черная горизонтальная линия: N = 50.

пазоне [39÷1313] поколений, в другой половине экспериментов – в диапазоне [1313÷44066] поколений).

В случае полового размножения выбрана рандомизация с распределением особей по двум группам – мутанты и не-мутанты, самцы и самки [19], что уменьшает системную ошибку отбора. Для двуполой популяции рассмотрен вариант модели Райта-Фишера [20], описывающей изменения в частоте одиночной мутации в популяции во времени. Модель и эксперимент основаны на следующих условиях: поколения не пересекаются, постоянный размер популяции в каждом поколении (N = const), популяция размера  $N \operatorname{cocto-}$ ит из диплоидных особей (2N копий), имеющих единственный полиморфный сайт с двумя аллелями – один из которых является предковым, а другой – производным (А и а), случайное спаривание. В каждую единицу времени типы особей в момент времени (n - 1) определяют типы особей в момент времени (n).

Рассмотрим процесс фиксации мутаций при случайном спаривании в непересекающихся поколениях для двуполой популяции постоянного размера (N = 100) и постоянного состава — количество самцов ( $N_{\rm m}$ ) и самок ( $N_{\rm f}$ ) неизменно в поколениях. На каждом временном шаге (n — поколение) каждая пара особей (самец-самка) производит пару потомков (самец-самка), далее родители элиминируются из популяции. Перемешивание самцов и самок происходит случайным образом на каждом временном шаге с использованием генератора случайных чисел (каждой самке f случайным образом равновероятно ставится в пару самец m). Передача мутации потомству определяется следующим образом:

а) если оба родителя не-мутанты, то оба потомка – не-мутанты;

б) если оба родителя мутанты, то оба потомка – мутанты;

в) если один родитель мутант, а другой — немутант, то наследование мутации для каждого потомка определяется в зависимости от значения вероятности  $p_{\text{mut}}$ .

Результаты моделирования определяются случайными процессами выборки, вероятностью фиксации новой мутации ( $p_{\rm mut}$ ) в следующем поколении и соотношением мутанты/не-мутанты в исходном поколении. Для модели Райта-Фишера произведено 10000 численных экспериментов для различных значений соотношения мутанты/не-мутанты в исходном поколении (10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 90/10) и вероятности передачи мутации ( $p_{\rm mut} = 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9$ ). Так же как и в модели Морана, графики динамики количества мутантов и не-мутантов по поколениям симметричны относительно N/2.

Для иллюстрации случайных процессов при половом размножении на рис. 3 представлены графики динамики численности мутантов и не-



**Рис. 2.** Графики зависимости количества поколений *n*, в которых достигается 100%-е доминирование мутантов, от доли мутантов (10, 30, 50, 70, 90) в исходном поколении ( $N_{mut0}$ ) для бесполой популяции: (а) – минимальное количество поколений ( $n_{min}$ ); (б) – медианное количество поколений ( $n_{median}$ ); (в) – максимальное количество поколений ( $n_{max}$ ). Размер исходного поколения популяции постоянный (N = 100); 10000 экспериментов. Цифрами над столбцами указано значение поколений.



**Рис. 3.** Результаты численного эксперимента для двуполой популяции (10 экспериментов) в соответствии с моделью Райта—Фишера при различных вариантах соотношения «мутанты/не-мутанты» в исходном поколении и значении коэффициента  $p_{\text{mut}}$ . Соотношение «мутанты/не-мутанты» от общей численности популяции в исходном поколении — 30/70: (а) –  $p_{\text{mut}} = 0.3$ ; (б) –  $p_{\text{mut}} = 0.5$ ; (в) –  $p_{\text{mut}} = 0.7$ . Соотношение «мутанты/не-мутанты» от общей численности популяции в исходном поколении — 10/90: (г) –  $p_{\text{mut}} = 0.3$ ; (д) –  $p_{\text{mut}} = 0.5$ ; (е) –  $p_{\text{mut}} = 0.7$ . Размер популяции N = 100. Светло-серые линии – мутанты, темно-серые линии – не-мутанты. Звездочками отмечены поколения, в которых клоны достигают 100%-го доминирования. Черная горизонтальная линия: N = 50.



**Рис. 4.** Графики зависимости количества поколений (*n*), необходимых для закрепления нового признака (100%-го доминирования мутантов в популяции), от количества мутантов в популяции в исходном поколении ( $N_{\text{mut0}}$ ) и вероятности мутации потомства от смешанной пары родителей ( $p_{\text{mut}}$ ): (а) — минимальное количество поколений ( $n_{\min}$ ); (б) — медианное ( $n_{\text{median}}$ ); (в) — максимальное количество поколений ( $n_{\max}$ ). Размер популяции N=100; 10000 экспериментов. Цифрами над столбцами указано количество поколений.

мутантов при  $p_{\text{mut}} = 0.5$  и различных вариантах соотношения мутанты/не-мутанты в исходном поколении по поколениям для десяти экспериментов. В отличие от модели Морана при половом размножении случайные выборки учитывают не только клоны мутантов и не-мутантов, но и половую принадлежность особей в клонах – самцы и самки.

Для полового размножения, аналогично модели Морана, отмечена зависимость количества поколений, необходимых для закрепления нового признака (100%-го доминирования мутантов в популяции) от начального соотношения мутанты/не-мутанты при постоянном значении коэффициента *p*<sub>mut</sub> (рис. 3). Количество поколений, необходимых для закрепления нового признака, зависит от значения коэффициента вероятности фиксации новой мутации (*p*<sub>mut</sub>): при увеличении коэффициента вероятности фиксации мутаций количество поколений, необходимых для фиксации мутаций, сокращается (рис. 36, в, д, е); при уменьшении коэффициента вероятности фиксации мутаций количество поколений, необходимых для фиксации мутаций, увеличивается (рис. 3б,в,д,е) или мутации не фиксируются (рис. 3а, г).

Для 10000 экспериментов отмечены аналогичные зависимости. Минимальное количество поколений, необходимых для доминирования мутантов, при значении коэффициента вероятности  $p_{mut} = 0.5$ , уменьшается от 68 поколений при соотношении мутанты/не-мутанты 10/90 до двух поколений при соотношении мутанты/не-мутанты 90/10 (рис. 4а); с ростом коэффициента вероятности до  $p_{mut} = 0.7 -$ от десяти до двух поколений (при аналогичных соотношениях); с уменьшением коэффициента вероятности до  $p_{mut} = 0.3 -$  доминирование мутантов не отмечено (рис. 4а). Для медианных значений количества поколений, в которых фиксируются мутанты, получаем зависимость, сходную с минимальными значениями количества поколений (рис. 4б), а для максимальных значений, в отличие от модели бесполого размножения (рис. 2в), отмечается наличие пика при соотношении мутанты/не-мутанты, равном 50/50, что связано с увеличением вариабельности при данном распределении в двух группах организмов (мутанты и не-мутанты, самцы и самки) (рис. 4в).

Для визуализации плотности распределения вероятностей случайной величины (количества поколений, в которых достигается доминирование мутантов или не-мутантов в популяции) в моделях бесполого и полового размножения были использованы «скрипичные» графики (violin plot) (рис. 5). (Вероятность того, что доминирование произойдет в интервале поколений  $[n_1, n_2]$ , равна площади области значений на этом интервале: чем больше площадь области, тем выше вероятность.) Чем шире светло-серая область на графике, тем выше вероятность достижения мутантами 100%-го доминирования в популяции в данном поколении (n) (это же справедливо и для темносерых областей – не-мутантов). С увеличением начальной доли мутантов светло-серая половина «скрипки» (мутанты) сдвигается к оси х: чем больше доля мутантов в исходном поколении, тем меньше поколений необходимо для домини-



**Рис. 5.** Скрипичные графики зависимости количества поколений (*n*), необходимых для закрепления нового признака (100%-го доминирования мутантов в популяции), от количества мутантов в популяции в исходном поколении ( $N_{mut0}$ ) для различных вариантов начального количества мутантов в популяции: (a) — модель бесполого размножения Морана, (б) — модель полового размножения Райта-Фишера. Размер популяции N = 100;  $p_{mut} = 0.5$ ; 10000 экспериментов. Светло-серые области на графике — мутанты, темно-серые — не-мутанты. Белыми горизонтальными линиями показаны медианы распределений.

рования мутантов. Белыми горизонтальными линиями показаны медианы распределений. Масштабирование рассчитывали отдельно для каждого графика. Для наглядности графики для модели бесполого размножения Морана построены до 15000 поколений, а для модели полового размножения Райта—Фишера — до 600: выше этих значений для *n* происходят единичные события фиксации мутантов или не-мутантов.

Несмотря на то что рандомные модели отличаются условиями случайного распределения — наличием двух групп при бесполом размножении и четырех групп при половом размножении, полученные результаты позволяют выявить определенные закономерности: с увеличением начальной доли мутантов уменьшается минимальное количество поколений, необходимых для фиксации мутации при случайной выборке особей.

Рассмотренные модели отражают процесс самоорганизованной критичности [1, 2]. Применительно к случайным процессам фиксации мутаций это состояние системы, при котором в результате кооперативного эффекта взаимодействующих элементов (особей в популяции) и в зависимости от их характеристик происходит накопление малых флуктуаций (мутаций), которое при определенных условиях способно перерасти в гигантскую флуктуацию, т. е. сформировать новую структуру - новый вид или вызвать элиминацию популяции. В модели «кучи песка» [2] цепная реакция, поддерживающая критическое состояние системы, определяется неустойчивостью песчинок - способностью к изменению динамического состояния сначала одной песчинки, а за-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

тем к локальному изменению коллективного состояния малой группы песчинок относительно соседних песчинок, что вызывает песочную лавину. При видообразовании способность особей к изменению генотипа связана с количеством мутантов в исходном поколении и особенностями размножения - характеристиками особей в популяции. Если при бесполом размножении формирование устойчивого клона (100%-е доминирование) в поколениях определяется только исходным соотношением особей-мутантов и немутантов, то при половом размножении добавляется еще одна характеристика – наличие пола. В результате размножения (кооперативного эффекта взаимодействующих особей в процессе размножения) происходит фазовый переход системы: состояние неустойчивости по мере накопления мутаций в поколениях преобразуется в качественно новое устойчивое состояние - новый вид (100%-е доминирование) или вымирание мутантов или не-мутантов.

### ПЕРКОЛЯЦИОННАЯ МОДЕЛЬ ОТБОРА МУТАЦИЙ. РОЛЬ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ И СЛУЧАЙНЫХ ПРОЦЕССОВ

Модели Морана и Райта—Фишера учитывают исключительно случайные процессы, однако при закреплении мутаций в поколениях существенную роль играют также детерминированные процессы. Представленная в данной работе модель перколяционной решетки как механизмов отбора мутаций в процессе видообразования включает как детерминированные, так и случайные процессы.

Перколяция — это явление протекания потока подвижной среды через пористые материалы, при котором формируется хотя бы один непрерывный путь через соседние проводящие узлы решетки [21]. Порог перколяции как количественная характеристика протекания зависит от параметров среды и доли проводящих узлов, при которой возникает перколяционный кластер [22]. Иными словами, кластером следует считать совокупность кооперативно связанных в перколяционном пространстве узлов и каналов. В такой системе существенно соотношение случайных и скоррелированных процессов [22-25]. Процесс фиксации мутаций в свою очередь также определяется детерминированными и случайными процессами. В модели естественный отбор представлен как явление перколяции [26, 27], где перколяционный фильтр – физический инструмент отбора оптимальных для видообразования мутаций на популяционном уровне. Детерминированные взаимодействия мутаций в череде поколений и случайные процессы дрейфа определяют коллективное поведение узлов и связей (мутаций) в пространстве перколяционной решетки популяции.

Естественный отбор (подобно фильтру перколяционной решетки) определяет закономерность прохождения потока новых мутаций [27]. Давление для протока создает пул мутаций, и в результате отбора происходит выборка и фиксация мутаций. Перколяции, как система связанных элементов (особей - носителей мутаций), в зависимости от характеристик отбора и потока мутаций могут стать либо разрастающимися – устойчивыми, либо – неустойчивыми. При отсутствии детерминированных механизмов неустойчивые перколяции стохастичны и отфильтровываются отбором, а устойчивые перколяции определяют эволюционную траекторию популяции и вида [27]. Фиксация новых мутаций на популяционном уровне зависит от соотношения ранее закрепившихся «разрешающих» и «запрещающих» мутаций [16]. В процессе фиксации мутаций преимущество получают мутации, которым подвержены не единичные особи, а кластеры в череде поколений [28, 29].

Формирование нового вида происходит поэтапно. На первом уровне процесс определяется точечными взаимодействиями особей — носителей мутаций, и мутации являются обратимыми, поскольку значителен вклад случайных процессов. При наличии достаточного количества носителей новой мутации происходит формирование кластера носителей мутаций — это промежуточный уровень локального взаимодействия (конкуренции) кластеров, связанный с началом специализации и дифференциации — необходимых условий образования вида. На этом уровне конечный результат в значительной степени определяется детерминированными процессами, что связано с наличием достаточно устойчивых кластеров носителей новых признаков. Согласно работе [30], в случае фиксации мутации в течение десяти поколений мутация становится закрепившейся — это третий уровень, определяемый взаимодействиями между популяциями в границах общего вида. Иными словами, если для единичных особей мутации (малые флуктуации) являются обратимыми, поскольку преимущественно определяются случайными процессами, то при формировании кластера носителей новой мутации (клона) малые флуктуации способны перерасти в гигантскую. Поэтому на этом уровне формируются предпосылки видообразования - специализация и дифференциация, а конечный результат, связанный с наличием достаточно устойчивых кластеров носителей новых признаков, в значительной степени определяется детерминированными процессами [27]. Устойчивое формирование кластеров является точкой бифуркации, при преодолении которой возможны два варианта: формирование нового вида (при наличии мутаций, способствующих видообразованию) или элиминация носителей мутации (при наличии негативных мутаций). «Знак» мутаций на популяционном уровне (положительных, отрицательных и нейтральных) определяется их адаптивной пользой на кратком временном интервале и в дальнейшем, в зависимости от условий среды, может изменить знак на противоположный, поэтому в модели мутации рассматриваются вне зависимости от их направленности [27].

Скорость закрепления новой мутации (в долях от общего количества мутаций) в поколениях определяется детерминированными процессами отбора и случайными процессами генетического дрейфа и может быть описана следующим уравнением [26]:

$$dM_{\rm C}/dt = -\ln M_{\rm C} \cdot p_{\rm C}(M_{\rm R} - M_{\rm B}) Ne/N + kW, \quad (1)$$

где *N* – численность популяции, *Ne* – доля особей от общей численности популяции, способных к размножению и являющихся носителями мутаций — кластер, (N - Ne) — количество особей немутантов. Отношение Ne/N лежит в интервале 0.3-0.8 (согласно работе [31], в среднем, минимальная величина эффективного размера популяции Ne составляет 30%, а максимальная величина – 60–85% от общей численности популяции [32]). М<sub>С</sub> – доля новых мутаций от общего количества мутаций (нормированы на единицу),  $p_{\rm C}$  – вероятность фиксации новых мутаций. Существуют различные подходы к определению вероятности мутации, согласно которым, как правило, значение  $p_{\rm C}$  колеблется в пределах 0.5~1.0 [33, 34]. Поскольку для таксонов разного уровня биологической сложности вклад случайных процес-



**Рис. 6.** Выборки случайных чисел для десяти поколений *n* при различных значениях (*Ne/N*) для бесполого ((a) – N $_{0}$  1, (b) – N $_{0}$  2, (b) – N $_{0}$  3) и полового ((г) – N $_{0}$  1, (д) – N $_{0}$  2, (е) – N $_{0}$  3) размножения. Отношение *Ne/N* равнялось: 0.3 (темные треугольники), 0.4 (светлые треугольники), 0.5 (темные квадраты), 0.6 (светлые квадраты), 0.7 (темные кружки) и 0.8 (светлые кружки).

сов различен, используя данные работы [35], рассчитываем вероятность закрепления новых мутаций при отсутствии дрейфа по формуле

$$p_{\rm C} \approx \frac{Ne / N \cdot s}{\{1 - \exp\left(-2Ne / Ns\right)\}}.$$
 (2)

*M*<sub>R</sub> – доля ранее закрепившихся в популяции разрешающих мутаций (нормированы на 1). M<sub>B</sub> – доля закрепившихся ранее в популяции запрещающих мутаций (нормированы на единицу). Новая мутация *М*<sub>С</sub> может быть передана конечному числу особей в популяции в зависимости от соотношения Ne/N, наличия и соотношения разрешающих (M<sub>R</sub>) и запрещающих (M<sub>B</sub>) мутаций, значений коэффициентов отбора (s) и дрейфа (k). s -Коэффициент отбора (определяет скорость уменьшения частоты генотипа: с уменьшением коэффициента отбора уменьшается приспособленность генотипов и увеличивается давление отбора), для природных популяций принимаем  $0.1 \le s \le 0.2$  [36]. kW — слагаемое, описывающее дрейф, где k — коэффициент дрейфа (определяет случайные изменения частот аллелей и генотипов в популяции), W – случайная величина, равномерно распределенная на отрезке [-1, 1]. Величина *W* изменяется каждые десять шагов (раз в поколение) в соответствии с выборками случайных чисел для полового и бесполого размножения (рис. 6).

Начальные условия:  $M_{\rm C} = 0.1$ , популяция состоит из N = 100 особей, из которых  $Ne_0 = 30$  – обладатели положительной мутации. Сумма разрешающих и запрещающих мутаций (в долях) определена как  $M_{\rm R} + M_{\rm B} = 1$ . Необходимое условие закрепления новой мутации – наличие преобладающей доли поддерживающих мутаций. Полагаем  $M_{\rm R} = 0.51$ , и тогда  $M_{\rm R} - M_{\rm B} = 0.02$ . Уравнение (1) принимает следующий вид:

$$dM_{\rm C}/dt = -0.02 \ln M_{\rm C} \cdot p_{\rm C} N e/N + kW.$$

Величина детерминированной части уравнения (1) ( $-\ln M_{\rm C} \cdot p_{\rm C}(M_{\rm R} - M_{\rm B}) Ne/N$ ) изменяется в интервале от 0.007117 (Ne/N = 0.3) до 0.000985 (Ne/N = 0.8). Отсюда пороговым значением коэффициента дрейфа при  $M_{\rm R} - M_{\rm B} = 0.02$  и Ne/N = 0.3 полагаем  $k_{\rm th} = 0.01$ : при  $k_{\rm th} < 0.01$  в ходе закрепления мутаций доминируют детерминированные процессы, а при  $k_{\rm th} > 0.01 -$ случайные.

Скорость изменения *Ne* зависит только от скорости смерти и рождения мутантов:

$$dN/dn = -r_{\rm d}^{-} (N - Ne) + r_{\rm b}^{-} (N - Ne) - r_{\rm d}^{+} Ne + r_{\rm b}^{+} Ne,$$
(3)

где  $r_{\rm d}^-$  – константа скорости смертности не-мутантов,  $r_{\rm b}^-$  – константа скорости рождаемости не-мутантов,  $r_{\rm d}^+$  – константа скорости смертности мутан-

тов,  $r_b^+$  — константа скорости рождаемости мутантов. В каждом поколении изменение численности популяции определяется скоростями рождаемости и смертности мутантов и не-мутантов:

$$N_{n} = -r_{d}^{-} \cdot (N_{n-1} - Ne_{n-1}) + r_{b}^{-} \cdot (N_{n-1} - Ne_{n-1}) - r_{d}^{+} \cdot Ne_{n-1} + r_{b}^{+} \cdot Ne_{n-1} + N_{n-1}.$$
(4)

Начальные условия: популяция состоит из  $N_0 = 100$  особей, из которых  $Ne_0 = 30$  – обладатели положительной мутации, а  $(N_0 - Ne_0) = 70$  – особи, не имеющие мутацию (не-мутанты). Условие соответствия между значениями *s* и  $Ne_0$ : мутация, повышающая приспособленность на 10% (*s* = 0.1), поддерживается отбором при численности мутантов от 10 особей [37].

Рассмотрим уравнение (4) для бесполого и полового размножения. Если принять, что рождаемость в обоих случаях одинакова и разница наблюдается только в смертности, то в этом случае константы скорости (в долях) равны: смертность немутантов  $r_d^- = 2$ , рождаемость не-мутантов ( $r_b^-$ ) равна рождаемости мутантов ( $r_b^+$ ):  $r_b^+ = r_b^- = 1$ , смертность мутантов  $r_d^+ = 0.5$ . В этом случае

смертность не-мутантов в два раза выше их рождаемости, а смертность мутантов в два раза ниже их рождаемости, и уже в первом поколении все немутанты вымирают. Поэтому принимаем следующие значения констант скорости: а) для полового размножения: смертность не-мутантов  $r_{\rm d}^{-} = 0.75$ , рождаемость не-мутантов  $r_b^- = 0.5$ , смертность мутантов  $r_{\rm d}^{+} = 0.33$ , рождаемость мутантов  $r_{\rm b}^{+} = 0.5$ (рис. 7а); б) для бесполого размножения: смертность не-мутантов  $r_{\rm d}^- = 1.5$ , рождаемость не-мутантов  $r_{\rm b}^{-} = 1$ , смертность мутантов  $r_{\rm d}^{+} = 0.66$ , рождаемость мутантов  $r_b^+ = 1$  (рис. 76). Поскольку мы рассматриваем только те мутации, которые способствуют видообразованию (положительные), то константы скорости смертности не-мутантов в полтора раза больше, чем скорость их рождаемо-



**Рис. 7.** Графики динамики популяции по поколениям (*n*). Для бесполого размножения: (a) – динамика численности популяции (*N*) и мутантов (*Ne*), (б) – динамика отношения Ne/N; для полового размножения: (в) – динамика численности популяции (*N*) и мутантов (*Ne*), (г) – динамика отношения Ne/N.
S	<i>p</i> <sub>C</sub>	k <sub>th</sub>	M <sub>C</sub>	M <sub>R</sub>	$M_{\rm R} - M_{\rm B}$	k <sub>th</sub>
0.1	0.51515	0.01	0.1	0.51	0.02	0.01

Таблица 1. Параметры условий решения уравнений (1) для полового и бесполого размножения

сти: не-мутанты оказываются менее приспособленными к изменившимся условиям, поэтому их элиминация происходит быстрее.

Полученные графики адекватно воспроизводят динамику популяции при бесполом и половом размножении в условиях достаточного объема ресурса: для бесполого размножения во время логарифмической фазы происходит более интенсивный экспоненциальный рост [38] отношения мутантов к численности популяции по поколениям (рис. 76), чем для полового размножения (рис. 7г). Ввиду особенностей бесполого размножения численности мутантов и популяции в целом выравниваются к четвертому поколению, а при половом размножении — к десятому поколению.

Численное решение уравнения (1) для полового и бесполого размножения выполнено на языке программирования Python 3.7 с использованием библиотек NumPy и Matplotlib. Параметры фиксации мутаций для полового и бесполого размножения, согласно уравнению (1), представлены в табл. 1–3.

Для демонстрации роли случайных чисел, в соответствии с уравнением (1), построены графики динамики фиксации мутаций при половом и бесполом размножении для трех выборок случайных чисел: s = 0.1,  $(M_{\rm R} - M_{\rm B}) = 0.8$ ,  $k_1 = 0.01$ ,  $k_2 = 0.6$  (рис. 8, табл. 2).

Графики на рис. 8 демонстрируют следующие закономерности. При пороговом значении коэффициента дрейфа ( $k_{th} = 0.01$ ) процесс фиксаций мутаций в поколениях для двух типов размножения и трех выборок случайных чисел ( $\mathbb{N}\mathbb{N}\mathbb{N}$  1–3) протекает по одному сценарию (рис. 8а,д). При k = 0.6 (значительно больше  $k_{th} = 0.01$ ) как при половом (рис. 8е–и), так и без бесполом (рис. 8б– г) размножении возникают хаотические процессы, и прохождение мутаций может происходить в разных поколениях и при разных значениях  $M_C$  (в долях), что объясняется не только значением коэффициента дрейфа, но и выборкой случайных чисел.



Рис. 8. Графики динамики фиксации мутации (в долях от общего количества мутаций) в поколениях (*n*) в зависимости от начальный значений *Ne/N*, *k* и выборки случайных чисел для бесполого ((а)–(г)) и полового ((д)–(з)) размножения. Бесполое размножение: (а) – k = 0.01, выборки №№ 1–3 (при трех выборках получаются визуально неразличимые графики); (б) – k = 0.6, выборка № 1; (в) – k = 0.6, выборка № 2; (г) – k = 0.6, выборка № 3. Половое размножение: (д) – k = 0.01, выборка № 1–3 (при трех выборках получаются визуально неразличимые графики); (е) – k = 0.6, выборка № 1–3 (при трех выборках получаются визуально неразличимые графики); (е) – k = 0.6, выборка № 2; (з) – k = 0.6, выборка № 3. Половое размножение: (д) – k = 0.6, выборка № 1–3 (при трех выборках получаются визуально неразличимые графики); (е) – k = 0.6, выборка № 1, (ж) – k = 0.6, выборка № 2; (з) – k = 0.6, выборка № 3. Постоянные значения: s = 0.1,  $M_R = 0.9$ . Оттенками серого обозначено возрастание доли новых мутаций (от 0 до 1).

	Выборка	k	$M_{\rm R}$	$M_{\rm R} - M_{\rm B}$	$M_{\rm C}({\rm min})$	$M_{\rm C}({\rm max})$
Бесполое размножение <i>s</i> = 0.1	Nº 1	0.01	0.9	0.8	0.05	1.00
		0.6	0.9	0.8	0.05	1.00
	N6 2	0.01	0.9	0.8	0.05	1.00
	JNº Z	0.6	0.9	0.8	0.04388	1.00
	Nº 3	0.01	0.9	0.8	0.05	0.99957
		0.6	0.9	0.8	0.05	1.00
Половое размножение <i>s</i> = 0.1	No. 1	0.01	0.9	0.8	0.05	1.00
	JN≌ 1	0.6	0.9	0.8	0.05	0.7985
	No 2	0.01	0.9	0.8	0.05	1.00
	JNº ∠	0.6	0.9	0.8	0.05	1.00
	<b>№</b> 3	0.01	0.9	0.8	0.05	0.9986
		0.6	0.9	0.8	0.05	1.00

**Таблица 2.** Параметры решения уравнения (1) при половом и бесполом размножении для разных выборок случайных чисел при  $M_{\rm R} = 0.9$ 

#### ТРИГГЕРНАЯ МОДЕЛЬ ФИКСАЦИИ МУТАЦИЙ

На популяционном уровне особи, а затем кластеры носителей мутаций, которые, в зависимости от численности особей, а также их генотипических и фенотипических характеристик, и спектра ранее зафиксированных и новых мутаций, определяют особенности взаимодействия с другими особями в популяции. Это состояние неустойчивости постепенно преобразуется в качественно новое устойчивое состояние — новый вид или вымирание. В модели перколяционной решетки рассматривается фиксация мутаций в течение десяти поколений под управлением детерминированных (в зависимости от доли разрешающих мутаций) и случайных (в зависимости от значения коэффициента дрейфа) процессов, а также размера кластера носителей мутаций, при этом доля ( $M_{\rm C}$ ) увеличивается от  $M_{\rm C}({\rm min})$  в первом поколении до  $M_C(\max)$  в десятом поколении. Если в первом поколении процесс фиксации мутаций можно охарактеризовать как малую флуктуацию, то к десятому поколению снижается уровень воздействия случайных процессов (по сравнению с первым поколением) и формируется гигантская флуктуация – новая структура. Таким образом, перколяционную решетку фиксации мутаций можно представить в качестве многослойной (десять слоев) структуры, где процесс закрепления мутаций в десяти поколениях под действием отбора и дрейфа определяется стационарным решением триггерного уравнения:

$$\frac{\partial u}{\partial t} - D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} = \begin{cases} -u, & M_{\rm C} \le M_{\rm C} \, (k=0), \\ 1-u, & M_{\rm C} > M_{\rm C} \, (k=0), \end{cases} 0.3 < x < 0.8.$$
(5)

Отношение Ne/N лежит в интервале 0.3-0.8, откуда x определяется соотношением Ne/N в пределах  $x \in [0.3; 0.8]$ .  $M_C > M_C(k=0)$  – необходимое условие закрепления новой мутации. Поскольку модель (5) определяет только два возможных варианта – прохождение или не прохождение новых мутаций по поколениям, значение  $M_C$  при k = 0 сравнивается с  $M_C$  при  $k \neq 0$ . u - Функция (в условных единицах) доли новых мутаций ( $M_C$ ) по поколениям в зависимости от Ne/N (уравнение 1); x определяется соотношением Ne/N в пределах  $x \in [0.3; 0.8]$ ; t – поколения (n) от 1 до 10.  $M_{\rm R}$  — доля ранее закрепившихся в популяции разрешающих мутаций;  $M_{\rm B}$  — доля ранее закрепившихся в популяции запрещающих мутаций; D — коэффициент диффузии прохождения новых мутаций. Согласно данным работы [39] принимаем D = 0.01 (средняя скорость мутаций на кодирующий геном за поколение для организмов). Отношение Ne/N лежит в интервале 0.3—0.8. Триггерная модель (5) определяет только два возможных варианта — прохождение или не прохождение новых мутаций по поколениям.

#### МОДЕЛЬ ПРЕДПОСЫЛОК ВИДООБРАЗОВАНИЯ

	Выборка	k	M <sub>R</sub>	$M_{\rm C}({\rm min})$	$M_{\rm C}({\rm max})$	M <sub>R</sub>	$M_{\rm C}({\rm min})$	$M_{\rm C}({\rm max})$
Бесполое размножение	Nº 1	0	0.6	0.05	0.7989	0.8	0.05	0.98115
		0.01	0.6	0.05	0.8143	0.8	0.0.5	0.99075
		0.1	0.6	0.05	0.9699	0.8	0.05	1.00
		0.2	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.3	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.4	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.5	0.6	0.04674	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.01	0.6	0.05	0.82116	0.8	0.05	0.99365
		0.1	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
	No 2	0.2	0.6	0.0448	1.00	0.8	0.05	1.00
s = 0.1	JNº Z	0.3	0.6	0.03437	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.4	0.6	0.021	1.00	0.8	0.0491	1.00
		0.5	0.6	0.00788	1	0.8	0.04174	1.00
		0.01	0.6	0.05	0.80813	0.8	0.05	0.98767
	<u>№</u> 3	0.1	0.6	0.05	0.92124	0.8	0.05	1.00
		0.2	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.3	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.4	0.6	0.044943	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.5	0.6	0.022169	1.00	0.8	0.05	1.00
	N <u>∘</u> 1	0.01	0.6	0.05	0.8197	0.8	0.05	0.993996
		0.1	0.6	0.0.5	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.2	0.6	0.0.5	1.00	0.8	0.05	1.00
Половое размножение <i>s</i> = 0.1		0.3	0.6	0.0.5	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.4	0.6	0.03549	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.5	0.6	0.015687	1.00	0.8	0.05	1.00
	Nº 2	0.01	0.6	0.05	0.80983	0.8	0.05	0.991484
		0.1	0.6	0.05	0.9565	0.8	0.05	0.981053
		0.2	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.3	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.4	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.5	0.6	0.05	1.00	0.8	0.05	1.00
	№ 3	0.01	0.6	0.05	0.8026	0.8	0.05	0.98491
		0.1	0.6	0.05	0.85736	0.8	0.05	0.981053
		0.2	0.6	0.05	0.9209	0.8	0.05	0.981053
		0.3	0.6	0.02173	1.00	0.8	0.05	1.00
		0.4	0.6	0.0036	1.00	0.8	0.04625	1.00
		0.5	0.6	0.0007	1.00	0.8	0.0383	1.00

Таблица 3. Параметры решения уравнения (5) при половом и бесполом размножении

Численное решение получено с помощью метода релаксации решения параболической задачи к решению соответствующей стационарной задачи на большом промежутке времени. Параболическое уравнение решается при помощи метода прямых в соответствии со схемой CROS1 (комплекснозначной одностадийной схемой Розенброка) [40].

Опишем алгоритм численного решения уравнения (5). Обозначим

$$f(u) = \begin{cases} -u, & M_{\rm C} \le M_{\rm C} \, (k=0), \\ 1-u, & M_{\rm C} > M_{\rm C} \, (k=0). \end{cases}$$

Зададим начальные условия задачи как u(x, 0) = 1 + th(x - 0.5). Эти условия отвечают случаю, когда фазовый переход происходит при эффективном размере популяции *Ne/N*=0.5. Зададим краевые условия следующим образом:

 $u_x(0.3; t) = u_x(0.8; t) = 0$ . Эти однородные условия Неймана означают отсутствие влияния на рассматриваемую систему процессов, происходящих при  $Ne/N \le 0.3$  или  $Ne/N \ge 0.8$ .

На отрезке  $x \in [0.3; 0.8]$  введем равномерную сетку из  $N_x + 1$  точек:  $x_0 = 0.3, ..., x_{Nx} = 0.8$ . Заменим вторую производную по координате разностной производной и перейдем к системе обыкновенных дифференциальных уравнений. Добавим краевые условия. Получаем следующую систему обыкновенных дифференциальных уравнений:

$$\frac{-y_0 + y_1 = 0}{h^2};$$

$$\frac{\partial y_i}{\partial t} = D \frac{y_{i+1} - 2y_i + y_{i-1}}{h^2} - f(y_i) =: F_i(y), i = 1, ..., N - 2;$$

$$-y_{N-2} + y_{N-1} = 0.$$
(6)

Здесь h = (0.8 - 0.3)/Nx - шаг сетки по переменной*x* $, а время задается как <math>t = \tau \times$  (количество шагов по времени),  $\tau - шаг$  по времени.

Решение задачи на каждом следующем временном слое рассчитывается как  $\hat{\vec{y}} = \vec{y} + \tau \text{Re}\vec{\omega}$ ,  $\vec{y} = (y_0, y_1, ..., y_{N-1})$  – решение на текущем временном слое;  $\hat{\vec{y}}$  – решение на следующем временном слое. Вектор  $\tau \text{Re}\vec{\omega}$ – это приращение сеточных значений  $\vec{y}$  искомой функции в приближении используемой численной схемы. Согласно алгоритму одностадийной комплекснозначной схемы Розенброка вектор  $\vec{\omega} = (\omega_0, \omega_1, ..., \omega_{N-1})$  находится из системы линейных алгебраических уравнений:

$$\left[E - \frac{1+i}{2}\tau\left(\frac{\partial F_i}{\partial y_j}\right)\right]\vec{\omega} = \vec{F}(y_i).$$
(7)

Распишем схему (7) подробно с учетом краевых условий для вектора  $\vec{\omega}$ , вытекающих из краевых условий для вектора  $\vec{y}$  (см. выражение (6)):

$$-\left(1+\frac{1+i}{2}\tau\right)\omega_{0}+\frac{1+i}{2}\tau\omega_{1}=0,$$

$$\frac{1+i}{2}\tau\frac{D}{h^{2}}\omega_{i-1}-\left[1+\frac{1+i}{2}\tau\left(\frac{2}{h^{2}}D+\frac{\partial f}{\partial y}(y_{i})\right)\right]\omega_{i}+\frac{1+i}{2}\tau\frac{\varepsilon^{2}}{h^{2}}\omega_{i+1}=-D\frac{y_{i+1}-2y_{i}+y_{i-1}}{h^{2}}+f(y_{i})-\left(\frac{1+i}{2}\tau\right)\omega_{N-2}-\left(1-\frac{1+i}{2}\tau\right)\omega_{N-1}=0.$$

Численное решение уравнения (5) как оценка процессов фиксации новых мутаций (в долях) по поколениям и при коэффициенте отбора, характерном для природных популяций (s = 0.1 [36]), выполнено на языке программирования Руthon 3.7 с использованием библиотек NumPy и Matplotlib.

На рис. 9 и 10 представлено графическое решение триггерной модели (5) при постоянном значении коэффициента отбора (s = 0.1),  $M_{\rm R} = 0.6$ ,  $M_{\rm R} = 0.8$  и различных значениях коэффициента дрейфа (k) для полового и бесполого размножения (рис. 9). Расчетные данные представлены в табл. 3. В модели сравниваются текущие значения параметров модели с исходными: k = 0 (без учета случайных процессов).

Графики на рис. 9 и 10 демонстрируют, что в результате детерминированных (в модели при s = const определяются значения  $M_{\rm C}$  в зависимости от значений k и M<sub>R</sub>) только часть мутаций способна сохраниться в кластере в течение десяти поколений. Для бесполого размножения отмечено закрепление мутаций в течение десяти поколений при  $M_{\rm R}$  = 0.6: для выборки № 1 – при Ne/N = = 0.7 (рис. 9а (№ 1), k = 0.01 и рис. 9б (№ 1), *k* = 0.5); для выборки № 2 – при *Ne/N* = 0.8 (рис. 9а (№ 2), *k* = 0.01); для выборки № 3 – при Ne/N = 0.8 (рис. 9а (No 3), k = 0.01); при  $M_{\rm R} = 0.8$ : для выборки № 1 – при *Ne/N* = 0.7 (рис. 9а (№ 1), k = 0.01); для выборки N = 2 - при Ne/N = 0.8(рис. 9а (№ 2), *k* = 0.01). Для полового размножения отмечено закрепление мутаций в течение де-



**Рис. 9.** Графики прохождения новых мутаций  $M_C$  (в долях от общего количества мутаций) по поколениям для бесполого размножения при постоянном значении коэффициента отбора (s = 0.1) в зависимости от начального соотношения Ne/N, значений  $M_R$  и k: верхний ряд соответствует  $M_R = 0.6$  для трех выборок случайных чисел; нижний ряд соответствует  $M_R = 0.8$  для трех выборок случайных чисел. Светло-серые квадраты – новые мутации (в долях от общей численности мутаций в популяции), закрепленные в поколениях; темно-серые – отсутствие закрепившихся новых мутаций. Светло-серые непрерывные полосы в интервале от первого до десятого поколения означают закрепившуюся мутацию в течение десяти поколений.

сяти поколений при  $M_{\rm R} = 0.6$ : для выборки № 1 – при Ne/N = 0.5 (рис. 10а (№ 2), k = 0.01 и рис. 10б (№ 2), k = 0.5); при  $M_{\rm R} = 0.8$ : для выборки № 1 – при Ne/N = 0.5 (рис. 9а (№ 1), k = 0.01). Остальные мутации в ряду поколений  $1 \le n \le 10$  не сохраняются в кластере. Поскольку в модели (5) учитывается прохождение мутаций для десяти поколений, в принципе существует вероятность, что в

череде последующих поколений (n > 10) также возможна фиксация (например, при Ne/N = 0.5(рис. 9а ( $N_{2}$  1), k = 0.01 или при Ne/N = 0.6(рис. 10а ( $N_{2}$  3), k = 0.01).

Таким образом, при  $M_{\rm R} = 0.6$  и  $M_{\rm R} = 0.8$  для всех выборок случайных чисел в случае бесполого размножения фиксируется в два раза больше мутаций, чем в случае полового размножения. По-



**Рис. 10.** Графики прохождения новых мутаций  $M_C$  (в долях от общего количества мутаций) по поколениям для полового размножения при постоянном значении коэффициента отбора (s = 0.1) в зависимости от начального соотношения Ne/N, значения  $M_R$  и k: верхний ряд соответствует  $M_R = 0.6$  для трех выборок случайных чисел; нижний ряд соответствует  $M_R = 0.8$  для трех выборок случайных чисел. Светло-серые квадраты – новые мутации (в долях от общей численности мутаций в популяции), закрепленные в поколениях; темно-серые – отсутствие закрепившихся новых мутаций. Светло-серые непрерывные полосы в интервале от первого до десятого поколения означают закрепившуюся мутацию.

лученные нами данные для десяти поколений коррелируют с экспериментальными данными, приведенными в работе [41], где было показано, что при одинаковом темпе мутирования в половых популяциях за 1000 поколений закрепляется в пять раз меньше мутаций, чем в бесполых популяциях такой же численности. Согласно классическим представлениям половое размножение помогает отбору закреплять полезные мутации. Фиксации негативных и нейтральных мутаций при бесполом размножении происходят за счет «генетического автостопа» [42] (отбираться могут только целые геномы, и многие вредные мутации могут закрепляться за счет полезных мутаций, расположенных в других местах генома) и клональной интерференции [37, 43] (конкуренция полезных мутаций в разных генах часто приводит к потере большинства полезных мутаций в популяции).

Перколяционные процессы характеризуются особыми критическими точками, в которых основные параметры системы претерпевают качественные изменения — это порог протекания системы [22, 44]. Для процесса фиксации мутаций через перколяционную решетку отбора также характерно наличие порогов протекания — нижнего и верхнего.

Как уже было сказано, если мутация сохранилась в кластере в течение десяти поколений, то в дальнейшем это может привести либо к формированию вида (положительная на данном этапе видообразования мутация), либо элиминации ее носителей (негативная мутация). Для сохранившейся в течение десяти поколений (минимальное количество поколений, необходимых для устойчивой фиксации мутации в кластере [30]) нижний порог перколяционной решетки фиксации мутаций определяется долей зафиксированных мутаций (*M*<sub>C</sub>) для воспроизводящей численности кластера носителей новой мутации (Ne) в одном поколении – M<sub>C</sub>(max). Иными словами, нижний порог перколяционной решетки отбора мутаций определяется минимальным количеством узлов (носителей мутаций в одном поколении) и связей (мутаций). На этом уровне детерминированные и случайные процессы работают на уровне отдельных особей в кластере, поэтому мутации (малые флуктуации) в последующих поколениях могут не закрепиться, т.е. являются обратимыми. Светло-серые непрерывные полосы в течение десяти поколений (рис. 9, 10) означают, что мутации, закрепившиеся в первом поколении, сохраняются в последующих поколениях. Как видно из графиков на рис. 9 и 10, а также данных табл. 3, при постоянных значениях доли поддерживающих мутаций  $(M_{\rm R})$  с ростом коэффициента дрейфа (k)усиливается роль случайных процессов, и значение нижнего порога перколяционной решетки

отбора мутаций может существенно снижаться (табл. 3). С ростом доли поддерживающих мутаций ( $M_{\rm R} = 0.8$ ) усиливается детерминированная составляющая в ходе фиксации мутаций, поэтому по сравнению с  $M_{\rm R} = 0.6$  отмечено уменьшение разбросов значений  $M_{\rm C}({\rm min})$  – нижнего порога перколяционной решетки отбора мутаций (табл. 3).

Анализ модели показывает, что важной особенностью системы могут быть как обратимый, так и необратимый режимы поведения нижнего порога перколяционной решетки отбора (фиксации мутаций), в зависимости от параметров (k,  $M_{\rm R}$ , Ne). При сохранении мутации в десяти поколениях в популяции возникают необратимые процессы, вызванные новым устойчивым состоянием, - это верхний порог перколяционной решетки фиксации мутаций, определяемый долей новых мутаций в кластере в десятом поколении, например, при  $M_{\rm R} = 0.6$ , k = 0.5 и Ne = 0.7 (рис. 9); при  $M_{\rm R} = 0.8, k = 0.01$  и Ne = 0.5 (рис. 9). Верхний порог перколяционной решетки фиксации мутаций — это эволюционный шаг видообразования [10], т.е. критический порог накопления мутаций, который соответствует состоянию самоорганизованной критичности. С точки зрения теории самоорганизованной критичности в данной модели, по сравнению с рассмотренными моделями случайных процессов видообразования, добавляется еще одна характеристика особей – наличие и соотношение ранее зафиксированных в популяции поддерживающих мутаций. Эта детерминированная составляющая моделей перколяционной решетки отбора и триггерной модели фиксашии мутаций существенно снижает роль случайных процессов в ходе образования.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для анализа процесса самоорганизованной критичности рассмотрены модели случайных процессов, а также случайных и детерминированных процессов фиксации мутаций при бесполом и половом размножении, позволяющие качественно оценить вероятность возникновения нового вида. Показано, что для этих моделей параметры взаимодействия особей в популяции в процессе самоорганизованной критичности зависят от их генотипа и фенотипа, начального соотношения «мутанты/не-мутанты» (определяет количество случайным образом выбранных контактов) и половой принадлежности.

Аналогично модели «кучи песка» [2] цепная реакция, поддерживающая критическое состояние системы, определяется неустойчивостью особей в популяции — способностью к изменению динамического состояния (фиксации мутации) сначала одной особи, а затем к локальному изменению коллективного состояния кластера носителей мутаций относительно соседних песчинок, что вызывает «лавину видообразования». При видообразовании способность особей к изменению генотипа связана с количеством мутантов в исходном поколении, соотношением поддерживающих и запрещающих мутаций в популяции, случайными процессами и особенностями размножения. Полученные нами результаты триггерной модели подтверждаются представленными в научной литературе экспериментальными моделями оценки скорости мутаций одноклеточных эукариотов (Saccharomyces cerevisiae) [45-48]. Представленная нами модель может быть использована для анализа формирования новых видов организмов в процессе биологической эволюции.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-11-00042).

#### 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

- P. Bak, C. Tang, and K. Wiesenfeld, Phys. Rev. Lett. 59 (4), 381 (1987).
- 2. P. Bak, *How nature works: the science of self-organized criticality* (Springer Science & Business Media, 2013).
- H. J. Jensen, Self-Organized Criticality: Emergent Complex Behavior in Physical and Biological Systems (Cambridge University Press, Cambridge, 1998), v. 10.
- 4. G. Pruessner, *Self-Organised Criticality* (Cambridge University Press, 2012).
- 5. P. Bak, et al., Phys. Rev. Lett. 88 (17), 178501 (2002).
- 6. E. Altshuler, et al., Phys. Rev. Lett. **86** (24), 5490 (2001).
- R. O. Dendy and P. Helander, Phys. Rev. E 57 (3), 3641 (1998).
- 8. S. C. Chapman and N. W. Watkins, Plasma Physics and Controlled Fusion **51** (12), 124006 (2009).
- 9. A. T. Y. Lui, et al., Geophys. Res. Lett. 27 (7), 911 (2000).
- K. Sneppen, P. Bak, H. Flyvbjerg, and M. H. Jensen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5209 (1995).
- 11. S. J. Gould and N. Eldredge, Nature 366, 223 (1993).

- 12. S. Wright, Evolution 36, 427 (1982).
- S. A. Kauffman and S. Johnsen, J. Theor. Biol. 149, 467 (1991).
- 14. L. A. Van Valen, Evol. Theory 1, 1 (1973).
- 15. N. W. Watkins and M. P. Freeman, Science **320** (5874), 323 (2008).
- T.N. Starr. L. K. Picton, and J. W. Thornton, Nature 549 (7672), 409 (2017).
- 17. P. A. P. Moran, Math. Proc. Cambridge Philosoph. Soc. 54 (1), 60 (1958).
- K. F. Schulz and D. A. Grimes, Lancet **359** (9305), 515 (2002).
- D. Moher, S. Hopewell, K. F. Schulz, et al., Br. Med. J. 340, 869 (2010).
- 20. S. Wright, Genetics 16 (2), 97 (1931).
- 21. А. Л. Эфрос, Физика и геометрия беспорядка (Наука, М., 1982).
- 22. J. Balogh and B. G. Pittel, Random Struct. Alg., No. 1–2, 257 (2007).
- 23. C. McDiarmid, Math. Progr. Study, No. 13, 17 (1980).
- 24. H. L. Frisch and J. M. Hammersley, J. SIAM, No. 11, 894 (1963).
- 25. N. Fountoulakis, Internet Mathematics 4 (4), (2007).
- 26. A. E. Sidorova and V. A. Tverdislov, Moscow University Phys. Bull. 67 (2), 213 (2012).
- A. Sidorova, N. Levashova, A. Garaeva, and V. Tverdislov, Biosystems 193–194, 104 (2020).
- 28. N. L. Komarova, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 10789 (2014).
- 29. L. Wagstaff, G. Kolahgar, and E. Piddini, Trends Cell Biol. 23, 160 (2013).
- 30. В. Эбелинг, А. Энгель и Р. Файстель, *Физика про*цессов эволюции (Эдиториал УРСС, М., 2001).
- 31. M. Nei and Y. Imaizumi, Heredity 21, 183 (1966).
- 32. J. F. Crow and N. E. Morton, Evolution 9, 202 (1955).
- 33. T. Bäck, in Proc. 5<sup>th</sup> Int. Conf. on Genetic Algorithms (1993), pp. 2–8.
- 34. J. Hesser and R. Männer, in *Proc. Conf. "Parallel Problem Solving from Nature"* (1990), pp. 23–32.
- 35. B. Charlesworth, Nature Rev. Genet. **10** (3), 195 (2009).
- 36. V. Grant, *Organismic evolution* (H. Freeman and Co., San Francisco, 1977).
- 37. S. F. Levy, J. R. Blundell, S. Venkataram, et al., Nature **519**, 181 (2015). DOI: 10.1038/nature14279
- C. Prats, D. López, A. Giró, et al., J. Theor. Biol. 241, 939 (2006).
- 39. M. Lynch, et al., Nature Rev. Genet. 17 (11), 704 (2016).
- Н. Н. Калиткин и П. В. Карякин, Численные методы. Кн. 2. Методы математической физики (Академия, М., 2013).
- 41. M. J. McDonald, D. P. Rice, and M. M. Desai, Nature **531** (7593), 233 (2016).
- 42. J. M. Smith and J. Haigh, Genet. Res. 23 (1), 23 (1974).

- 43. M. J. Wiser, N. Ribeck, and R. E. Lenski, Science **342**, 1364 (2013).
- 44. H. Kesten, *Percolation Theory for Mathematicians* (Birkhauser, Boston, 1982).
- 45. A. Morrison, A. L. Johnson, L. H. Johnston, and A. Sugino, EMBO J. **12**, 1467 (1993).
- 46. H. T. Tran, D. A. Gordenin, and M. A. Resnick, Mol. Cell. Biol. **19**, 2000 (1999).
- 47. C. N. Greene and S. Jinks-Robertson, Genetics **159**, 65 (2001).
- 48. A. J. Herr, et al., PLoS Genetics 7 (10), el002282 (2011).

## A Model of Speciation Preconditions in the Notions of Percolation and Self-Organized Criticality Theories

## A.Ya. Garaeva, A.E. Sidorova, V.A. Tverdislov, and N.T. Levashova

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

The model is presented which describes features of the formation of the upper threshold of percolation selection lattice—a share of the fixed mutations, the excess accumulation of which lead to irreversible processes in the population. It is shown that a state of instability caused by a cooperative effect of interaction between mutant individuals and the formation of their clusters, evolves into a qualitatively new stable state—a new species or extinction of the population. Obtained results are confirmed by available in scientific literature experimental models for estimation of mutation rates in multicellular and unicellular eukaryotes. Models of random processes of the fixation of mutations which happen asexually and in sexually reproducing species are presented to describe the process of self-organized criticality. With the use of these models it is possible to estimate qualitatively the probability of occurrence of a new species.

Keywords: natural selection, self-organization, fluctuations, bifurcations, percolations, prohibitive and permitting mutations

## — БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 574.34:575.174.4

# ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ В ПОПУЛЯЦИОННОЙ БИОФИЗИКЕ

© 2020 г. Е.Я. Фрисман\*, О.Л. Жданова\*\*, Г.П. Неверова\*\*

\*Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, 679016, Биробиджан, ул. Шолом-Алейхема, 4 \*\*Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН, 690041, Владивосток, ул. Радио, 5

> *E-mail: axanka@iacp.dvo.ru* Поступила в редакцию 25.11.2019 г. После доработки 10.06.2020 г. Принята к публикации 16.06.2020 г.

Динамика численности популяции и изменение ее генетической структуры находятся в сложных причинно-следственных связях. В работе на простом модельном примере показано, что эволюционный процесс плотностно-независимого естественного отбора по приспособленностям, определяемым одним диаллельным локусом, может привести к изменению параметров роста популяции и связанной с этим смене динамических режимов ее численности. Обсуждаются возможные механизмы и направленность этих изменений. Результаты наглядно демонстрируют, что эволюционное изменение частот аллелей, сопровождающееся ростом средней приспособленности популяции, может привести к циклическим, квазипериодическим и хаотическим режимам динамики ее численности. Эффекты, наблюдаемые в рассматриваемых моделях, во многом появляются в силу простого объединения (суперпозиции) двух моделей: естественный отбор приводит к эволюционному росту приспособленности, а плотностное регулирование при увеличении репродуктивного потенциала приводит к известным бифуркациям, обеспечивающим различные колебания численности. Только теперь эти флуктуации появляются (и проявляются) в ходе генетической эволюции. Вместе с этим при объединении моделей появляются новые режимы, которые не наблюдались в каждой из моделей отдельно: колебания частот генов, связанные с мультирежимностью рассматриваемых систем и возникновением новых устойчивых аттракторов.

Ключевые слова: математическое моделирование, эволюция, естественный отбор, динамика популяции, ловушка бистабильности.

DOI: 10.31857/S0006302920050130

В 1798 г. Т. Мальтус опубликовал работу «Essay on the Principle of Population» («Опыт о законе народонаселения») [1], в которой привел обоснование модели, описывающей рост численности населения земли по геометрической прогрессии со знаменателем, названным впоследствии мальтузианским параметром. Эта работа не только послужила основой для многих демографических и мировоззренческих концепций, но и стимулировала развитие основополагающих биологических теорий.

Так, Ч. Дарвин приводит и подробно анализирует модель Мальтуса в первой части своей знаменитой книги: "On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life" («Происхождение видов путем естественного отбора, или сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь») [2], а затем использует ее в качестве одного из обоснований своей концепции естественного отбора. Создатели синтетической «генетической» теории эволюции Р. Фишер, С. Райт, Дж. Холдейн и С.С. Четвериков [3–6] фактически применяли модель Мальтуса, полагая мальтузианский параметр зависимым от генотипа, а основоположники теоретической экологии (динамической теории экосистем) П. Ферхюльст и В. Вольтерра (а также Г.Ф. Гаузе) [7–10] рассматривали модель Мальтуса, в которой этот параметр являлся функцией численности популяции (или нескольких численностей взаимодействующих популяций).

Таким образом, были сформулированы базовые концепции общей биологии, связанные с эволюцией популяций и динамикой экосистем. Однако полного синтеза экологических и генетических представлений и концепций нет до сих пор.

Вместе с тем уже в 60-е годы прошлого столетия появились представления о плотностно- и частотно-зависимых составляющих в действии естественного отбора [11, 12], а также о плотностно-независимых формах естественного отбора, действие которых в условиях экологического лимитирования способно вызвать изменение характера динамики численности популяций [13–16]. Работы в рамках эколого-генетического направления моделирования, рассматривающего взаимосвязанные изменения численности и генетической структуры популяции, позволили охарактеризовать действие эволюционных факторов, в первую очередь естественного отбора, на изменение генетической структуры, а соответственно и изменений характера динамики популяций, которые сталкиваются с естественным ограничением экологических ресурсов (т.е. находящихся под действием лимитирующих факторов окружающей среды) [17–22].

Даже простейшие модели лимитированных популяций, построенные на классических для математической биологии уравнениях Рикера, Смита-Фейгенбаума, Мэя-Хассела, демонстрируют удивительно сложную динамику [23, 24]. При этом важно учитывать, что большинство биологических популяций имеет ярко выраженную неоднородность, представленную возрастной или стадийной структурой. В популяционной экологии для описания динамики структурированных популяций широко используются матричные модели Лесли–Лефковича [25–28]. Все эффекты, связанные с плотностно-зависимой регуляцией роста популяции и наблюдающиеся в одномерных моделях неструктурированных популяций, отмечаются и в системах динамики структурированных популяций. Наиболее исследованными моделями, демонстрирующими разнообразные типы динамического поведения, являются двумерные системы рекуррентных уравнений или двумерные отображения, преимущественно описывающие динамику двухвозрастной популяции [29]. Такая структура характерна для организмов с небольшим временем жизни, включающим два-три периода размножения. Примерами могут служить мелкие млекопитающие (мышевидные грызуны, беличьи и т.п.), быстросозревающие рыбы (такие как корюшка, навага и др.), многие насекомые, двух- и трехлетние растения [30-33]. Именно мышевидные грызуны, быстросозревающие виды рыб и насекомые обладают сложной флуктуирующей динамикой и являются наиболее частыми объектами исследований в экспериментальной и яркими примерами в теоретической популяционной биологии.

В теоретических исследованиях двухвозрастных популяций неоднократно было показано, что увеличение репродуктивного потенциала и параметров, характеризующих выживаемость особей, проводит к усложнению динамики численности от стабильных режимов до нерегулярных колебаний [34–36]. Однако механизмы роста репродуктивного потенциала, как правило, не рассматривались. Вместе с тем можно предположить, что рост потенциальной плодовитости особей в природных популяциях происходит в процессе их эволюции под действием естественного отбора, а точнее, под действием плотностно-независимого естественного отбора, повышающего среднюю приспособленность популяции в соответствии с фундаментальной теоремой естественного отбора Р. Фишера. Если это так, то в процессе естественной эволюции природной популяции с выраженной сезонностью жизненного цикла должен происходить закономерный переход от равновесных режимов динамики численности к колебаниям и хаосу (псевдостохастическому поведению).

В данной работе мы на простом модельном примере рассмотрим, как эволюционный процесс естественного отбора по приспособленностям особей может привести к изменению параметров роста популяции и связанной с этим смене динамических режимов ее численности. Обсудим возможные механизмы и направленность этих изменений.

#### ХАРАКТЕР ДИНАМИКИ ЧИСЛЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ С НЕПЕРЕКРЫВАЮЩИМИСЯ ПОКОЛЕНИЯМИ

Для однолетних растений, многих видов насекомых, некоторых видов рыб, земноводных и пресмыкающихся каждая отдельная популяция представляет собой один возрастной класс, и смежные поколения такой популяции не перекрываются. Если условия среды меняются от поколения к поколению не очень сильно, то численность некоторого поколения будет определяться только численностью предыдущего поколения. Обозначив через N<sub>n</sub> численность n-го поколения, можно записать следующее детерминистическое уравнение, описывающее динамику численности такой одновозрастной популяции:  $N_{n+1} = F(N_n)$ . Простейший вид этого уравнения для  $F(N_n) = rN_n$  фактически является моделью Мальтуса, где *г* — некоторая постоянная (т.е. каждая особь оставляет в следующем поколении r потомков независимо от численности родительской популяции):

$$N_{n+1} = rN_n. \tag{1}$$

Решение этого уравнения представляет собой геометрическую прогрессию со знаменателем r и начальным членом  $N_0$ , что фактически идентично экспоненциальному росту численности популяции в отсутствие лимитирующих факторов.

Хорошо известно, что достаточно долгий экспоненциальный рост численности в природе никогда не наблюдается. Рано или поздно сказывается действие лимитирующих факторов, поэтому коэффициент *r* в уравнении (1) оказывается функцией численности. Положим r = af(N), где f(N) - функция, описывающая лимитирование,

и a — параметр, называемый репродуктивным потенциалом популяции и характеризующий скорость роста популяции в пустоту (т.е. f(N) выбирается так, чтобы выполнялось f(0) = 1). Теперь вместо уравнения (1) получаем:

$$N_{n+1} = a N_n f(N_n). \tag{2}$$

Именно такие модели исследовали А.П. Шапиро [23] и Р. Мэй [24]. Они показали, что динамика численности популяции, описываемая уравнением (2), может быть весьма сложной, если функция F(N) = aNf(N) убывает при больших N достаточно быстро (например, быстрее, чем  $1/N^2$ ). Рассмотрим кратко характер этой динамики.

Пусть N(a) – нетривиальное стационарное значение численности, т.е. решение уравнения N = F(N). При малых значениях коэффициента *а*  $(1 < a < a^0; F'(N(a^0)) = 0; 0 < F'(N(a)) < 1)$  каждое решение уравнения (2) ведет себя аналогично решению соответствующего дифференциального уравнения - его можно изобразить последовательностью точек (n, N(n)), лежащих на S-образной кривой в плоскости {n, N}. Каждая из таких последовательностей монотонно сходится к равновесному значению численности N(a). Однако при больших значениях коэффициента а динамическая картина существенно меняется. Так, при  $a^{0} < a < a^{*}(F'(N(a^{*}) = -1))$  решения уравнения (2) сходятся к равновесию N(a) уже не монотонно, а в виде затухающих колебаний.

При  $a > a^*$  (но  $a < a^{**}$ , см. ниже) решения уравнения (2) уже не сходятся к N(a) (если начальное значение не совпадало с N(a)), а дают картину устойчивых незатухающих колебаний. Потеря устойчивости равновесной точки N(a)при  $a = a^*$  сопровождается возникновением предельного цикла длины 2, который представляет собой единственное устойчивое решение уравнения (2) при  $a^* < a < a_1^*$ .

При  $a_1^* < a < a_2^*$  решения уравнения (2) сходятся к устойчивому предельному циклу длины 4, при  $a_2^* < a < a_3^* - \kappa$  предельному циклу длины 8 и т.д. Последовательность значений параметра  $a \{a_k^*\}$ , при которых происходит удвоение периода, удовлетворяет закону М. Фейгенбаума [37, 38].

Описанные изменения характера динамики численности, связанные с изменением параметра модели и заключающиеся в возникновении серии устойчивых циклических траекторий с длинами циклов, равными целым степеням числа 2, принято называть первой серией бифуркаций. Эта серия заканчивается при  $a = a^{**}$ , называемой «точкой накопления». Если параметр *а* превосходит точку накопления  $a^{**}$ , то появляются области его значений, в которых поведение численности популяции теряет сколько-нибудь регулярный

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



**Рис. 1.** Бифуркационная диаграмма, характеризующая предельные траектории уравнения  $x_{n+1} = ax_n(1 - x_n)$  в зависимости от величины коэффициента *a*.

характер и становится хаотическим. Однако зоны хаотического поведения численности перемежаются с «окнами» периодического, т.е. регулярного поведения. Отличить эти режимы можно, рассчитав значение показателя Ляпунова; при этом регулярной динамике соответствует отрицательный показатель, квазипериодическим режимам — нулевой, а хаосу — положительный [39].

Конкретизируя вид функции f(N), для уравнения (2) численно можно построить бифуркационную диаграмму, характеризующую предельные траектории в зависимости от величины коэффициента a (рис. 1). Хорошо изучены дискретный аналог модели Ферхюльста, для которого f(N) = 1 - kN, и модель, предложенная канадским ихтиологом У. Рикером, для которой  $f(N) = \exp(-kN)$ . При исследовании уравнения (2) обычно исключают масштабный параметр k и переходят к безразмерным переменным: «относительным» численностям x = kN. В этом случае дискретный аналог модели Ферхюльста имеет вид:  $x_{n+1} = ax_n(1-x_n)$ , а модель Рикера:  $x_{n+1} = ax_n\exp(-x_n)$ .

#### F-ОТБОР В ПОПУЛЯЦИИ С НЕПЕРЕКРЫВАЮЩИМИСЯ ПОКОЛЕНИЯМИ. ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРА ДИНАМИКИ ЧИСЛЕННОСТИ В ПРОЦЕССЕ ЭВОЛЮЦИИ ЛИМИТИРОВАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Мы рассматривали характер динамики численности при фиксированных значениях параметров. Однако эволюционный процесс и изменения в окружающей среде могут привести к изменению параметров конкретной популяции. Обсудим возможные механизмы и направленность этих изменений.

Одной из первых задач математической популяционной генетики, рассматриваемой Р. Фишером [3], С. Райтом [4] и Дж. Холдейном [5], оказался количественный анализ результатов действия отбора в изолированной популяции диплоидных организмов. Предполагалось, что популяция не лимитирована внешними ресурсами, и динамика ее численности не рассматривалась. Мы попытались перенести полученные в ходе решения той задачи результаты на лимитированные популяции и неожиданно обнаружили, что чисто количественные изменения генетической структуры приводят к существенным качественным изменениям динамики их численности.

Для понимания основных закономерностей эволюции динамического поведения численности лимитированной популяции ограничимся подробным рассмотрением простой модельной ситуации, когда все адаптивное разнообразие в популяции определяется одним диаллельным А локусом с аллеломорфами  $A_1$  и  $A_2$ , причем фенотип особи жестко определяется ее генотипом; популяция панмиктична, в ней действуют менделевские правила наследования, а смежные поколения особей не перекрываются. В этом случае действие отбора можно описать количественно, поставив в соответствие каждому из генотипических классов особей  $A_1A_1, A_1A_2,$ и  $A_2A_2$  по одному коэффициенту  $w_{11}, w_{12}$ и w<sub>22</sub> соответственно, называемому приспособленностью (fitness) особей данного генотипа. Будем считать, что *w<sub>ii</sub>* равно среднему числу потомков, произведенных одной особью данного генотипического класса и доживших до репродуктивного возраста (давших вклад в следующее поколение). Это определение приспособленности формально эквивалентно определению Р. Фишера [3, 40].

Несмотря на заведомое максимальное упрощение, моногенная модель отбора не является полностью оторванной от реальности. В качестве яркого примера можно привести моногенный характер наследования размера помета у песцов (*Alopex lagopus*). В работе [41] на основе комплексного сегрегационного анализа типа наследования размера приплода в расширенной генеалогии фермерских песцов было показано, что данный заведомо адаптивный (напрямую определяющий приспособленность) признак является аутосомным признаком, а его наследование можно описать в рамках моногенной модели с контролем малого размера приплода по рецессивному типу.

Перейдем теперь к математическому описанию процесса эволюции популяции. Введем следующие обозначения: q – частота гамет, несущих аллель  $A_1$ ; N – численность популяции. Сделанные предположения позволяют получить рекуррентные уравнения, связывающие значения этих переменных в смежных поколениях [40]:

$$\begin{cases} N_{n+1} = \overline{w}_n N_n \\ q_{n+1} = q_n (w_{11}q_n + w_{12}(1-q_n)) / \overline{w}_n \end{cases}$$
(3)

где *n* – номер поколения,

$$\overline{w}_n = w_{11}q_n^2 + 2w_{12}q_n(1-q_n) + w_{22}(1-q_n)^2$$

- средняя приспособленность популяции.

Пусть действие отбора не зависит от численности (плотности населения) популяции, однако будем учитывать влияние плотностно-зависимых факторов, лимитирующих рост популяции. Такое представление, по-видимому, вполне соответствует реальному действию отбора на те признаки, природная генотипическая изменчивость по которым никак не коррелирована с изменениями плотности в популяции. Подобным образом должны, по-видимому, отбираться многие физиологические мутации, влияющие на общую жизнеспособность. Можно привести опубликованные данные о плотностно-независимом поведении генетической структуры популяции. Например, Л.Д. Готлибом показано отсутствие какой-либо корреляции между изменениями численности и динамикой частот аллелей для трех (из пяти изученных) полиморфных белковых локусов в четырех сильно флуктуирующих популяциях степных полевок Microtus ochrogaster [13], М.С. Грайнесом обнаружена стабильность генетической структуры по пяти полиморфным ферментным локусам в географически изолированной популяции однолетнего растения Stephanomeria exigua (Compositae) [42]. Аллельные частоты этих локусов практически не изменились в течение четырех последовательных поколений несмотря на то, что численность популяции испытывала в этот период значительные изменения.

Это означает, что относительные приспособленности (отношения  $w_{ij}/w^*$ , где  $w_{ij}$  — приспособленность ij-го генотипа, а  $w^*$  — приспособленность одного из генотипов, принятая за эталон) не зависят от величины численности популяции, т.е. их можно считать константами. Если популяция находится под действием плотностно-зависимых лимитирующих факторов, то абсолютные приспособленности каждого генотипического класса должны зависеть от численности популяции:

$$w_{ij}(N) = a_{ij}f(N), \tag{4}$$

где f(N) — функция, характеризующая плотностную регуляцию численности, одинаковую для каждого генотипа,  $a_{ij}$  — коэффициенты, равные относительным генотипическим приспособленностям. Функцию f(N) мы будем считать монотонно убывающей с ростом численности, причем f(0) = 1. Такое действие отбора мы предлагаем называть F-отбором, подчеркивая этим тот факт, что отбор осуществляется при постоянных относительных приспособленностях (fitnesses). Легко видеть, что в случае F-отбора уравнения динамики (3) преобразуются к виду:

$$\begin{cases} N_{n+1} = a_n N_n f(N_n) \\ q_{n+1} = q_n (a_{11}q_n + a_{12}(1 - q_n)) / a_n \end{cases}$$
(5)

Уравнение для динамики численности (N) рассматриваемой популяции, находящейся под действием F-отбора, фактически может описываться моделями Рикера ( $f(N) = \exp(-bN)$ ), Ферхюльста (f(N) = 1 - kN) и др. Разница в том лишь,

что  $a_n$  зависит от n, это связано с тем, что  $a_n$  равно среднему значению относительных приспособленностей (*a<sub>ii</sub>*) в популяции в *n*-м поколении, т.е.

 $a_n = a_{11}q_n^2 + 2a_{12}q_n(1-q_n) + a_{22}(1-q_n)^2$ . Заметим, что без потери общности модель (5) может быть записана в относительных значениях численности:

подробнее на новых эффектах, связанных с нали-

чием плотностного лимитирования роста чис-

При движущем типе отбора относительная

$$x_{n+1} = a_n x_n f(x_n)$$

$$q_{n+1} = q_n (a_{11}q_n + a_{12}(1-q_n)) / (a_{11}q_n^2 + 2a_{12}q_n(1-q_n) + a_{22}(1-q_n)^2),$$
(5\*)

ленности популяции.

при этом в случае дискретного аналога модели Ферхюльста  $f(x_n) = 1 - x_n$ , а в случае модели Рике- $\operatorname{pa} - f(x_n) = \exp(-x_n).$ 

Уравнения, характеризующие изменение генетической структуры популяции, при F-отборе не зависят от ее численности и, следовательно, могут быть исследованы отдельно. Кроме того, они совпадают с точностью до обозначений с уравнением динамики генетической структуры нелимитированной популяции (3). Следовательно, здесь справедливо утверждение теоремы Фишера, доказанное для дискретного случая Кингманом [43]:  $a_{n+1} \ge a_n$ , т.е. среднее значение относительных приспособленностей a<sub>i</sub> может лишь возрастать в процессе эволюции, независимо от их конкретных значений и начального состояния популяции. Это означает, что репродуктивный потенциал лимитированной популяции возрастает в процессе эволюции так же, как средняя приспособленность свободной. Однако такой монотонный рост репродуктивного потенциала, вызванный динамикой генетической структуры, может привести к изменению характера динамического поведения численности даже однородной популяции и обусловить возникновение колебаний и нерегулярной динамики численности. Таким образом, в лимитированных популяциях с неперекрывающимися поколениями прогрессивное возрастание средней приспособленности может оказаться в диссонансе со стабильностью роста популяции. Этот факт находится в явном противоречии с интуитивным представлением об увеличении стабильности популяции с ростом ее средней приспособленности.

#### ТИПЫ ОТБОРА В ЛИМИТИРОВАННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

По аналогии с классической моделью нелимитированной популяции для модели (5) также можно выделить три типа естественного отбора в зависимости от соотношения репродуктивных потенциалов генотипов на основе анализа условий существования и устойчивости неподвижных точек рассматриваемых моделей. Остановимся

приспособленность гетерозиготы занимает промежуточное положение между приспособленностями гомозигот (min{ $a_{11}, a_{22}$ } <  $a_{12}$  < max{ $a_{11}, a_{12}$ } *a*<sub>22</sub>}). В этом случае в ходе эволюции популяции происходит вытеснение неоптимальных аллелей и средняя относительная приспособленность популяции монотонно увеличивается, стремясь к наибольшей приспособленности гомозигот. При этом, пока не произойдет полного вытеснения одного из аллелей, в популяции будет наблюдаться полиморфизм (т.е. будут присутствовать все три генотипа), но этот полиморфизм будет «переходящим» - он исчезнет с фиксацией аллеля, обеспечивающего большую относительную приспособленность. Действительно, в случае такого отбора система имеет только одно устойчивое мономорфное состояние, в котором и должна оказаться популяция вне зависимости от начальных условий. Однако при этом может существенно поменяться динамическое поведение численности популяций. Пока значение средней приспособленности невелико численность популяции будет стремиться к устойчивому равновесию, соответствующему этому значению. Однако если значение средней приспособленности перейдет через некоторое бифуркационное значение, то это может привести к возникновению колебаний численности, а при дальнейшем росте средней приспособленности – и к хаотическим режимам динамики численности мономорфной популяции

намического режима были использованы показатели Ляпунова ( $L_1, L_2$ ); в частности, регулярная динамика представлена на рис. 2г (оба показателя отрицательны:  $L_1 = -0.08, L_2 = -0.56$ ), хаосу соответствует один положительный показатель (рис. 2а  $(L_1 = 0.494, L_2 = -0.002)$ , рис. 2б  $(L_1 = 0.497, L_2 = -0.296)$ , рис. 2в  $(L_1 = 0.494,$  $L_2 = -0.72$ ), рис. 2д ( $L_1 = 0.362$ ,  $L_2 = -0.588$ )); квазипериодическим режимам — один нулевой и

(рис. 2). Отметим, что для идентификации типа ди-



**Рис. 2.** Динамика частоты аллеля  $A_1(q)$ , средней приспособленности (*a*) и относительной численности популяции (*x*), полученная по модели (5\*). Для панелей (a), (б) и (в): f(x) = 1 - x,  $a_{11} = 3.9$ ,  $a_{22} = 1.9$ ,  $q_0 = 0.01$ ,  $x_0 = 0.01$ . Панель (a) – аллель  $A_1$  доминантен,  $a_{12} = 3.9$ ; панель (б) – аллель  $A_1$  кодоминантен,  $a_{12} = 2.9$ ; панель (в) –аллель  $A_1$  рецессивен,  $a_{12} = 1.9$ . Панель (г):  $f(x) = \exp(-x)$ ,  $a_{11} = 14$ ,  $a_{12} = 8$ ,  $a_{22} = 2$ ,  $q_0 = 0.001$ ,  $x_0 = 1$ . Панель (д):  $f(x) = \exp(-x)$ ,  $a_{11} = 18$ ,  $a_{12} = 10$ ,  $a_{22} = 2$ ,  $q_0 = 0.001$ ,  $x_0 = 1$ .

один отрицательный показатель, а гиперхаосу – два положительных показателя [44].

Как видно на рис. 2а, появление нового доминантного аллеля, обеспечивающего большую приспособленность гомозиготы (и соответственно, гетерозиготы), приводит к весьма быстрой фиксации этого аллеля, быстрому росту средней приспособленности и быстрому переходу численности популяции от стабильного режима к нерегулярным колебаниям. Если появившийся аллель доминирует не полностью (гетерозигота имеет приспособленность промежуточную между



**Рис. 3.** Динамика частоты аллеля  $A_1(q)$ , средней приспособленности (*a*) и относительной численности популяции (*x*), полученная по модели (5\*) при сверхдоминировании:  $f(x) = \exp(-x)$ ,  $a_{11} = 10$ ,  $a_{12} = 30$ ,  $a_{22} = 2$ ,  $q_0 = 0,001$ ,  $x_0 = 1$ .

приспособленностями гомозигот), эти процессы идут заметно медленнее (рис 2б). Они идут совсем медленно, если появившийся аллель оказывается рецессивным: рост средней приспособленности и равновесного значения численности начинает проявляться где-то к сотому поколению (рис. 2в). По-видимому, реальная ситуация роста средней приспособленности оказывается еще более медленная и существенно менее регулярная. Редко возникающие положительные мутации могут обеспечивать очень небольшую прибавку приспособленности, и, следовательно, небольшое медленное увеличение равновесной численности популяции. Однако даже такой медленный рост средней приспособленности вполне может привести к тому, что она превзойдет некоторое бифуркационное значение и равновесная численность популяции окажется неустойчивой: возникнут популяционные колебания. Дальнейший рост приспособленности приведет к их усложнению и, возможно, скатыванию в хаотический режим динамики. Заметим, что, как видно на рис. 2г,д, последовательность описываемых процессов принципиально не зависит от конкретной модели плотностно-зависимого лимитирования роста численности популяции.

Сверхдоминирование или повышенная приспособленность гетерозигот ( $a_{12} > \max\{a_{11}, a_{22}\}$ ) всегда приводит к установлению сбалансированного полиморфизма: частота аллеля  $A_1$  стремится к нетривиальному равновесному значению

$$q^* = \frac{a_{21} - a_{22}}{2a_{21} - a_{11} - a_{22}},\tag{6}$$

и в популяции всегда присутствуют все три генотипа. При этом в популяции за счет отбора происходит монотонный рост средней приспособленности, а численность сначала стремится к более высокому значению равновесия, а потом, при переходе средней приспособленности через бифуркационное значение, начинает колебаться (рис. 3). Подчеркнем, что в случае свехдоминирования в популяции независимо от уровня числен-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

ности в предельных режимах всегда присутствуют все три генотипа в стабильных соотношениях.

При пониженной приспособленности гетерозиготы ( $a_{12} < \min\{a_{11}, a_{22}\}$ ) полиморфное равновесное значение частот аллей  $q^*$ , определяемое выражением (6), существует, но оказывается неустойчивым. Популяция стремится к одному из двух мономорфных состояний (q = 0 или q = 1), причем к какому именно – определяется начальными условиями. Если в начальный момент выполнено соотношение  $q_0 < q^*$ , то будет вытесняться аллель  $A_1$  и в итоге популяция окажется мономорфной по генотипу  $A_2A_2$  (q = 0), если  $q_0 > q^*$ , то будет вытесняться аллель  $A_2$  и в итоге популяция окажется мономорфной по генотипу  $A_1A_1$ . вне зависимости от соотношения величин приспособленностей  $a_{11}$  и  $a_{22}$  (рис. 4).

Таким образом, здесь возникает эффект, который можно назвать «ловушкой бистабильности». Этот эффект возникает только в случае, когда приспособленность гетерозиготы меньше приспособленности каждой из гомозигот и заключается в том, что более перспективная форма не может естественным образом вытеснить явно более слабого (по приспособленности) генетического конкурента.

Дело в том, что при низких значениях репродуктивного потенциала гетерозиготы популяция находится в режиме бистабильности, когда оба мономорфных состояния устойчивы и характеризуются своими областями притяжений. Если в некоторый «начальный» момент времени в мономорфной популяции появляется новый аллель, обеспечивающий большую приспособленность гомозиготы (но с пониженной приспособленностью гетерозиготы), то этот аллель никак не сможет закрепиться в популяции. Действительно, начальная концентрация нового аллеля (мутанта или мигранта) не может быть высокой, она близка нулю и заведомо меньше  $q^*$ . Именно поэтому текущие значения частот оказываются в бассейне притяжения исходного мономорфного равнове-



**Рис. 4.** Изменение частоты аллеля *A*<sub>1</sub> в модели (3) при пониженной относительной приспособленности гетерозигот и различных начальных условиях.

сия, и даже большое значение приспособленности гомозиготы по новому аллелю не способно привести к смещению частот в бассейн притяжения другого мономорфного равновесия с большой приспособленностью особей. Как результат, изменение режима динамики численности также не происходит: популяция остается стабильной по численности и мономорфной по генотипу с низким значением приспособленности.

Для выхода из описанной ловушки необходимо внешнее воздействие на популяцию. Падение численности популяции и связанные с этим случайные процессы (известные, как «прохождение через бутылочное горлышко») могут привести к флуктуации генетического состава и «перескоку» популяции из одного бассейна притяжения в другой (т.е. к случайному увеличению текущей частоты нового аллеля до величины, превышающей  $q^*$ ). А это уже приведет к прогрессивному росту средней относительной приспособленности, к росту численности, к росту равновесных значений численности и, возможно, к возникновению колебательных режимов при большой приспособленности.

Далее рассмотрим более сложные нелинейные модели динамики популяций с возрастной структурой и покажем, как влияет наличие возрастной структуры или стадийности развития на результаты действия естественного отбора.

#### ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ С ДВУМЯ СТАДИЯМИ РАЗВИТИЯ

Рассмотрим популяцию с возрастной структурой, которая к началу очередного сезона размножения может быть представлена совокупностью двух возрастных классов: младшего, включающего неполовозрелых особей, и старшего, состоящего из особей, участвующих в размножении. Обозначим через  $X_n$  численность младшего возрастного класса в *n*-й сезон размножения, а  $Y_n$  –

численность репродуктивной части популяции. Период размножения заканчивается появлением новорожденных особей следующего поколения. Будем предполагать, что времени, протекающего между двумя последовательными периодами размножения, достаточно для развития особей младшего возраста до половозрелого состояния, а новорожденных (или личинок) до состояния младшего возраста. Допустим, что выживаемость и репродуктивная способность половозрелых особей не зависит от их хронологического возраста. Это правомерно для организмов с небольшим временем жизни, включающим два-три периода размножения, как у многих насекомых, рыб, мелких млекопитающих, двух- и трехлетних растений и др. Можно записать следующую систему уравнений, описывающую относительные численности рассматриваемых возрастных групп в смежных поколениях:

$$\begin{cases} X_{n+1} = A(X_n, Y_n) Y_n \\ Y_{n+1} = B(X_n, Y_n) X_n + C(X_n, Y_n) Y_n \end{cases}$$
(7)

где *А* – рождаемость, *В* и *С* – выживаемости младшего и старшего возрастного классов соответственно.

Регуляция роста численности популяции пуплотностно-зависимого лимитирования тем рождаемости наблюдается у многих животных, особенно у мелких млекопитающих, когда рождаемость заметно снижается по мере увеличения численности популяции. Основным проявлением плотностно-зависимой регуляции рождаемости является стресс-синдром, приводящий к снижению половой активности и уменьшению плодовитости особей, вплоть до рассасывания части заложенных эмбрионов. В частности, это характерно для видов, подверженных сильным колебаниям численности, например леммингов, полевок и др. [30]. При моделировании динамики популяций таких видов выживаемости можно считать константами B(X,Y) = b, C(X,Y) = c, а рождаемость, по аналогии с моделью Рикера, можно записать в виде:  $A(X,Y) = r \exp(-\alpha X - \beta Y)$ , где  $r - \beta Y$ репродуктивный потенциал, α и β – коэффициенты, характеризующие интенсивности воздействия численностей (плотностей) неполовозрелого и половозрелого возрастного класса на уменьшение рождаемости. С учетом этого и после перехода к безразмерным переменным – относительным значениям численностей  $x = b\beta X$  и  $y = \beta Y -$ модель (7) может быть преобразована к виду:

$$\begin{cases} x_{n+1} = r \cdot y_n \cdot \exp(-\rho \cdot x_n - y_n) \\ y_{n+1} = x_n + c \cdot y_n \end{cases},$$
(8)

где параметр  $\rho = \alpha/(b\beta)$  характеризует относительный вклад младшей возрастной группы в лимитирование воспроизводства.

В работах [34, 35] проведено детальное исследование динамики численности двухвозрастной популяции, описываемой моделью (8), где показано, что падение рождаемости с ростом численности особей оказывается эффективным механизмом регуляции роста численности. Однако при больших потенциальных репродуктивных возможностях и большой выживаемости особей падение рождаемости с ростом численности особей может привести к потере устойчивости и возникновению колебаний численности, имеющих весьма сложную временную организацию.

В частности показано, что при относительно больших значениях параметра  $\rho$  ( $\rho \ge 1$ ), т.е. в случае, когда вклад в лимитирование рождаемости осуществляется преимущественно младшим возрастным классом, потеря устойчивости, как и в исходной одномерной модели Рикера, сопровождается появлением двухгодичных колебаний и их последующими бифуркациями по сценарию Фейгенбаума. При этом чем больше  $\rho$ , тем при более низком значении репродуктивного потенциала наблюдаются колебания.

При малых же значениях параметра  $\rho$ , т.е. в случае, когда лимитирование рождаемости осуществляется в основном численностью взрослых половозрелых особей, потеря устойчивости может произойти только при комплексно-сопряженных корнях характеристического уравнения, при переходе  $|\lambda|$  через 1, и сопровождается появлением предельных инвариантных кривых. Соответственно уменьшение рождаемости с ростом численности взрослых особей способно привести к возникновению достаточно сложно организованных колебаний численности. Именно этот механизм является, по-видимому, определяющим в поведении численности мелких млекопитающих, таких как лемминги и некоторые полевки [45].

Рассмотрим еще случай, когда регуляция роста численности популяции осуществляется путем плотностно-зависимого лимитирования выживаемости особей младшего возрастного класса. По аналогии с моделью Ферхюльста будем полагать B(X) = 1 - kX. Ситуация, когда выживаемость приплода в большей степени зависит от его собственной численности и практически (либо совсем) не зависит от величины половозрелой группы, широко распространена в природе. Так, у видов с выраженной стадийностью возрастные группы могут быть разделены географически и развиваются в разных условиях, не вступая в конкурентные отношения между собой. Примером могут служить многие виды рыб, которые, отложив икру, мигрируют в другие места, мальки же развиваются отдельно и присоединяются к основному стаду, лишь достигнув определенной стадии зрелости.

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

Рождаемость и выживаемость особей старшей возрастной группы в (7) будем считать константами: A(X,Y) = r и C(X,Y) = c. Перейдем далее от абсолютных численностей возрастных классов к относительным (x = kX, y = kY) и получим следующую систему уравнений, описывающую относительные численности рассматриваемых возрастных групп в смежных поколениях:

$$\begin{cases} x_{n+1} = ry_n \\ y_{n+1} = x_n(1 - x_n) + cy_n \end{cases},$$
(9)

где *r* — репродуктивный потенциал особей старшей возрастной группы, а *с* — их выживаемость на последующих годах жизни.

#### F-ОТБОР В ПОПУЛЯЦИИ С ДВУМЯ СТАДИЯМИ РАЗВИТИЯ

В случае, когда репродуктивный потенциал *г* определяется генетически одним адаптивным аутосомным диаллельным локусом, уравнения динамики численностей возрастных групп популяции преобразуются очевидным образом и к ним добавляются уравнения динамики частот генов, характеризующие изменение генетической структуры в ходе эволюции двухвозрастной популяции [36]. При плотностно-зависимом лимитировании рождаемости уравнения имеют следующий вид [46]:

$$\begin{cases} x_{n+1} = r_n y_n \exp(-\rho x_n - y_n) \\ y_{n+1} = x_n + c y_n \\ q_{n+1} = \frac{p_n (r_{11} p_n + r_{12} (1 - p_n))}{w_n}, \quad (10) \\ p_{n+1} = \frac{q_n x_n + c p_n y_n}{y_{n+1}} \end{cases}$$

а в случае лимитирования выживаемости младшего возрастного класса:

$$\begin{cases} x_{n+1} = r_n y_n \\ y_{n+1} = x_n (1 - x_n) + c y_n \\ q_{n+1} = \frac{p_n (r_{11} p_n + r_{12} (1 - p_n))}{r_n}, \\ p_{n+1} = \frac{x_n (1 - x_n) q_n + c y_n p_n}{y_{n+1}}, \end{cases}$$
(11)

где  $p_n$  и  $q_n$  – это частота аллеля  $A_1$  в старшем и младшем возрастном классах соответственно; параметры  $r_{11}$ ,  $r_{12}$  и  $r_{22}$  характеризуют репродуктивные потенциалы генотипов  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$  и  $A_2A_2$  старшего возрастного класса;  $r_n = r_{11}p_n^2 + 2r_{12}p_n(1-p_n) +$  $+ r_{22}(1-p_n)^2$  – средний репродуктивный потенциал.

В моделях (10, 11) на основе анализа условий существования и устойчивости неподвижных то-



**Рис. 5.** Динамика частот аллеля  $A_1$  и численностей возрастных классов, полученных по модели (10) при начальных условиях  $q_0 = p_0 = 0.05$ ,  $x_0 = y_0 = 1$ . Панель (a):  $\rho = 1.2$ ; c = 0.1,  $r_{11} = 28$ ,  $r_{12} = 15$ ,  $r_{22} = 2$ ; панель (б):  $\rho = 0.2$ , c = 0.1,  $r_{11} = 18$ ,  $r_{12} = 10$ ,  $r_{22} = 2$ .

чек также можно выделить три типа естественного отбора в зависимости от соотношения репродуктивных потенциалов генотипов. Остановимся подробнее на новых существенных эффектах, связанных с наличием возрастной структуры.

При движущем типе отбора репродуктивный потенциал гетерозиготы занимает промежуточное положение относительно репродуктивных потенциалов гомозигот (min{ $r_{11}$ ,  $r_{22}$ } <  $r_{12}$  <  $< \max\{r_{11}, r_{22}\}$ ) и происходит вытеснение неоптимальных аллелей с возникновением колебаний численности при достаточно высоком среднем репродуктивном потенциале популяции (рис. 5). В частности, при плотностно-зависимой регуляции рождаемости и при относительно больших значениях параметра ρ (ρ≥1) такая потеря устойчивости в модели (10) происходит, как показано на рис. 5а, подобно потери устойчивости в модели (5\*) и сопровождается появлением двухгодичных колебаний и их последующими усложнениями по сценарию Фейгенбаума (т.е. подобно динамике, приведенной на рис. 2д). При малых же значениях параметра р, т.е. в случае, когда уменьшение рождаемости происходит с ростом численности взрослых особей, в ходе эволюции популяции увеличение среднего репродуктивного потенциала популяции приводит к бифуркации Неймарка-Сакера и возникают достаточно сложно организованные колебания численности

(квазипериодические режимы) (рис. 5б), не наблюдающиеся в моделях популяций без возрастной структуры.

Сверхдоминирование или повышенный репродуктивный потенциал гетерозигот ( $r_{12} > \max\{r_{11}, r_{22}\}$ ) всегда приводит к установлению полиморфизма, при этом популяция за счет отбора достигает большего среднего репродуктивного потенциала, а численность, как и при движущем отборе, сначала стремится к более высокому значению равновесия, а потом начинает колебаться (рис. 6).

Более того, при сверхдоминировании в случае лимитирования выживаемости младшего возрастного класса, т.е. в модели (11), эволюционное увеличение среднего репродуктивного потенциала может не только вызвать колебания численности, но и привести к возникновению колебаний генетического состава.

Рассмотрим возможные сценарии динамики модели (11) при фиксированных значениях параметров (c = 0.8,  $r_{11} = 1.1$ ,  $r_{22} = 1.05$ ) и изменении параметра  $r_{12}$ . Если репродуктивный потенциал гетерозиготы  $r_{12}$  меняется в интервале от 1.1 до 1.736, то в популяции устанавливается устойчивый генетический полиморфизм, а численность достигает своего устойчивого равновесия. При переходе  $r_{12}$  через 1.736 происходит бифуркация



**Рис. 6.** Динамика системы (10) в случае сверхдоминирования при различном репродуктивном потенциале гетерозиготы:  $\rho = 0.2$ , c = 0.1,  $r_{11} = 10$ ,  $r_{12} = 25$ ,  $r_{22} = 3$ ,  $q_0 = p_0 = 0.05$ ,  $x_0 = y_0 = 1$ .

Неймарка—Сакера (пара комплексно-сопряженных собственных значений становятся больше единицы по модулю) и появляются флуктуации численности при постоянном генетическом составе.

При дальнейшем увеличении параметра  $r_{12}$ , примерно при  $r_{12} = 2.787$ , происходит новая бифуркация — появляется еще один устойчивый режим динамики: цикл длины 7 — устойчивые колебания как численности, так и генетического состава с периодом 7, которые сосуществуют с устойчивым стационарным состоянием генетического состава. Другими словами, при  $r_{12} > 2.787$ в модели (11) наблюдается бистабильность: из одних начальных условий популяция приходит к устойчивому полиморфному равновесию частот генов и колебаниям численности, из других — к устойчивым колебаниям как численностей, так и генетического состава (рис. 7).

С ростом  $r_{12}$  наблюдаемый цикл с периодом 7 быстро зашумляется, и динамика всех переменных, начинающихся в бассейне притяжения этого цикла, становится нерегулярной. Еще больший рост  $r_{12}$  приводит к мультистабильности. Помимо имеющихся аттракторов с устойчивым полиморфным равновесием генотипов и нерегулярной динамикой всех переменных появляется еще один цикл с периодом 7, сменяющийся цик-



**Рис.** 7. Два динамических режима (бистабильность) модели (11) при c = 0.8,  $r_{11} = 1.1$ ,  $r_{22} = 1.05$  и  $r_{12} = 2.7871$ . Из одних начальных условий (бассейн показан темно-серым цветом) популяция приходит к устойчивому полиморфному равновесию частот генов и колебаниям численности, из других (бассейн показан светло-серым цветом) — к устойчивым колебаниям, с периодом 7 как для численностей, так и для генетического состава.



**Рис. 8.** Два динамических режима модели (11) при c = 0.8,  $r_{11} = 1.1$ ,  $r_{22} = 1.05$  и  $r_{12} = 2.82$ . Из одних начальных условий (бассейн показан белым цветом) популяция приходит к устойчивым колебаниям с периодом 14 как численностей, так и генетического состава, из других (бассейн показан серым цветом) – к нерегулярным флуктуациям и численностей и частот аллелей.

лом с периодом 7, и бассейн притяжения этого цикла фактически захватывает почти все начальные условия, из которых популяция стремилась к устойчивому равновесию генетического состава при флуктуирующей численности (рис. 8). Таким образом, в зависимости от начальных условий в популяции фактически устанавливаются либо устойчивые периодические колебания, либо апериодические колебания как численности, так и генетического состава.

При пониженной приспособленности гетерози*готы* ( $r_{12} < \min\{r_{11}, r_{22}\}$ ) оба мономорфных состояния могут быть устойчивы, и система окажется в одном из них в зависимости от начальных условий. При этом если в популяции без возрастной структуры зависимость от начальных условий выглядит предельно просто: при  $q_0 \leq q^*$  она достигнет равновесия (q = 0), при  $q_0 > q^* - q = 1$  (рис. 4), то модели структурированных популяций уже имеют весьма сложно очерченную область притяжения соответствующих мономорфных равновесий (рис. 9). Следовательно, результат отбора в лимитированной популяции зависит не только от начальной частоты рассматриваемого аллеля в популяции, но и от численности и ее возрастного состава.

Здесь также возникает эффект «ловушки бистабильности», который заключается в том, что более перспективная форма не может естественным образом вытеснить явно более слабого по репродуктивным показателям генетического конкурента.

Вместе с тем при пониженной приспособленности гетерозигот в моделях с возрастной структурой наряду с выявленной и хорошо понятной бистабильностью, связанной с устойчивостью двух мономорфных состояний, несколько неожиданно обнаруживается еще один – третий устойчивый динамический режим. Этот режим оказывается возможен при низких значениях коэффициента выживания взрослых половозрелых особей и заключается в циклических колебаниях генетической структуры, при которых в четные годы в популяции преобладает один из аллелей, а в нечетные годы другой (рис. 10). Наличие такого режима означает возможность устойчивой первичной генетической дивергенции (дифференциации) особей разных поколений. Выявленный периодический режим реализуется при определенных начальных условиях, т.е. имеет свой бассейн притяжения, и тем более выражен, чем больше изоляция между поколениями, т.е чем меньше половозрелых особей выживает. В качестве край-

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ



**Рис. 9.** Бассейны притяжения мономорфных равновесий модели (11) в области бистабильности. Белые области соответствуют областям притяжения мономорфного решения  $\bar{q} = 0$ ,  $\bar{p} = 0$ , а черные –  $\bar{q} = 1$ ,  $\bar{p} = 1$ . Значения параметров: панель (а) –  $r_{22} = 5$ , панель (б) –  $r_{22} = 3$ ,  $r_{11} = 5$ ,  $r_{12} = 2$ , c = 0.2,  $\rho = 0.2$ .

него примера проявления этого режима динамики (при полной изоляции между поколениями) можно отметить выраженную аллозимную дифференциацию популяций тихоокеанской горбуши (Oncorhynchus gorbuscha), вида, нерестующего на втором году жизни. Благодаря этой особенности в одной реке размножаются особи четных и нечетных генераций, между которыми существует жесткая репродуктивная изоляция. В результате две субпопуляции четных и нечетных лет порождают двухлетний цикл. На основе данных об аллозимной изменчивости было показано наличие заметных генетических различий между поколениями четных и нечетных лет, которые и демонстрируют выявленный эффект генетической дифференциации [47, 48]. Таким образом, мы видим, что наряду с известными и ожидаемыми режимами эволюционной динамики в рамках даже простейших моделей отбора проявляются новые и интересные эффекты, требующие дальнейшего исследования и осмысления.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Колебания численности и хаотические режимы популяционной динамики в рассматриваемых моделях в большой степени связаны с дискретным представлением времени. Такое представление времени связано с биологическими особенностями видов, динамика популяций которых рассматривается в данной работе. Предполагается, что эти виды имеют выраженный временной цикл развития (например, годовой) с

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

фиксированным периодом размножения. Постоянство параметров модели означает, что к началу следующего периода популяция оказывается в тех же условиях окружающей среды, которые были и в начале предыдущего. Другими словами, все потребляемые популяцией ресурсы успевают полностью восстановиться. Полученным на моделях с дискретным временем трансформациям режимов динамики при изменении параметров модели можно дать следующую содержательную интерпретацию. Численность популяций видов с небольшим репродуктивным потенциалом (небольшой средней приспособленностью) успевает монотонно перейти в равновесие, которое обеспечивается существующими условиями среды. Для видов с несколько бо́льшим репродуктивным потенциалом такой переход происходит в виде затухающих колебаний. Виды с большим репродуктивным потенциалом при численности популяции вблизи равновесия дают слишком большое количество приплода, которое подрывает ресурсную базу, и численность падает. Возникают незатухающие осцилляции. Интуитивно казалось, что естественный отбор должен приводить к тому, чтобы виды как можно полнее использовали имеющие ресурсы жизнедеятельности и давали большую равновесную численность при заданных параметрах экологической ниши. Фактически так и происходит, но оказывается, что рост равновесной численности в конечном итоге приводит к потере ее устойчивости. Особи начинают давать слишком много потомства, и популяция переска-



**Рис.** 10. Три устойчивых динамических режима (и бассейны их притяжений) модели (11) при пониженной приспособленности гетерозигот. При одних начальных условиях (бассейн показан белым) в популяции устанавливается мономорфизм  $\bar{q} = 0$ ,  $\bar{p} = 0$ , при других (бассейн показан черным цветом) – мономорфизм  $\bar{q} = 1$ ,  $\bar{p} = 1$ , а при третьих (бассейн показан серым цветом) – устанавливаются устойчивые колебания частот генов с периодом, равным двум, причем во всех трех случаях численность популяции стремится к устойчивому равновесному уровню.

кивает равновесное состояние со всеми вытекающими последствиями.

В работе развита концепция плотностно-независимого отбора в экологически лимитированных популяциях (F-отбора). Показано, что результаты такого отбора не отличаются от результатов отбора по «фишеровским» приспособленностям в свободно размножающихся популяциях. Плотностное лимитирование приводит к тому, что при достижении больших средних репродуктивных потенциалов популяций их равновесная численность теряет устойчивость и возникают колебания. При этом генетическая структура определяется соотношением приспособленностей. Наличие возрастной структуры обеспечивает возможность двух сценариев: известный из одномерных моделей сценарий Фейгенбаума, приводящий к «пилообразным» колебаниям численности, весьма редко встречающимся в природе, и сценарий рождения инвариантной кривой (аналог предельного цикла), приводящий к более-менее плавной модельной цикличности, похожей на то, что часто наблюдается в природе. Эффекты, полученные в наших моделях, во многом являются простым объединением (суперпозицией) эффектов двух моделей: естественный отбор приводит к эволюционному росту приспособленности (здесь к ро-

сту репродуктивного потенциала), а плотностное регулирование при увеличении репродуктивного потенциала приводит к известным бифуркациям, обеспечивающим устойчивые различные флуктуации численности. Только теперь эти флуктуации появляются (и проявляются) в ходе генетической эволюции.

Принципиально новое и, по-видимому, самое интересное это то, что здесь обнаружилось возникновение устойчивых колебаний не только численности, но и частот генов. Вообще-то F-отбор не является плотностно-зависимым отбором: репродуктивные потенциалы генотипов являются константами и не зависят ни от уровня численности, ни от уровня плотности. Ожидалось, что F-отбор вызовет монотонное изменению частот. но при этом может привести и к изменению динамического режима популяции и создать условия для r- и K-отбора. Но оказалось, что в рамках только F-отбора возможны бифуркации, которые приводят к возникновению устойчивых колебаний частот аллелей. При этом уже нарушается принцип простого объединения (суперпозиции) результатов двух моделей: плотностно-независимого естественного отбора и плотностно-зависимой регуляции роста численности; появляются режимы, которые не наблюдались отдельно в каждой из моделей: на фоне колебания численности возникают колебания частот генов, связанные с мультирежимностью рассматриваемых систем.

Флюктуации колебаний численности характерны для подавляющего большинства природных популяций биологических видов, имеющих высокий репродуктивный потенциал и сезонный режим жизненного цикла: насекомые, многие короткоцикличные виды рыб, многие мелкие млекопитающие и т.д. Причины этих колебаний были, есть и будут объектом многих версий и дискуссий. Но их существование не вызывает сомнений.

Проведенное исследование показывает, что теоретически эти флуктуации изначально вполне могли возникнуть в ходе эволюционного процесса в экологически лимитированных популяциях в результате независимого от плотности населения естественного отбора в случаях, когда рост приспособленности приводит к тому, что интенсивное воспроизводство популяции не позволяет ей перейти к устойчивому равновесию.

Выявление хаотических режимов динамики в реальных популяциях крайне сложная задача. Прежде всего, нужны длинные ряды наблюдений, по которым можно было бы надежно рассчитать показатели хаотичности (например, показатели Ляпунова). Конечно, всегда остаются сомнения, как в надежности показателей, так и в причинах хаотизации в каждом конкретном случае. Нередко в динамике природных популяций выявляются квазипериодические режимы. Природа этой квазипериодики чаще всего вызывает дискуссию и, как правило, объявляется «зашумленной» периодичностью. Вместе с тем при учете возрастной структуры квазипериодические режимы появляются в детерминированной модели при вполне естественных значениях параметров, характерных для популяций многих видов, обладающих возрастной структурой и стадийностью развития. Такие режимы наблюдаются в моделях в случаях, когда экологическое лимитирование осуществляется путем уменьшения рождаемости с ростом численности половозрелых особей или путем уменьшения выживаемости молоди с ростом численности молоди. Эти виды регуляции популяционного роста весьма распространены в природе и именно при такой регуляции чаще всего наблюдаются квазипериодические режимы динамики численности.

Дальнейший рост средней приспособленности теоретически может вызвать как возникновение хаотических режимов, так и увеличение амплитуды квазипериодических колебаний, что, в свою очередь, может привести к достижению столь малых значений численности, при которых детерминистическое описание оказывается недостаточно адекватно. При вероятностном (стохастическом) описании процесса динамики экологически лимитированных популяций учениками А.А. Ляпунова Ю.Г Каревым и С.А. Терсковым было показано, что однородные лимитированные популяции обречены на вымирание [49]. Заметим, что большинство существовавших в природе популяций вымерло, и многие существующие обречены на вымирание. Вместе с тем в весьма изящном исследовании, выполненном учениками В.А. Ратнера М.А. Коростышевским и М.Р. Штабным, было показано, что необходимыми условиями, требуемыми для «невымирания» популяции, являются, в частности, процессы, обеспечивающие выполнение триады Ч. Дарвина – изменчивости, наследственности и естественного отбора [50, 51].

В наших моделях наследственность и естественный отбор присутствуют, а изменчивость неявно предполагается в виде мутаций, обеспечивающих начальное распределение генотипов. Вместе с тем, поскольку численность популяции в модельных расчетах может падать до весьма низких значений, возможность вырождения остается. Долгое успешное существование природных флуктуирующих популяций можно объяснить в частности следующими соображениями. Как показано в данной работе, плотностно-независимый отбор (F-отбор) в лимитированных популяциях увеличивает среднюю приспособленность особей, увеличивает равновесную численность и вначале увеличивает среднее время жизни (до вырождения) популяции, но затем приводит к

флуктуациям численности и росту вероятности вырождения. Однако возникновение и наличие флуктуаций само по себе становится новой ареной для действия отбора. В результате мутаций появляются новые генотипы, чувствительные к уровню плотности и дающие преимущества их обладателям либо в фазах роста, либо в фазах падения численностей. Колебания частот этих генотипов синхронизируются с колебаниями численности, а затем регуляризируют и сглаживают эти колебания. Это позволяет либо сильно увеличить время жизни популяции, либо вообще избежать процесса вырождения. Принципиальным здесь является то, что рост средней приспособленности, вызванный плотностно-независимым отбором, может оказаться причиной возникновения колебаний, которые, уже в свою очередь, могут привести к плотностно-зависимому отбору и процессам регуляризации. Другими словами, плотностно-зависимый отбор может быть полезным следствием и модификатором возникших колебаний численности, но не их причиной.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные ранее исследования нелинейных моделей динамики популяций с возрастной структурой показали, что увеличение средней индивидуальной приспособленности приводит к колебаниям численности, а затем к возникновению хаотических аттракторов, структура и размерность которых меняются при изменении параметров модели. В частности, увеличение рождаемости и уменьшение смертности возрастных групп приводят к усложнению структуры аттракторов и росту фрактальной размерности [33–36].

Здесь мы обобщили все результаты, свидетельствующие о том, что перечисленные типы динамики численности могли бы последовательно возникать в эволюции лимитированной популяции под действием плотностно-независимого естественного отбора, повышающего среднюю приспособленность популяции в соответствии с фундаментальной теоремой естественного отбора Р. Фишера. Эффект совокупного одновременного взаимодействия плотностно-независимого отбора и плотностно-зависимых неселективных экологических лимитирующих факторов, назван нами F-отбором.

Показано, что результаты F-отбора в экологически лимированных популяциях не отличаются от результатов отбора по «фишеровским» приспособленностям в свободно размножающихся популяциях: промежуточные значения приспособленностей гетерозигот, относительно припособленностей гомозигот (движущий отбор), приводят к установлению мономорфизма по аллелям, обеспечивающим больший репродуктивный потенциал; сверхдоминирование приводит к устойчивому полиморфизму; пониженная относительная приспособленность гетерозигот приводит к бистабильности мономорфных состояний.

Плотностное лимитирование приводит к тому, что при достижении больших средних репродуктивных потенциалов популяций их равновесная численность теряет устойчивость и возникают колебания. При этом генетическая структура определяется соотношением приспособленностей: при движущем отборе — мономорфизм, при сверхдоминировании — полиморфизм, при пониженном репродуктивном потенциале гетерозигот — ловушка бистабильности.

Наличие возрастной структуры обеспечивает возможность двух сценариев: известный из одномерных моделей сценарий Фейгенбаума, приводящий к «пилообразным» модельным колебаниям численности, весьма редко встречающимся в природе, и сценарий рождения инвариантной кривой (аналог предельного цикла), приводящий к более-менее плавной модельной циклике, похожей на то, что часто наблюдается в природе.

Эффекты, наблюдаемые в наших моделях, во многом появляются в силу простого объединения (суперпозиции) двух моделей: естественный отбор приводит к эволюционному росту приспособленности (здесь к росту репродуктивного потенциала), а плотностное регулирование при увеличении репродуктивного потенциала приводит к известным бифуркациям, обеспечивающим различные флуктуации численности. Только теперь эти флуктуации появляются (и проявляются) в ходе генетической эволюции.

Принципиально новое и, по-видимому, самое интересное это то, что здесь обнаружилось возникновение устойчивых колебаний не только численности, но и частот генов. Вообще-то F-отбор не является плотностно-зависимым отбором: репродуктивные потенциалы генотипов являются константами и не зависят от уровня численности. Ожидалось, что F-отбор вызовет монотонное изменение частот, но при этом может привести и к изменению динамического режима популяции и создать условия для г- и K-отбора. Но оказалось, что в рамках F-отбора возможны бифуркации, которые приводят к возникновению устойчивых колебаний частот аллелей.

При этом нарушается принцип простого объединения (суперпозиции) результатов двух моделей: плотностно-независимого естественного отбора и плотностно-зависимой регуляции роста численности; появляются режимы, которые не наблюдались отдельно в каждой из моделей: колебания частот генов, связанные с мультирежимностью рассматриваемых систем, которая возникает в результате бифуркационного появления новых устойчивых аттракторов.

Другой парадокс F-отбора заключается в том, что он, будучи независимым от плотности, приводит к колебаниям и хаотическим режимам динамики численности, которые создают условия для плотностно-зависимого отбора, такого как rи K-отбор.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственных заданий Института автоматики и процессов управления ДВО РАН и Института комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-00073а).

#### 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. T. R. Malthus, *The works of Thomas Robert Malthus* (Pickering & Chatto Publishers, London, 1986).
- 2. C. Darwin, On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life (Oxford University Press, H. Milford, 1859).
- R. A. Fisher, *The genetical theory of natural selection* (Clarendon Press, Oxford, 1930.
- 4. S. Wright, J. Hered. 21, 340 (1930).
- 5. J. B. S. Haldane, *The causes of evolution* (Longman Green, London, 1932).
- С. С. Четвериков, О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики (Госиздат., 1926).
- 7. P. F. Verhulst, Nouv. Mem. Acad. Roy. Soc. Bellelettr. Bruxelles 18, 1 (1845).
- В. Вольтерра, Математическая теория борьбы за существование (Наука, М., 1976).
- 9. Г. Ф. Гаузе, Зоол. журн. 14 (2), 243 (1935).
- Г. Ф. Гаузе, в кн. Экология и эволюционная теория (Наука, Л, 1984), сс. 5–105.
- 11. L. C. Birch, Evolution 9, 389 (1955).
- 12. B. Charlesworth, Ecology 52, 469 (1971).
- 13. L. D. Gottlieb, Genetics 76 (3), 551 (1974).
- M. S. Gaines, Jr, L. R. McClenaghan, and R. K. Rose, Evolution 32 (4), 723 (1978).
- Е. Я. Фрисман, Первичная генетическая дивергенция (теоретический анализ и моделирование) (ДВНЦ АН СССР, Владивосток, 1986).
- 16. Е. Я. Фрисман, Вестн. ДВО РАН 4, 97 (1995).

- 17. I. Hanski, *Metapopulation ecology* (Oxford University Press, N.Y., 1999).
- В. И. Евсиков, Г. Г. Назарова и В. Г. Рогов, Сибирский экологич. журн. 1, 59 (1999).
- Г. В. Гречаный, А. Я. Никитин, В. М. Корзун и др., Эколого-генетическая детерминация динамики численности популяций (ФГБОУ ВО «ИГУ», Иркутск, 2004).
- В. С. Артамонова и А. А. Махров, Генетика 42 (3), 310 (2006).
- U. Dieckmann and J. A. J. Metz, Theor. Popul. Biol. 69 (3), 263 (2006).
- 22. M. Traykov and I. Trenchev, Rus. J. Genet., **52** (9), 985 (2016).
- 23. А. П. Шапиро, Управление и информация **3**, 96 (1972).
- 24. R. M. May, J. Theor. Biol. 51 (2), 511 (1975).
- 25. P. H. Leslie, Biometrika 33 (3), 183 (1945).
- 26. P. H. Leslie, Biometrica 35 (3/4), 213 (1948).
- 27. L. P. Lefkovitch, Biometrics 21 (1), 1 (1965).
- 28. H. Caswell, *Matrix Population Models: Construction, Analysis, and Interpretation* (Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 2001).
- 29. Е. Я. Фрисман, М. П. Кулаков, О. Л. Ревуцкая и др., Компьютерные исследования и моделирование **11** (1), 119 (2019).
- 30. Р. Дажо, Основы экологии (Прогресс, М., 1975).
- Ю. М. Свирежев и Д. О. Логофет, Устойчивость биологических сообществ (Наука, М., 1978).
- 32. Е. Я. Фрисман, С. П. Луппов, И. Н. Скокова и др., в кн. Математические исследования в популяционной экологии (ДВО АН СССР, Владивосток, 1988), сс. 4–18.
- Е. Я. Фрисман и Е. И. Скалецкая, Обозрение прикладной и промышленной математики 1 (6), 988 (1994).
- 34. E. Ya. Frisman, G. P. Neverova, and O. L. Revutskaya, Ecol. Model. **222**, 1943 (2011).
- Е. Я. Фрисман, Г. П. Неверова, О. Л. Ревуцкая и др., Изв. вузов. Прикладная нелинейная динамика 18 (2), 111 (2010).
- Е. Я. Фрисман и О. Л. Жданова, Генетика 45 (9), 1277 (2009).
- 37. M. J. Feigenbaum, J. Stat. Phys. 19 (1), 25 (1978).
- М. Фейгенбаум, Успехи физ. наук 141 (10), 343 (1983).
- 39. С. П. Кузнецов, *Динамический хаос* (Физматлит, М., 2006).
- В. А. Ратнер, Математическая популяционная генетика (Наука, Новосибирск, 1977).
- 41. T. I. Axenovich, I. V. Zorkoltseva, I. R. Akberdin, et al., Heredity **98**, 99 (2007).
- 42. M. S. Graines, L. R. McClenaghay, and R. R. Rose, Evolution **32** (4), 723 (1978).
- 43. J. F. C. Kingman, Proc. Can. Phill. Soc. 57, 574 (1961).
- 44. А. П. Кузнецов, С. П. Кузнецов, М. В. Поздняков и др., Нелинейная динамика **8** (3), 461 (2012).
- 45. Ф. Б. Чернявский и А. Н. Лазуткин, Циклы леммингов и полевок на Севере (ИБПС ДВО РАН, Магадан, 2004).

- 46. Г. П. Неверова, О. Л. Жданова и Е. Я. Фрисман, Генетика **56** (6), 714 (2020).
- 47. С. П. Пустовойт, Вавиловский журн. генетики и селекции **15** (3), 475 (2011).
- 48. С. П. Пустовойт, Изв. ТИНРО 188, 162 (2017).
- 49. Г. П. Карев, А. А. Ляпунов и С. А. Тресков, в кн. Современные проблемы эволюции, под ред. Н. Н. Во-

ронцова (Наука, Сибирское отделение, Новосибирск, 1975), сс. 5–10.

- М. А. Коростышевский, М. Р. Штабной и В. А. Ратнер, в кн. Вопросы математической генетики (ИЦиГ СО АН СССР, Новосибирск, 1974), сс. 5–32.
- 51. M. A. Korostyshevsky, M. R. Shtabnoy and V. A. Ratner, J. Theor. Biol. **48**, 85 (1974).

## **Ecological and Genetic Models in Population Biophysics**

## E.Ya. Frisman\*, O.L. Zhdanova\*\*, and G.P. Neverova\*\*

\*Institute for Complex Analysis of Regional Problems, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Sholom-Aleikhema 4, Birobidzhan, 679016 Russia

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

There are complex causal relationships between population dynamics and a change in population genetic structure. In our study a simple model was used to show that the evolutionary process of density-independent natural selection depending on the fitnesses determined by a single diallelic locus could lead to a change in population growth parameters changing the dynamic modes in population. Possible mechanisms and direction of these changes are discussed. Results obtained clearly demonstrate the evolutionary change of allele frequencies accompanied by an increase in the average fitness in the population that may result in appearance of periodic, quasiperiodic and chaotic modes of population dynamics. The effects observed in our models are largely due to the simple combination (superposition) of the two models: natural selection leads to an evolutionary increase in the fitness, and density regulation number. At that in eco-evolutional models, these fluctuations appear (and progress) due to genetic evolution. At the same time, combined models give appearance of new dynamic modes that were not observed in each of the separate models, i.e. fluctuations in gene frequencies associated with the multi-modality of the considered systems and the emergence of new stable attractors.

Keywords: mathematical modeling, evolution, natural selection, population dynamics, bistability of trapping positionkl

## === БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 577.3

# ДИНАМИКА СИСТЕМЫ «ХИЩНИК–ЖЕРТВА» СО СТАДНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ В ОБОИХ СЛУЧАЯХ И СИЛЬНЫМ ЭФФЕКТОМ ОЛЛИ У ЖЕРТВЫ

#### © 2020 г. С. Бисвас\*, Д. Пал\*\*, Г.С. Махапатра\*, Г.П. Саманта\*\*\*

\*Отдел математики Национального технологического института Пудучерри, Караикал-609609, Индия \*\*Средняя школа Чандрахати Дилипа Кумара (Х.С.), Чандрахати, Западная Бенгалия, 712504, Индия \*\*\*Отдел математики Индийского института инженерных наук и технологий, Шибпур, Хора-711103, Индия

> E-mail: biswassoumen84@gmail.com Поступила в редакцию 11.03.2020 г. После доработки 11.03.2020 г. Принята к публикации 08.05.2020 г.

Работа посвящена динамике хищника и жертвы, когда и жертва, и хищник демонстрируют стадное поведение. Положительность, ограниченность, некоторые критерии вымирания, устойчивость возможных точек равновесия обсуждаются в инновационном подходе, в связи с некоторым глобальным поведением. Для пояснения аналитических дискуссий представлены результаты численного моделирования. Биологические последствия аналитических и численных результатов с целью поддержания экологического баланса в природе обсуждаются отдельно. Представлены возможности будущих исследований по этой теме.

Ключевые слова: хищник—жертва, стадное поведение, эффект Олли, вымирание, устойчивость. **DOI:** 10.31857/S0006302920050142

Моделирование двумерных динамических систем является широко обсуждаемой концепцией в различных сферах экологии в наше время. Все исследования популяционных моделей прошлого столетия исходили в основном из модели Лотки-Вольтерра [1-4], тогда как были предложены и некоторые другие возможные динамики, кроме классического предположения о квадратичных взаимодействиях. Прежде всего, мы можем назвать систему Холлинга-Танера [5-7], зависимую от соотношения численностей RD-модель [8, 9], и функциональные реакции Холлинга типа II и типа III [1, 2, 10]. Последние, однако, требуют большего изучения и обсуждения [11-13], чтобы быть обоснованными должным образом. Более того, квадратичные взаимодействия, основанные на законе действующих масс, используются даже сегодня в более сложной модели пищевой цепи [14].

В нашей настоящей статье мы рассматриваем систему двух популяций по-другому, используя в некоторых случаях подходящие допущения для обсуждения различного динамического поведения. Важнейшими компонентами любой модели являются выбор функции роста жертвы и функциональный ответ хищника. Концепция групповой защиты с подходящими предположениями о форме и типе функциональных реакций жертвы была подробно обсуждена в работе [15]. Здесь мы будем использовать функцию роста и соответствующее уравнение роста, использованное авторами в работах [16—19]. Уравнение роста описывается выражением

$$\frac{dM}{dT} = \alpha M \left( 1 - \frac{M}{K} \right), \tag{1.1}$$

где M(T) обозначает плотность населения в момент времени  $T, \alpha$  – собственная скорость роста на душу населения, а К – несущая способность окружающей среды. Можно отметить, что темп роста на душу населения является уменьшающейся функцией размера населения и достигает нуля в насыщенной фазе, когда население достигает размера К. Из-за ограниченности ресурсов, таких как еда, пространство и основные питательные вещества, каждая популяция растет к насыщенной фазе и не может расти дальше. Любая популяция, достигшая размера выше К, получит отрицательный темп роста. Исследователи обнаружили много доказательств в реальных жизненных ситуациях, когда у роста населения наблюдается обратная тенденция при низкой плотности населения [20-25], явление положительной зависимости плотности прироста населения при низкой плотности известно как эффект Олли [23-26]. Эффект Олли обуславливают проблема адаптации к окружающей среде, снижение оборонительной бдительности, трудности в поиске партнера, снижение защиты от хищников и многие другие причины [20–23]. Вот почему эффект Олли можно разделить на два разных типа в зависимости от скорости снижения темпов роста на душу населения при низкой плотности населения: сильный эффект Олли [27–30] (или критическая диспенсация [31–33]) и слабый эффект Олли [26, 34] (или некритическая диспенсация [31–34]). Моделирование эффекта Олли обычно представляется уравнением роста следующего вида

$$\frac{dM}{dT} = \alpha M \left( 1 - \frac{M}{K} \right) \left( \frac{M}{K_0} - 1 \right), \qquad (1.2)$$

где M(T) – плотность населения в момент времени T, K – несущая способность среды,  $\alpha$  – собственная скорость роста на душу населения, и  $0 < K_0 << K$ . Условия, при которых значение  $K_0$  является положительным и размер популяции ниже порогового уровня  $K_0$ , показывают, что темпы прироста населения уменьшаются и исчезают [27, 35–37]. Здесь был использован сильный эффект Олли, хотя описание слабого эффекта Олли также доступно [29, 38]. Показав аддитивный эффект Олли, упомянем другую форму функции роста, которую можно найти в работах [39, 40]. Также можно найти сравнение между логистической функцией роста (1.1) и функцией, представляющей эффект Олли уравнением (1.2), в работе [16].

Теперь обратимся к функции, которая описывает количество добычи, потребляемой хищником на единицу времени для заданных популяций жертв и хищников, и называется функциональной реакцией или тропной функцией. Исследователи разработали множество подходящих функциональных реакций, в зависимости от поведения популяций, реагирования скорости хищничества на изменение плотности жертв у различных популяций жертв. Как мы упоминали расемейство функциональных нее, ответов Холлинга наиболее разработано, что подтверждают работы [41-47]. Но в динамике хищников очень популярной стала функциональная реакция Холлинга II типа [48-50]. Этот тип функциональной реакции включает в себя тот факт, что одна особь может питаться только до тех пор, пока желудок не заполнится, и поэтому функцию насыщения лучше описать как прием пищи. Эта концепция похожа на закон убывающей отдачи, заимствованный из исследования операций, то есть гиперболу, поднимающуюся до асимптотического значения. Другими словами, функциональный ответ будет иметь вид

$$G(M) = \frac{\beta M}{1 + T_{\rm h} \beta M},$$
(1.3)

где M(T) обозначает плотность добычи в момент времени  $T, \beta - эффективность поиска хищником$  $жертвы, а <math>T_{\rm h}$  – среднее время обработки хищником каждой жертвы.

Теперь попробуем осветить концепцию стадного поведения. Словарное значение понятия стада – это большая группа животных, особенно копытных, которые живут вместе как домашний скот. Несколько причин побуждают вид демонстрировать стадное поведение. Например, стадо может защитить жертв от хищников. С другой стороны, для хищников стая может быть более эффективной стратегией, чтобы уничтожить стадо добычи. Таким образом, здесь возникает необходимость поиска подходящей формы функционального ответа для описания этого социального поведения. Понятие о том, что квадратный корень из переменной, задающей плотность популяции хищника, может быть использован в функции, описывающей показатель встречаемости в двумерной системе, было введено в работе [51]. Точно так же две трети силы хищника в показателе встречаемости лучше описывают такое групповое поведение хищников в трехмерных системах. Эту концепцию можно найти в работе [52]. Но в работах [53] и [54] была предложена другая концепция в этой области. Прежде чем продолжить, мы должны описать основные идеи этих работ.

Пусть M – плотность населения, которое собирается в стада. Предположим, что стадо занимает область Н. Количество особей, находящихся в самых удаленных местах в стаде, пропорционально длине периметра участка, где находится стадо. Таким образом, его длина пропорциональна  $\sqrt{H}$ . Следовательно,  $\sqrt{H}$  будет подсчитывать индивидуумов на краю участка, тогда как М распределяется по двумерной области. Следовательно, при моделировании атаки хищника на эту популяцию функциональная реакция должна быть выражена в виде квадратного корня из популяции добычи. Эта идея была впервые представлена в работе [53]. В работе [54] был введен новый функциональный отклик, в котором показатель плотности жертв в выражении (1.3) заменяется его квадратным корнем. Было также принято предположение, что среднее время обработки  $T_{\rm h}$  равно нулю в его расчетной части. Для настоящей статьи мы хотели бы использовать эти наблюдения для построения нашего нынешнего функционального отклика. Эта модель может быть более подходящей для крупных хищников по отношению к их добыче. Подобные рассуждения привели в работе [52] к созданию модели планктона, в которой токсичный фитопланктон высвобождает яд через поверхность трехмерного пятна. В реальной жизни мы можем легко найти некоторые виды хищников, которые сравнительно существенно сильнее, чем виды их жертв, и поэтому среднее

время обработки хищником для каждой добычи может быть проигнорировано. Более того, аргумент авторов работы [53] мотивирует нас моделировать функцию реакции жертвы, которая демонстрирует стадное поведение, в терминах квадратного корня из показателя популяции добычи. Итак, не говоря уже о функциональном ответе, использованном авторами работ [16, 54–56], мы рассматриваем хищнический функциональный ответ как

$$G_1(M) = \beta \sqrt{M}, \tag{1.4}$$

где β и М такие же, как в выражении (1.3). Примечательно, что жизнь в стадах может быть полезной, если население восприимчиво к эффекту Олли. Исследователи предположили, что групповое поведение может уменьшить риски исчезновения, вызванные эффектом Олли. В присутствии хищника такое поведение играет ключевую роль в отношении бдительности и риска хищничества [24]. В большинстве работ, связанных с этой концепцией, предполагается, что добыча имеет логистический рост. Заинтересованные читатели могут обратиться к работе [55] и приведенным в ней ссылкам. Но авторы работ [16, 17] рассмотривали свои модели со стадным поведением жертв и стадным поведением и жертв, и хищников соответственно, причем обе модели имели сильный эффект Олли. Анализируя эти работы, здесь мы пытаемся построить и исследовать новую модель с некоторыми подходящими допущениями.

Следующий раздел содержит краткое обсуждение предположений и параметров. Раздел 3 данной работы объясняет положительность и ограниченность системы. Некоторые критерии вымирания как для жертвы, так и для хищника описаны в разделе 4, а в разделе 5 можно найти возможные точки равновесия и анализ их устойчивости. В разделе 6 представлен анализ бифуркаций. Численная проверка наших аналитических результатов дана в разделе 7. Наконец, в разделе 8 представлены заключительные замечания для наших аналитических и численных наблюдений.

#### 2. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Здесь мы рассмотрим некоторые подходящие предположения для построения нашей модели. Позже мы должны дать некоторую логику этого. Пусть M(T) и N(T) – плотность жертвы и хищника соответственно. Мы считаем, что обе популяции живут в стадах, предполагаем также мультипликативный эффект Олли в росте популяции добычи. Теперь самое важное предположение о том, что среднее время обработки хищника для каждой жертвы равно нулю, побуждает нас ввести

следующий набор нелинейных дифференциальных уравнений

$$\frac{dM}{dT} = \alpha M \left( 1 - \frac{M}{K} \right) \left( \frac{M}{K_0} - 1 \right) - \beta \sqrt{M} \sqrt{N}$$

$$\frac{dN}{dT} = -\delta N + \beta \gamma \sqrt{M} \sqrt{N}$$
(2.1)

с начальными условиями

где *а* – собственная скорость роста на душу населения, K – пропускная способность жертвы,  $K_0$  с  $0 < K_0 << K -$  порог Олли популяции добычи в отсутствие хищника,  $\delta$  – смертность хищника в отсутствие добычи. Из-за стадного поведения здесь мы использовали модифицированный функциональный отклик (1.4) для представления взаимодействия между добычей и хищником. Следовательно, β и γ представляют эффективность поиска хищника и степень конверсии биомассы соответственно. Попробуем объяснить логику наших предположений. Предположения о стадном поведении и эффекте Олли уже рассматривались в работах многих авторов [16, 17]. Но предположение о том, что среднее время обработки хищника для каждой жертвы равно нулю, лучше всего объяснить подходящим примером. Хищники, которые сравнительно сильнее, чем их жертвы, не тратят время, чтобы справиться со своей добычей. В практической жизни мы видим, что мелкие рыбы проглатываются более крупными. На самом деле в нашей вселенной очень много хищников, для которых мы можем без всяких сомнений пренебречь термином «среднее время обработки каждой добычи». Очевидно, что все используемые здесь параметры положительны.

Если мы перемасштабируем 
$$m = \frac{M}{K}$$
,  $n = \frac{n}{K}$  и

 $t = \alpha \frac{K}{K_0} T$  для уменьшения количества параметров в выражении (2.1), то после некоторых упрощений получим систему:

$$\frac{dm}{dt} = m(1-m)(m-r) - a\sqrt{m}\sqrt{n},$$

$$\frac{dn}{dt} = -dn + b\sqrt{m}\sqrt{n}$$
(2.2)

где 
$$r = \frac{K_0}{K}, a = \frac{\beta K_0}{\alpha K}, d = \frac{\delta K_0}{\alpha K}$$
 и  $b = \frac{\beta \gamma K_0}{\alpha K}$ .  
3. ПОЛОЖИТЕЛЬНОСТЬ  
И ОГРАНИЧЕННОСТЬ

Для обеспечения положительности системы (2.2) необходимо рассмотреть следующую теорему.

**Теорема 3.1.** Решения системы уравнений (2.2), область которых есть  $R_+^2$ , положительны всегда.

*Доказательство*: Доказательство этой теоремы простое и поэтому незначительно для нашего настоящего исследования.

Для ограниченности системы (2.2) можно рассмотреть следующую теорему.

**Теорема 3.2.** Начиная с  $R_+^2$ , все решения системы уравнений (2.2) равномерно ограничены.

Доказательство. Если будет иметься какое-либо решение  $\{m(t), n(t)\}$  системы уравнений (2.2), то у нас должно быть два возможных случая.

*Случай 1:* Если  $m(0) \le 1$ , мы будем утверждать, что  $m(t) \le 1$  для всех  $t \ge 0$ . Если предположить, что наше утверждение не соответствует действительности, то можно найти два положительных действительных числа  $t_1$  и  $t_2$  такие, что  $m(t_1) = 1$  и m(t) > 1 для всех  $t \in (t_1, t_2)$ . Теперь для всех  $t \in (t_1, t_2)$  из системы уравнений (2.2) имеем

$$m(t) = m(0) \exp\left[\int_{0}^{t} f(m(s), n(s)) ds\right],$$
  
где  $f(m(t), n(t)) = \left\{(1 - m(t))(m(t) - r) - \frac{a\sqrt{n(t)}}{\sqrt{m(t)}}\right\}.$ 

Это означает, что

$$m(t) = m(0) \exp\left[\int_{0}^{t_{1}} f(m(s), n(s))ds\right] \left[\exp\int_{t_{1}}^{t} f(m(s), n(s))ds\right]$$
$$m(t) = m(t_{1}) \exp\left[\int_{t_{1}}^{t} f(m(s), n(s))ds\right]$$

для всех  $t \in (t_1, t_2)$ .

Поэтому для всех  $t \in (t_1, t_2)$  имеем f(m(t), n(t)) < 0как r < 1, следовательно,  $m(t) < m(t_1) = 1$ , что противоречит нашему предположению что m(t) > 1для всех  $t \in (t_1, t_2)$ . Следовательно, наше предположение верно.

*Случай 2:* Пусть m(0) > 1, мы утверждаем, что lim sup  $m(t) \le 1$ . Допустим, что наше утверждение не соответствует действительности. Тогда m(t) > 1 для всех t > 0. Таким образом, f(m(t), n(t)) < 0, причем

$$f(m(t), n(t)) = \left\{ (1 - m(t))(m(t) - r) - \frac{a\sqrt{n(t)}}{\sqrt{m(t)}} \right\}.$$

Поэтому из первого уравнения системы уравнений (2.2) мы получаем

$$m(t) = m(0) \exp\left[\int_{0}^{t} f(m(s), n(s))ds\right] < m(0).$$

Также можно получить

$$\frac{dm}{dt} < (m(0) - r)m(1 - m),$$

где m(0) - r > 0.

Это означает, что  $\limsup_{t\to\infty} m(t) \le 1$ , что противоречит нашему предположению. Следовательно, оно верно.

Соответственно, из вышеописанных двух случаев мы имеем  $\limsup m(t) \le 1$ .

Теперь пусть U = bm + an. Тогда для больших t имеем

$$\frac{dU}{dt} = bm(1-m)(m-r) - adn,$$
  

$$\frac{dU}{dt} = bm\left\{(1+r)m - r - m^2\right\} - adn,$$
  

$$\frac{dU}{dt} \le b(1+r)m - adn,$$
  

$$\frac{dU}{dt} \le 2b(1+r) - \lambda U,$$

где  $l = \min\{(1 + r), d\}.$ 

Следовательно, имеем

$$\frac{dU}{dt} + \lambda U \le 2b(1+r).$$

Применяя теорию дифференциальных неравенств, мы легко получаем

$$0 \le U(m,n) \le \frac{2b(1+r)}{\lambda} + \frac{U(m(0),n(0))}{e^{\lambda t}}$$

и для  $t \rightarrow \infty$ 

$$0 \le U(m,n) \le \frac{2b(1+r)}{\lambda}.$$

Следовательно, все решения системы уравнений (2.2) входят в область

$$B = \left\{ (m, n) : 0 \le U(m, n) \le \frac{2b(1+r)}{\lambda} + \varepsilon \right\},$$
для любого  $\varepsilon > 0.$ 

Таким образом, теорема доказана.

#### 4. СЦЕНАРИИ ВЫМИРАНИЯ

Любая модель, подобная нашей, может представить некоторые условия для исчезновения хищников и жертв. Итак, в этом разделе мы попытаемся найти некоторые критерии относительно вымирания с помощью логического анализа. Сначала попытаемся установить два условия, при которых популяция жертв может исчезнуть, а условие, обеспечивающее исчезновение популяции хищников, будет в конце этого раздела.

Пусть 
$$\overline{m} = \limsup_{t \to \infty} m(t)$$
 и  $\underline{n} = \liminf_{t \to \infty} n(t)$ . Таким

образом, мы можем использовать  $m \le 1$ , что следует из доказательства теоремы 3.2.

**Теорема 4.1.** Если  $\overline{m} \le 1$ , то  $\lim_{t \to \infty} m(t) = 0$ .

Доказательство: Пусть  $\lim_{t\to\infty} m(t) = \mu > 0$ , тогда из определения *т*для любого є, удовлетворяющего условию  $0 < \varepsilon < r - m$ , существует  $t_{\varepsilon} > 0$  такое, что  $m(t) < m + \varepsilon$  для любого  $t > t_{\varepsilon}$ . Далее, для  $t > t_{\varepsilon}$ первое уравнение системы уравнений (2.2) дает:

$$m(t) = m(0) \exp\left[\int_{0}^{t} \left\{ (1 - m(s))(m(s) - r) - \frac{a\sqrt{m(s)}\sqrt{n(s)}}{m(s)} \right\} ds$$
$$m(t) < m(0) \exp\left[\int_{0}^{t} (\overline{m} + \varepsilon - r) ds\right]$$
$$m(t) < m(0) \exp\left\{ -(r - \overline{m} - \varepsilon)t \right\} \to 0, \ \text{если } t \to \infty,$$

что является противоречием, и, следовательно, наша теорема доказана.

Здесь наша попытка может создать условия, при которых хищник может играть жизненно важную роль, чтобы «вымыть» популяцию жертв из системы.

**Теорема 4.2.** Если  $\underline{n} > \frac{8}{a^2}(1-r)^2$ , то  $\lim_{t \to \infty} m(t) = 0$ .

Доказательство: Если возможно, пусть  $\lim_{t\to\infty} m(t) = \varsigma > 0$ . Поскольку  $\overline{m} \le 1$ , для любого  $0 < \varepsilon < 1 - r$  существует  $t_{\varepsilon} > 0$  такое, что  $m(t) < 1 + \varepsilon$ для любого  $t > t_{\varepsilon}$ . Определение <u>n</u> включает в себя, что для любого  $\varepsilon'$ , удовлетворяющего условию  $0 < \varepsilon' < \underline{n} - \frac{8}{a^2}(1 - r)^2$ , существует  $t_{\varepsilon'} > 0$  такое, что  $n(t) > \underline{n} - \varepsilon$  для  $t > t_{\varepsilon'}$ . Теперь для  $t > \max\{t_{\varepsilon}, t_{\varepsilon'}\}$  первое уравнение системы уравнений (2.2) предполагает, что

$$\begin{split} &\frac{dm}{dt} < m(1+\varepsilon-r) - a\sqrt{m}\sqrt{n} \\ &\frac{dm}{dt} < m(1+\varepsilon-r) - \frac{am\sqrt{n}}{\sqrt{1+\varepsilon}}, \text{ если } m < \sqrt{1+\varepsilon}\sqrt{m} \\ &\frac{dm}{dt} < m\left\{2(1-r) - \frac{a\sqrt{n-\varepsilon}}{\sqrt{2}}\right\} \\ &\frac{dm}{dt} < -\frac{am}{\sqrt{2}}\left\{\sqrt{n-\varepsilon} - \frac{2\sqrt{2}}{a}(1-r)\right\} < 0. \end{split}$$

Это в свою очередь означает, что  $\lim_{t\to\infty} m(t) = 0$ , т.е. данное противоречие доказывает теорему.

Следующая теорема касается вымирания хищников.

**Теорема 4.3.** Если *n* > 
$$\frac{2b^2}{d^2}$$
, то  $\lim_{t\to\infty} n(t) = 0$ 

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

Доказательство: Поскольку  $\overline{m} \le 1$ , для любого  $\varepsilon$ , удовлетворяющего условию  $0 < \varepsilon < 1$ , существует  $t_{\varepsilon} > 0$  такое, что  $m(t) < 1 + \varepsilon$  для любого  $t > t_{\varepsilon}$ . Также для любого  $\varepsilon'$ , удовлетворяющего условию  $0 < \varepsilon < \underline{n} - \frac{2b^2}{d^2}$  существует  $t_{\varepsilon'} > 0$  такое, что  $n(t) > \underline{n} - \varepsilon$  для  $t > t_{\varepsilon'}$ . Теперь для  $t > \max{\{\tau_{\varepsilon}, t_{\varepsilon'}\}}$ из второго уравнения системы уравнений (2.2) имеем:

$$\begin{split} \frac{dn}{dt} &= \sqrt{n} \left( -d\sqrt{n} + b\sqrt{m} \right) \\ \frac{dn}{dt} &< \sqrt{n} \left( -d\sqrt{n} + b\sqrt{1+\varepsilon} \right) \\ \frac{dn}{dt} &< -d\sqrt{n} \left( \sqrt{n} - \frac{b\sqrt{2}}{d} \right) \\ \frac{dn}{dt} &< -d\sqrt{n} \left( \sqrt{n-\varepsilon} - \frac{b\sqrt{2}}{d} \right) < 0 \end{split}$$

Следовательно,  $\lim_{t\to\infty} n(t) = 0$ , и теорема доказана.

#### 5. ТОЧКИ РАВНОВЕСИЯ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ

Здесь будут обсуждаться возможные равновесные решения и их устойчивость относительно системы (2.2). На рис. 1 показаны изоклины с нулевым ростом для этой системы. Для точек равновесия и условий их существования мы должны следовать нижеуказанным леммам и теореме.

Лемма 5.1. Нулевое равновесие  $E_1(0,0)$  системы уравнений (2.2) существует всегда, и два свободных (аксиальных) равновесия  $E_2(0,0)$  и  $E_3(r,0)$ также существуют безоговорочно.

Заметим, что теорема 3.1 обеспечивает положительность решения нашей системы уравнений (2.2). Опять же, для существования внутреннего



**Рис. 1.** Изоклины с нулевым ростом для системы (2.2) в случае *r* = 0.05, *a* = 0.2, *b* = 0.22 и *d* = 0.21.

равновесия системы, мы можем получить условие, изложенное в следующей лемме.

**Лемма 5.2.** Внутреннее равновесие  $E^*(m^*,n^*)$  существует, если и только если уравнение

$$y^{2} - (1+r)y + r + \frac{ab}{d} = 0$$

имеет положительный корень.

Таким образом, мы имеем следующую теорему, гарантирующую существование внутреннего равновесия.

**Теорема 5.1.** Необходимое и достаточное условие существования внутреннего равновесия

$$E^*(m^*,n^*) - \operatorname{PTO}(1-r)^2 - \frac{4ab}{d} \ge 0.$$

Доказательство: Допустим, что внутреннее равновесие существует. Тогда, согласно лемме 5.2, уравнение

$$y^{2} - (1+r)y + r + \frac{ab}{d} = 0$$

имеет положительный вещественный корень. Следовательно, дискриминант уравнения должен быть больше или равен нулю. Далее, дискриминант квадратного уравнения равняется  $(1-r)^2 - \frac{4ab}{d}$  (после упрощения). Поэтому  $(1-r)^2 - \frac{4ab}{d} \ge 0.$ 

С другой стороны, пусть  $(1-r)^2 - \frac{4ab}{d} \ge 0$ . Рассмотрим уравнение  $y^2 - (1+r)y + r + \frac{ab}{d} = 0$ , из которого можно получить, что  $y = \frac{1+r}{2} \pm \frac{\sqrt{(1+r)^2 - 4(r+\frac{ab}{d})}}{2}$ , и дискриминант квадратного уравнения равняется  $(1-r)^2 - \frac{4ab}{d}$ (после упрощения). Мы также видим, что  $\frac{1+r}{2} > 0$ , когда 0 < r < 1. Следовательно,  $(1-r)^2 - \frac{4ab}{d} \ge 0$  гарантирует, что хотя бы одно из значений у должно быть положительным. Следовательно, согласно лемме 5.2, внутреннее равновесие существует. Теорема доказана.

Теперь пришло время обсудить стабильность всех возможных точек равновесия. Линеаризация системы уравнений (2.2) вокруг  $E_1(0,0)$ ,  $E_2(0,0)$  и  $E_3(r,0)$  невозможна, поэтому локальная устойчивость не может быть изучена. Но  $E_1(0,0)$  глобально устойчиво, если выполнено хотя бы одно из двух условий:

1) Теоремы 4.1 и 4.3 выполняются одновременно.

2) Теоремы 4.2 и 4.3 выполняются одновременно.

В нашем настоящем исследовании мы не затрагиваем изложение этих результатов.

Для наиболее важной точки равновесия  $E^*(m^*,n^*)$  мы имеем матрицу Якоби следующего вида:

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

где 
$$a_{11} = m^*(1-m^*) + (m^*-r)(1-2m^*) - \frac{a\sqrt{n^*}}{2\sqrt{m^*}},$$
  
 $a_{12} = -\frac{a\sqrt{m^*}}{2\sqrt{n^*}}, a_{21} = \frac{b\sqrt{n^*}}{2\sqrt{m^*}}$  и  $a_{22} = -d + \frac{b\sqrt{m^*}}{2\sqrt{n^*}}.$ 

Характеристическое уравнение для  $J(E^*)$ :

 $\gamma^2 + A\gamma + B = 0,$ где  $A = -trJ(E^*) = -a_{11} - a_{22}$  и  $B = \det J(E^*) = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}.$ 

Теперь, применяя концепцию правила знаков Декарта, оба корня характеристического уравнения для  $J(E^*)$  будут отрицательными тогда и только тогда, когда A > 0 и B > 0. Следовательно, если внутреннее равновесие существует, то следующая теорема обеспечивает устойчивость  $E^*$ .

**Теорема 5.2.** Необходимыми и достаточными условиями локально асимптотической устойчивости  $E^*$  являются A > 0 и B > 0.

Далее попробуем найти некоторое глобальное поведение равновесия  $E^*$ .

Пусть  $\Gamma = \{(m,n) \in \mathbb{R}^2: 0 \le m \le 1, n \ge 0\}$ . Ясно, что  $E^*(m^*,n^*) \in \Gamma$ , поэтому имеем следующую теорему:

**Теорема 5.3.** Если  $E^*(m^*, n^*)$  локально асимптотически устойчиво с d > b + r + 2, то  $E^*$  привлекает все решения системы уравнений (2.2), лежащие в Г.

Доказательство: Пусть 
$$P(m,n) = \frac{dm}{dt}$$
 и

$$Q(m,n) = \frac{dn}{dt}$$
, тогда для всех  $(m,n) \in \Gamma$  получим

$$\begin{split} \frac{\partial P}{\partial m} + \frac{\partial Q}{\partial n} &= m(1-m) + (m-r)(1-2m) - \frac{a\sqrt{n}}{2\sqrt{m}} - d + \frac{b\sqrt{m}}{2\sqrt{n}} \\ \frac{\partial P}{\partial m} + \frac{\partial Q}{\partial n} &\leq 2m + 2rm - r - d + b\sqrt{m} \\ \frac{\partial P}{\partial m} + \frac{\partial Q}{\partial n} &\leq 2 + r - d + b < 0, \text{ если } d > b + r + 2. \end{split}$$

Следовательно, согласно критерию Бендиксона, предельный цикл отсутствует, таким образом, наша теорема следует из теоремы Пуанкаре—Бендиксона.

#### 6. БИФУРКАЦИЯ ХОПФА

В этом разделе используем теорему бифуркации Хопфа [50, 57, 58], чтобы предусмотреть некоторые условия возникновения простой бифуркации Хопфа вблизи внутреннего равновесия  $E^*(m^*,n^*)$  системы уравнений (2.2).

**Теорема 6.1.** Если равновесие  $E^*(m^*, n^*)$  существует, то бифуркация Хопфа происходит при  $r = r^* = m^* - \frac{1}{1-2m^*} \left\{ \frac{d}{2} + \frac{ab}{2d} - m^*(1-m^*) \right\}, \ если \ r^*$ положительно при  $m^* \neq 1/2$  и  $ab > d^2$ .

Доказательство: Мы видим, что

i) 
$$[trJ(E^{*})]_{r=r^{*}} = 0;$$
  
ii)  $[\det J(E^{*})]_{r=r^{*}} = \frac{ab-d^{2}}{4} > 0$  при  $ab > d^{2};$ 

ііі) При  $r = r^*$  получаем характеристическое уравнение  $\gamma^2 + \det J(E^*) = 0$ , имеющее чисто мнимые корни;

iv) 
$$\left[\frac{d}{dr}(trJ(E^*))\right]_{r=r^*} = 2m^* - 1 \neq 0$$
 при  $m^* \neq \frac{1}{2}$ .

Отсюда вытекает наша теорема, поскольку все условия теоремы Хопфа о бифуркации выполнены.

До сих пор обсуждалась только аналитическая сторона нашей модели. Следующий раздел будет посвящен численной проверке наших аналитических результатов.

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

#### 7. ЧИСЛЕННЫЙ АНАЛИЗ

В этом разделе мы предоставляем компьютерное моделирование некоторых решений системы уравнений (2.2) с использованием программного обеспечения MATLAB. Этим численным анализом можно проверить достоверность наших аналитических наблюдений.

Для начала возъмем следующие параметры системы уравнений (2.2): r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 0.21 и начальные условия (m(0), n(0)) = (0.04, 0.01). Легко проверить, что в этом случае 0.04 = m(0) < r = 0.05. Следовательно, согласно теореме 4.1, популяция жертв вымрет. Однако вымирание жертв автоматически влечет за собой исчезновение популяций хищников. Этот факт проиллюстрирован на рис. 2. Таким образом, наша теорема 4.1 верифицирована.

Теперь, если мы рассмотрим параметры точно те же, как на рис. 2, то обнаружим, что



**Рис. 2.** Поведение системы (2.2) при r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 0.21 и (m(0), n(0)) = (0.04, 0.01).



**Рис. 3.** Фазовый портрет системы (2.2), показывающий сходимость траекторий к точке  $E^*(0.6519, 0.7155)$  при r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 0.21 и различных начальных условиях.

 $(1-r)^2 - \frac{4ab}{d} = 0.06440476 \ge 0$  и по теореме 5.1 внутреннее равновесие существует. Следовательно, можно найти две точки равновесия:  $E^*(0.3981, 0.4369)$  и  $E^*(0.6519, 0.7155)$ . Используя выражения из раздела 5, вычисляем значения A и B для обеих точек равновесия. Находим, что A = -0.1008014 < 0 и B = -0.01060852 < 0 для  $E^*(0.3981, 0.4369)$ ; A = 0.16569803 > 0 и B = 0.01737317 > 0 для  $E^*(0.6519, 0.7155)$ . Следовательно, по теореме 5.2,  $E^*(0.6519, 0.7155) -$ устойчивая точка, а  $E^*(0.3981, 0.4369) -$  неустойчивая. Соответствующий фазовый портрет для точки  $E^*(0.6519, 0.7155)$  дан на рис. 3 для различных вариантов начального условия. Все эти наблюдения подтверждают справедливость теоремы 5.1 о существовании и теоремы 5.2,



**Рис. 4.** Фазовый портрет системы (2.2) при r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 2.3 и (m(0), n(0)) = (0.22, 0.09).

касающейся устойчивости точки равновесия, а рис. 3 делает эту картину достаточно ясной.

Теперь выберем параметры r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 2.3 и начальные условия (m(0), n(0)) = (0.22, 0.09). Тогда можно найти, что 2.3 = d > b + r + 2 = 2.27, и согласно теореме 5.3 внутреннее равновесие притягивает все решения системы уравнений (2.2), лежащие в области  $\Gamma = \{(m,n) \in \mathbb{R}^2: 0 < m < 1, n > 0\}$ . Это доказывает неизбежность теоремы 5.3 (см. рис. 4).

Далее демонстрируем поведение популяций с течением времени. Принимая начальные условия (m(0), n(0)) = (0.6, 0.8) и выбирая параметры r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 0.21, мы можем видеть, что обе популяции сходятся к своему состоянию равновесия за конечное время. Графически такое поведение представлено на рис. 5. Такое графическое представление поможет нам проверить, что точка стабильного равновесия является целью популяции.

Наконец, если мы примем начальные условия (m(0), n(0)) = (0.66, 0.7) и параметры те же, что были использованы на рис. 5, то можно обнаружить колебательное поведение нашей системы (2.2), которое показано на рис. 6. Видим, что обе популяции демонстрируют осцилляции в ограниченном диапазоне. Интересно, что этот график подтверждает стабильность точки внутреннего равновесия, показывая, что виды и хищников, и жертвы сходятся к своему устойчивому равновесию.

#### 8. ВЫВОДЫ

Представленное исследование направлено на дальнейшее развитие моделей типа «хищникжертва» с квадратичными функциональными откликами и сильным эффектом Олли. Многие работы, касающиеся этой концепции, были процитированы в данной статье. Исследователи применили в своих работах собственные инновационные идеи. Как развитие предыдущих исследований, здесь мы рассмотрели модель «хищникжертва» с квадратичным функциональным откликом и сильным эффектом Олли на жертву, что актуально в реальной жизни, где предполагается, что среднее время обработки хищника для каждой жертвы равно нулю. Это предположение было впервые введено П.А. Браза [54] для упрощения его рабочих уравнений. Но наша нынешняя модель отличается от работы [54], так как там не учитывался эффект Олли. Также нами было принято во внимание стадное поведение для обеих популяций. Мы использовали некоторое подходящее масштабирование для уменьшения количества параметров нашей модели. Были даны теоремы для положительности и ограниченности решений наших рабочих уравнений, а также теоремы, обеспечивающие биологическое пове-



**Рис. 5.** Фазовый портрет системы (2.2) при r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 0.21 и (m(0), n(0)) = (0.6, 0.8). Видно, что обе популяции сходятся к своему состоянию равновесия.

дение системы. В разделе 4 также приведены некоторые критерии исчезновения для жертвы и хищника. Удивительно, что нам удалось найти некоторые условия, касающиеся глобальной стабильности тривиального равновесия для нашей нынешней системы. Агрессивность хищника характеризуется высоким значением a, а сильный эффект Олли лучше всего объяснить, принимая  $r \approx 1$ . Итак, мы видим, что теорема 4.2 может выполняться автоматически, если хищник агрессивен или эффект Олли очень силен. Более того, хищник может вымереть, если максимальная выгода хищника не сможет преодолеть его исчезновение из-за смертности. Существование и устойчивость всех возможных решений для системы



**Рис. 6.** Колебательное поведение системы (2.2) при значениях параметров r = 0.05, a = 0.2, b = 0.22, d = 0.21 и (m(0), n(0)) = (0.66, 0.7).

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

уравнений (2.2) обсуждались отдельно. В связи с этим мы сформулировали соответствующие леммы и теоремы. Также были получены некоторые условия глобального поведения для внутреннего равновесия. Наконец, численное моделирование с графическим представлением было представлено, чтобы подтвердить нашу аналитическую дискуссию. Таким образом, благодаря этой модели наши усилия помогают развитию работ в этой области.

Методы и результаты нашего настоящего исследования могут быть полезны для формирования эталона в моделях типа «хищник-жертва». Анализ устойчивости всегда помогает поддерживать экологический баланс в природе. Следовательно, теоремы 5.2 и 5.3 могут сыграть ключевую роль в равновесии в экологии, что является важной целью для исследователей во всем мире. Таким образом, данная статья может легко вступить в новую эру будущих работ с эффектом Олли у хищника, стохастическими моделями, моделью задержки и так далее. В то же время мы должны признать, что существует необходимость дальнейшего изучения в этой области. Цитируемые работы [59-64] могут помочь сформировать новые модели реакции-диффузии. Можно, следуя работе [65], перейти к новой концепции сравнительного исследования моделей, зависящих от соотношения хищника и жертвы. Таким образом, более сложные модели могут быть проанализированы и объяснены с надлежащей разработкой и объяснением.

#### 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

- H. Malchow, S. Petrovskii, and E. Venturino, *Spatio-temporal patterns in Ecology and Epidemiology* (CRC, Boca Raton, 2008).
- 2. J. D. Murray, *Mathematical Biology* (Springer-Verlag, New York, 1989).
- 3. V. Volterra and U. D'Ancona, in *Materials of VII Congr. int. acqui. et de pêche* (Paris, 1931), pp. 1–14.
- 4. A. J. Lotka, *Elements of Mathematical Biology* (Dover, New York, 1956).
- 5. C. S. Holling, Memories Entomol, Soc. Can. **45**, 3 (1965).
- 6. J. T. Tanner, Ecology 56, 855 (1975).
- 7. P. A. Braza, SIAM J. Appl. Math. 63 (3), 889 (2003).

- S. B. Hsu, T. W. Hwang, and Y. Kuang, J. Math. Biol. 42, 490 (2001).
- S. B. Hsu, T. W. Hwang, and Y. Kuang, Math. Biosci. 181, 55 (2003).
- 10. P. H. Leslie and J. C. Gower, Biometrika 47, 219 (1960).
- 11. H. R. Akcakaya, Ecol. Monogr. 62, 119 (1992).
- 12. P. A. Abrams, Ecology **75** (6), 1842 (2003).
- P. A. Abrams and L. R. Ginzburg, Trends. Ecol. Evol. 15, 337 (2000).
- T. Matsuoka and H. Seno, Math. Model. Nat. Phenom. 3 (4), 131 (2008).
- H. I. Freedman and G. Wolkowitz, Bull. Math. Biol. 48, 493 (1986).
- A. Maiti, P. Sen, D. Manna, and G. P. Samanta, Nonlinear Dynamics and Systems Theory 16 (1), 86 (2016).
- A. Maiti, R. Paul, and S. Alam, J. Stat. Math. Engineer. 2 (1), 1 (2016).
- A. Maiti, R. Paul, and S. Alam, Int. J. Res. Engineer. Technol. 5 (9), 233 (2016).
- 19. A. Maiti, R. Paul, and S. Alam, Int. J. Res. Publ. Engineer. Technol. 2 (9), 22 (2016).
- L. Berec, E. Angulo, and F. Courchamp, Trends Ecol. Evol. 22, 185 (2006).
- 21. T. H. Clutton-Brock, D. Gaynor, G. M. Mcllrath, et al., J. Anim. Ecol. **68**, 672 (1999).
- 22. F. Courchamp, T. Clutton-Brock, and B. Grenfell, Trends Ecol. Evol. 14, 405 (1999).
- F.Courchamp, L. Berec, and J. Gascoigne, *Allee Effects in Ecology and Conservation* (Oxford University Press, Oxford, 2008).
- 24. M. S. Mooring, T. A. Fitzpatrick, T. T. Nishihira, and D. D. Reisig, J. Wildlife Management **68**, 519 (2004).
- 25. D. J. Rinella, M. S. Wipfli, C. A. Stricker, et al., Canad. J. Fish. Aquat. Sci. **69**, 73 (2012).
- 26. P. A. Stephens, W. J. Sutherland, and R. P. Freckleton, Oikos **87**, 185 (1999).
- 27. M. Kot, *Elements of Mathematical Biology* (Cambridge University Press, Cambridge, 2001).
- 28. G. A. K. van Voorn, L. Hemerik, M. P. Boer, and B. W. Kooi, Math. Biosci. **209**, 451 (2007).
- 29. M. H. Wang and M. Kot, Math. Biosci. 171, 83 (2001).
- 30. J. Wang, J. Shi, and J. Wei, J. Math. Biol. **62**, 291 (2011).
- C. W. Clark, Mathematical Bioeconomic: The Optimal Mmanagement of Renewable Resources (Wiley, New York, 1990).
- C. W. Clark, *The Worldwide Crisis in Fisheries: Econom*ic Models and Human Behavior (Cambridge University Press, Cambridge, 2007).
- 33. M. Liermann and R. Hilborn, Fish Fish. 2, 33 (2001).
- 34. G. Wang, X. G Liang, and F. Z Wang, Ecol. Model. 124, 183 (1999).
- 35. A. D. Bazykin, F. S. Berezovskaya, A. S. Isaev, and R. G. Khlebopros, J. Theor. Biol. 186, 267 (1997).
- E. D. Conway and J. A. Smoller, SIAM J. Appl. Math. 46, 630 (1986).
- J. D. Flores, J. Mena-Lorca, B. Gonźalez-Yaňez and E. Gonźalez-Olivares, in Proc. Int. Symp. on Mathematical and Computational Biology, ed. by R. Mondaini

and R. Dilao (E-papers Servios Editoriais Ltda., 2007), pp. 219–232.

- E. Gonźalez-Olivares, and A. Rojas-Palma, Bull. Math. Biol. 73, 1378 (2011).
- 39. P. Aguirre, E. Gonźalez-Olivares, and E. Sáez, Nonlinear Anal. RWA **10**, 1401 (2009).
- P. Agiurre, E.Gonźalez-Olivares, and E. Sáez, SIAM J. Appl. Math. 69, 1244 (2009).
- 41. C. S. Holling, Can. Entomol. **91**, 385 (1959).
- 42. A. Hastings and T. Powell, Ecology 72, 896 (1991).
- 43. S. Gakkhar and A. Shing, J. Math. Anal. Appl. **385**, 423 (2012).
- 44. T. V. Ton and A. Yagi, Communications on Stochastic Analysis **2**, 371 (2011).
- 45. D. Xiao, W. Li, and M. Han, J. Math. Anal. Appl. **324**, 14 (2006).
- 46. B. Mukhopadhyay and R. Bhattacharyya, Nonlinear Analysis: Modelling and Control **16** (1), 77 (2011).
- 47. C. S. Holling, Can. Entomol. 91, 293 (1959).
- 48. A. Maiti and G. P. Samanta, J. Math. Ed. Sci. Tech. 36, 65 (2005).
- 49. S. Ruan and D. Xiao, SIAM J. Appl. Math. **61**, 1445 (2001).
- 50. J. D. Murray, *Mathematical Biology* (Springer-Verlag, New York, 1993).
- 51. C. Cosner, D. L. DeAngelis, J. S. Ault, and D. E. Olson, Theor. Pop. Biol. **56**, 65 (1999).
- 52. J. Chattopadhyay, S. Chatterjee, and E. Venturino, J. Theor. Biol. **253**, 289 (2008).
- V. Ajraldi, M. Pittavino, and E. Venturino, Nonlinear Anal. RWA 12, 2319 (2011).
- 54. A. P. Braza, Nonlinear Anal. RWA 13, 1837 (2012).
- 55. S. P. Bera, A. Maiti, and G. P. Samanta, World J. Model. Simulation 11, 3 (2015).
- 56. S. P. Bera, A. Maiti, and G. P. Samanta, Nonlinear Analysis: Modelling and Control **21** (3), 345 (2016).
- 57. D. K. Arrowsmith and C. M. Place, *Dynamical Systems: Differential Equations, Maps, and Chaotic Behaviour* (Chapman & Hall, London, 1992).
- B. D. Hassard, N. D. Kazarinoff, and Y. H. Wan, *Theory and Application of Hopf-bifurcation* (Cambridge University Press, Cambridge, 1981).
- 59. M. R. Garvie, Bul. Math. Biol. 69 (3), 931 (2007).
- 60. L. N. Guin and P. K. Mandal, Appl. Math. Model. **38** (17–18), 4417 (2014).
- L. N. Guin and P. K. Mandal, Int. J. Biomathematics 7 (5), 1450047 (2014).
- 62. L. N. Guin, Appl. Math. Comput. 226, 320 (2014).
- 63. L. N. Guin, M. Haque, and P. K. Mandal, Appl. Math. Model. **36** (5), 1825 (2012).
- 64. L. N. Guin, S. Chakravarty, and P. K. Mandal, Nonlinear Analysis: Modelling and Control **20** (4), 509 (2015).
- L. N. Guin and H. Baek, Math. Comput. Simulation 146, 100 (2018).
## Dynamics of a Prey-Predator System with Herd Behaviour of Prey and Predator and with Strong Allee Effect in Prey

## S. Biswas\*, D. Pal\*\*, G.S. Mahapatra\*, and G.P. Samanta\*\*\*

\*Department of Mathematics, National Institute of Technology-Puducherry, Karaikal, 609609, India

\*\*Chandrahati Dilip Kumar High School, Chandrahati, West Bengal, 712504, India

\*\*\* Department of Mathematics, Indian Institute of Engineering Science and Technology, Shibpur, Howrah-711103, India

This paper concerns the dynamics of a prey-predator system in which the prey and predator exhibit herd behavior. The positivity and boundedness of solution, some extinction criteria, stability of possible equilibrium points are discussed relative to some global behavior in terms of an innovative approach. The results of numerical simulations are represented to clarify the analytical discussions. The biological implications of analytical and numerical findings are discussed separately for the purpose of maintaining ecological balance in nature. Thereafter, possible directions for future research on this theme are outlined.

Keywords: prey-predator, herd behaviour, Allee effect, extinction, stability

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ=

УДК 638.141

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЕСЕННЕЙ АГРЕГАЦИИ ПЧЕЛ В УЛЬЕ ПРИ БОЛЬШИХ СУТОЧНЫХ КОЛЕБАНИЯХ ТЕМПЕРАТУРЫ НАРУЖНОГО ВОЗДУХА

## © 2020 г. С.В. Оськин, Д.А. Овсянников

Кубанский государственный аграрный университет им. академика И.Т. Трубилина, 350044, Краснодар, ул. Калинина, 13 E-mail: kgauem@yandex.ru Поступила в редакцию 15.02.2020 г. После доработки 15.02.2020 г.

Принята к публикации 05.06.2020 г.

Прохождению пчелами зимнего периода посвящено много исследований, что говорит сложности понимания такого состояния пчелиной семьи. Однако самым критическим периодом для пчел является конец зимы и весна. В это время наблюдаются большие температурные колебания воздуха, и пчелы вынуждены время от времени переходить из пассивного состояния в активное и наоборот. Наиболее явно этот феномен появляется на пчеловодческих пасеках, расположенных в районах Северного Кавказа. В весеннее время положительные высокие температуры воздуха провоцируют пчел на вылет из улья, и не все пчелы к концу дня возвращаются в улей. Низкие температуры могут привести к агрегации пчел в неудобном месте, где нет запасов корма или отсутствует возможность добраться к запасам меда. Данное исследование посвящено именно этим периодам существования пчел. Моделирование основных физических процессов проводилось в программном обеспечении Comsol. В ранее разработанные модели были добавлены слагаемые, связанные с переходными процессами и учитывающие теплоемкости элементов улья. Также модели учитывали изменение объема зимней агрегации в зависимости от окружающей температуры. По результатам моделирования установлено, что действительно при весенних колебаниях температуры воздуха теплоемкость медовых запасов значительно влияет на внутренний температурный режим улья. Запасенная в меде тепловая энергия сглаживает температурные колебания воздуха внутри улья, что является положительным фактором для пчел.

Ключевые слова: агрегация пчел, улей, температура, электрический обогрев, моделирование. **DOI:** 10.31857/S0006302920050154

Известно, что пчеловоды уделяют много внимания подготовке к зимовке пчелиных семей. Осенью необходимо правильно определить объем корма и его месторасположение в улье, предположить место, где будет находиться пчелиный клуб. Правильно сформированная семья в зиму – это высокая вероятность успешной зимовки. Особенно критический период для пчелиной семьи конец зимы и начало весны. В это время часто запасы корма на исходе, кроме того, пчелиный клуб может сместиться в одну сторону улья, и пчелы не могут добраться до медовых рамок, расположенных в другой стороне. Также нужно учитывать, что в это время в улье уже есть расплод, и пчелы повышают температуру воздуха внутри своей агрегации, что, естественно, сопровождается более высоким потреблением корма. Нужно отметить, что в эти периоды года наблюдаются существенные суточные колебания температуры. Наиболее высокие значения суточных температурных колебаний отмечаются на территории Северного Кавказа. В данной местности днем температура воздуха может доходить до плюс 10-14°C, а ночью опускаться до нуля или даже до отрицательных значений – до –5°С. В конце зимы и начале весны возрастает роль электрического подогрева ульев, так как это дает возможность пчелам забрать мед даже в дальних частях улья и стабилизирует температуру внутри улья [1]. Для того чтобы создать эффективную систему электроподогрева в ульях, нужно иметь адекватные модели агрегации пчел и теплопроводности элементов улья в этот период. Моделированию тепловых процессов внутри улья зимой был посвящен ряд работ [2, 3, 4, 5]. Однако весеннее состояние пчел и параметры окружающего воздуха в этот период требу-



Рис. 1. Виды геометрической модели объекта исследований.

ет особенного подхода к моделированию. Пчеловоды замечают, что весной в теплый день пчелы иногда не выходят на очистительный облет. Приходится даже их возбуждать, чтобы они вышли из улья. Скорее всего, это связано с тем, что после длительной зимовки с низкими температурами внутри улья мед принимает температуру, практически равную температуре окружающей среды (особенно на краях улья). При значительном количестве меда в улье (может еще доходить до 10-20 кг) за счет высокой теплоемкости внутренняя температура будет держаться длительное время на низкой отметке даже при положительных значениях температуры наружного воздуха. В этом случае важно произвести подогрев кормовых запасов заранее с помощью системы электроподогрева. Может возникать и другой случай, когда днем довольно долго держалась высокая температура, а ночью пошло понижение, и возникает вопрос – есть ли необходимость сразу включать электроподогрев. Таким образом, существует проблема обоснованности использования в такие периоды системы подогрева ульев. Если такая система будет работать, основываясь только на сигналах датчиков температуры, и не будет учитывать теплоемкости тел, находящихся в улье, то это может приводить к повышенному расходу электроэнергии, задержке пчел на вылет из ульев или, наоборот, к провокации на выход, гибели пчел с пониженным запасом корма.

Следовательно, необходимо разработать модель весенней агрегации пчел и провести моделирование состояния внутреннего микроклимата улья с применением системы электрообогрева.

## модель

Математическое моделирование велось в среде моделирования Comsol. Ранее были представлены результаты моделирования основных физических процессов пчелиной семьи из 15000 пчел, зимующей в дадановском улье [1, 2]. Зимняя агрегация пчел представлена в виде эллипсоида, состоящего из нескольких цилиндров разного размера. Часть цилиндров — это пчелы, размещающиеся в ячейках сот, и пчелы, расположенные в межсотовом пространстве (рис. 1).

Для моделирования прохождения воздуха через клуб введены воздушные цилиндры (по два на улочку) с изменяющейся высотой цилиндра. Эти цилиндры по своему объему будут эквивалентны общему объему воздуха в улочке, занимаемой пчелами. Высота воздушных цилиндров изменяется по линейному закону в функции температуры.

Так как в зимний период плотность клуба изменяется, то будет изменяться и радиус цилиндров клуба в зависимости от температуры окружающего воздуха. Объем клуба пропорционален квадрату радиуса, следовательно, при максимальной плотности пчел радиус клуба уменьшится в 0,71 раз от первоначального значения. В соответствии с принятыми геометрическими значениями радиусы отдельных улочек будут описываться уравнениями:

$$\begin{cases}
R_{1 bee} = 1,07 \cdot T + 110 \text{ MM} \\
R_{2 bee} = 0,93 \cdot T + 95 \text{ MM} \\
R_{3 bee} = 0,7 \cdot T + 70 \text{ MM} \\
R_{4 bee} = 0,3 \cdot T + 35 \text{ MM}
\end{cases}$$
(1)

где *T* – температура окружающего воздуха.

Два воздушных цилиндра в улочке имеют высоту  $d_{air} = 1.25$  мм (при температуре наружного воздуха 0°С). При снижении температуры будет происходить уменьшение этого параметра по линейному закону, что можно представить следующим образом:

$$d_{\rm air} = 1.25 + 0.025 T \,(\rm MM). \tag{2}$$

Моделирование физических процессов, происходящих в улье, проводили в Comsol 5.4.

Полученные уравнения для определения геометрических и физических параметров вводили в соответствующие блоки программы. Ранее анализ проводили только для стационарного режима [1, 5]. Теперь моделирование проходило для нестационарного режима, и в системы уравнений были добавлены производные по времени. Так, обобщенная математическая модель, описывающая тепловые процессы в улье, имеет вид:

$$\begin{cases} \rho_{\text{wood}} \cdot c_{\text{wood}} \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \rho_{\text{hc}} \cdot c_{\text{hc}} \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \rho_{\text{emptyhc}} \cdot c_{\text{emptyhc}} \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \rho_{\text{bee}} \cdot c_{\text{bee}} \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \rho_{\text{air1}} \cdot c_{\text{air1}} \cdot u_{\text{air1}} \cdot \nabla T + \\ + \rho_{\text{air2}} \cdot c_{\text{air2}} \cdot u_{\text{air2}} \cdot \nabla T + \nabla q_{\text{air1}} + \nabla q_{\text{air2}} + \nabla q_{\text{wood}} + \nabla q_{\text{hc}} + \nabla q_{\text{emptyhc}} + \nabla q_{\text{bee}} N u = Q_{\text{bee}} \\ \lambda_{\text{bee}} = 0,0076 - 0,0017 \cdot T_0; \rho_{\text{rry}} = 243 - 8 \cdot T_0 , \qquad (3) \\ Q_{\text{bee}} = 3,2 \cdot T_0^2 - 20 \cdot T_0 + 922 \\ q_i = -\lambda_i \Delta T \end{cases}$$

где  $\rho_{air1}$  и  $\rho_{air2}$  — соответственно плотности воздуха, поступающего снаружи и проходящего через пчелиный клуб;  $c_{wood}$ ,  $c_{hc}$ ,  $c_{empty hc}$ ,  $c_{bee}$  — соответственно теплоемкости деревянных элементов, медовых сот, пустых сот, пчелиного клуба;  $c_{air1}$  и  $c_{air2}$  — соответственно теплоемкости воздуха первого и второго воздушных блоков (внутреннего воздуха и воздуха внутри клуба);  $u_{air1}$  и  $u_{air2}$  — соответственно поля скоростей первого и второго воздушных блоков, м/с;  $q_{air1}$ ,  $q_{air2}$ ,  $q_{wood}$ ,  $q_{hc}$ ,  $q_{empty hc}$ ,  $q_{bee}$  — соответственно плотности теряемых тепловых потоков путем теплопроводности, воздушных блоков 1 и 2, деревянных элементов, медовых сот, пустых сот, пчелиного клуба, Вт/м<sup>2</sup>; Nu — число Нуссельта.

Аналогично были добавлены производные по времени в модели движения воздуха и влажности, представленные в литературе [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Первоначально были моделированы температурные поля внутри улья при разных наружных температурах. При этом проводилось сопоставление с реально возможными значениями температуры воздуха внутри клуба и внутри улья. Анализировалось изменение геометрии клуба вместе с максимальными и минимальными значениями температуры в отдельных точках агрегации пчел. На рис. 2 представлены геометрические конфигурации видов агрегации пчел при разных температурах окружающего улей воздуха. Из рисунка видно, что при температуре наружного воздуха –  $20^{\circ}$ С клуб пчел сжимается, при этом минимальная температура зафиксирована на периферии клуба и равна  $8.2^{\circ}$ С, а максимальное значение температуры характерно для центра клуба ( $28^{\circ}$ С). При температуре наружного воздуха  $0^{\circ}$ С агрегация пчел увеличивает свои размеры, и минимальная температура становится равной  $14^{\circ}$ С, а максимальная –  $32^{\circ}$ С.

В результате анализа температурных изменений отдельных элементов улья и агрегации пчел установлено, что при изменении наружной температуры от -30°С до 13°С температурные поля соответствуют реально возможным для данной конструкции улья и конкретного количества пчел. Пример распределения температуры внутри улья при наружном значении этого параметра, равном  $-3^{\circ}$ С, приведен на рис. 3. На данном рисунке представлен разрез через центр улья, и видно, что ближе к стенкам улья температура находится на уровне -1°C, а максимальная температура зафиксирована внутри клуба со значением 36°С. Также можно наблюдать высокие значения температуры в верхней части улья – от 12°С до 20°С, что связано с хорошей теплоизоляцией потолка улья и тепловой конвекцией. Можно видеть и выход теплого воздуха через верхний леток (в правой части разреза).

Моделирование транспорта влаги внутри улья и движения воздуха во внутриульевом пространстве показало совпадение практически всех процессов с вариантом стационарного анализа [5].



Рис. 2. Геометрические конфигурации видов агрегации пчел при разных температурах наружного воздуха.

Таким образом, при длительном сохранении температуры окружающего улей воздуха учет в моделях переходных процессов особого влияния не оказывает на расчеты температурных распределений внутри объекта исследований. При наступлении конца зимы и начала весны расширяется диапазон суточных колебаний, и картины температурных полей внутри улья начинают отличать-



Рис. 3. Температурное поле улья в разрезе через центральный леток и при температуре наружного воздуха минус 3°С.

ся от стационарных режимов. Такие температурные перепады в течение суток характерны для южных регионов России. В этих частых температурных переходах начинает оказывать влияние на температуру воздуха внутри улья теплоемкость элементов улья.

Следующим этапом моделирования было определение диапазонов колебаний температуры отдельными элементами объекта исследований при реальных изменениях температуры в зимневесенний период. Для этого были взяты значения температуры воздуха в отдельные дни в Краснодарском крае (Лабинском районе) в 2017 г. Температурный диапазон был зафиксирован через каждые 12 ч с середины февраля до середины марта и введен в модель.

## ОБСУЖДЕНИЕ

После осуществления моделирования нестационарных режимов в улье и получения соответ-



Рис. 4. Графики изменения средней температуры отдельных элементов улья. БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



Рис. 5. Графики изменения минимальной температуры отдельных элементов улья.

ствующих данных был проведен анализ полученных результатов. В первую очередь было необходимо определить, как влияет теплоемкость материалов на температурные графики внутреннего воздуха в улье. На рис. 4 представлены графики изменения температуры окружающего улей воздуха (наружный воздух) и средних значений температур: всего внутреннего воздуха в улье (весь воздух), медовых запасов в улье (мед в рамках), внутреннего воздуха в агрегации пчел (воздух внутри клуба).

При анализе полученных графиков установлено следующее. За рассматриваемый период диапазон изменения наружной температуры воздуха составил от  $-3^{\circ}$ С до  $17^{\circ}$ С ( $\Delta T = 20^{\circ}$ С). Изменения температуры меда были явно меньше – от  $8^{\circ}$ С до  $21^{\circ}$ С ( $\Delta T = 13^{\circ}$ С), что объясняется высокой теплоемкостью данного вещества. Также на температурном графике меда можно видеть более плавные переходы от одной фиксированной точки к другой. Диапазон изменения температуры внутреннего воздуха клуба пчел составил от 20°C до  $32^{\circ}$ C ( $\Delta T = 12^{\circ}$ C), но переходы от одной точки к другой более резкие, что связано с малой теплоемкостью воздуха и реакцией пчел на изменения температуры. Температура воздуха внутри улья в среднем колебалась от 7°C до 19°C ( $\Delta T = 12^{\circ}$ C) с умеренными колебаниями температуры между соседними временными данными.

Представляют интерес графики изменения минимальной температуры в отдельных материалах объекта в зависимости от времени (рис. 5). Из рисунка видно, что минимальная температура воздуха внутри клуба пчел не опускается ниже



Рис. 6. Графики изменения максимальной температуры отдельных элементов улья.

плюс 11°С, что соответствует реальным значениям, установленным различными авторами [2, 3, 7-10]. Минимальная температура всего внутреннего воздуха доходила до температуры за пределами улья  $(-2^{\circ}C)$ , конечно, такая температура была только на периферии улья — за крайними рамками. При этом график минимальной температуры в точках минимума практически совпадает с графиком наружной температуры. В точках с высокими значениями наружной температуры график наружного воздуха значительно ниже, что объясняется запасом тепловой энергии в меде. В этих точках наблюдается совпадение значений температур внутреннего воздуха и меда. Также можно отметить минимальное значение температуры меда, которое находится на уровне 1°С, и эти значения присущи крайним рамкам с медом.

На рис. 6 показаны графики максимальных температур в отдельных элементах улья. Здесь видно, что графики максимальной температуры воздуха в улье и внутри клуба полностью совпадают. Это связано с тем, что такие температуры пространственно расположены близко друг к другу – при выходе воздуха из клуба. К этим графикам близок и график максимальной температуры меда, так как это тоже температура воздуха внутри клуба рядом с нижним краем меда в центральных рамках.

#### выводы

Теплоемкость меда значительно влияет на микроклимат пчелиного улья в переходные температурные периоды. Наиболее значительные колебания температуры окружающего воздуха отмечаются весной на юге России, в частности в Краснодарском крае. Эти периоды особенно тяжело проходят пчелиные семьи: при высоких температурах пчелиный клуб расширяется, вплоть до распада, а при похолоданиях – наоборот, пчелы уменьшают размеры своей агрегации. При высоких температурах пчелы могут переходить уже в активный режим с повышенным потреблением меда и начинают выращивать расплод. В это время, если наступает похолодание, пчелы собираются вокруг расплода и интенсивно его обогревают, и могут возникнуть проблемы с невозможностью взять мед на дальних рамках. В такие периоды пчеловоды стараются применять электрообогрев с автоматическим включением нагревателей. Однако управление электрообогревом по датчикам температуры может привести к значительному энергопотреблению и провокации пчел на раннюю закладку расплода. Полученные модели показали, что, действительно,

при весенних колебаниях температуры теплоемкость медовых запасов значительно влияет на внутренний температурный режим улья. Запасы тепловой энергии в меде сглаживают температурные колебания воздуха внутри улья. Если температура воздуха за ульем меняется на 10°C в течение 12 ч, то не следует включать нагреватели из-за наличия запаса тепловой энергии в меде. Если температура воздуха установилась низкая и такой режим длится более суток, то нужно включать нагреватели. При этом нагреватели лучше секционировать на три части, и весной следует вести подогрев только кормовых запасов, т.е. крайних рамок. Такой режим позволит не провоцировать пчелиную матку на раннюю закладку яиц и, в тоже время, даст возможность пчелам забирать мед даже с периферии улья.

## 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. С. В. Оськин и Д. А. Овсянников, Биофизика **65** (2),1 (2020).
- Е. К. Еськов и В. А. Тобоев, Биофизика 54 (1),114 (2009).
- 3. В. А. Тобоев и М. С. Толстов, в сб. *Мат-лы Всерос. науч. конф-ии «Физические процессы в биологических системах»* (Казань, 2014), сс. 97–102.
- 4. В. А. Тобоев и М. С. Толстов, Межотраслевой институт «Наука и образование». Ежемесячный научный журнал, № 3, 116 (2014).
- 5. С. В. Оськин и Д. А. Овсянников, Биофизика **64** (1),153 (2019).
- 6. В. А. Тобоев, Пчеловодство, № 1, 20 (2007).
- 7. А. И. Касьянов, Пчеловодство, № 2, 16 (2003).
- 8. А. Д. Трифонов, Пчеловодство, № 11, 21 (1990).
- А. Ф. Рыбочкин и И. С. Захаров, Компьютерные системы в пчеловодстве, 2-изд. (Курский гос. техн. ун-т., Курск, 2004).
- С. В. Оськин и Д. А. Овсянников, Электротехнологические способы и оборудование для повышения производительности труда в медотоварном пчеловодстве Северного Кавказа (Изд-во ООО «Крон», Краснодар, 2015).

## Simulation of Bees' Aggregation in the Hive in Spring when Daily Outdoor Air Temperature Fluctuates a Great Deal

## S.V. Oskin and D.A. Ovsyannikov

### Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350044 Russia

There is a lot of research reporting on bee wintering process that shows that the state of bee family during wintering is yet to be understood. However, the most critical time for bees is late winter and spring. There are large fluctuations of temperature in the air during this period stimulating bees to occasionally become active and switch to the ectothermic state and vice versa. This phenomenon has mostly been observed in the apiaries, which cultivate the bees in the North Caucasus region. With springtime strong positive air temperature tendency, bees fly from the hive, and not all bees return to the hive by the end of the day. Low temperatures may lead to aggregation of bees in awkward places where there is neither food nor direct access to the honey reserves. This study focuses on bee behavior under these natural conditions. The main physical effects were simulated using the Comsol® software. The components associated with transient processes were added to the previously developed models, which include the heat capacity of the beehive elements. The models also addressed the change in the volume of bees' winter aggregation depending on the ambient temperature. Our simulation results suggest that with spring air temperature fluctuations, the heat capacity of honey reserves has a significant effect on the temperature regime inside the hive. Honey-produced energy in the form of heat mitigates temperature fluctuations inside the hive. This is an important factor in honey bee health.

Keywords: bee aggregation, hive, temperature, electric heating, simulation

## — БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 57.01+573+575+576.7+611-013+611.018

## ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ЭПИТЕЛИЯ КАК РЕГУЛЯРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СЕТИ (НА ПРИМЕРЕ ГЛАЗА ДРОЗОФИЛЫ)

© 2020 г. Г.А. Савостьянов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44 E-mail: genasav38@mail.ru Поступила в редакцию 19.03.2020 г. После доработки 23.05.2020 г.

Принята к публикации 25.05.2020 г.

На примере анализа пространственной организации сетчатки дрозофилы показано, что структуру клеточных пластов можно представлять трехмерными клеточными решетками, имеющими вид этажерок. Такие решетки отражают топологию клеточных пластов и являются новым предметом гистологии. Для их исследования предложен специальный подход, заключающийся в синтезе семейства моделей пространственной организации тканей, сравнении тканевых срезов с сечениями моделей и выбору той из них, которая соответствует реальности. Этот подход существенно облегчает реконструкцию и открывает путь к построению трехмерной вычислительной гистологии.

Ключевые слова: топология тканей, клеточная решетка, коннектом, компьютерное моделирование, трехмерная гистология, глаз дрозофилы.

DOI: 10.31857/S0006302920050166

Современная гистология в значительной мере остается плоскостной. Это – следствие того, что основным методом исследования в ней служит изучение тонких срезов, не отражающих морфологические и функциональные взаимосвязи клеток в тканевом пространстве. Несмотря на появление новых методов микроскопии, компьютерных технологий трехмерной реконструкции, а также количественной гистологии [1] знания о трехмерной структуре тканей явно недостаточны. Конечным результатом исследования до сих пор служат микрофотографии (или рисунки) плоскостных картин, которые видны в микроскоп, их качественное описание или морфометрическая характеристика. Более того, в современной описательной гистологии не выделены главные параметры, которые следует изучать при реконструкции пространственной организации тканей, и основные усилия направляются на выяснение геометрии клеток и формы ткани как континуума, но не на характер клеточных взаимосвязей и образуемых ими сетей. Разработка моделей для исследования этих вопросов проводится в рамках математической теории строения биологических тканей [2-8]. Однако пока она основана на излишне жесткой аксиоматике и предлагает ограниченный набор моделей тканевой структуры, поэтому в существующем виде эта теория слабо

влияет на работу практических гистологов. Таким образом, трехмерная гистология пока не создана, а закономерности эволюционного становления пространственной организации тканей остаются неизвестными. Это сдерживает понимание закономерностей трансформации тканей в патологии и, в частности, в морфогенезе опухолей.

Ранее нами были предприняты шаги к ликвидации этого пробела путем дальнейшего развития теории и пополнения семейства тканевых моделей [9–12]. Она основана на представлениях о том, что ткани состоят не из клеток как таковых, а из клеточных групп, возникающих в результате разделения функций между клетками. Такие группы получили название гистионов. Полимеризация гистионов дает клеточные сети различной размерности (1D, 2D и 3D), состава и структуры. Такое представление позволяет сформулировать более адекватный набор аксиом и строить расширенные семейства топологических и геометрических моделей гистоархитектуры. Предлагаются также два варианта компьютерного представления моделей: в виде полиэдров, отражающих геометрию клеток, и в виде клеточных решеток, отражающих топологию клеточных сетей. Для их анализа в реальных тканях был разработан специальный подход, который заключается в сравнении тканевых срезов с сечениями моделей и выбору той из них, которая соответствует реальности. Этот подход показал свою эффективность при трехмерной реконструкции ряда покровных и сенсорных эпителиев и позволил определить строение их клеточных сетей [9–13].

Целью настоящей работы было изучение с помощью разработанного подхода пространственной организации сетчатки дрозофилы. Первый шаг, направленный на исследование геометрии ее клеток, был сделан нами ранее [14]. В настоящей работе приводятся результаты изучения топологии ее клеточных сетей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Глаз мухи Drosophila melanogaster отличается высокой упорядоченностью расположения омматидиев, что делает его удобным объектом для исследования. Особенно это относится к глазу зародыша мухи, имеющему более простую геометрию. Изучению структуры глаза у зародышей и взрослых особей посвящено множество работ, из которых мы используем лишь несколько [15-19]. В соответствии с ними в каждом омматидии различают три основные части: преломляющую или диоптрическую (хрусталик и кристаллический конус), воспринимающую или рецепторную (ретинальные клетки) и изолирующую, состоящую из пигментных клеток. При этом хрусталик с кристаллическим конусом, все ретинальные и две первичных пигментных клетки совместно образуют единый комплекс [19]. В дальнейшем его внутреннее строение мы детализировать не будем. Такие комплексы изолированы друг от друга вторичными и третичными пигментными клетками, а также механорецепторами. Их взаиморасположение на разных уровнях сетчатки в настоящее время представляется в виде различных двухмерных схем. При этом трехмерная форма составляющих глаз клеток, их численные соотношения, смежность, а также клеточная сеть, отражающая топологию глаза, на схемах не отражены и остаются неизвестными. Выяснение этих вопросов с помощью моделей и составляло нашу задачу.

Исходным материалом для построения трехмерных моделей сетчатки служили обобщенные результаты морфологических исследований нормального глаза дрозофилы, представленные в виде двухмерных схем различной полноты [16, 18]. Эти схемы были сведены нами в единую картину (рис. 1).

В верхней части рис. 1а показано существующее представление о строении омматидия зародыша дрозофилы на продольном разрезе. На рис. 16 дается его апикальная поверхность (по [15]), и картины поперечных сечений на уровнях a-c, имеющих вид двухмерных мозаик. На этих сечениях единый двенадцатиугольный комплекс из светопреломляющих, ретинальных и первичных пигментных клеток обозначен буквой А, гексагональные вторичные и тетрагональные третичные пигментные клетки – буквами В и С соответственно, гексагональные механорецепторы – буквой D. Внутреннее строение этих клеток также не учитывается. Другими словами, в нашем рассмотрении элементы моделей считались «непрозрачными» и характеризовались лишь внешней формой, имеющей вид полиэдров с выровненными гранями. Наконец, не учитывалось наличие синапсов и нервных волокон. Такая упрощенная схема строения сетчатки на продольном разрезе, с отмеченными уровнями а-с, представлена в нижней части на рис. 1а.

Построенные схемы служили основой для создания трехмерных моделей сетчатки, которое проводили с использованием разработанной нами компьютерной программы «Гистоарх» [20]. Для этого в качестве исходной принимали двухмерную мозаику b на рис. 16, которая приближается к геометрически правильной форме. С помощью «Гистоарха» проводили непрерывное преобразование этой мозаики и получали серию геометрических вариантов и топологических трансформаций мозаик, показанных на рис. 1в. Эти мозаики отражали геометрию и смежность клеток на различных уровнях сетчатки, от апикального до базального, Полученные двумерные мозаики превращали в решетки, показанные на рис. 1г. В соответствии с работой [3] это делалось следующим образом: центры полигонов обозначали кружками, а связи между ними (непосредственное соседство) – отрезками. Такие решетки отражают без геометрических деталей состав (с помощью оттенков цвета) и топологию клеточных сетей на соответствующих уровнях пласта.

На основании полученной серии мозаик с помощью «Гистоарха» строили трехмерные модели в полиэдрах, отражающие геометрию отдельных клеток сетчатки, а также их объединения в массивы. Кроме того, на основании полученных решеток, соединяя их одноцветные кружки стержнями (отрезками того же цвета), строили трехмерную модель сети в виде «этажерки», которая отражала топологию ткани в трехмерном пространстве. Оба варианта моделей имели векторную природу. Эти модели сравнивали с имеющимися данными о строении реальной сетчатки. Для этого использовали предложенный ранее [10] комплекс признаков: клеточный состав, численные соотношения клеток, их смежность и микроокружение. Для большей информативности построенные модели и их сечения группировали в наглядные композиции с помощью программы Adobe Photoshop®. Поскольку в нашем случае высокой регулярности сетчатки и ее моделей эти признаки являются неслу-



**Рис. 1.** Существующие двухмерные представления о строении омматидия зародыша дрозофилы. (а) — Вверху показано существующее представление о строение омматидия зародыша дрозофилы на продольном срезе. Внизу дана его упрощенная схема, дополненная верхним и нижним уровнями. Третичная пигментная клетка на срез не попала. (б) — Вид поперечных сечений омматидия на уровнях *a-c* (буквы *b* со звездочками обозначают мозаики с той же топологией, что и мозаика *b*, но отличающиеся от них геометрически); А — «непрозрачный» комплекс первичных пигментных и ретинальных клеток («радужка»), В и С — вторичные и третичные пигментные клетки, D — механорецептор. (в) — Аппроксимация поперечных сечений омматидия двумерными мозаиками на уровнях *a-c*. (г) — Представление топологии мозаик регулярными клеточными решетками с указанием их клеточного состава и смежности.

чайными, статистическая обработка результатов сравнения не требовалась.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты трансформации исходной мозаики, полученные с помощью «Гистоарха», представлены на рис. 1в набором регулярных двумерных мозаик. На апикальном уровне a они состоят из девятиугольных профилей комплексов A и треугольных профилей щетинок механорецепторов D. Расположенная ниже основная часть мозаик (уровни  $b, b^*, b^{**}$ ) состоит из двенадцатиугольных профилей комплексов A, гексагональных профилей механорецепторов D и вторичных пигментных клеток B, а также тетрагональных третичных пигментных клеток С. Наконец, на базальном уровне *с* мозаика представлена треугольными профилями клеток В и D. Эти мозаики аппроксимируют с точностью до топологии сечения омматидиев, схематически показанных на рис. 16. Таким образом, несмотря на обилие геометрических модификаций мозаик на уровнях *b*,  $b^*$  и  $b^{**}$ , их общий набор включает в себя только три топологических варианта, обозначенных буквами *a*, *b* и *c*.

Клеточные решетки, отражающие состав и топологию этих мозаик без геометрических деталей, представлены на рис. 1г. Поскольку они характеризуются высокой регулярностью строения (трансляционной симметрией), можно выделить их элементарные ячейки и определить их состав,



**Рис. 2.** Трехмерные модели пространственной организации сетчатки зародыша дрозофилы состава ABC<sub>3</sub>D. (a) – Геометрия клеток и их взаиморасположение. Буквенное обозначение клеток повторяется. (б) – Внешний вид клеточного массива. (в) – Строение внутриэпителиальных клеточных ниш. Вверху – ниши омматидиев, внизу – вторичной пигментной клетки. (г) – Базально-апикальные сечения массива, проведенные в различных направлениях. Можно видеть, как сильно зависит получаемая картина от направления и глубины сечения.

как это описано ранее [10]. Для мозаик a, b и c он будет равен AD, ABC<sub>3</sub>D и BD соответственно.

Описанные мозаики (рис. 1в) представляют собой упрощенные поперечные сечения сетчатки. На основании их набора с помощью компьютерной программы «Гистоарх» была построена трехмерная модель сетчатки, представленная в левой части рис. 2а. Она показывает геометрию клеток различных типов в виде полиэдров, число их ребер и граней, а также клеточное взаиморасположение. Видно, что только механорецепторы D выходят и на апикальную, и на базальную поверхности. Комплексы А достигают только апикальной, а вторичные пигментные клетки В – только базальной поверхности. Третичная пигментная клетка С не достигает ни одной из этих поверхностей и находится в глубине пласта. На построенной модели отмечены также уровни сечений, соответствующие различным мозаикам сетчатки. Например, нижнее ее сечение с на рис. 1 соответствует сечению с трехмерной модели.

Следующие сечения омматидия соответствуют уровням  $b^{**}$  и b модели. Последовательность геометрических изменений профилей элементов сетчатки на более высоких уровнях также отражается моделью, что можно видеть на примере уров-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

ня  $b^*$ . Наконец, на поверхности глаза находится мозаика a (рис. 1, уровень a), состоящая из топологических девятиугольников (комплексы A) и треугольников (механорецепторные сенсиллы) в соотношении 1/1. Эта мозаика соответствует уровню a модели.

Нетрудно видеть, что по составу, численным соотношениям (AD, ABC<sub>3</sub>D и BD), геометрии и смежности клеток, характеру микроокружения каждой клетки, а также регулярности строения (трансляционной симметрии) все мозаики на сечениях омматидиев и модели полностью совпадают. Это позволяет заключить, что модель отражает трехмерное строение сетчатки дрозофилы. В частности, модель впервые позволяет точно описать микроокружение каждого элемента сетчатки в трехмерном пространстве. Так, каждый «непрозрачный» комплекс А связан с тремя вторичными пигментными клетками В, тремя механорецепторами D и с шестью третичными пигментными клетками С. Каждая вторичная пигментная клетка и механорецептор связаны с тремя комплексами А и тремя третичными пигментными клетками. Последние связаны с двумя комплексами А,



**Рис. 3.** Топологическая характеристика пространственной организации сетчатки. Слева – клеточная решетка (коннектом) в виде «этажерки», отражающей топологию ткани без геометрических деталей на уровнях a-c. Для наглядности средний уровень b растянут и заключен между двумя идентичными двумерными решетками. Справа показаны гистионы, отражающие состав и смежность клеток в двумерных решетках каждого уровня «этажерки». Гистион среднего уровня b является репрезентативным, поскольку он наиболее полно отражает клеточный состав решетки в целом.

вторичной пигментной клеткой и механорецептором D. Модель описывает и чередование различных контактов. Такая точность описания достигнута впервые. Кроме того, модель предсказывает то, каким образом должно меняться строение сетчатки на различных уровнях.

Из описанных клеток с помощью компьютерной программы «Гистоарх» можно построить клеточный массив и исследовать его поверхность. Общий вид такого массива показан на рис. 2б. Удаляя из него отдельные клетки, можно рассмотреть строение внутриэпителиальных клеточных ниш, которые обеспечивают вышеописанное микроокружение удаленных клеток. Эти ниши для комплексов A и механорецептора D показаны на рис. 2в. Отметим, что ниша клеток B практически совпадает с нишей механорецептора. Исследовать строение ниш впервые оказалось возможным благодаря применению нашего подхода. С помощью программы «Гистоарх» выполняются сечения клеточного массива в различных направлениях и оценивается их информативность. Например, показанные на рис. 1в аппроксимирующие мозаики отражают косое сечение модели. Сечения, получаемые в апикально-базальном направлении, показаны на рис. 2г. Поскольку пласт характеризуется анизотропией, результат таких сечений очень сильно зависит от их направления и глубины и дает различные картины. Таким образом, компьютерная реализация модели показала, что определить геометрию клеток и строение клеточной решетки путем исследования базально-апикальных и плохо ориентированных срезов массива весьма сложно.

Построенная модель не только отражает геометрию клеток, но и содержит в себе строение трехмерной клеточной сети сетчатки. Набор двухмерных решеток, показанных на рис. 1г, позволяет построить модель клеточной сети сетчатки

в явном виде. Для этого, как было сказано выше, кружки двумерных решеток, соответствующие одним и тем же клеткам, нужно объединить с помощью вертикальных отрезков в виде стержней. Возникающая в итоге трехмерная решетка приобретает вид «этажерки», которая отражает топологию ткани в трехмерном пространстве (рис. 3).

На рис. 3 стержни – это различные клетки сетчатки, простирающиеся на различные уровни, горизонтальные отрезки между стержнями отражают клеточную смежность на различных уровнях. В построенной таким путем «этажерке» выделяются три уровня: а, b и c с решетками различного состава и топологии. Решетка каждого уровня характеризуется своим гистионом (показаны справа от «этажерки»). Гистионы — это элементарные структурные единицы двумерных решеток. Они компактно отражают состав, численные соотношения и смежность (микроокружение) клеток в решетках. Например, легко видеть, что репрезентативный (наиболее полный по составу) гистион «этажерки» имеет состав АВС<sub>3</sub>D, а смежность его клеток показана числом отходящих от них отрезков.

В целом можно сказать, что трехмерная модель из полиэдров, построенная на основании сечений омматидиев, совместно с клеточной решеткой в виде «этажерки» дают полное описание геометрии клеток сетчатки и топологии ее клеточной сети. Отметим, что глаз взрослой дрозофилы имеет ту же топологию и отличается лишь геометрической модификацией его клеток. Отметим также, что при специальном исследовании глаза модель можно сделать более подробной и учесть внутреннее строение комплекса А, т.е. диоптрической и фоторецепторной частей омматидия.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Главный смысл данной работы состоит в том, что в ней впервые в явной форме и точно установлена топология сетчатки, представленная моделью в виде трехмерной клеточной решетки. Такая решетка имеет вид «этажерки». Эта модель представляет без геометрических деталей наиболее существенную черту строения сетчатки, а именно: ее клеточную сеть, т.е. все взаимосвязи клеток в трехмерном пространстве пласта. Поэтому мы назвали такую решетку тканевым коннектомом, расширив первоначальный смысл этого термина (взаимосвязи не только нейронов мозга, но и клеток в различных тканях). Современная плоскостная гистология пока упускает этот аспект, что является важным пробелом. Этот пробел заполняет предложенная модель коннектома, который является новым предметом гистологии. Его изуче-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

ние в различных тканях должно быть включено в число главных задач создающейся трехмерной гистологии.

При кажущейся сложности «этажерок» полезную вспомогательную роль для характеристики коннектома пласта могут играть гистионы. Будучи более простыми, они дают почти всю информацию о каждом уровне «этажерки». Но одно ее важное свойство они не отражают. Это свойство — ориентационный порядок решеток, т.е. направления межклеточных связей и углы, под которыми эти связи осуществляются. Таким образом, гистион, оставаясь полезным понятием, не может полностью заменить клеточную решетку и «этажерку».

Кроме топологического описания сетчатки, была продолжена характеристика формы ее клеток, начатая ранее [14]. Наряду с уточнением их геометрии, с помощью «Гистоарха» был показан общий вид клеточного массива и его поверхностей. Также впервые показано строение в нем внутриэпителиальных клеточных ниш и дана их количественная характеристика (т.е. форма и число граней различных клеток, формирующих каждую нишу, а также порядок их чередования). Важно также то, что с помощью компьютерных моделей была проведена оценка информативности сечений массива, сделанных в различных направлениях. Эксперименты с моделями показали, как разнообразно и порой обманчиво может выглядеть ткань на различных срезах в зависимости от их ориентации. Опираясь на такие срезы, трудно судить о клеточном составе и пространственной организации пласта. В итоге найдено, что наиболее информативными являются тангенциальные или слегка скошенные срезы, а менее информативными – срезы в базально-апикальном направлении. Для описания строения таких срезов ранее был предложен комплекс новых информативных признаков [10].

Построенные модели можно надстроить сверху так, чтобы щетинки исчезли, и тогда апикальная мозаика будет состоять только из гексагональных профилей комплекса А. Надстроенные модели будут давать полное описание возможной гистоархитектуры сетчатки. Они позволят судить о ее мозаиках даже на тех уровнях, которые не были исследованы экспериментально (благодаря этой способности модели позволяют проводить реконструкцию реальной ткани при меньшем количестве ее срезов). В то же время в реальных тканях в отдельные периоды (в развитии, при повреждении) описанная гистоархитектура может реализовываться и не полностью. Это имеет место и в нашем случае: в отличие от модели в реальной сетчатке две клетки доходят до апикальной поверхности, и все клетки доходят до базальной поверхности. Это означает, что в данном случае

верхняя и нижняя части модели в сетчатке не реализованы. Однако реальный пласт может достраиваться как сверху, так и снизу. Тогда модель сможет прогнозировать то, как будет изменяться строение сетчатки при более полной ее реализации. Еще одним различием модели и реальной сетчатки является то, что все ее клетки обычно подвергаются геометрической модификации. Так, в верхней части пласта комплексы А являются выпуклыми, а вторичные пигментные клетки В, механорецепторы D и смежные с ними третичные клетки С – вогнутыми. В нижней части (на уровне  $b^{**}$ ) клетки С становятся уже выпуклыми. Возможность геометрической модификации клеток при сохранении топологии пласта уже обсуждалась ранее [10]. Такая модификация не затрагивает коннектом, является переменчивой и может отражать физиологические особенности клеток в различные периоды их жизнедеятельности.

В целом полученные результаты ранжируют по важности задачи, связанные с изучением пространственной организацией клеточных пластов любого состава. Прежде всего следует определять топологию тканей (их коннектомы) как наиболее существенной и постоянной их характеристики. Затем с помощью морфометрии можно проводить изучение особенностей геометрической вариабельности клеток в различных условиях.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые установлена топология сетчатки глаза дрозофилы, т.е. структура ее клеточной сети. Такая сеть представляет собой регулярную трехмерную решетку и имеет вид «этажерки». Она выступает как новый способ характеристики пространственной организации тканей и количественного описания их коннектомов. Кроме того, описана геометрия клеток сетчатки и строение внутриэпителиальных клеточных ниш. Это стало возможным благодаря применению нового подхода к реконструкции пространственной организации тканей, основанного на компьютерном моделировании. Этот подход радикально улучшает результаты реконструкции пространственной организации сетчатки и исследования топологии ее клеточных сетей. Он способен также прогнозировать направления тканевого развития. Уже говорилось, что его применение к реконструкции трехмерного строения ряда покровных и сенсорных эпителиев также оказалось результативным. Можно надеяться, что применение этого подхода к изучению и других тканей будет способствовать пониманию их перестроек в нормальном развитии и патологии. Развитие исследований в этом направлении может в конечном счете привести к построению трехмерной эволюционной гистологии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00776-19-02.

## 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. А. Г. Никоненко, *Введение в количественную гистологию* (Книга-плюс, Киев, 2013).
- 2. F. T. Lewis, Amer. Sci. 34 (3), 359 (1946).
- 3. В. В. Смолянинов, *Математические модели биоло*гических тканей (Наука, М., 1980).
- 4. K. J. Dormer, *Fundamental tissue geometry for biologist* (Cambridge Univ. Press, London, 1980).
- 5. В. М. Маресин, *Пространственная организация эмбриогенеза* (Наука, М., 1990).
- R. Nagpal, A. Patel, and M. C. Gibson, BioEssays 30 (3), 260 (2008).
- 7. F. Graner and D. Riveline, Development **144**, 4226 (2017).
- K. Goodwin and C. M. Nelson, Exp. Cell Res. 358, 45 (2017).
- 9. Г. А. Савостьянов, Биофизика 46 (3), 512 (2001).
- Г. А. Савостьянов, Основы структурной гистологии. Пространственная организация эпителиев. (Наука, СПб., 2005).
- Г. А. Савостьянов, Изв. РАН, сер. биол., № 2, 164 (2012).
- 12. Г. А. Савостьянов, Цитология 58 (8), 577 (2016).
- 13. Е. Г. Магницкая, Н. М. Грефнер, Т. Б. Голубева и др., Сенсорные системы **23** (4), 334 (2009).
- Г. А. Савостьянов, Сенсорные системы 15 (2), 121 (2001).
- 15. D. F. Ready, T. E. Hanson, and S. Benzer, Develop. Biol. **53** (2), 217 (1976).
- T. Wolff and D. F. Ready, Development 113 (3), 825 (1991).
- D. T. Miller and R. L. Cagan, Development 125 (12), 2327 (1998).
- S. Hilgenfeldt, S. Erisken, and R. W. Carthew, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105 (3), 907 (2008).
- 19. R. Cagan, Curr. Top. Dev. Biol. 89, 115 (2009)
- 20. Е. Г. Савостьянова, А. В. Воробьев, Н. М. Грефнер и др. Морфология **131** (4), 8 (2007)

## Representation of a Three-Dimensional Epithelial Structure as a Cell Regulatory Network in a Drozophila Eye Model

## G.A. Savostyanov

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

Analysis of the spatial arrangement of the Drosophila retina has shown that a structure of cell layers can be represented by three-dimensional cell lattices, they resemble a stack. Such lattices simulate the topology of cell layers and are a new subject of histology. The proposed approach to study these lattices is to perform synthesis of a series of models of the spatial arrangement of tissues, compare biological tissue sections and model sections and choose the one that has the most natural structure. This approach greatly eases the reconstruction and opens the way for the development of the computational three-dimensional histology.

Keywords: tissue topology, cell lattice, connectom, computer modeling, reconstruction, three-dimensional histology, Drosophila eye

## ==== БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ =

УДК 577.0;57.042;57.033

## ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ШЛАМОВЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА ФИТОПЛАНКТОН

© 2020 г. С.В. Беспалова, С.М. Романчук, С.В. Чуфицкий, В.В. Перебейнос, Б.А. Готин

Донецкий национальный университет, 283050, Донецк, ул. Щорса, 46

E-mail: ChufitskyiSergey@yandex.ru Поступила в редакцию 29.11.2019 г. После доработки 29.04.2020 г. Принята к публикации 07.05.2020 г.

Представлены результаты биомониторинга реки Ольховая (Донецкая область). Показано воздействие шахтных шламовых отходов на состояние поверхностных вод. Оценка физико-химических показателей дает возможность охарактеризовать воду в р. Ольховая как грязную, загрязненную большим количеством взвешенных угольных частиц, содержание которых значительно превышало предельно допустимые нормы. Флуориметрическим методом установлено снижение содержания хлорофилла в пробах воды, отобранных после попадания шламовых стоков в русло реки. Представлены результаты анализа кривых индукции флуоресценции хлорофилла. Установлено, что загрязнение шламовыми стоками приводит к нарушению протекания первичных фотосинтетических реакций в клетках фитопланктона.

*Ключевые слова: флуориметрия, фитопланктон, шламонакопители, биоиндикация.* **DOI:** 10.31857/S0006302920050178

Большое количество предприятий горнодобывающей промышленности Донецкого региона, а также высокая интенсивность их работы приводит к значительному ухудшению состояния окружающей среды [1, 2]. Попадание шахтных сточных вод, а также воды из шламонакопителей в природные водоемы делает их непригодными даже для хозяйственного использования [3-5]. Суммарное содержание растворенных солей в шахтных стоках изменяется в широких пределах и может достигать 10 г/л [6, 7]. Значительная степень минерализации, насыщенность взвешенными угольными частицами различного размера, а также высокая мутность воды приводят к гибели биоты, прежде всего клеток фитопланктона, а также к необратимым изменениям в водном биоценозе [5]. Следовательно, при проведении биомониторинга поверхностных вод в регионах с высокой антропогенной нагрузкой, обусловленной деятельностью предприятий горнодобывающей промышленности, необходим контроль степени воздействия данных предприятий на состояние природных вод.

В качестве биоиндикатора, который позволяет оценить степень негативного антропогенного воздействия на окружающую среду, выделяют фитопланктон [8, 9]. Высокая чувствительность к изменениям окружающей среды делает фитопланктон универсальным индикатором, способным реагировать на внесение малых концентраций загрязнителей. Одним из наиболее информативных экспресс-методов по оценке состояния фитопланктона является метод флуориметрии, позволяющий не только определять биомассу в исследуемом образце, но и анализировать функциональную активность фотосинтетического аппарата биообъекта [10–13].

Интенсивному загрязнению сточными водами угольных шахт подвергается изучаемая нами река Ольховая [14], которая является левым притоком р. Крынка (притока р. Миус, впадающей в Азовское море). Вода из р. Ольховая попадает в Ольховское водохранилище, которое является резервным. Следовательно, загрязнение реки шахтными водами, кроме гибели водного биоценоза, может сделать непригодными для использования водные ресурсы водохранилища.

При рассмотрении воздействия угольного шлама на фитопланктон данный загрязнитель представляют как коллоид, состоящий из частиц различного диаметра. При достаточной плотности такой взвеси частиц образуется слой, препятствующий прохождению солнечного света в водные горизонты под ним, что и оказывает наибольшее воздействие на клетки фитопланктона.

Сокращения: УКИЗВ – удельный комбинаторный индекс загрязненности воды, ПДК – предельно допустимая концентрация, ФС – фотосистема.



Рис. 1. Карта расположения мониторинговых точек на участке русла р. Ольховая, загрязненного притока и шламона-копителей.

Затемнение водного горизонта взвешенными частицами угольного шлама может снижать скорость фотосинтетических процессов, подавлять таким образом развитие фитопланктона и, как следствие, зоопланктона. Кроме того, попадание угольных частиц в донные отложения может приводить к более длительному действию данного загрязнителя на биоту [15]. В исследованиях, описанных в работе [16], было показано, что представители родов Ulotrix, Pinnularia и Frustulia могут выступать в качестве биоиндикатора, отражая степень загрязнения поверхностных вод шламовыми отходами. Однако, согласно данным биотестирования на клетках Chlorella vulgaris, содержащиеся в шламовых отходах гуминовые кислоты могут оказывать и стимулирующее действие на рост числа клеток, что возможно при относительно низком содержании загрязнителя [17]. Также следует отметить, что данных по воздействию данного загрязнителя на функционирование фотосинтетического аппарата, а также на флуоресценцию клеток микроводорослей в литературе недостаточно.

Целью исследования являлось изучение воздействия угольных шламовых стоков на состояние фитопланктона р. Ольховая с применением метода флуориметрии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Принимая во внимание все источники загрязнения шламовыми отходами, а также шахтными стоками, по ходу русла реки, был выбран ряд мониторинговых точек. Начальная точка № 1 располагалась у предполагаемого истока реки, точки № 2 и 3 – в местах накопления биомассы фитопланктона до попадания в поверхностные воды каких-либо источников загрязнения, № 4 – после попадания стоков из шламонакопителей, № 5 – проба из внешнего притока со шламовыми отходами, № 6 – после попадания шламовых отходов из внешнего притока, № 7 – проба, отобранная на территории поселка Ольховчик, в непосредственной близости к приусадебным участкам местного населения, № 8 – переход в широкое заиленное русло, место скопления угольных отходов, попавших в русло реки. Мониторинговые точки нанесены на карту и представлены на рис. 1.

Для оценки качества воды р. Ольховая проводили измерение температуры, мутности, показателя pH, а также содержания растворенного кислорода. Концентрацию растворенного кислорода, а также температуру проб воды определяли с помощью прибора охі::lyser E-501 (Scan Messtechnik GmbH, Австрия). Мутность проб определяли с помощью мутномера ИМП-2А (НПП «Аквастандарт-юг», Севастополь). Показатель pH в

пробах воды измеряли с помощью прибора pH-3500 производства фирмы «ЭкоЮнит» (Москва).

Химический анализ проб воды проводили на базе кафедры аналитической химии химического факультета ДонНУ. Определяли содержание Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Fe<sub>общ</sub>, Mo<sub>общ</sub>, Hg<sub>общ</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Полученные значения сравнивали с предельно допустимыми концентрациями согласно нормативным документам [18, 19].

Для оценки качества воды определяли класс загрязненности воды на основании определения удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ), а также количество критических показателей загрязненности [18]. Для этого рассчитывали:

— баллы кратности превышения предельно допустимой концентрации (ПДК):  $K_i = C_i / \Pi \square K_i$ ,

— баллы повторяемости случаев превышения ПДК:  $H_i = N_{\Pi \square K_i} / N_i$ ,

— общий оценочный балл:  $B_i = K_i \cdot H_i$ ,

- УКИЗВ: *УКИЗВ* = 
$$\frac{\sum_{i=0}^{n} B_i}{N_i}$$

где  $C_i$  – концентрация *i*-го вещества в пробе воды;  $\Pi \not\square K_i$  – предельно допустимая концентрация *i*-го вещества в пробе воды;  $N_{\Pi \not\square K_i}$  – число превышений значения ПДК для *i*-го вещества;  $N_i$  – общее число измерений содержания *i*-го вещества в среде [18].

Класс загрязненности определяли согласно коэффициенту, вычисленному из следующего соотношения: *УКИЗВ/k*, где k – коэффициент запаса, который рассчитывается в зависимости от числа критических показателей загрязненности *F*, согласно выражению: k = 1 - 0.1F. По значению полученного коэффициента определяли класс загрязненности воды [18].

Сбор фитопланктона осуществляли общепринятыми методами [20]. Из реки в мониторинговых точках отбирали по 2 дм<sup>3</sup> воды. Изучение качественного состава фитопланктона проводили в препаратах раздавленной капли с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия). При определении видовой принадлежности микроводорослей использовали классификационные схемы, общепринятые в специализированной литературе [21].

Флуориметрический анализ проб воды проводили с помощью двух импульсных флуориметров: Phyto-PAM (Walz, Германия), а также разработанного на базе СКТБ «Турбулентность» (Донецк) макета флуориметра ФС-2. Проводили измерение содержания хлорофилла в пробах воды, а также базовых показателей флуоресценции: уровней минимальной ( $F_0$ ), максимальной ( $F_m$ ) и переменной ( $F_v = F_m - F_0$ ) флуоресценции хлорофилла, а также квантового выхода флуоресценции ( $F_0 = (F_m - F_0)/F_m$ ) [10, 12, 22, 23].

С помощью флуориметра ФС-2 получали кривые индукции флуоресценции хлорофилла. На основании полученных кривых (см. рис. 2) и параметров ОЈІР-теста [22, 24] проводили анализ состояния микроводорослей.

При анализе индукционных кривых получали следующие параметры:

 $t_{Fm}$  — время, необходимое для достижения максимального уровня флуоресценции (милли-секунды);

*A*<sub>0</sub> или *Area* — площадь над индукционной кривой:

 $\varphi_{p0} = (F_{\rm m} - F_0)/F_{\rm m}$  – максимальный квантовый выход;

 $S_{\rm M} = A_0 / (F_{\rm m} - F_0)$  – нормированная общая площадь над кривой ОЈІР (отражающая емкость пула электронных акцепторов до полного восстановления  $Q_a$ );

 $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$  – относительная величина переменной флуоресценции в момент времени *t*;

 $V_{\rm J} = (F_{\rm J} - F_0)/(F_{\rm m} - F_0)$  – относительная величина переменной флуоресценции в фазе J (после 2 мс освещения); отражает количество закрытых реакционных центров по отношению к общему числу реакционных центров, которые могут быть закрыты;

 $V_{\rm I} = (F_{\rm I} - F_0)/(F_{\rm m} - F_0)$  – относительная величина переменной флуоресценции во время фазы I (30 мс), связанная с промежуточным стационарным уровнем восстановления пула пластохинонов; отражает способность фотосистемы (ФС) I и ее акцепторов окислять PQH<sub>2</sub>;

 $\Phi_{E_0} = (F_v/F_m) \times (1 - V_J)$  – квантовая эффектив-

ность переноса электронов от  $Q_A^-$  (при t = 0);

 $\Psi_0 = (1 - V_J)$  – вероятность транспорта электронов за пределы  $Q_A^-$  (при t = 0), т. е. эффективность, с которой экситон, захваченный реакционным центром, движет электрон по цепочке после  $Q_A$ ;

 $PI = (V_{J \times \varphi_{p0}}/M_0) \times (\varphi_{p0}/(1 - \varphi_{p0})) \times (\Psi_0/(1 - \Psi_0)) -$ тотальный индекс производительности – показатель функциональной активности ФС II, ФС I и цепи переноса электронов между ними [22, 24].

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили с помощью



Рис. 2. Некоторые параметры кривой индукции флуоресценции (кривая измерена в мониторинговой точке 3).

программ Statistica 8 (StatSoft Inc., США) и Excel 2003 (Microsoft, США). Достоверность отличий средних значений полученных данных определяли с использованием *t*-теста и критерия Вилкоксона [0].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Видовой состав альгофлоры. Анализ видового состава проводили в следующих мониторинговых точках: № 3, которую принимали за контрольную, содержащую наибольшее количество биомассы фитопланктона; № № 5, 7 и 8 — для оценки видового состава фитопланктона в загрязненном русле реки в условиях загрязнения при различной длительности экспозиции клеток фитопланктона. Следует отметить достаточно низкое содержание клеток фитопланктона в исследуемых образцах воды даже после концентрирования отобранных проб.

Наиболее многочисленными в мониторинговых точках № 3 и № 5 являлись представители рода *Nitzshia*, в частности *N. longissima*. Также были обнаружены клетки рода *Chlorella*, в частности *C. vulgaris*. В мониторинговых точках № 7 и № 8 (после впадения притоков) наиболее многочисленными являлись представители рода *Chlorella*, в частности *C. vulgaris*. Однако количество клеток

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

*N. longissima* не изменилось в сравнении с результатами, полученными в точках № 3 и № 5. Наиболее широко представлен отдел Chlorophyta, для которого были определены представители трех классов (Chlorophyceae, Trelouxiophyceae, Ulvophyceae), 3 порядков (Sphaeropleales, Chlorellales, Ulotrichales), пяти семейств (Scenedesmaceae, Hydrodictyaceae, Selenastraceae, Chlorelaceae, Ulotrichaceae) и семи родов (*Coelastrum, Scenedesmus, Tetraedron, Monoraphidium, Closteriopsis, Chlorella, Ulotrix*), видовую принадлежность удалось установить лишь для шести видов.

Таким образом, в точке № 3 были обнаружены представители рода Amphora, Nitzshia, Chlorella и Monoraphidium, до вида были определены Nitzshia longissima и Chlorella vulgaris; в точке № 5 – представители родов Ulotrix и Merismopedia; в точке № 7 – представители родов Pinnularia, Chlorella, Nitzshia, Stephanodiscus, Closteriopsis, Amphora, Coelastrum, Tetraedron, Scenedesmus, до вида были определены Nitzshia longissima, Chlorella vulgaris, Closteriopsis longissima, Coelastrum micronium, Tetraedron minimum, Scenedesmus quadricauda; в точке № 8 – представители родов Chlorella, Nitzshia, Stephanodiscus и Scenedesmus, до вида были определены Nitzshia longissima, Chlorella vulgaris и Scenedesmus quadricauda.

			-					
Наименование показателя	Точка № 1	Точка № 3	Точка № 4	Точка № 5	Точка № 6	Точка № 7	ПДК, мг/л [19]	УКИЗВ
Температура, °С	24.6	24.2	24.9	22.2	22.2	23.2	_	_
Мутность, отн. ед.	2.52	5	4.88	5.02	4.92	6.6	_	_
Растворенный О <sub>2</sub> , мг/л	5.08	5.44	5.45	5.46	5.43	5.42	>4	_
pН	8.00	8.35	8.40	8.20	8.40	8.40	8.5	_
Na <sup>+</sup> , мг/л	510	482	462	494	508	516	200	2.48
К <sup>+</sup> , мг/л	134	127	122	130	134	136	_	_
Рb <sup>2+</sup> , мкг/л	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.01	
NO <sub>3</sub> , мг/л	<10	<10	<10	<10	<10	<10	45	_
NO <sub>2</sub> , мг/л	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3.3	
РО <sub>4</sub> <sup>3+</sup> , мг/л	0.1	0.2	0.33	0.18	0.36	0.26	3.5	_
Mg <sup>2+</sup> , мг/л	55	54	55	63	62	61	50	1.17
НСО <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мг/л	952	909	878	805	903	903	_	_
Fe <sub>общ</sub> , мг/л	0.11	0.11	0.1	0.08	0.09	0.11	0.3	_
Ca <sup>2+</sup> , мг/л	29	40	24	20	22	20	-	_
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , мг/л	632	609	612	784	655	729	500	1.34
Cl <sup>-</sup> , мг/л	145	148	145	130	159	148	отс.	
Co <sup>2+</sup> , мкг/л	< 0.3	<0.3	< 0.3	< 0.3	<0.3	< 0.3	0.1	_
Cd <sup>2+</sup> , мг/л	0.009	0.007	0.008	0.009	0.01	0.009	0.001	8.7
Мо <sub>общ</sub> , мкг/л	<10	<10	<10	<10	<10	<10	0.25	_
Нд <sub>общ</sub> , мкг/л	<0.5	<0.5	< 0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.0005	_

Перечень физико-химических параметров проб воды р. Ольховая

Примечание. Полужирным шрифтом выделены значения, превышающие ПДК для соответствующих веществ.

В мониторинговой точке № 8 биоразнообразие значительно снижалось. Однако основные доминантные виды сохранились, что указывает на их устойчивость к воздействию шламовых стоков, тогда как остальные виды являются чувствительными к данному типу загрязнения, которое вызывало их гибель.

Таким образом, снижение биомассы фитопланктона по ходу русла р. Ольховая связано с гибелью представителей родов *Coelastrum, Tetraedron, Monoraphidium, Closteriopsis, Ulotrix, Amphora, Pinnularia, Merismopedia,* обладающих чувствительностью к загрязнению шламовыми стоками, тогда как представители рода *Nitzshia, Chlorella* и *Scenedesmus* обладают некоторой устойчивостью к данного рода загрязнениям. **Физико-химические показатели проб воды.** Результаты анализа физико-химических параметров проб воды представлены в таблице.

Для всех проб была характерна высокая степень минерализации. Показатели pH не превышали нормы, однако в точках № 6 и № 7 колебались около максимальной границы. Содержание растворенного кислорода не изменялось по ходу русла реки и не выходило за границы нормальных значений. Содержание ионов тяжелых металлов было значительно ниже предельно допустимых, кроме концентраций  $Cd^{2+}$ . Содержание ионов  $Cd^{2+}$  превышало показатели ПДК в семь-десять раз (см. таблицу).

В сравнении с первым этапом исследования [14] сохранилось превышение ПДК по сульфатам

и количеству взвешенных частиц. Также превышение предельных концентраций наблюдалось для натрия и магния (см. таблицу). Наблюдалось двукратное повышение мутности проб при попадании шламовых загрязнений. Следует отметить повышение мутности пробы в точке № 7, которое обусловлено накоплением угольной взвеси в донных отложениях реки, а также скопления шламовых отходов на водных растениях. В литературных источниках не указан четкий механизм воздействия угольной взвеси на клетки фитопланктона. Однако значительное повышение мутности проб приводит к снижению количества солнечного света, потребляемого клетками фитопланктона, что приводит к снижению их фотосинтетической активности [15].

Согласно нормативному документу [19], не установлены нормы контроля для  $K^+$  и Ca<sup>2+</sup>. Однако содержание  $K^+$  оставалось высоким во всех мониторинговых точках. Содержание биогенных веществ (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и PO<sub>4</sub><sup>3+</sup>) оставалось низким на протяжении всего исследуемого участка русла, что может обуславливать лимитирование скорости нарастания биомассы фитопланктона.

Согласно полученным значениям *УКИЗВ* для каждого из веществ, воду в русле реки можно характеризовать как очень грязную (класс 4, разряд б) [18].

**Флуориметрический анализ проб воды.** Содержание суммарного хлорофилла в пробах воды возрастало от мониторинговой точки  $\mathbb{N}$  1 до  $\mathbb{N}$  3 (см. рис. 3).

В начальной точке, у истока реки содержание хлорофилла было низким – около 0.2 мг/л. Значительное нарастание биомассы фитопланктона обусловлено двумя русловыми водоемами, в которых значительно снижалась скорость течения, создавая благоприятные условия для размножения микроводорослей (см. рис. 1 – мониторинговые точки № 2 и № 3). Снижение исследуемого показателя в точке № 4 обусловлено воздействием шламовых сбросов. Пробы воды в мониторинговой точке № 5 (загрязненный приток) характеризовались низким содержанием хлорофилла. После впадения загрязненного шламовыми и шахтными водами притока в р. Ольховая происходило постепенное снижение концентрации суммарного хлорофилла от точки № 6 до точки № 8 (см. рис. 3).

В результате анализа кривых индукции флуоресценции с помощью ОЈІР-теста был получен ряд показательных тест-функций:  $F_0$ ,  $F_m$ , Area,  $\Phi_0$ ,  $t_{Fm}$ ,  $\Psi_0$ , PI,  $\Phi_{E_0}$ . Изменения остальных параметров статистической значимости не имели.

Изменение уровней минимальной и максимальной флуоресценции, а также площади над

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



Рис. 3. Изменение содержания суммарного хлорофилла в мониторинговых точках р. Ольховая.

кривой индукции флуоресценции происходило сходно с изменением содержания хлорофилла в пробах воды — нарастание показателей в мониторинговой точке № 3, затем снижение в точке № 4 под воздействием загрязнения, с последующим снижением всех параметров в точках №№ 6–8 после впадения загрязненного притока в русло реки (см. рис. 4а).

Снижение уровня максимальной флуоресценции ( $F_{\rm m}$ ) связано как со снижением общей интенсивности сигнала флуоресценции в результате гибели части клеток фитопланктона, так и с уменьшением числа реакционных центров ФС II, способных передавать поглощенную световую энергию по электрон-транспортной цепи. Снижение уровня минимальной флуоресценции ( $F_0$ ) может быть связано с уменьшением содержания хлорофилла в пробах воды (см. рис. 4а). Изменение параметра *Area* связано со снижением интенсивности сигнала флуоресценции также в результате уменьшения содержания хлорофилла в пробах воды (см. рис. 4б).

Уменьшение параметра  $t_{F_m}$ , времени нарастания флуоресценции до пика Р (соответствующего значению  $F_m$ ), указывает на снижение амплитуды данного пика (см. рис. 5а). Снижение показателей квантовой передачи ( $\Psi_0$ ) и эффективности переноса ( $\Phi_{E_0}$ ) электронов от первичного акцептора по электрон-транспортной цепи в сравнении со значениями в мониторинговой точке № 3 указывает на ингибирование функций реакционных центров [22] (см. рис. 5б). Переносчики электронов  $Q_A$  под воздействием факторов внешней среды не способны эффективно передавать поглощенную световую энергию, что приводит к замедлению процессов тепловой диссипации.



**Рис. 4.** (а) – Изменение уровня минимальной (*F*<sub>0</sub>, треугольники) и максимальной (*F*<sub>m</sub>, кружки) флуоресценции хлорофилла; (б) – изменение общей площади под кривой индукции флуоресценции.

Показатели общей фотосинтетической продуктивности в исследуемых пробах воды — квантовый выход флуоресценции клеток фитопланктона ( $\Phi_0$ ), а также тотальный индекс производительности (PI) — снижались относительно значений, полученных в точке № 3 (см. рис. 5а,б).

Значения  $\Phi_0$  и *PI* в точке № 8 соответствовали таковым в загрязненном шламовыми стоками притоке (точка №5). Несмотря на попадание фитопланктона из чистых притоков, между точками № 6 и № 7 происходило быстрое угнетение функционирования клеток. Индекс производительности (*PI*) фитопланктона принимал достаточно низкие значения во всех отобранных пробах воды. Все полученные в результате ОЈІР-теста параметры согласуются между собой, а также с результатами анализа химического состава проб воды и указывают на негативное воздействие шламовых загрязнений на фитопланктон р. Ольховая, вызывая угнетение фотосинтетической активности.

## выводы

Снижение биомассы фитопланктона по ходу русла реки Ольховая связано с гибелью представителей родов Coelastrum, Tetraedron, Monoraphidium, Closteriopsis, Ulotrix, Amphora, Pinnularia, Merismopedia, обладающих чувствительностью к загрязнению шламовыми стоками, тогда как представители рода Nitzshia, Chlorella и Scened-



**Рис. 5.** (а) – Изменение значений квантового выхода ( $\Phi_0$ ) и параметра  $t_{Fm}$  в мониторинговых точках; (б) – изменение показателя вероятности передачи электронов от первичного переносчика ( $\Psi_0$ ), тотального индекса производительности (*PI*), а также показателя квантовой эффективности переноса электронов от первичного переносчика  $\Phi_{E_0}$  в мониторинговых точках.

*esmus* обладают некоторой устойчивостью к шламовым загрязнениям.

В сравнении с первым этапом исследования [14] сохранилось превышение ПДК по сульфатам и количеству взвешенных частиц. Также превышение предельных концентраций наблюдалось для натрия, магния и кадмия. Пробы воды содержали низкие концентрации биогенных веществ. Согласно значениям *УКИЗВ* для каждого из веществ, воду в русле реки можно характеризовать как очень грязную (класс 4, разряд б).

Наибольшее содержание хлорофилла  $(1.60 \pm 0.03 \text{ мг/л})$  наблюдалось в мониторинговой точке № 3 (до попадания шламовых стоков), тогда как после впадения загрязненного притока, а также попадания загрязнения в русло реки из шламонакопителей происходило постепенное снижение концентрации суммарного хлорофилла до  $0.462 \pm 0.013 \text{ мг/л}$  (в загрязненном притоке данный показатель не превышал  $0.266 \pm 0.012 \text{ мг/л}$ ).

Попадание шламовых отходов приводило к снижению уровня максимальной ( $F_{\rm m}$ ) и минимальной ( $F_0$ ) флуоресценции, что может быть связано со снижением общей интенсивности сигнала флуоресценции в результате гибели части клеток фитопланктона, а также уменьшением числа реакционных центров ФС II, способных поглощать и передавать поглощенную световую энергию по электрон-транспортной цепи. Кроме того, загрязнение приводит к снижению показателей эффективности функционирования фотосинтетического аппарата клеток фитопланктона, что указывает на ингибирование функций реакционных центров.

Поскольку в исследуемых мониторинговых точках не происходило смены доминантных форм фитопланктона, снижение параметров кривых индукции флуоресценции хлорофилла связано, прежде всего, с воздействием шламового загрязнения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность старшему преподавателю кафедры ботаники и экологии биологического факультета Донецкого национального университета Э. И. Мирненко за помощь в определении видового состава фитопланктона в исследуемых пробах воды.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. А. И. Гавришин, Успехи современного естествознания **10**, 102 (2016).
- А. И. Гавришин, Фундаментальные исследования 11, 2465 (2014).
- 3. E. G. Gorlov, O. G. Safiev, and A. I. Seregin, Solid fuel chemistry **42** (1), 46 (2008).
- 4. Е. И. Захаров, Н. М. Качурин и И. И. Мохначук, Изв. Тульского гос. университета. Науки о земле 2, 58 (2012).
- 5. А. П. Красавин, Защита окружающей среды в угольной промышленности (Недра, М., 1991).
- Г. А. Солодов, Е. В. Жбырь, А. В. Папин и др., Изв. Томского политехнич. университета **310** (1), 139 (2007).
- А. В. Папин, Г. А. Солодов, А. Н. Заостровский и др., Вестн. Кузбасского гос. технич. университета 2 (39), 86 (2004).
- 8. K. Trishala Parmar, D. Rawtani, and Y. K. Agrawal, Front. Life Sci. 9, 110 (2016).
- Д. Н. Маторин и А. Б. Рубин, Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей (ИКИ-РХД, Ижевск, 2012).
- 10. G. C. Papageorgiou and Govindjee, *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis* (Springer, The Netherlands, Dordrecht, 2004).
- 11. U. Schreiber, W. Bilger, and C. Neubauer, Ecophysiol. Photosynthesis **100**, 49 (1994).
- Д. Ю. Корнеев, Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла (Альтерпрес, Киев, 2002).
- В. А. Осипов, Г. М. Абдурахманов, А. А. Гаджиев и др., Юг России: экология, развитие 7 (2), 93 (2012).
- С. В. Беспалова, С. В. Чуфицкий, С. М. Романчук и др., Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона 3–4, 152 (2018).
- 15. C. Jaffrennou, L. Stephan, P. Giamarchi, et al., J. Fluorescence 17, 564 (2007).
- 16. 16. T. E. Weaks, Hydrobiologia 97, 97 (1982).
- S. L. Hoeffner and S. E. Manahan, J. Environ. Sci. Health. Part A: Environmental Science and Engineering 15 (2), 149 (1980).
- РД 52.24.643-2002 Метод комплексной оценки степени загрязнения поверхностных вод по гидрохимическим показателям (Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, 2013).
- 19. ГН 2.1.5.1315-03 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объек-

тов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования (2003).

- И. Г. Радченко, В. И. Капков и В. Д. Федоров, Руководство по сбору и анализу проб морского фитопланктона (Мордвинцев, М., 2010).
- 21. А. В. Топачевский и Н. П. Масюк, *Пресноводные* водоросли Украинской СССР (Наук. думка, Киев, 1984).
- 22. В. Н. Гольцев, М. Х. Каладжи, М. А. Кузманова и др., Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а – теоретические основы и практическое

приложение в исследовании растений (Институт компьютерных исследований, М.–Ижевск, 2014).

- 23. K. Maxwell and G. N. Johnson, J. Exp. Bot. **51** (345), 659 (2000).
- R. J. Strasser, A. Srivastava, and M. Tsimilli-Michael, *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adap-tation* (Taylor & Francis, London, 2000).
- 25. Д. А. Новиков и В. В. Новочадов, Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (ВолГМУ, Волгоград, 2005).

# Fluorescence Analysis of Coal Slurry Pollution Effects on Phytoplankton S.V. Bespalova, S.M. Romanchuk, S.V. Chufitskiy, V.V. Perebeinos, and B.A. Gotin

Donetsk National University, ul. Schorsa 46, Donetsk, 283050

This paper reports the results of biomonitoring of pollutant inputs to the Olkhovaya river. Coal slurry pollution effects on the state of surface waters are shown. The results obtained after the analysis of physico-chemical parameters of the Olkhovaya river show that the water has poor quality, is contaminated with a large number of suspended coal particles, the content of which significantly exceeded the threshold limit values. A decrease in the chlorophyll content in water samples, taken after water pollution from coal slurry spilled into the river bed, was observed using the fluorescence analysis. The paper presents the results of the analysis of chlorophyll fluorescence induction curves. It was found that contamination with coal slurry leads to alterations in primary photosynthetic reactions of phytoplankton cells.

Keywords: fluorimetry, phytoplankton, slurry accumulators, bioindication

## ———— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.3

## ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА ПУРИНЕРГИЧЕСКУЮ СИНАПТИЧЕСКУЮ МОДУЛЯЦИЮ В ДИАФРАГМЕ КРЫСЫ

© 2020 г. А.Е. Хайруллин, А.У. Зиганшин, С.Н. Гришин

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49 E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.05.2020 г. После доработки 13.05.2020 г. Принята к публикации 16.06.2020 г.

Исследована термочувствительность пре- и постсинаптических эффектов АТФ в диафрагме крысы. Установлено, что снижение температуры окружающей среды с 37°С до 22°С вызывает уменьшение силы сокращений *m. Diafragma*, вызванных как электрической стимуляцией, так и карбахолином. При 37°С введение АТФ в инкубационную среду повышает сократительную активность диафрагмы, вызванную как электрической стимуляцией, так и карбахолином. Эти эффекты АТФ сохраняются и при снижении температуры, но в большей степени проявляются при карбахолин-вызванных сокращениях. Предположено, что в диафрагме крысы термочувствительное звено пуриновой модуляции расположено преимущественно постсинаптически.

Ключевые слова: гипотермия, *АТФ*, *Р2-рецепторы*, *диафрагма*, *синапс*, *сурамин*. **DOI:** 10.31857/S000630292005018X

АТФ наряду с другими внутриклеточными нуклеотидами участвует в синтезе нуклеиновых кислот, аккумулирует энергию и играет важную роль в регуляции функции ферментов и ионных каналов. Кроме того,  $AT\Phi$  (и некоторые другие нуклеотиды) может высвобождаться из нервных окончаний и секреторных клеток во внеклеточное пространство путем экзоцитоза или иными механизмами, играя роль нейромедиатора или нейромодулятора в периферических возбудимых тканях, вегетативных ганглиях и центральной нервной системе [1]. Известно, что в физиологических условиях пуриновые нуклеотиды обычно являются лишь модуляторами функций клеток и систем, однако их роль значительно возрастает при определенных патологических условиях (гипотермия, гипоксия, стресс), когда они начинают играть главенствующую роль в качестве сигнальной молекулы [2-5].

Установлено, что физиологические эффекты внеклеточной АТФ реализуются посредством специфических рецепторов, получивших в настоящее время название Р2-рецепторы. Р2-рецепторы делятся на два больших семейства — Р2Х и Р2Ү. На сегодняшний день в номенклатуру рецепторов внесено семь подтипов Р2Х-рецепторов и восемь подтипов Р2Ү-рецепторов [6]. Р2-рецепторы широко распространены, в том числе в скелетной мускулатуре [7]. Известно, что АТФ, выделяясь в нервно-мышечном синапсе вместе с основным медиатором ацетилхолином, действует через пресинаптические Р2-рецепторы, осуществляющие регуляцию экзоцитоза по принципу отрицательной обратной связи [8, 9]. Установлено, что АТФ угнетает квантовую [8] и неквантовую [10, 11] секрецию нейромедиатора, действуя на Р2-рецепторы. Продукт ее метаболизма – аденозин – оказывает действие на квантовую секрецию через аденозиновые рецепторы. Пресинаптический ингибиторный эффект АТФ и аденозина в мионевральном синапсе вначале был описан на препаратах пойкилотермных животных [12-14]. Однако наши результаты последних лет свидетельствовали о возможных постсинаптических эффектах АТФ и в мионевральных синапсах теплокровных [15].

В настоящей работе мы исследовали особенности пуриновой модуляции синаптических процессов на изолированных препаратах диафрагмы, которая является «смешанной» по типу волокон, при нормальной и пониженной температуре.

## МЕТОДЫ

Подготовительные процедуры. Исследования проводили на нервно-мышечных препаратах белых лабораторных крыс-самцов массой 130— 190 г, которых содержали в группах по пять особей с водой и кормом *ad libitum*. Животных предварительно наркотизировали, вводя внутрибрюшинно раствор этаминала натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли *m. Diafragma*.

Условия проведения экспериментов по регистрации параметров сокращения. Выделенные фрагменты мышцы фиксировали одним сухожильным концом к неподвижному штативу, второй конец прикрепляли лигатурой к датчику механической активности и погружали в резервуары объемом 10 мл, наполненные раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl<sub>2</sub> – 2.5, NaHCO<sub>3</sub> – 24.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.18, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1.18, глюкоза – 11, pH 7.4, t == 37.0 ± 0.5°C. Заданное значение температуры поддерживали с помощью термостата. На мышцы изначально подавали нагрузку в 1 г, затем оставляли в покое на полчаса для адаптации к среде.

Электростимуляцию проводили с помощью сакшн-электрода оригинальной конструкции, в который помещали культю нерва выделенной мышцы. Для раздражения использовали электростимулятор D330 MultiStim System (Digitimer, Beликобритания). Мышцы стимулировали в течение 2 мин прямоугольными импульсами амплитудой 3 В и продолжительностью 0.5 мс при частоте 0.1 Гц. Силу сокращений мышц регистрировали датчиком двигательной активности FCG-01 (Linton, Великобритания), аналоговый сигнал преобразовывали с помощью системы сбора данных MP100MSW (Biopack, США). Все полученные ответы в течение 2 мин (12 сократительных ответов) усредняли и обрабатывали как один результат, величину которого рассчитывали в процентах относительно исходного значения, полученного в начале эксперимента. Через полчаса после фиксирования нервно-мышечной ткани проводили контрольную электрическую стимуляцию мышц дважды с интервалом в 5 мин и, удостоверившись в стабильности сократительных ответов, начинали экспериментальные процедуры.

Силу сокращений, вызванных карбахолином в концентрации 20 мкМ, оценивали как разницу в амплитуде сократительных реакций до и после добавления карбахолина. Было показано, что при двадцатиминутных интервалах между сокращениями карбахолин в концентрации 20 мкМ способен в течение всего времени эксперимента (два-четыре часа) развивать стабильные воспроизводимые сокращения *m. Diafragma* крысы.

Эффекты пуринергических агентов. В ванночку добавляли 100 мкМ АТФ и через 10 мин оценивали механические ответы мышцы. Затем ткань инкубировали с сурамином в концентрации 100 мкМ в течение 20 мин, вновь добавляли 100 мкМ АТФ и опять регистрировали механические ответы мышц. В контрольных экспериментах нервно-мышечную ткань инкубировали с сурамином в концентрации 100 мкМ, через 20 мин регистрировали сократительные ответы мышц, возникающие в ответ на стимуляцию электрическим током.

Температурная зависимость. Оценку влияния  $AT\Phi$  и сурамина на сократительную активность *m. Diafragma*, инициированную как электрическим током, так и аппликацией карбахолина, проводили вначале при температуре 37°С. Далее температуру снижали до 22°С. При этой температуре подавали раствор АТФ в концентрации 100 мкМ и оценивали силу сократительных ответов мышцы через 10 мин аппликации. Далее в ванночки добавляли раствор сурамина в концентрации 100 мкМ и оценивали силу сократительных ответов мышцы через 20 мин аппликации. После этого оценивали эффект АТФ на фоне антагониста. Температуру раствора регулировали водяным насосом TE-8A (Techne, Великобритания), быстрое снижение температуры жидкости в водяном насосе осуществляли добавлением льда.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Сокращения, вызванные электрической стимуляцией. При физиологической температуре (37°С) сила сокращения *m. Diafragma* составила 1.510  $\pm$  0.075 г (n = 12). При понижении температуры окружающей среды сила сокращений мышцы снижалась, достигая  $1.320 \pm 0.081$  г (n = 12) при  $22^{\circ}$ С (рис. 1). При температуре  $37^{\circ}$ С АТФ в концентрации 100 мкМ вызывала достоверное увеличение силы сокращения *m. Diafragma*, которая становилась равной 118.3  $\pm$  4.6% (n = 12) от сокращений мышцы при этой же температуре в контроле.

При понижении температуры до 22°С сила сокращений мышцы в присутствии АТФ составила 117.8 ± 5.5% (n = 12) от величины контрольных сокращений при 37°С, что достоверно отличается от контрольных значений при 22°С, но не от эффекта АТФ при 37°С (рис. 1).

Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) нивелировала влияние АТФ на силу сокращений при всех температурах (рис. 1).

Сокращения, вызванные карбахолином. При температуре 37°С сила сокращения *m. Diafragma*, вызванная карбахолином в концентрации 20 мкМ, составила 676.4  $\pm$  33.8 мг (n = 12). При понижении температуры сила сокращения *m. Diafragma* снижалась и составила 586.3  $\pm$  29.2 мг (n = 12) при 22°С (рис. 2).

АТФ в концентрации 100 мкМ при температуре 37°С вызывала достоверное увеличение силы карбахолин-индуцированного сокращения *m. Diafragma* до 124.7  $\pm$  6.0% (*n* = 12) от исходных сокращений в контроле.

При снижении температуры потенцирующее действие АТФ сохранялось и при 22°С составило



**Рис. 1.** Влияние температуры на силу сокращений *m. Diafragma* крысы, вызванных электрической стимуляцией, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в% от исходных величин, принятых за 100%; n = 12; \* -p < 0.05 от эффекта при  $37^{\circ}$ C, # -p < 0.05 от контроля.

115.2  $\pm$  8.1% от уровня исходных сокращений в контроле (рис. 2), что достоверно отличается (*p* < 0.05) от соответствующих контрольных значений, но не от эффекта АТФ на этой мышце при 37°С.

Наличие сурамина в инкубационной среде (100 мкМ) предупреждало не только влияние АТФ на мышцу, но и частично ингибиторный эффект гипотермии на карбахолин-индуцированные сокращения.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами были проведены серии механомиографических экспериментов на препаратах дыхательной (*m. Diafragma*) мышцы крысы и оценены эффекты АТФ, универсального агониста Р2-рецепторов, и сурамина, универсального антагониста Р2-рецепторов. Метод стимуляционной изометрической механомиографии используется в физиологии и клинической патофизиологии мышечных и нервно-мышечных заболеваний [16]. Его применение позволило получить новые данные о роли внешней регуляции в функционировании скелетных мышц [17].

Известно, что внеклеточные нуклеотиды, к которым относится АТФ, оказывают разнообразные эффекты при разных физиологических и патофизиологических состояниях (в том числе и при гипо- и гипертермиях), влияя на мембранные рецепторы, названные Р2-рецепторами [18–20]. Первая информация о внеклеточном действии АТФ появилась почти полвека назад [21]. Доказано выделение АТФ из нервных терминалей при

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



**Рис. 2.** Влияние температуры на силу сокращений *m. Diafragma* крысы, вызванных карбахолином, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в% от исходных величин, принятых за 100%; n = 12; \* – p < 0.05 от эффекта при 37°С, # – p < 0.05 от контроля.

активности двигательных единиц [22,23]. Описано угнетающее действие АТФ в мионевральном синапсе озерной лягушки [13]. Пресинаптические ингибиторные эффекты пуринов в мионевральном синапсе были зафиксированы преимущественно на препаратах холоднокровных животных [12–14, 24].

Роль пуринергической модуляции в особенностях функционирования двигательных единиц грызунов долгое время оставалась неясна [25]. АТФ угнетает амплитуду сокращения, вызванного непрямой электростимуляцией скелетных мышц крысы. Также АТФ снижает амплитуду карбахолин- индуцированных сократительных ответов мышц длинного разгибателя пальцев крысы. Известно, что ингибирующий эффект АТФ на высвобождение нейромедиатора в нервно-мышечном соединении опосредован Р2У-рецепторами [8, 13]. Недавними исследованиями было предположено [26], а затем и доказано [27], что в опосредовании этого эффекта в двигательных единицах холоднокровных главную роль играют Р2Ү<sub>12</sub>-рецепторы. Предполагается, что в мышцах теплокровных основную роль играют Р2Ү<sub>13</sub>-рецепторы [28]. Кроме того, было показано [29], что стабильные аналоги АТФ облегчают высвобождение ацетилхолина путем активации пресинаптических Р2Х-рецепторов.

В ранних исследованиях, проведенных в нашей лаборатории на нервно-мышечном препарате озерной лягушки, было установлено, что гипотермия существенно повышает эффективность Р2-рецептор-опосредованных ответов [20]. Тем-

пературная зависимость АТФ-опосредованных процессов была позже продемонстрирована на гладкой и скелетной мускулатуре теплокровных. На изолированных препаратах мочевого пузыря и семявыносящих протоков морской свинки сокращения в ответ на альфа,бета-метилен АТФ (агонист Р2Х-рецепторов) и в ответ на стимуляцию электрическим полем были значительно более заметным при гипотермии, чем при физиологической температуре [20]. Кроме того, индуцированное стимуляцией электрическим полем расслабление продольного тяжа слепой кишки морской свинки, опосредованное Р2У-рецепторами, увеличивалось с уменьшением температуры среды [20]. Аналогичные результаты были показаны на изолированных мышечных препаратах лягушки, в которых АТФ угнетала сокращения, вызванные стимуляцией электрическим полем, более заметно при 17°С, чем при 22°С [14].

На препаратах холоднокровных регистрировался исключительно пресинаптический эффект пуринов. Однако в последнее время накопились данные о том, что АТФ в мионевральных синапсах теплокровных обладает выраженным постсинаптическим эффектом, часто отличающимся по знаку от того, который она оказывает на нервную терминаль [26, 30].

В данной работе мы установили, что АТФ увеличивала амплитуду сокращения *m. Diafragma*, вызванного непрямой стимуляцией электрическим током, и карбахолин-индуцированные сократительные ответы. Данные эффекты оказались высокочувствительны к неселективному антагонисту Р2-рецепторов сурамину [31]. Трипаноцидный препарат сурамин имеет широкий спектр биологической активности [33, 34], включая неспецифическое ингибирование Р2рецепторов [31, 35] и ингибирование нескольких эктоферментов, разрушающих АТФ [36-38]. Считается, что сурамин является неселективным антагонистом Р2-рецепторов, поскольку установлено его угнетающее действие на большинство Р2Х и Р2У подтипов рецепторов [32]. Тот факт, что эффекты АТФ угнетались антагонистами Р2-рецепторов, указывает на вовлечение Р2рецепторов в опосредование этих эффектов. В диафрагме крысы сурамин может ингибировать пресинаптические кальциевые каналы [39] и угнетать высвобождение медиатора. Таким образом, эффекты сурамина на нервно-мышечную передачу являются очень сложными и, скорее всего, различными в различных типах скелетных мышц. В наших экспериментах он не только противодействовал АТФ-зависимому потенцированию электровызванных или карбахолин-индуцированных сокращений *m. Diafragma* крысы, но и предотвращал гипотермия-зависимое уменьшение сократимости независимо от вида стимуляции. Это может означать, что, также как и в других тканях [29], в *m. Diafragma* теплокровных существует естественный механизм, с помощью которого P2-рецепторы опосредуют увеличение высвобождения трансмиттера, который становится более заметным при низких температурах и который полностью угнетается сурамином.

В сериях с карбахолин-индуцированными сокращениями АТФ усиливала сокращение мышцы. Для выявления термочувствительных механизмов модуляции пуринами нервно-мышечного синапса проводили эксперименты при пониженной температуре (22°С).

Мы предполагаем, что облегчающий постсинаптический эффект, который проявляет АТФ, с уменьшением температуры позволяет поддерживать дыхание даже животным, подвергнутым глубокому охлаждению.

В этой работы мы установили, что сократимость *m. Diafragma* крысы, вызванная как электростимуляцией, так и аппликацией карбахолина (исключительно постсинаптическая стимуляция), зависит от температуры. Температурная зависимость сокращений скелетных мышц - это известный феномен. Однако ранее в этом отношении изучались либо скелетные мышцы холоднокровных [40], либо быстрые смешанные мышцы теплокровных [23]. На препаратах этих мышц наблюдался ингибиторный модуляторный эффект  $AT\Phi$ , обратный представленному в данном исследовании [14]. Предполагалось, что данный феномен имеет эндотермическую природу; и повышение температуры увеличивает силу и натяжение миозиновых головок при изометрическом сокращении [41, 42]. Было высказано предположение, что снижение силы сокращений при низкой температуре возможно ввиду истощения активности обменных ферментных систем [43, 44] или процессов синтеза и переноса энергии [45-49]. С другой стороны, было высказано мнение, что вклад температурочувствительности собственно биохимии мышечных волокон не может оправдать столь драматические изменения в характере сокращения всего мышечного органа при изменении температуры [41].

Недавно было показано увеличение квантового состава потенциалов концевой пластинки под действием  $AT\Phi$  в синапсах длинного разгибателя пальцев мыши [50]. Эти данные согласуются с нашими результатами и объясняет полученное нами повышение силы сокращения данного объекта под действие этого пурина. Другое исследование показало, что при повышении температуры происходит постоянное снижение постсинаптического ответа [51]. На основании этих данных мы предполагаем, что в скелетных мышцах теплокровных существует цепь пурин-модулируемых синаптических эффектов.

Подытоживая, скажем, что к настоящему времени температурная зависимость Р2-рецепторопосредованных реакций была показана на трех различных препаратах мышц – гладких мышцах млекопитающих [20], скелетной мускулатуре амфибий [14] и скелетных мышцах млекопитающих [52, 53]. Во всех трех мышечных тканях был установлен один и тот же результат – эффективность Р2-рецептор-опосредованных процессов выше при низких температурах, чем при физиологической температуре. Мы предполагаем, что это свидетельствует о сходной роли Р2-рецепторов в мышечных тканях - они малозаметны или маскируются другими системами регулирования при физиологических условиях, но их роль становится все более очевидной и важной при патологических или экстремальных условиях.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. G. Burnstock, Bioassays 34, 218 (2012).
- 2. G. Burnstock, Keio J. Med. 62 (3), 63 (2013).
- S. N. Grishin, A. I. Gabdrakhmanov, A. E. Khairullin, et al., Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology 11 (4), 253 (2017).
- 4. A. U. Ziganshin, R. R. Kamaliev, A. I. Gabdrakhmanov, et al., Int. J. Pharmacol. **14**, 1198 (2018).
- 5. A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, et al., Biophysics **64** (5), 812 (2019).
- 6. G. Burnstock, Methods Mol. Biol. 2041, 1 (2020).
- G. Burnstock, T. R. Arnett, and I. R. Orriss, Purinergic Signal. 9 (4), 541 (2013).
- R. A. Giniatullin and E. M. Sokolova, Br. J. Pharmacol. **124** (4), 839 (1998).
- S. N. Grishin, A. Shakirzyanova, A. Giniatullin, et al., Eur. J. Neurosci. 21, 1271 (2005).
- 10. A. V. Galkin, R. A. Giniatullin, M. R. Mukhtarov, et al., Eur. J. Neurosci. 13, 2047 (2001).
- А. И. Маломуж и Е. Е. Никольский, Нейрофизиология **39**, 289 (2007).
- 12. W. M. Fu, J. Physiol. 477, 449 (1995).
- E. Sokolova, S. Grishin, A. Shakirzyanova, et al., Eur. J. Neurosci. 18, 1254 (2003).
- 14. A. U. Ziganshin, R. R. Kamaliev, S. N. Grishin, et al., Eur. J. Pharmacol. **509**, 187 (2005).

- 15. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology **11** (1), 1 (2017).
- А. Хилл, Механика мышечного сокращения (Мир, М., 1972).
- Э. И. Богданов и Р. Р. Фасхутдинов, Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова **91** (2), 129 (1991).
- 18. R. A. North, Physiol. Rev. 82 (4), 1013 (2002).
- 19. V. Ralevic and G. Burnstock, Pharmacol. Rev. 50 (3), 413 (1998).
- A. U. Ziganshin, A. V. Rychkov, L. E. Ziganshina, and G. Burnstock, Eur. J. Pharmacol. 456 (1–3), 107 (2002).
- 21. G. Burnstock, Br. J. Pharmacol. 40, 668 (1970).
- 22. R. A. Cunha and A. M. Sebastiao, Pflugers Arch. **424** (5–6), 503 (1993).
- 23. E. S. Vizi, K. Nitahara, K. Sato, and B. Sperlágh, J. Autonomic Nervous System **81** (1–3), 278 (2000).
- 24. J. A. Ribeiro and A. M. Sebastião, J. Physiol. **384**, 571 (1987).
- 25. A. M. Kelly and N. A. Rubinstein, Med. Sci. Sports Exerc. **18** (3), 292 (1986).
- S. N. Grishin and A. U. Ziganshin, Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology 7 (3), 183 (2013).
- 27. A. Giniatullin, A. Petrov, and R. Giniatullin, Neuroscience **285**, 324 (2015).
- 28. J. F. Guarracino, A. R. Cinalli, V. Fernández, et al., Neuroscience **326**, 31 (2016).
- A. I. Salgado, R. A. Cunha and J. A. Ribeiro, Brain Res. 877 (2), 245 (2000).
- 30. S. N. Grishin, A. V. Galkin, A. L. Zefirov, et al., Neurochem. Int. **49** (8), 756 (2006).
- 31. C. H. Hoyle, Gen. Pharmacol. 21 (6), 827 (1990).
- 32. G. Burnstock, Trends Pharmacol Sci. 22 (4), 182 (2001).
- R. P. McGeary, A. J. Bennett, Q. B. Tran, et al., Mini Rev. Med. Chem. 8, 1384 (2008).
- 34. T. E. Voogd, E. L. Vansterkenburg, J. Wilting, and L. H. Janssen, Pharmacol. Rev. 45 (2), 177 (1993).
- 35. G. Lambrecht, K. Braun, M. Damer, et al., Curr. Pharm. Des. 8, 2371 (2002).
- 36. T. Kiffer-Moreira, M. E. Fernandes Sampaio, D. S. Alviano, et al., FEMS Yeast Res. **10**, 735 (2010).
- 37. E. Marti, C. Canti, I. Gomez de Aranda, et al., Br. J. Pharmacol. **118**, 1232 (1996).
- L. Savegnago, C. W. Nogueira, R. Fachinetto, and J. B. T. Rocha, Cell Biol. Int. 29 (7), 559 (2005).
- 39. R. H. Henning, A. Nelemans, A. H. Scaf, et al., Eur. J. Pharmacol. **216**, 73 (1992).
- П. В. Кочубей и С. Ю. Бершицкий, Биофизика 59 (5), 967 (2014).
- M. Nyitrai, R. Rossi, N. Adamek, et al., J. Mol. Biol. 355 (3), 432 (2006).

- 42. G. Piazzesi, M. Reconditi, N. Koubassova, et al., J. Physiol. **549** (1), 93 (2003).
- 43. K. J. Cowan and K. B. Storey, Cryobiology **43** (1), 32 (2001).
- 44. J. A. MacDonald and K. B. Storey, Comp. Biochem. Physiol. B. BiochemMol. Biol. **131** (1), 27 (2002).
- 45. R. G. Boutilier and J. St-Pierre, J. Exp. Biol. **205** (15), 2287 (2002).
- 46. M. Mantovani, N.C. Heglund and G.A. Cavagna, J. Physiol. **537** (3), 923 (2001).
- 47. K. S. Litvinova, I. M. Vikhlyantsev, I. B. Kozlovskaya, et al., J. Gravit. Physiol. **11** (2), 131 (2004).

- I. M. Vikhlyantsev, Z. A. Podlubnaya, B. S. Shenkman, and I. B. Kozlovskaya, Dokl. Biochem. Biophys. 407, 88 (2006).
- 49. A. Ulanova, Y. Gritsyna, I. Vikhlyantsev, et al., Biomed. Res. Int. **2015**, 104 (2015).
- 50. П. О. Богачева и О. П. Балезина, Бюл. эксперим. биологии и медицины **5**, 532 (2015).
- 51. R. J. Balnave and P. W. Gage, J. Physiol. 239, 657 (1974).
- 52. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov, et al., Muscle & Nerve 55 (3), 417 (2017).
- 53. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al. Muscle & Nerve **59** (4), 509 (2019).

## Influence of Hypothermia on Purinergic Synaptic Modulation in Rat Diaphragm

## A.E. Khayrullin, A.U. Ziganshin, and S.N. Grishin

Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

The thermal sensitivity of the pre- and postsynaptic effects of ATP in the rat diaphragm was studied. It was found that a decrease in ambient temperature from  $37^{\circ}$ C to  $22^{\circ}$ C leads to a decline in the force of m. Diafragma contractions caused by both electrical stimulation and carbacholine. At  $37^{\circ}$ C, the introduction of ATP into the incubation medium increases the contractile activity of the diaphragmatic muscle, caused by both electrical stimulation of ATP also has an effect on muscle contractions even with a decrease in temperature, but after the application of carbacholinum, muscle contractions are more pronounced. It has been suggested that in the rat diaphragm, the thermal sensitivity of purine modulation develops predominantly postsynaptically.

Keywords: hypothermia, ATP, P2 receptors, diaphragm, synapse, suramin suramin

## ——— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.3

## ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ ЛИГАНДА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ БИЯДЕРНЫХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

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

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

имени И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

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

\*\*\*\*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ,

115478, Москва, Каширское шоссе, 24 E mail: larros@list.ru Поступила в редакцию 23.06.2020 г. После доработки 23.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Проведено изучение влияния природы лиганда на ростингибирующий и цитотоксический эффект генерирующих оксид азота соединений — биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих глутатион и меркаптосукцинат, — в условиях *in vivo* и *in vitro*. Установлена преимущественная противоопухолевая активность комплексов с глутатионом по сравнению с комплексами с меркаптосукцинатом, ингибирующих развитие опухоли (карцинома легких Льюис) на 90 и 65% по сравнению с контролем соответственно. Обнаружено, что препараты обладают слабо выраженным цитотоксическим эффектом в отношении культуры клеток опухоли человека МСF7. Расчетная концентрация, вызывающая гибель 50% клеток ( $ИK_{50}$ ), составляет для комплексов с меркаптосукцинатом 0.8 мкмоль/мл (640 мкг/мл), а для комплексов с глутатионом значение  $MK_{50}$  превышает 2 мкмоль/мл (1600 мкг/мл). Предполагается, что противоопухолевое действие исследованных комплексов железа в значительной степени определяется их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки, обеспечивающих направленную доставку комплексов к опухолям.

Ключевые слова: биядерные динитрозильные комплексы железа, противоопухолевая активность in vivo, карцинома легких Льюис, цитотоксический эффект in vitro, культура клеток опухоли человека MCF7. **DOI:** 10.31857/S0006302920050191

Ранее нами было обнаружено, что генерирующие оксид азота соединения, такие как моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), содержащие различные лиганды, а также S-нитрозоглутатион, обладают способностью ингибировать развитие ряда солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Ca-755). Противоопухолевый эффект изученных препаратов проявлялся при их введении как внутрибрюшинно, так и внутривенно и колебался в пределах от 60 до 90% торможения роста опухоли, изменяясь в зависимости от дозового режима, схемы применения, времени оценки эффекта и природы опухолевого штамма [1–6].

В продолжение данного направления работ нами с целью выявления оптимальных подходов для дальнейшего исследования доноров оксида азота в качестве противоопухолевых агентов проведено изучение влияния природы лиганда на ростингибирующий и цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих глутатион (ДНКЖ-Г) и меркаптосукцинат (ДНКЖ-МС) условиях *in vivo* и *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали ферросульфат железа (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, Fluka,

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-Г – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие глутатион, ДНКЖ-МС – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие меркаптосукцинат, ТРО – коэффициент торможения роста опухоли.

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

Биядерная форма динитрозильных комплексов железа с глутатионом. Синтез ДНКЖ-Г проводили согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [1, 8]. В соответствии с этим методом синтез 5 мМ раствора ДНКЖ с глутатионом проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызывавшего подкисление раствора до рН 4.0, с последующим введением в него 28 мг (10 мМ) сернокислого железа, приводившего к дальнейшему снижению рН до 3.8. После этого в раствор добавляли 6.9 мг (10 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленному образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для S-нитрозоглутатиона, реакция заканчивалась через полтора часа с образованием 10 мМ этого соединения. После этого рН раствора повышали до 7.2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования ДНКЖ-Г в растворе при участии Sнитрозоглутатиона, Fe<sup>2+</sup> и глутатиона [9]. Для полного превращения S-нитрозоглутатиона в ДНКЖ-Г требовалось несколько часов. После удаления образовавшегося за это время осадка гидроокиси трехвалентного железа путем фильтрования раствора через фильтровальную бумагу полученный раствор замораживали в жидком азоте и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Оценку полученного количества ДНКЖ-Г (молекулярная масса 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции є, равными соответственно, 9200 и 7400 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [1]. Согласно этой оценке концентрация Б-ДНКЖ в растворе составляла ~2.5 мМ или 5 мМ в пересчете на один атом железа в комплексе.

Биядерная форма динитрозильных комплексов железа с меркаптосукцинатом. Синтез ДНКЖ-МС проводили путем обработки газообразным NO (при давлении 150 мм рт. ст.) 1 мл раствора ферросульфата в дистиллированной воде и 4 мл 15 мМ раствора меркаптосукцината в 15 мМ HEPES-буфере (рН 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим смешиванием этих растворов в присутствии NO, как это описано ранее [8]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 мМ. После пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего двухвалентного железа в ДНКЖ-МС, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного ДНКЖ-МС замораживали и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата ДНКЖ-МС (молекулярная масса 800 Да) оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм с коэффициентом экстинкции є, равным 7000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ).

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 75 инбредных мышах линии  $BDF_1$  — гибриды первого поколения  $f_1(C_{57}Bl/_6 \times DBA_2)$ , самках с массой тела 18—20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевой тест-системы служила солидная опухоль мышей — карцинома легких Льюис, перевиваемая подкожно в соответствии со стандартной методикой [9].

Исследовавшиеся препараты вводили животным в виде водных растворов внутривенно в хвостовую вену мышей при использовании различных дозовых режимов и схем применения. ДНКЖ-Г вводили в суточных дозах 0.5, 1.0, 2.0, 10.0 и 20.0 мкмоль/кг (400, 800, 1600, 8000 и 16000 мкг/кг) пятикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 11-е и 14-е сутки после перевивки опухоли. ДНКЖ-МС вводили в суточных дозах 2,5 и 5 мкмоль/кг (2000 и 4000 мкг/кг) пятикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена при сопоставлении кинетики роста опухолей в группах контрольных и леченых животных. Показателем ростингибирующего эффекта препарата служил коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %), который определялся из соотношения:  $TPO = (P_{\rm C} - P_{\rm T})/P_{\rm C}$ , где  $P_{\rm C}$  и Р<sub>Т</sub> – объем (или масса) опухоли в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как  $V = ab^2/2$ , где a - длина, b ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли плотность опухолевой ткани принимали равной 1 г/см<sup>3</sup> [9].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шестивосьми мышей при восьми-десяти животных в контроле. Наблюдение за животными продолжа-

лось в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных проведена путем оценки размеров опухолей (массы опухолей) у контрольных и леченых животных с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

Цитотоксический эффект *in vitro*. Сравнительное изучение цитотоксичности биядерных динитрозильных комплексов железа с двумя различными лигандами — глутатионом и меркаптосукцинатом — проведено на модели культуры клеток опухоли молочной железы МСF7 человека, полученной из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Действие препаратов *in vitro* исследовано при их использовании в широком диапазоне концентраций — от 0.0039 до 2.0 мкмоль/мл (от 3 до 1600 мкг/мл).

Оценку цитотоксического эффекта осуществляли путем определения доли выживших клеток по отношению к контролю с использованием стандартного МТТ-теста. Выживаемость клеток в культуре оценивали спектрофотометрически по окрашиванию жизнеспособных клеток [9, 11].

Клетки (8 · 10<sup>4</sup> клеток/лунка) вносили в 96-луночный планшет в полной среде DMEM (арт. 41965039, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) в конечном объеме 200 мкл на лунку и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Через 24 ч проводили замену среды, после чего добавляли исследуемые препараты в указанных концентрациях. В контрольную группу клеток препараты не вносили. Клетки инкубировали в СО2-инкубаторе в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ-реагента (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолия бромид) (AppliChem, Германия) в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 3 ч, затем среду отбирали и добавляли к ним по 200 мкл диметилсульфоксида до (37°C, растворения кристаллов формазана 10 мин, при встряхивании).

Оптическую плотность (ОП) раствора формазана определяли спектрофотометрически, при длине волны 570 нм, на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США), выживаемость клеток высчитывали по формуле: (ОП экспериментальной группы / ОП контрольной группы) · 100%.

Результаты экспериментов представлены в виде зависимостей «доза—эффект», характеризующих цитотоксическое действие препаратов и позволяющих определить показатель цитотоксичности ДНКЖ-Г и ДНКЖ-МС в отношении изучавшейся культуры опухолевых клеток —  $UK_{50}$  (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ «Statistica» и «Excel».

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Противоопухолевая активность биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и меркаптосукцинатом *in vivo*. Исследование влияния лиганда на противоопухолевый эффект биядерных динитрозильных комплексов железа проведено на модели карциномы легких Льюис при сопоставлении активности препаратов, содержащих глутатион и меркаптосукцинат.

Противоопухолевая активность ДНКЖ-Г исследована в суточных дозах, изменяющихся в диапазоне от 0.5 до 20 мкмоль/кг, вводимых внутривенно на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли (рис. 1 и 2, табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о нелинейном характере зависимости противоопухолевого эффекта ДНКЖ-Г от дозы. Как видно, при применении препарата в суточных дозах 0.5, 1.0 и 2.0 мкмоль/кг наблюдается повышение ростингибирующего эффекта ДНКЖ-Г, вызывающего торможение роста опухоли на 57, 73 и 90% соответственно. Дальнейшее увеличение дозы до 10 и 20 мкмоль/кг приводит к снижению торможения роста опухоли до 70 и 30% по сравнению с контролем соответственно (рис. 2).

Таким образом, исследование противоопухолевого эффекта ДНКЖ-Г в широком диапазоне доз (от 0.5 до 20 мкмоль/кг в сутки) позволило установить, что оптимальным режимом применения препарата является его внутривенное введение в суточной дозе 2 мкмоль/кг, пятикратно с интервалом в трое суток, вызывающее ингибирование на 90% роста опухоли (карцинома легких Льюис), что хорошо согласуется с полученными ранее данными [4, 9].

Противоопухолевое действие ДНКЖ-МС изучено при внутривенном введении в суточных дозах 2.5 и 5 мкмоль/кг пятикратно в течение четырнадцати суток с интервалом в двое-трое суток между инъекциями. Применение препарата в указанных дозах приводит к подавлению развития карциномы легких Льюис на 65 и 50% по сравнению с контролем соответственно. При этом противоопухолевый эффект, как видно из представленных данных, усиливался при снижении дозы препарата (рис. 3, табл. 2).

Для сравнения противоопухолевой активности исследовавшихся препаратов на всем протяжении развития карциномы легких Льюис проведено сопоставление их ростингибирующего эффекта при применении в максимально эффекВАНИН и др.



**Рис. 1.** Противоопухолевая активность ДНКЖ-Г при внутривенном введении различных доз препарата на модели карциномы легких Льюис: (а) – *1* – контроль, *2*–*4* – ДНКЖ-Г в суточных дозах 20, 10 и 2 мкмоль/кг соответственно; (б) – *1* – контроль, *2* и *3* – ДНКЖ-Г в суточных дозах 0.5 и 1.0 мкМ/кг соответственно. Дозы ДНКЖ-Г приводятся в пересчете на один Fe(NO)<sub>2</sub>-фрагмент. Введение препарата осуществляли внутривенно, пятикратно, на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

тивных дозах – 2.0 мкмоль/кг/сутки (ДНКЖ-Г) и 2.5 мкмоль/кг/сутки (ДНКЖ-МС). Как видно из представленных зависимостей, при применении ДНКЖ-Г показатель торможения роста опухоли за период наблюдения изменяется незначительно, всего на 9%, колеблясь в пределах от 96 до 85%, регистрируемых на 7-е и 17-е сутки после перевивки опухоли соответственно. При применении ДНКЖ-МС показатель ТРО уменьшается за тот же срок на 30% – с 86 до 56% по сравнению с контролем (рис. 4).

Сопоставление эффектов препаратов на 16-е сутки развития опухоли свидетельствует о том, что ДНКЖ-Г, примененный в оптимальной дозе



**Рис. 2.** Зависимость противоопухолевого эффекта ДНКЖ-Г от дозы при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис (оценка эффекта на 16-е сутки после перевивки опухоли).

(2.0 мкмоль/кг/сутки или 1600 мкг/кг/сутки), подавляет рост карциномы легких Льюис на 90%, в то время как препарат ДНКЖ-МС, введенный в максимально эффективной дозе (2.5 мкмоль/кг/сутки или 2000 мкг/кг/сутки), ингибирует развитие опухоли не более чем на 65% по сравнению с контролем (табл. 1 и 2, рис. 4).

Иными словами, использование глутатиона в качестве лиганда обеспечивает на модели карциномы легких Льюис несколько более высокую эффективность биядерного динитрозильного



Рис. 3. Влияние препарата ДНКЖ-МС на развитие карциномы легких Льюис: *1* – контроль; *2* – ДНКЖ-МС, 5.0 мкМ/кг в сутки; *3* – ДНКЖ-МС, 2.5 мкМ/кг в сутки. Введение препарата осуществляли внутривенно на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки после перевивки опухоли

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

1012
Серия опыта, №	Группа	Суточная доза, мкмоль/кг	Средняя масса опухоли, г	Торможение роста опухоли на 16-е сутки, %
1	ДНКЖ-Г	20.0	$2.76\pm0.54$	30
1	ДНКЖ-Г	10.0	$1.19\pm0.14$	70
1	ДНКЖ-Г	2.0	$0.37\pm0.08$	90
1	Контроль	-	$3.93\pm0.65$	_
2	ДНКЖ-Г	1.0	$1.2\pm0.24$	73
2	ДНКЖ-Г	0.5	$1.97\pm0.13$	57
2	Контроль	-	$4.54\pm0.45$	_

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

Примечание. Введение препарата осуществляли на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

комплекса железа по сравнению с препаратом, содержащим меркаптосукцинат.

Цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и меркаптосукцинатом *in vitro*. Влияние динитрозильных комплексов железа, содержащих различные лиганды – ДНКЖ-Г и ДНКЖ-МС, на выживаемость клеток культуры опухоли человека МСF7 изучено в широком диапазоне доз, изменяющихся в пределах от 0.0039 до 2.0 мкмоль/мл.

Полученные данные свидетельствуют о немонотонном характере зависимости доли выживших после воздействия препаратов клеток от дозы.

Как видно из зависимостей, представленных на рис. 5, применение препаратов в диапазоне концентраций от 0.0039 до 0.125 мкмоль/мл (что соответствует диапазону доз, варьирующих в пределах от 3 до 100 мкг/мл) приводит к некоторому увеличению числа выживших клеток. Доля выживших клеток превышает уровень контроля на 5-22% при воздействии ДНКЖ-Г и на 1-15% при воздействии ДНКЖ-МС (рис. 5).

При увеличении концентраций препаратов от 0.5 до 2 мкмоль/мл (что соответствует диапазону доз от 400 до 1600 мкг/мл) наблюдается постепенное снижение доли выживших клеток — до 65% при воздействии ДНКЖ-Г и до 42% при воздействии ДНКЖ-МС (рис.5).

Зависимость гибели клеток от концентрации динитрозильных комплексов железа в указанном диапазоне концентраций — от 0.5 до 2 мкмоль/мл показана на рис. 6.

Как видно, максимальный цитотоксический эффект выражается в гибели 58% клеток при применении ДНКЖ-МС (концентрация 1 мкмоль/мл или 800 мкг/мл) и 35% клеток при применении ДНКЖ-Г (концентрация 2 мкмоль/мл или 1600 мкг/мл).

Расчетная концентрация, вызывающая гибель 50% клеток ( $UK_{50}$ ), составляет для ДНКЖ-МС 0.8 мкмоль/мл (640 мкг/мл), а для ДНКЖ-Г зна-

Таблица 2. Против Льюис	оопухолевый эффек	т ДНКЖ-МС при вну	тривенном введении на	модели карциномы легких
F	Суточная доза,	Средняя масса		K KO

Группа	Суточная доза, мкмоль/кг	Средняя масса опухоли, г	ТРО на 16-е сутки, %	Критерий Стьюдента <i>t</i>
ДНКЖ-МС	2.5	$2.00 \pm 0.15$	65	$3.45 > t_{0.01} = 3.05$ f = 12
ДНКЖ-МС	5.0	$2.85\pm0.35$	50	$2.69 > t_{0.05} = 2.22$ f = 10
Контроль	_	$5.61 \pm 0.25$	-	_

Примечание. Введение препарата осуществляли на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки после перевивки опухоли.



Рис. 4. Изменение показателя противоопухолевой активности биядерных динитрозильных комплексов железа с различными лигандами ДНКЖ-Г и ДНКЖ-МС в зависимости от времени оценки эффекта на модели карциномы Льюис: *1* – ДНКЖ-Г (2.0 мкмоль/кг/сутки), *2* – ДНКЖ-МС (2.5 мкмоль/кг/сутки).

чение *ИК*<sub>50</sub> превышает 2 мкмоль/мл (1600 мкг/мл) (рис. 6).

Учитывая, что согласно общепринятым критериям оценки цитотоксического эффекта вещество считается цитотоксически активным при значениях  $MK_{50} \leq 100$  мкг/мл [9], следует признать, что динитрозильные комплексы железа с глутатионом (ДНКЖ-Г) и с меркаптосукцинатом (ДНКЖ-МС) не обладают цитотоксическим действием на опухолевые клетки культуры MCF7 человека *in vitro*.

Представляется уместным отметить, при всей условности такого сопоставления, что диапазон доз, использованных в экспериментах *in vitro* и



**Рис. 5.** Влияние динитрозильного комплекса железа с глутатионом (1) и с меркаптосукцинатом (2) на выживаемость опухолевых клеток культуры MCF7 человека *in vitro*.



**Рис. 6.** Влияние динитрозильного комплекса железа с глутатионом (*1*) и с меркаптосукцинатом (*2*) на гибель клеток культуры MCF7 человека *in vitro*.

*in vivo*, изменяется примерно в одинаковых пределах — от 30 до 16000 мкг/кг в опытах, проведенных на культуре клеток, и от 400 до 16000 мкг/кг в опытах, проведенных на лабораторных животных (мыши).

Полученные результаты свидетельствуют о весьма значительной противоопухолевой активности динитрозильных комплексов железа с глутатионом и с меркаптосукцинатом, ингибирующих развитие опухоли (карцинома легких Льюис) на 90 и 65%, соответственно, *in vivo*, при слабо выраженном цитотоксическом эффекте препаратов в отношении культуры опухолевых клетки человека MCF7 *in vitro*.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление результатов исследований противоопухолевого действия использованных ДНКЖ на уровне организма (*in vivo*) и на уровне клеточной культуры (*in vitro*) приводит к следующим, казалось бы, взаимоисключающим выводам.

Во-первых, из опытов *in vivo* следует, что это действие должно усиливаться по мере понижения дозы ДНКЖ, вводившейся мышам, тогда как опыты *in vitro* показывают, что гибель злокачественных клеток должна повышаться по мере увеличения концентрации этих комплексов в культуральной среде.

Во-вторых, из экспериментов на животных следует, что для ДНКЖ-МС характерно более слабое, чем для ДНКЖ-Г, противоопухолевое действие, а в опытах на культуре клеток обнаруживается обратная зависимость.

Эти противоречия можно устранить, если принять во внимание участие иммунной системы в противоопухолевом действии ДНКЖ, а также

факт существенно меньшей стабильности ДНКЖ-МС. Последнее следует из факта более быстрого распада этих комплексов при их выдерживании на воздухе при нейтральных и кислых значениях рН. Если ДНКЖ-Г сохранялись в этих условиях соответственно в течение суток или в течение двух-четырех часов, то ДНКЖ-МС распадались при нейтральных значениях рН за два-три часа, а при рН 1–2 – в течение получаса.

Участие иммунокомпетентных клеток в противоопухолевом действии ДНКЖ на уровне организма определяется способностью этих клеток, например макрофагов, эффективно включать в себя ДНКЖ [12] с последующей направленной транспортировкой этих комплексов к злокачественным опухолям и их поступлением из макрофагов внутрь тканей этих опухолей. При этом следует иметь в виду и то обстоятельство, что иммунокомпетентные клетки сами по себе могут подвергаться токсическому действию ДНКЖ, естественно, по мере повышения дозы этих комплексов. Именно поэтому противоопухолевое действие обоих ДНКЖ усиливалось по мере снижения дозы этих комплексов, вводившихся в организм животных, достигая оптимального действия при дозах 2.0-2.5 мкмоля/кг веса животных. При этих дозах иммунокомпетентные клетки сохраняли интактность, целенаправленно передавая ДНКЖ в ткани опухолей. При этом локальная концентрация ДНКЖ в ближайшем окружении опухолей из-за преимущественной локализации этих комплексов в иммунокомпетентных клетках, контактирующих с опухолями, могла быть достаточно высокой.

В связи с вышесказанным более слабое противоопухолевое действие ДНКЖ-МС *in vivo* могло быть обусловлено тем, что токсическое действие на макрофаги и другие иммунокомпетентные клетки, включающие в себя эти комплексы, могло иметь место при их более низкой, чем для ДНКЖ-Г, дозе. В результате иммунокомпетентные клетки могли доставлять к опухолям существенно меньшее количество ДНКЖ-МС и тем самым инициировать более слабое, чем ДНКЖ-Г, противоопухолевое действие в экспериментах *in vivo*.

Как сейчас установлено [13], цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами определяется их способностью высвобождать при распаде как нейтральные молекулы NO, так и катионы нитрозония (NO<sup>+</sup>). Первые, связываясь с ионами супероксида, продуцируют анионы пероксинитрита, продукты распада протонированной формы которых – гидроксильные радикалы и диоксид азота – собственно и оказывают токсическое действие на клетки и ткани. Что касается катионов нитрозония, их цитотоксическое действие, определяется, по-видимому, их способно-

стью инициировать S-нитрозирование тиолсодержащих белков, нарушающее нормальное функционирование этих белков, что и приводит к негативным для клеток и тканей последствиям. Остается открытым вопрос, какой из указанных компонентов ДНКЖ – молекулы NO или катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ при их распаде, – мог оказывать решающее цитотоксическое действие на злокачественные ткани и клетки.

### 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. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **59** (3), 508 (2014).
- 2. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60** (1), 152 (2015).
- 3. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60** (6), 1157 (2015).
- A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, Austin J. Reprod. Medicine & Infertility 2, 1109 (2015).
- 5. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **62** (3), 591 (2017).
- А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика 64 (6), 1216 (2019).
- 7. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **23**, 1236 (2010).
- 8. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **35**, 110 (2013).
- Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), сс. 642–657.
- 10. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **65** (1), 48 (2020).
- 11. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., Биофизика **64** (6), 1138 (2019).
- 12. H. Lewandowska, T. M. Stepkowski, S. Meczynska, et al., J. Inorg. Biochem. **188**, 29 (2018).
- A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).

## The Influence of the Ligand Nature on the Antitumour Activity and the Cytotoxic Effect of the Binuclear Dinitrosyl Iron Complexes

A.F. Vanin<sup>\*,</sup> \*\*, L.A. Ostrovskaya<sup>\*\*\*</sup>, D.B. Korman<sup>\*\*\*</sup>, E.I. Nekrasova<sup>\*\*\*</sup>, O.O. Riabaya<sup>\*\*\*\*</sup>, N.V. Bluhterova<sup>\*\*\*</sup>, V.A. Rykova<sup>\*\*\*</sup>, and M.M. Fomina<sup>\*\*\*</sup>

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

\*\*Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosigina 4, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*\*Blokhin National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

The influence of the ligand nature on the growth-inhibiting and cytotoxic effects of nitric oxide-generating compounds such as binuclear dinitrosyl iron complexes containing glutathione and mercaptosuccinate was studied in vivo and in vitro. It was established that complexes with glutathione demonstrated antitumor activity prevailing over the effect exerted by complexes with mercaptosuccinate capable of inhibiting tumor growth (Lewis lung carcinoma) (90% and 65%, respectively, versus control). It was found that these complexes are weakly cytotoxic against MCF7 human cancer cell line. Half-maximal inhibitory concentration at which the viability of cells reduced by 50% ( $IC_{50}$ ) was equal to 0.8 mM/ml (640 µg/ml) when a complex with mercaptosuccinate was administered and 2 mM/ml (1600 µg/ml) after injection of a complex with glutathione. It is assumed that the antitumor activity of iron complexes under study is determined by the ability of these complexes to enter into immunocompetent cells which provide a direct route to tumor tissues.

Keywords: binuclear dinitrosyl iron complexes, in vivo antitumor activity, Lewis lung murine carcinoma, cytotoxic effect in vitro, MCF-7 human cancer cell line

==== БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ ==

УДК 577.35

## ПОНИЖЕННАЯ БИОДОСТУПНОСТЬ ОКСИДА АЗОТА У ЛОШАДЕЙ С СИМПТОМОКОМПЛЕКСОМ КОЛИК: ОЦЕНКА МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2020 г. В.А. Сереженков\*, Н.А. Ткачев\*, З.С. Артюшина\*\*, М.И Кузнецова\*\*, М. Ковач\*\*\*, А.Ф. Ванин\*

\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4 \*\*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина,

> 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23 \*\*\*Ветеринарная клиника КСК «Новый Век», 143421, Красногорск Московской области, д. Поздняково, ул. Животноводов, вл. 1 *E-mail: serezhenkov@yandex.ru* Поступила в редакцию 17.02.2020 г. После доработки 17.02.2020 г. Принята к публикации 25.05.2020 г.

Патогенез заболеваний пищеварительного тракта лошадей, сопровождающихся развитием воспаления и окислительного стресса, может быть связан с недостатком моноксида азота, который контролирует различные сигнальные пути в организме. В работе проведено определение уровня нитритов, метаболитов оксида азота, у лошадей с различными кишечными заболеваниями. Концентрация нитрита в сыворотке крови у лошадей возрастной группы 7–26 лет составила  $3.60 \pm 3.02$  мкM, а у молодых животных (1–5 лет) –  $8.3 \pm 6.0$  мкM. Резкое снижение нитрита было отмечено у всех лошадей с кишечными заболеваниями ( $3.39 \pm 2.85$  мкM), особенно при метеоризме ( $0.6 \pm 0.4$  мкM) и закупорке ободочной кишки ( $0.81 \pm 0.5$  мкM).

Ключевые слова: лошадь, ЭПР-спектроскопия, нитрит, оксид азота, динитрозильные комплексы железа, нитрозогемоглобин.

DOI: 10.31857/S0006302920050208

Распространенность заболеваний желудка и кишечника у лошадей [1, 2], многофакторный характер их патогенеза, а также сложность дифференциальной диагностики требуют дальнейшего изучения, обуславливая высокую практическую и теоретическую значимость этой проблемы.

Одной из основных характеристик желудочнокишечных заболеваний у лошадей является частое развитие эндотоксического шока. Практически все заболевания кишечника лошади вызывают изменение состава и количественных соотношений ее микрофлоры, снижение pH содержимого кишечника. Как правило, эндотоксины грамотрицательных бактерий, всасываемые стенкой кишечника, связываются со специфическими рецепторами CD14 на эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, дендритных клетках, моноцитах и макрофагах. Через рецепторы CD14 эндотоксины связываются с Toll-подобными рецепторами (TLR2, TLR4) и митоген-активируемыми киназами [3, 4], что вызывает развитие воспалительного ответа.

В этой связи важную роль в метаболизме нитросоединений (нитритов, нитратов и NO) при развитии заболеваний кишечного тракта принадлежит не только патогенной, а всей микрофлоре кишечника [5–7]. Мембранные липополисахариды бактерий и цитокины служат индукторами индуцируемой NO-синтазы; возрастание продукции NO при заболеваниях желудочно-кишечного тракта показано в многочисленных исследованиях [8–11]. NO в высоких концентрациях может оказывать токсическое действие, вызывая апоптоз и некроз энтероцитов, нарушение кишечного барьера, что способствует бактериальной транслокации, снижению моторики и возникновению диареи [12]. Вместе с тем при воспалении NO может оказывать защитное действие: стимулировать кровоток в стенке кишечника, усиливать секрецию слизи, способствовать возрастанию антибактериального ответа [13].

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, МГД – N-метил-D,L-глюкаминдитиокарбамат, МНКЖ – мононитрозильные комплексы железа.

Иными словами, заболевания желудочно-кишечного аппарата лошадей имеют острый характер течения, и в результате гиперпродукции активных форм кислорода [14, 15] уровень NO, необходимый для нормального функционирования эндотелия сосудов слизистой оболочки кишечника и сфинктеров, может снижаться.

Особые физико-химические свойства NO определяют способ его транспортировки: в форме нитрозильных комплексов с гемовым железом, нитрозотиолов [16, 17], а также высокомолекулярных комплексов негемового железа с тиильными лигандами (глутатион, цистеин) - так называемых «комплексов 2.03» [18, 19]. Образование динитрозильных комплексов (ДНКЖ) при связывании тиоловых групп железа (II) с NO и нитрозотиолов на белках представляет собой форму посттрансляционной регуляции их активности [18-20]. Такой способ модификации белка является селективным, обратимым и стабилизирует NO в уникальной биологически активной форме. Источником железа для синтеза ДНКЖ служит нетрансферринсвязанное железо, в транспорте которого важная роль принадлежит альбумину, трансферрину крови и белкам клеток кишечника, ответственным за его всасывание.

Измерение концентрации нитратов и нитритов - (NO)<sub>x</sub> - с использованием реактива Грисса традиционно применяется для количественной оценки тяжести воспалительного процесса [16]. В литературе также имеются данные об измерении концентрации нитрозотиолов [21-23]. Из-за методологических трудностей данные об уровне нитрозотиолов в норме и при воспалительных состояниях часто варьируют в широком диапазоне: от 1 нМ до 7 мкМ [24]. В работах [25, 26] определяли по методу Грисса нитриты и нитраты в сыворотке крови лошадей при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Несмотря на очевидные клинические показатели желудочно-кишечных заболеваний у животных, оценка общего уровня нитратов и нитритов [27] не позволила дифференцировать норму от патологии даже в случае исследования больших выборок животных. В литературе утвердилась точка зрения, что как в норме, так и при патологии желудочно-кишечного тракта измерение метаболита NO – нитрита [28] – является наиболее правильной оценкой его уровня в организме. Ранее нами была исследована группа лошадей разных пород и возраста, в том числе восемь животных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. В данной работе мы дополнили наши исследования животных с патологией.

Целью работы, основанной на анализе литературных данных о возможной связи уровней оксида азота, было измерение уровня метаболита NO – нитрита – в сыворотке крови методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием спиновых ловушек [29, 30] одновременно с измерением нитрозогемоглобина и трансферрина в крови лошадей с симптомами колик и патологии желудочно-кишечного тракта в целом.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись лошади в количестве 62 животных, в том числе пород ганновер-голштинской, орлово-терской, ахалтекинской; при клиническом исследовании у десяти из них были диагностированы: катаральный спазм, закупорка толстой кишки, колит, смещение толстой кишки, метеоризм.

NO образует с гемоглобином стабильные комплексы железа, что позволяет определять его непосредственно в образцах крови методом ЭПР. Для определения в сыворотке крови метаболита NO – нитрита – мы использовали метод спиновой ловушки, основанный на использовании дитиокарбамата и железа (II).

Для исследования кровь брали из яремной вены в гепариновые пробирки и центрифугировали в течение 10 мин на центрифуге модели CH80-2S (ООО НПЦ МТ «АРМЕД», Балашиха Московской области) со скоростью 3000 об/мин для осаждения эритроцитов. После этого образцы сыворотки хранили в жидком азоте (-196°С). Для измерения концентрации нитрозогемоглобина цельную кровь (без гепарина) замораживали в пластиковых контейнерах цилиндрической формы длиной 35 мм и диаметром 4 мм. Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре Bruker ECS-106 (Германия).

Синтез ДНКЖ с глутатионом проводили согласно ранее опубликованной работе [18].

Метод определения NO, использованный в данной работе, основан на реакции образования нитрозотиола – нитрозоцистеина – в кислой среде (pH 3.5) из нитрит-аниона  $NO_2^-$  и гидрохлорида цистеина. Затем нитрозоцистеин в присутствии железа (2+) и N-метил-D,L-глюкаминдитиокарбамата (МГД) образует водорастворимый парамагнитный мононитрозильный комплекс железа (МНКЖ) – МГД-Fe-NO. Определение нитрит-аниона (NO<sub>2</sub>) осуществляли следующим образом: сывороточные белки с массой более 30 кДа после размораживания удаляли фильтрованием через фильтр Microcon 30 кДа (Milliроге Согр., США) в течение 20 мин при 14500 об/мин в мини-центрифуге «Спин плюс» (Эппендорф, Австрия). Разработанный метод позволяет, во-первых, контролировать влияние сывороточных белков на реакцию образования МНКЖ МГД, во-вторых, учесть вклад высокомолекулярных нитрозотиолов [17] и ДНКЖ [18] в

качестве источников NO. К 50 мкл цистеина в концентрации 400 мМ после фильтрации добавляли 10—120 мкл сыворотки, pH раствора доводили до 3.5 путем добавления 0.01 мМ HCl. Через 5 мин добавляли 50 мкл 40 мМ сульфата железа (II), 200 мкл 400 мМ буфера (трис или HEPES) и 200 мкл МГД с концентрацией 250 мМ. Затем pH раствора повысили до 7.6 с помощью 0.06% раствора NaOH. В этих условиях образуется MHKЖ МГД-Fe-NO.

Анализ данных. Для построения калибровочной кривой различные объемы (2-40 мкл) раствора нитрита натрия с концентрацией 480 мкМ добавляли к 50 мкл гидрохлорида цистеина с концентрацией 400 мМ, рН раствора доводили до 3.5, добавляя 0.01 мМ HCl. Через 5 мин добавляли 50 мкл 40 мМ сульфата железа, 200 мкл 200 мМ (трис или HEPES), 200 мкл 250 мМ МГД, pH доводили до 7.6 с помощью 0.06% раствора NaOH. Через 10 мин регистрировали спектр ЭПР МН-КЖ МГД-Fe-NO. Концентрацию нитрита в образце оценивали методом двойного интегрирования и построения калибровочной кривой (рис. 1). Для оценки степени различия использовали анализ формы распределения (критерий Колмогорова-Смирнова) и сравнение медиан и средних (критерий Манна-Уитни и критерий Стьюдента соответственно).



**Рис.** 1. Зависимости интенсивности сигнала ЭПР от концентрации нитрита в диапазоне 0.3-16 мкМ в образце в присутствии (кривые 1-3) и после удаления сывороточных белков (кривая 4).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя построенную калибровочную кривую (рис. 1), мы измерили содержание нитритов в образцах сыворотки крови животных (табл. 1). Оценку проводили после исследования влияния сывороточных белков, которые вносят существенный вклад в вариабельность данных. Также на рис. 1 можно видеть, что калибровочная кривая в присутствии белков отличается от той, где

N⁰	Характеристика животных	Концентрация нитрозогемоглобина, мкМ	Концентрация нитрита, мкМ
1	Здоровые лошади;	$0.1 \pm 0.1$	$min 0.74 \pm 0.4$
1	возраст от 1 года до 6 лет, <i>n</i> = 8	$0.1 \pm 0.1$	max $16.8 \pm 0.6$
2	Здоровые лошади;	$0.14 \pm 0.1$	$\min 0.35 \pm 0.3$
2	возраст от 7 до 26 лет, <i>n</i> = 14	$0.14 \pm 0.1$	max $14.9 \pm 0.5$
3	Закупорка большой ободочной	_	$238 \pm 0.70$
5	кишки; 13.5 года		2.58 ± 0.70
4	Метеоризм; 7 лет	_	$0.60 \pm 0.40$
5	Закупорка слепой кишки; 14 лет	_	$2.41 \pm 0.70$
6	Резекция после заворота; 12 лет	$0.1 \pm 0.1$	$3.45 \pm 1.20$
7	Резекция после заворота; 9 лет	$0.1 \pm 0.1$	$1.36 \pm 0.4$
8	Закупорка большой ободочной	_	$0.81 \pm 0.50$
	кишки, легкое перемещение; 26 лет		0.01 ± 0.50
9	Хронические колики; 3.5 года	$0.69\pm0.30$	$2.30\pm0.60$
10	Колит (периодами); 15 лет	$0.1 \pm 0.1$	$3.8 \pm 1.80$
11	Колики, редко; 8 лет	-	$11.4 \pm 4.2$
12	Колит; 2 гола	$0.4 \pm 0.1$	$7.2 \pm 2.4$

Таблица 1. Результаты измерения нитрозогемоглобина в цельной крови и нитритов в сыворотке крови лошадей

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm m$ .



Рис. 2. (а) — Спектры ЭПР комплекса N-метил-D,Lглюкамин дитиокарбамата с железом (2+) и оксидом азота МНКЖ (комплекс МГД-Fe-NO) в сыворотке крови больных лошадей: 1 — метеоризм, 2 — закупорка большой ободочной кишки, 3 — закупорка слепой кишки. Условия записи спектров: Х-диапазон, центр поля 334 мТл, развертка 10 мТл, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление 1 · 10<sup>5</sup>, 1 скан, T = 290 К. (б) — Структурная формула парамагнитного комплекса МГД-Fe-NO (R1 и R2 — N-метил-D,L-глюкамин).

белки удалены фильтрацией, тангенс угла наклона у нее ниже. На рис. 2 показаны хорошо выраженные спектры ЭПР МНКЖ МГД-Fe-NO с g = 2.035 сыворотки крови животных с желудочно-кишечными заболеваниями. На рис. 3 представлен спектр нитрозогемоглобина с g = 2.07 и g = 1.98 при 77 К крови больной лошади и спектр крови, обработанной оксидом азота, где по величине сверхтонкой структуры 17 Гс можно четко идентифицировать комплекс «гемоглобин-NO». Это является строгим критерием его наличия.

В табл. 1 приведены результаты измерений нитритов в сыворотке крови здоровых животных двух возрастных групп: 1-6 и 7-26 лет, а также десяти животных с патологией (данные остальных восьми животных были приведены ранее). Результаты статистического анализа полученных данных приведены в табл. 2 и на рис. 4. Статистический анализ показал существенные отличия по изученным параметрам возрастных и заболевших лошадей от молодых (p = 0.0484 и 0.0108; 0.0587 и



**Рис.** 3. Спектры ЭПР крови здоровой лошади (спектр 2), крови, обработанной газообразным оксидом азота (спектр 1), и церулоплазмина (спектр 3). Кровь здоровой лошади содержит нитрозогемоглобин в количестве  $0.2 \pm 0.5$  мкМ; кровь, обработанная оксидом азота,  $-12,3 \pm 0,3$  мкМ. Условия регистрации, как указано выше. Спектр 1: усиление  $2 \cdot 10^5$ , 4 скана; спектр  $2 - 1 \cdot 10^5$ , 1 скан. T = 77 К.

0,0831), тогда как отличия по медиане между возрастными и заболевшими мало значимы (p = 0.3340 и 0.0216). Эти результаты согласуются с ранее полученными нами данными.

На рис. 5 показаны спектры ЭПР трансферрина крови здоровой лошади шестилетнего возраста (спектр 1) и крови с добавлением 20 мкМ Fe<sup>3+</sup> (спектр 2), а также трех животных с метеоризмом (спектр 3), закупоркой слепой кишки (спектр 4) и закупоркой большой ободочной кишки с (спектр 5). Форма ЭПР сигнала трансферрина лошадей с патологией отличается от нормы, что, по-видимому, обусловлено вкладом нетрансферринсвязанного железа крови. Нельзя исключить и возможность замены аминокислоты в активном центре связывания железа, что приводит к снижению константы связывания железа трансферрином и накоплению свободного железа. Обмен железа у лошадей отличается тем, что после интенсивных нагрузок его уровень в крови сильно колеблется, что обусловлено гемолизом эритроцитов, в том числе легочными геморрагиями. Анализ спектров ЭПР трансферрина здоровых животных в нашей выборке свидетельствует о его низкой насыщенности железом (44-46%), что согласуется с литературными данными. В случае воспалительных процессов в организме лошади

	Группы лошадей			
	Молодые (1-6 лет)	Возрастные (7-26 лет)	Больные	
Среднее $\pm$ <i>SD</i> , мкМ	$8.32\pm5.96$	$3.55\pm3.02$	$3.39\pm2.85$	
Медиана, мкМ	8.8	1.6	2.41	
Нормальное распределение, тест Шапиро–Уилка, <i>р</i>	0.77	6·10 <sup>-5</sup>	0.0021	
	Молодые/возрастные	Молодые/больные	Возрастные/больные	
Форма распределения, тест Колмогорова–Смирнова, <i>р</i>	0.0512	0.0831	0.0216	
Медианы, <i>U</i> -тест Манна–Уитни, <i>p</i>	0.0156	0.0587	0.3340	
Средние, <i>t</i> -тест Стьюдента, <i>p</i>	0.0194	0.0169	0.9791	

Таблица 2. Статистический анализ полученных данных

также наблюдается снижение уровня железа и насыщенности трансферрина.

На рис. 6 приведен спектр ЭПР крови здоровой лошади, которой ввели ДНКЖ с глутатионом (1:10) в дозе 1700 мкг/кг. Концентрация комплекса с альбумином в крови соответствует  $3.6 \pm 0.5$  мкМ. При комнатной температуре ЭПРсигнал идентичен модельному комплексу ДНКЖ альбумина (спектр не приводится). вегетативной нервной системы составляют третий тип автономной нервной системы, NO играет роль нейромедиатора [31–33]. Активность К<sup>+</sup>-каналов в проводящих импульсах в нейронах сильно зависит от степени нитрозилирования цистеинов каналообразующего белка [15]. Нитрозилирование цистеинов в четырех из пяти фрагментов белка замедляет проведение импульсов в нейронах. У лошадей есть три автономных центра регуляции перистальтики, связанных с интерстици-

### ОБСУЖДЕНИЕ

NO следует рассматривать как один из важнейших факторов защиты слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Сниженное образование NO влияет на секреторные и регенеративные функции желудка. В неадренергических/ нехолинергических нейронах, которые наряду с холин- и норадренергическими проводниками



Рис. 4. Концентрация нитрита в сыворотке лошадей.



Рис. 5. Спектры ЭПР трансферрина крови: 1 – здоровая лошадь возраста 6 лет; 2 – то же, с добавлением 20 мкМ Fe<sup>3+</sup>; 3 – метеоризм; 4 – закупорка слепой кишки; 5 – закупорка большой ободочной кишки. Условия записи спектров: Х-диапазон, центр поля 160 мТл, развертка 60 мТл, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление  $1 \cdot 10^5$ , 1 скан, T = 77 К.



**Рис. 6.** *1* – Спектр ЭПР крови здоровой лошади до введения ДНКЖ (гемоглобин + церулоплазмин); *2* – после введения экзогенного ДНКЖ с глутатионом (1 : 10); *3* – разность спектров *2* и *1*. Условия записи спектров: Х-диапазон, центр поля 336 мТл, развертка 40 мТл, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление  $1 \cdot 10^5$ , 4 скана, *T* = 77 К.

альными клетками Кахаля: гастродуоденальный центр, илео-целиакальный центр и центр тазового изгиба [34-36]. В дополнение к NO вегетативная нервная система кишечника использует в качестве нейромедиаторов вазоактивный кишечный пептид и субстанцию Р [35, 37]. Участие NO в патологических процессах, происходящих в толстой кишке, было показано в работах [6, 38]. В частности, экспериментальный колит сопровождается снижением экспрессии нейрональной NO-синтазы и нарушением релаксации толстой кишки. Эти изменения могут способствовать нарушению моторики и кишечной абсорбции. По последним данным, повышенный общий уровень (NO)<sub>х</sub> характеризует течение воспалительных процессов в организме в результате повышенной активности индуцируемой NO-синтазы. Хорошо известно, что в этом случае развивается окислительный стресс в клетках и тканях, процессы инициируются с участием активных форм кислорода [39, 40]. В результате эффективный NO превращается в активные формы азота (NOCl, OO-NO<sup>-</sup> и др.) и нитраты. Из измерений методом масс-спектрометрии сыворотки крови человека авторы работы [24] установили, что при патологии уровень нитратов в сыворотке увеличивается, а уровень нитритов уменьшается по отношению к норме.

Для обоснования сниженного уровня NO при развитии окислительного стресса предложена концепция биодоступного NO. Иными словами, производится много NO, но его действие как медиатора недостаточно. На определенных стадиях заболевания наблюдается дефицит NO, и, следовательно, сниженная биодоступность NO вызывает нарушение функций желудочно-кишечного тракта у лошадей. В работах [2, 41] метронидазол впервые применили для лечения лошадей и людей при желудочно-кишечных заболеваниях как противовоспалительное и снимающее болевой синдром средство. Мейсон и др. показали образование оксида азота из нитрогруппы метронидазола в присутствии железа и цистеина в виде комплексов МНКЖ и ДНКЖ [42]. Аналогичным эффектом обладает нестероидный противовоспалительный препарат NO-аспирин (NCX-4016), который выделяет NO [43]. Было показано ингибирование функции сфинктера Одди донором оксида азота S-нитрозоацетилцистеином [44]. Эксперименты на моделях колита грызунов показали положительный эффект нитратов жирных кислот [45]. В работе [46] были исследованы заживление язв и изменения в микроциркуляции, вызванные синтезом оксида азота NO-синтазами, вызванным препаратом BHB (benexate hydrochloride betadex). Таким образом, введение в организм источников оксида азота оказывало значительный терапевтический эффект для работы желудочно-кишечного тракта.

Полученные нами данные показывают, что концентрация нитритов (см. табл. 1 и рис. 2) в сыворотке лошадей возрастной группы 7–26 лет была в 2.4 раза выше, чем у молодых животных. Острое снижение нитрита наблюдалось у всех лошадей с кишечными заболеваниями, особенно с метеоризмом и спастическими коликами. Уровень нитрозогемоглобина (см. табл. 1 и рис. 3) ниже в цельной крови двух возрастных групп здоровых лошадей, чем у больных животных.

Как в норме, так и при заболеваниях основным механизмом удаления избытка NO является его превращение в оксигенированном геме гемоглобина в нитрат (рис. 7a). В то же время часть NO может реагировать с кислородом с образованием нитрита, но эта реакция очень медленная при их физиологических концентрациях. Одним из авторов настоящей работы был предложен иной механизм возникновения нитрита из NO<sup>+</sup> в процессе распада ДНКЖ (или биядерных ДНКЖ) [47, 48]. Превращение NO также может происходить при взаимодействии с супероксидным анион-радикалом, образующимся при воспалении, с образованием пероксинитрита [39], который при рН 7.4 разлагается с образованием как нитратов, так и нитритов. Таким образом, в состоянии воспаления и окислительного стресса пути метаболизма NO смещаются в сторону образования нитратов (рис. 7б). Также возможно, что NO частично расходуется как на образование ДНКЖ [49], так и на неконтролируемое нитрозилирование белковых тиолов, а также на образование нитротирозина в



Рис. 7. Пути метаболизирования оксида азота: (а) – в норме, (б) – при окислительном стрессе.

белках [50], но вклад этого пути не так существенен [51]. Нами не зарегистрированы значимые уровни ДНКЖ (или биядерных БДНКЖ) и нитрозотиолов в сыворотке как здоровых, так и больных животных, что согласуется с данными работ [52–54].

Мы полагаем, что эффективным средством восполнения оксида азота как экзогенного мессенджера и регулятора при заболеваниях желудочно-кишечного тракта у лошадей могут служить ДНКЖ (или биядерные БДНКЖ) с тиолатными лигандами.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- P. C. Barko, M. A. McMichael, K. S. Swanson, and D. A. Williams, J. Vet. Intern. Med. **32**, 9 (2018).
- 2. 2. N. D. Cohen, Equine Vet. Educ. 14 (4), 212 (2002).
- 3. E. Lorenz, Curr. Pharmaceut. Design **12** (32), 4185 (2006).
- 4. H. Hug, M. H. Mohajeri, and G. La Fata, Nutrients **10**, 203 (2018).
- J. Vermeiren, T. Van de Wiele, W. Verstraete, et al., J. Biomed. Biotechnol. 2009, 284718 (2009).
- 6. J. O. Lundberg and E. Weitzberg, Gut **62** (4), 616 (2013).
- 7. F. A. Uzal and S. S. Diab, Vet. Clin. North Am. Equine Pract. **31**, 337 (2015).
- 8. D. Rachmilewitz, J. S. Stamler, D. Bachwich, et al., Gut 36 (5), 718 (1995).

- M. Herulf, B. Svenungsson, A. Lagergren, et al., J. Infect. Dis. 180 (2), 542 (1999).
- N. K. Chokshi, Y. S. Guner, C. J. Hunter, et al., Semin. Perinatol. 32 (2), 92 (2008).
- R. E. Malmström, H. Björne, A. Oldner, et al., Shock 18 (5), 456 (2002).
- 12. M. B. Grisham, K. P. Pavlick, F. S. Laroux, et al., J. Investig. Med. **50** (4), 272 (2002).
- 13. D. M. McCafferty, J. S. Mudgett, M. G. Swain, and P. Kubes, Gastroenterology **112** (3), 1022 (1997).
- H. M. M. Ibrahim, J. Equine Vet. Sci. 34 (10), 1205 (2014).
- N. Gamper and L. Ooi, Antioxid. Redox Signal. 22 (6), 486 (2015).
- J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (16), 7674 (1992).
- D. T. Hess, A. Matsumoto, S.-O. Kim, et al., Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6, 150 (2005).
- A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, and M. V. Genkin, Nitric Oxide 2 (4), 224 (1998).
- 19. V. P. Mokh, A. P. Poltorakov, V. A. Serezhenkov, and A. F. Vanin, Nitric Oxide **22** (4), 266 (2010).
- 20. В. А. Сереженков, С. М. Борунова, М. И. Кузнецова и Н. А. Ткачев, Дезинфекция. Антисептика 5 (1), 50 (2014).
- 21. A. Gow and J. Stamler, Nature 391 (6663), 169 (1998).
- 22. S. A. Rocks, C. A. Davies, S. L. Hicks, et al., Free Radic. Biol. Med. **39** (7), 937 (2005).
- 23. P. H. MacArthur, S. Shiva, and M. T. Gladwin, J. Chromatogr. **851**, 93 (2007).
- 24. D. Tsikas, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **851**, 51 (2007).
- M. H. Mirza, J. L. Oliver, T. L. Seahorn, et al., Can. J. Vet. Res. 63 (4), 230 (1999).
- N. Galvin, H. Dillon, and F. McGovern, Irish Vet. J. 57 (8), 467 (2004).
- 27. M. H. Mirza, T. L. Seahorn, J. L. Oliver, et al., Can. J. Vet. Res. **69**, 106 (2005).
- 28. D. Tsikas, Anal. Biochem. 379 (2), 139 (2008).

СЕРЕЖЕНКОВ и др.

- 29. V. D. Mikoyan, L. N. Kubrina, V. A. Serezhenkov, et al., Biochim. Biophys. Acta **1336** (2), 225 (1997).
- S. K. Jackson, M. P. Thomas, S. Smith, et al., Faraday Discuss. 126, 103 (2004)
- 31. G. Dijkstra, H. van Goor, P. L. Jansen, and H. Moshage, Curr. Opin. Invest. Drugs 5 (5), 529 (2004).
- 32. M. J. Rand and C. G. Li. Annu. Rev. Physiol. 57, 659 (1995).
- O. Dietz and B. Huskamp, *Handbuch Pferdepraxis*, 3<sup>rd</sup> ed. (Enke, 2006).
- 34. M. Kovach, *Colic horses. Causes. Diagnosis. Treatment* (Royal Publ. House, 2010).
- 35. N. A. White and B. Edwards, *Handbook of Equine Colic* (Butterworth-Heinemann, 2001).
- 36. H. Bult, G. E. Boeckxstaens, P. A. Pelckmans, et al., Nature **345**, 346 (1990).
- 37. N. E. Robinson, *Current Therapy in Equine Medicine*, 5<sup>th</sup> ed. (Saunders, 2003).
- C. A. Reinders, D. Jonkers, E. A. Janson, et al., Scand. J. Gastroenterol. 42 (10), 1151 (2007).
- F. Dalloz, V. Maupoil, S. Lecour, et al., Mol. Cell. Biochem. 177, 193 (1997).
- 40. C. Nathan and M. U. Shiloh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (16), 8841 (2000).
- 41. I. Bjarnason, J. Hayllar, A. J. MacPherson, and A. S. Russell, Gastroenterol. **104**, 832 (1993).

- R. P. Mason and P. D. Josephy, J. Inorg. Biochem. 24 (2), 161 (1985).
- 43. B. Whittle, Expert Opin. Investig. Drugs **14** (11), 1347 (2005).
- A. Slivka, R. Chuttani, D. L. Carr-Locke, et al., J. Clin. Invest. 94 (5), 1792 (1994).
- S. Borniquel, E. A. Jansson, M. P. Cole, et al., Free Radic. Biol. Med. 48, 499 (2010).
- J. M. Lee, J. Y. Lim, Y. Kim, et al., Exp. Ther. Med. 12 (2), 573 (2016).
- 47. A. F. Vanin, Nitric Oxide 54, 15 (2016).
- 48. A. F. Vanin, Cell. Biochem. Biophys. 77 (4), 279 (2019).
- 49. J. R. Hickok, D. Vasudevan, G. R. Thatcher, et al., Antioxid. Redox Signal. **17** (7), 962 (2012).
- 50. H. Ischiropoulos, Arch. Biochem. Biophys. **356** (1), 1 (1998).
- 51. D. Tsikas and J. C. Frölich, Circ. Res. 90, 39 (2002).
- 52. V. Y. Titov, A. M. Dolgorukova, V. G. Vertiprakhov, et al., Bull. Exp. Biol. Med. **168**, 321 (2020).
- 53. E. D. Lamprecht and A. Carey, Williams Oxid. Med. Cell. Longevity **2012**, 1 (2012).
- 54. G. T. Mukosera, T. Liu, A. S. Ahmed, et al., Nitric Oxide **79**, 57 (2018).

## Reduced Nitric Oxide Bioavailability in Horses with Colic: Evaluation by ESR Spectroscopy

V.A. Serezhenkov\*, N.A. Tkachev\*, Z.S. Artyushina\*\*, M.I. Kuznetsova\*\*, M. Kovac\*\*\*, and A.F. Vanin\*

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

\*\*K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, ul. Akademika Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia

\*\*\*"New Century" Veterinary Clinic, ul. Zhivotnovodov 1, Pozdnyakovo, Krasnogorsk, Moscow Region, 143421 Russia

The pathogenesis of diseases of the gastrointestinal tract of horses, which is caused by inflammation and oxidative stress, may be associated with a lack of nitric oxide, that controls various signaling pathways in the body. This study was aimed at determining the level of nitrites, metabolites of nitric oxide in horses with various intestinal diseases. The concentration of nitrite in blood serum was  $3.60 \pm 3.02 \,\mu\text{M}$  and  $8.3 \pm 6.0 \,\mu\text{M}$  in horses aged 7–26 years and 1–5 years, respectively. The sharp changes downwards in nitrite concentrations were observed in all horses with intestinal diseases ( $3.39 \pm 2.85 \,\mu\text{M}$ ), especially in horses with flatulence ( $0.6 \pm 0.4 \,\mu\text{M}$ ) and obstruction of the colon ( $0.81 \pm 0.5 \,\mu\text{M}$ ).

Keywords: horse, ESR spectroscopy, nitrite, nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, nitrosyl hemoglobin

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 612.062; 612.829; 591.512

## ОСОБЕННОСТИ КОГНИТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОЙ ГИПОМАГНИТНОЙ СРЕДЫ

© 2020 г. Д.Р. Хусаинов\*, И.И. Коренюк\*, В.И. Шахматова\*\*, К.Н. Туманянц\*, Н.С. Трибрат\*, Е.Д. Хорольская\*\*\*, А.В. Чайка\*, И.А. Борзова\*

\*Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, 295007, Симферополь, просп. Вернадского, 4 E-mail: gangliu@yandex.ru

\*\*Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, 420012, Казань, ул. Карла Маркса, 76

\*\*\*Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

Поступила в редакцию 03.12.2019 г. После доработки 17.07.2020 г. Принята к публикации 22.07.2020 г.

У крыс, находившихся в условиях четырнадцатидневного умеренного экранирования магнитного поля, исследовали динамику формирования условных рефлексов в установке «Шелтер» и тесте «лабиринт Барнса». Обнаружено, что у крыс, находящихся в условиях экранирования, выработка условной реакции активного избегания происходила быстрее, чем у нативных животных. Непосредственное ускоряющее влияние умеренной гипомагнитной среды на выработку условной реакции считается крайне маловероятным, а наблюдаемый эффект связан, скорее всего, с известными биоритмологическими перестройками болевой чувствительности в условиях гипомагнитной среды, при которых в первую неделю развивается гиперальгезия, что является дополнительной мотивацией для формирования условной реакции активного избегания в установке «Шелтер». Двухфазное изменение болевой чувствительности крыс-самцов в четырнадцатидневный период показано в установке «Электростимуляция»: на первой неделе развивается гиперальгезия, на второй – гипоальгезия. В тесте «лабиринт Барнса» в четырнадцатидневный отрезок времени не было обнаружено никаких отличий фиксируемых поведенческих показателей между группами контрольных животных и экспериментальных, находящихся в гипомагнитных условиях. Следовательно, ускоренное формирование условной реакции активного избегания у крыс под влиянием гипомагнитной среды, вероятнее всего, связано именно с существенным усилением болевой чувствительности на первой неделе эксперимента.

Ключевые слова: гипогеомагнитная среда; обучение и память; установка «Шелтер», тест «лабиринт Барнса».

DOI: 10.31857/S000630292005021X

Естественный геомагнитный фон является неотъемлемым условием существования всех живых организмов Земли. Однако с развитием человеческой цивилизации живые организмы и, прежде всего, человек подвергаются электромагнитному экранированию различной степени выраженности — от незначительного до практически нулевых значений напряженности магнитного поля.

Многими авторами показано, что в широком диапазоне от умеренного до мощного экранирования магнитного поля у живых организмов возникают выраженные десинхронозы, обусловленные смещением фаз секреции мелатонина [1–3],

функционирования опиоидной системы [4], некоторых других систем [5, 6]. В гипомагнитных условиях изменяется динамика болевой чувствительности [1, 7], агрессии [3, 5, 8], депрессивных состояний [6] и других физиологических процессов в организме [8, 9]. Заметная доля исследований посвящена изучению высшей нервной деятельности животных и человека в гипомагнитной среде. Так, показано, что в условиях электростатического или «нулевого» магнитного полей у людей возрастало количество ошибок в результатах и увеличивалось время, необходимое для выполнения тестов, измеряющих параметры когнитивных процессов, ухудшалась цветовая память и снижалась скорость двигательных реакций [9, 10]. В исследованиях когнитивной сферы животных показано ухудшение процесса консолидации

Сокращение: УРАИ – условная реакция активного избегания.

<i>f,</i> Гц	SB						
16	3,7	50	2,5	95	3,8	160	1,0
20	2,4	51	2,3	100	2,9	200	1,0
25	1,9	70	2,4	102	2,8	250	1,0
30	2,6	75	2,8	105	2,8	255	1,8
35	2,3	80	2,5	125	2,2	350	0,9
40	2,7	85	2,4	130	1,6	400	1,1
45	2,4	90	2,7	152	1,4	500	1,0

**Таблица 1.** Зависимость коэффициента экранирования (*S*<sub>B</sub>) камеры, выполненной из двухслойного железа «Динамо» от частоты (*f*) переменного магнитного поля

Примечание. S<sub>B</sub> – коэффициент экранирования, f – частота переменного магнитного поля.

памятного следа [11, 12], гиперплазия дендритных шипиков в нейронах, участвующих в долговременной памяти [13]. При поличастотном воздействии полей низкой интенсивности наблюдается подавляющий эффект на выработку рефлекса избегания [12]. Иногда встречаются работы, в которых указывается на ускоренное обучение крыс при интенсивных физических воздействиях [14].

Следовательно, доминируют работы, в которых исследуются когнитивные процессы в условиях практически нулевого магнитного поля, особо актуальные для условий космического полета, но не для повседневной жизни человека. Немаловажен тот факт, что человек сталкивается с условиями умеренного экранирования в связи со своей профессиональной деятельностью: работники метро, банковских хранилищ, шахтеры, спелеологи и др. Значит, условия именно умеренного экранирования для людей определенных профессий приобретают устойчивое постоянство. Но, к сожалению, по особенностям влияния этого фактора на динамику когнитивных процессов печатных работ встречается не так много. При этом воздействие гипомагнитного фактора не исследовано на непосредственный процесс обучения и формирования условнорефлекторного поведения. В связи с этим в настоящей работе мы выясняли динамику формирования условнорефлекторного поведения крыс-самцов, подвергшихся четырнадцатидневному умеренному экранированию фонового магнитного поля.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первый этап исследования проводили на белых крысах (самцах) линии Wistar одного возраста (6 месяцев) в установке «Шелтер» (ООО «Нейроботикс», Москва). В отборочный период баллы, набранные крысами во время фонового тестирования в установке, варьировали от трех до восьми. При этом крысы, набравшие от пяти до шести баллов (принцип подсчета подробно описан далее), были охарактеризованы нами как крысы со средним уровнем способностей к интегративному научению и составили контрольную и экспериментальную выборки по десять особей в каждой, которые после отбора для социальной адаптации находились в условиях вивария без каких-либо дополнительных воздействий в течение десяти суток. По истечению этого срока экспериментальную выборку подвергали четырнадцатидневному электромагнитному экранированию по 19 ч в сутки. Ослабление фонового магнитного поля в экспериментальной группе осуществляли с помощью камеры размером 2 × 3 × 2 м, изготовленной из двухслойного железа «Динамо». Определение коэффициента экранирования камеры было проведено экспериментально путем измерения величины магнитного поля вне камеры и внутри нее. Измерения проводили как с помощью феррозондового магнитометра, так и с помощью индукционной катушки. Коэффициент экранирования магнитного поля на частоте f вычисляли как отношение значения магнитной индукции вне камеры к значению магнитной индукции внутри нее (табл. 1).

Для измерения в области низких частот (от  $10^{-4}$  Гц до 100 Гц) использовали однокомпонентный и двухкомпонентный феррозондовые магнитометры, позволяющие одновременно проводить измерение двух взаимно перпендикулярных проекций вектора магнитного поля. Порог чувствительности магнитометров составляет 1 нТл по каждой компоненте, точность измерения ± 3%.

Измерения гипомагнитного поля в области высоких частот (от 15 Гц до 100 кГц) проводили в лаборатории и экранирующей камере с помощью измерительной катушки со следующими характеристиками: 500 витков, внутренний диаметр

10 см, внешний — 10.6 см совместно с селективным усилителем У2-8. Измеряли также спектральную плотность магнитного шума в экранирующей камере как в области ультранизких частот, так и в области радиочастот. Результат этих измерений графически представлен на рис. 1.

В четырнадцатидневный экспериментальный период всех крыс переносили в лабораторию к десяти часам утра, где они до тринадцати часов имели возможность адаптироваться к обстановке лаборатории. Затем с тринадцати до четырнадцати часов дня животные проходили процесс обучения в установке «Шелтер», а в пятнадцать часов их снова помещали в условия экранирующей камеры. Животные контрольной группы находились в условиях имитации экранирования в тех же временных интервалах: их помещали в камеру размером  $2 \times 3 \times 2$  м из трехслойного гофрированного картона Т-24, усиленную в угловых стыках деревянными рейками. При этом все условия (освещенность, температура, влажность и т. д.) поддерживались идентичными как в реальной, так и в имитационной экранирующей камере. Имитационная камера находилась в том же помещении, что и реальная установка.

Значения индукции для постоянного магнитного поля в областях пространства контрольной и экспериментальной групп измеряли магнитометром HMR 2300 (Honeywell, США) и представлены в табл. 2.

Камера установки «Шелтер» разделена на два отсека, между которыми имеется небольшое отверстие, соответствующее размерам крысы, для перемещения. Перед обучением каждой крысе предоставляли для ознакомления с установкой пять минут. Затем в отсек, где находилась крыса, подавали звуковой и световой (20 Вт) сигналы одновременно. Через 5 с на металлическую решетку пола подавали электрический ток (1.5 мА), причем звуковые и световые сигналы прекращались. При переходе крысы в другой отсек происходила автоматическая отмена подачи электрического тока на решетку пола. Полный ежедневный цикл для одной крысы состоял из семи предъявлений раздражителя. Регистрировали число переходов на условные раздражители (звуковые и световые сигналы), число переходов на безусловные раздражители (электрический ток) и отсутствие переходов как отсутствие реакции активного избегания. Переходы на условные раздражители оценивались в 2 балла, переходы на безусловный раздражитель — в 1 балл, отсутствие перехода оценивалось в 0 баллов. Таким образом, крысы каждой выборки во время каждой сессии набирали определенное количество баллов, которые служили для оценки формирования условной реакции активного избегания (УРАИ).

1000 1 – Вне камеры 2 – Внутри камеры 100 0.001 0.001 0.001 100 1000 1000 10000 10000 100000 Частота, Гц

**Рис.** 1. Зависимости спектральной плотности магнитного шума вне камеры и внутри камеры от частоты в области частот от 15 Гц до 100 кГц.

Вышеописанная методика выработки УРАИ была сформирована согласно работе [15].

Для определения четырнадцатидневной динамики болевой чувствительности крыс, находящихся в условиях экранирования, использовали тест «Электростимуляция». Данная экспериментальная серия была выполнена на 20 крысах-самцах линии Wistar шестимесячного возраста. Животные были отобраны таким образом, что их поведенческие реакции позволяли однозначно идентифицировать болевую реакцию (критерии будут подробно описаны далее). Затем животные были разделены на две равнозначные группы по десять особей в каждой и оставлены на десять суток в стандартных условиях вивария для социальной адаптации. По истечении этого срока животные обеих групп прошли пятидневное (однократно в сутки) предварительное тестирование в установке «Электростимуляция», что позволило минимизировать эффект научения в период основного эксперимента. Этот подход был необходим именно в данной серии исследования, так как ставилась главная задача: определить изменение болевой чувствительности в четырнадцатидневный период нахождения в гипомагнитных условиях с минимизацией дополнительных факторов. Особи одной группы составили контрольную выборку, другой – экспериментальную группу. Особенности содержания животных обеих групп и характеристики экранирующей камеры описаны выше.

Тест «Электростимуляция» представляет собой камеру 20×30×20 см, пол которой является высокопроводимой медной площадкой. На площадку подается ток от электростимулятора, генерирующего прямоугольные одиночные импульсы длительностью 10 мс с частотой 40 Гц с возмож-

Характеристики индукции магнитного поля (контрольная группа)		Реальная экранирующая камера (экспериментальная группа)	Коэффициент экранирования (ослабления)
По оси Х	12.3 мкТл	1.5 мкТл	8.2
По оси У	10.7 мкТл	0.5 мкТл	21.5
По оси Z	46.7 мкТл	6.0 мкТл	7.78
Модуль магнитной индукции (В)	48.52 мкТл	6.2 мкТл	7.82

**Таблица 2.** Значения магнитной индукции в имитационной и реальной экранирующих камерах и соответствующие коэффициенты экранирования (ослабления)

ностью постепенного увеличения вольтажа. Маркером болевой реакции в указанном тесте выступает ряд поведенческих реакций: вздрагивание (внезапное напряжение мускулатуры или прижимание к полу, при котором лапы остаются на решетке), при напряжении около 30 В; попытка активного избегания (бег по периметру установки, отрыв отдельных конечностей от пола, иногда, облизывание лап; ярко выраженная дрожь) – при напряжении порядка 40-50 В; прыжок (сильная реакция, при которой все четыре лапы одновременно отрываются от решетки) и голосовые реакции (писк) – при напряжении 50 В и более. В редких случаях относительно невысокие прыжки и слабый писк могут проявляться уже при напряжении 40-50 В.

В нашем исследовании маркерами болевой реакции крыс в тесте «Электростимуляция» мы приняли поведенческие реакции, обозначаемые как попытка активного избегания. Следует сказать, что в контрольной группе пороговые значения напряжения на протяжении всего четырнадцатидневного эксперимента колебались в диапазоне 40–45 В, что полностью соответствует литературным данным [15].

На третьем этапе исследования мы провели изучение четырнадцатидневной поведенческой динамики крыс в тесте Барнса. На указанном этапе также были использованы 20 крыс самцов линии Wistar возрастом 6 месяцев, которые были разделены на две группы – контрольную и экспериментальную – по десять особей в каждой. Все условия содержания и подготовки животных к экспериментальному тестированию уже описаны в предыдущих этапах.

В установке «лабиринт Барнса» используется естественное желание грызунов избегать ярко освещенных открытых незащищенных пространств [16]. Она состоит из большой круглой арены с двадцатью отверстиями, расположенными на одинаковом расстоянии друг от друга и от центра установки. Под одним из отверстий располагается убежище (большой пенал, имитирующий норку), которое животное может использовать для выхода из лабиринта, в то время как другие ведут, в зависимости от комплектации теста, либо к ложному убежищу (маленький пенал, где нельзя спрятаться), либо являются сквозными, т.е. животное может оступиться и упасть с платформы [16, 17].

Перед непосредственным проведением тестирования животных в течение нескольких дней приучают к установке для минимизации стрессвоздействия, а также показывают возможность избегания в убежище, если животное до этого времени не обнаружило его. Напротив убежища может располагаться узнаваемый ориентир, но его использование и пространственное положение опционально и имеет различные вариации, вплоть до расположения противоположно убежищу. Грызуны, выполняющие одну-две попытки в день длительностью 4-5 мин, могут узнать местоположение укрытия через два-три дня. После завершения тренировки длительность эксперимента составляет по разным методикам от одной до пяти минут. Стоит помнить, что после того, как животное обнаружило убежище, следует позволить ему остаться в нем не менее, чем на одну минуту для привыкания и закрепления полезного действия [16, 17].

Регистрируемые показатели: 1) время, необходимое для обнаружения укрытия (в секундах); 2) количество ошибочно выбранных укрытий (шт/баллы); 3) общее пройденное расстояние в см; 4) стратегия, применяемая животным для поиска укрытия: случайная, последовательная, либо имеющая определенный паттерн.

В нашем случае мы использовали модификацию приведенной классической методики в силу того, что целью исследования явилось выявление влияния гипомагнитной среды на когнитивные процессы в четырнадцатидневный период от

стартового (нулевого) состояния. Поэтому в указанный временной отрезок включены и первые тренировочные дни. Именно в эти дни распределение данных не подчинялось гауссовскому закону, и для статистического анализа результатов, полученных в тесте «лабиринт Барнса», мы использовали непараметрический критерий Данна. Также мы не использовали ориентир, и крысы для ориентации в лабиринте Барнса должны были выстраивать лишь свою внутреннюю систему координат.

Статистическую обработку данных и графическую визуализацию проводили в программе GraphPad Prism 7.0, используя параметрический критерий Тьюки для анализа данных, полученных в установке «Шелтер» и тесте «Электростимуляция», а также непараметрический критерий Данна — в тесте «лабиринт Барнса». Нормальность распределения числового массива оценивали с помощью критерия Колмогорова—Смирнова.

Все исследования были проведены с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [18].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение результатов контрольной и экспериментальной групп выявило достоверные различия в количестве набранных баллов (см. рис. 2) на четвертые, пятые, шестые, седьмые и восьмые сутки. В указанные дни животные экспериментальной группы демонстрировали большую успешность избегания в противоположный отсек и набирали соответственно на  $2.90 \pm 0.45$  (p < 0.05),  $3.70 \pm 0.47$  (p < 0.01),  $2.80 \pm 0.53$  (p < 0.05),  $3.00 \pm 0.42$  (p < 0.05) и на  $2.00 \pm 0.44$  (p < 0.05) баллов больше, чем животные контрольной группы.

Следовательно, крысы, которые находились в условиях умеренного экранирования магнитного поля, продемонстрировали более высокую скорость формирования УРАИ. Если проанализировать динамику формирования УРАИ у животных каждой группы по отдельности, то в контрольной группе (см. рис. 1) можно четко проследить линейную зависимость возрастания успешности избегания болевого стимула. Обнаруженная зависимость полностью соответствует классическому представлению о процессах формирования УРАИ, другими словами, постепенному обучению животных [15].

У крыс экспериментальной группы (см. рис. 2) наблюдается достаточно быстрое развитие УРАИ, причем максимальное количество набранных баллов (порядка 12 баллов) достигается уже к пятым суткам эксперимента и остается на

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020



**Рис. 2.** Динамика формирования условного рефлекса активного избегания в четырнадцатидневный период. Представлены средние значения и ошибка среднего, Экранирование – показатели животных экспериментальной группы, \* – данные статистически значимо различаются при p < 0.05, \*\* – данные статистически значимо различаются при p < 0.01.

уровне «плато» до конца эксперимента. Важно отметить, что максимальное количество баллов, соответствующих успешности избегания болевого стимула, у крыс обеих групп практически совпадает и к четырнадцатому дню составляет  $12.6 \pm 0.8$  в контроле и  $12.2 \pm 1.2$  в экспериментальной группе.

В силу того, что в установке «Шелтер» безусловным раздражителем является болевой стимул электрической модальности, во второй экспериментальной серии мы изучали четырнадцатидневную динамику болевой чувствительности крыс в установке «Электростимуляция».

В результате проведенного исследования была обнаружена фазная зависимость уровня болевой чувствительности, при которой на первой неделе развивалась гиперальгезия, а на второй — гипоальгезия (рис. 3).

Четко видно, что с третьих по седьмые сутки эксперимента животные, находящиеся в условиях гипомагнитной среды, демонстрируют значимое снижение болевого порога на 11–22 В (при уровне значимости от  $p \le 0.05$  до  $p \le 0.001$ ) по сравнению с контрольными животными. С девятых по одиннадцатые сутки исследования у экспериментальных крыс, наоборот, развивалась гипоальгезия, и значения болевого порога повышались на 13–17 В (при  $p \le 0.01$ ) по сравнению с контрольными значениями. В целом же, анализируя полученные результаты, можно проследить четкую зависимость: на первой неделе гипомагнитного воздействия проявляется заметное снижение порога болевой чувствительности по сравне-



**Рис. 3.** Динамика болевой чувствительности крыссамцов, рассчитанная по болевому порогу. \*\*\* — Данные статистически значимо различаются при p < 0.001, остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

нию с нативными показателями, на второй — его повышение. Полученные результаты по своей качественной характеристике полностью совпали с литературными данными, в которых описана аналогичная динамика, исследованная на других видах животных [1, 8].

Последнюю третью экспериментальную серию мы провели в тесте «лабиринт Барнса», в котором минимизируется влияние сопутствующих факторов, в частности, болевой чувствительности. Следовательно, результаты этого этапа позволят с заметной долей уверенности говорить о возможности непосредственного влияния гипомагнитной среды на когнитивные процессы или, наоборот, станут основанием для опровержения такого воздействия.

На рис. 4 представлена четырнадцатидневная динамика пройденной дистанции крысами во время поиска убежища в тесте «лабиринт Барнса». Из представленный динамики видно, что никаких отличий между показателями контрольной и экспериментальной групп на протяжении всего четырнадцатидневного тестирования в указанном тесте не обнаружено. Аналогичная ситуация была характерна и для динамики количества ошибочно выбранных укрытий, и для времени и стратегии поиска убежища. Поэтому мы решили не визуализировать динамику этих параметров во избежание перегруженности однотипным графическим материалом. Укажем на то, что, как и следовало ожидать, количество ошибочно выбранных укрытий постепенно снижалось до минимальных значений (0-1). При этом по стратегии поиска убежища в обеих группах крысы разделились примерно поровну: половина животных от центра лабиринта Барнса перемещалась непо-



**Рис. 4.** Четырнадцатидневная динамика пройденной дистанции в лабиринте Барнса. Представлены медиана и ошибка для 95%-го доверительного интервала, остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

средственно к убежищу (норке), вторая половина ориентировалась по ложным норкам.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам, полученным в установке «Шелтер», сформированность УРАИ у животных обеих групп к концу эксперимента находится на одинаковом уровне, а различие касается только скорости его выработки. Возникает закономерный вопрос: чем обусловлено заметно более быстрое развитие УРАИ у животных, подвергнутых гипомагнитному воздействию? На него напрашивается ответ, что умеренное экранирование магнитного поля способствует ускоренному обучению у крыс. Для обоснования такого вывода необходимо обратиться к литературным данным, касающихся проблематики исследования. Итак, если анализировать современное состояние вопроса, в литературных источниках гораздо чаще встречается описание негативного действия гипомагнитной среды на когнитивные функции живых систем. Показано, что в условиях сильного экранирования, вплоть до практически нулевого значения магнитного поля, у людей наблюдается ухудшение таких показателей, как концентрация внимания, скорость реакции, объем кратковременной памяти и т. п. [9, 10]. Испытуемые, подвергавшиеся воздействию гипомагнитной среды, совершали больше ошибок при выполнении стандартных тестовых заданий, по сравнению с контрольной группой [9]. Однако стоит отметить, что данные эффекты существенно зависели от пола и возраста испытуемых, а сила воздействия не носила ярко выраженный характер и зачастую не превышала 3-6%, хотя в от-

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

1030

дельных случаях показатели могли ухудшаться более чем на 10%. Необходимо принять во внимание и то, что у определенных испытуемых нулевое электромагнитное поле вызывало даже улучшение когнитивных функций, а сам фактор действовал однократно в течение 40—44 мин, но не хронически или субхронически.

Негативное действие сильного экранирования на когнитивные процессы выявлено и в исследованиях на животных, в которых показано снижение эффективности выработанных условных рефлексов, объемных характеристик памяти [13, 19]. При этом в условиях сильного экранирования у животных (крыс) происходит снижение концентрации моноаминов в мозговых структурах, участвующих в осуществлении когнитивной и эмоционально-мотивационных функциях [4, 20]. Также угнетающее действие экранирования отмечено и на непосредственную активность нейронов и нейронных сетей, например, опиоидергических нейронов [4, 8], формирование дендритных шипиков [13], снижение мощности основных ритмов энцефалограммы крысы, в том числе, α- и β-ритмов [20].

Следовательно, с учетом приведенных литературных данных непосредственное увеличение скорости формирования УРАИ в условиях гипомагнитной среды становится крайне сомнительным. Также маловероятен вариант случайности, так как результаты были дважды воспроизведены, и встречаются работы, в которых отмечается ускоренное формирование условного рефлекса у крыс, например, в тесте Морриса после облучения высокоэнергетическими протонами [14]. Но как же тогда объяснить феноменологию ускоренного формирования УРАИ в гипомагнитной среде, которая отмечена в настоящем исследовании? Мы склонны думать, что такой эффект может быть обусловлен опосредованными причинами. Так, в установке «Шелтер» безусловным раздражителем является электрический ток, который вызывает болевые ощущения, а значит, изменение болевой чувствительности скажется на процессах формирования УРАИ. К настоящему времени общеизвестным является факт перестройки и/или модификации биологических ритмов в условиях гипомагнитной среды [1, 2, 5, 8]. Не является исключением и временная структура болевой чувствительности, которая в умеренной гипомагнитной среде в четырнадцатидневный период демонстрирует двухфазное изменение: на первом этапе формируется гиперальгезия, а на втором – гипоальгезия [1, 7]. При этом гиперальгезия выраженно проявляется с третьих по пятые сутки, например, у мышей [1], затем развивается

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

гипоальгезия. Следовательно, на начальном этапе (до пятых-седьмых суток) у крыс экспериментальной группы может развиваться гипоальгезия, что, несомненно, в установке «Шелтер» выступит дополнительным и существенным фактором, ускоряющим формирование УРАИ.

Именно для проверки выдвинутого предположения во второй части настоящего исследования мы определяли динамику болевой чувствительности крыс в условиях умеренного магнитного экранирования в тесте «Электростимуляция». Опираясь на результаты, полученные в тесте «Электростимуляция», можно заключить, что на первой неделе формируется гиперальгезия, на второй – гипоальгезия; ускоренное формирование УРАИ у крыс под влиянием гипомагнитной среды мы склонны связывать именно с существенным усилением болевой чувствительности. Следовательно, логично полагать, что у крыс экспериментальной группы на первой неделе повышается мотивация к избеганию болевого фактора в установке «Шелтер». Кроме того, с восьмых суток эксперимента достоверная разница в набранных баллах между животными двух групп исчезает (см. рис. 2). Отсутствие негативного влияния фазы гипоальгезии на выраженность УРАИ у экспериментальных крыс вероятнее всего связано с тем, что к этому времени у животных уже сформирована достаточно устойчивая реакция на предупредительный звуковой и световой сигналы.

Следует отметить, что как в установке «Шелтер», так и в тесте «Электростимуляция» на животных оказывается выраженное болевое воздействие. Поэтому на третьем экспериментальном этапе настоящего исследования мы решили изучить условнорефлекторную деятельность крыс в тесте без интенсивных воздействий, тем более болевых. Как нельзя лучше для этой задачи подходил тест Барнса. Результаты, полученные в тесте Барнса, не продемонстрировали никаких достоверных отличий в четырнадцатидневной поведенческой динамике между контрольной и экспериментальной группами. Это указывает на отсутствие непосредственного положительного или отрицательного воздействия гипомагнитной среды (с указанными в методике параметрами ослабления) на когнитивные процессы у крыс, по крайней мере, в четырнадцатидневный период в тесте Барнса. Следовательно, по совокупному результату трех экспериментальных серий можно с большой долей уверенности говорить о том, что феномен ускоренного формирования УРАИ в установке «Шелтер» у экспериментальных животных обусловлен именно фазой гиперальгезии,

которая развивается на первой неделе гипомагнитного воздействия.

#### выводы

1. Гипомагнитная среда вызывает перестройку болевой чувствительности крыс и в четырнадцатидневный отрезок времени приводит к формированию на первой неделе гиперальгезии, а на второй — гипоальгезии.

2. Гипомагнитная среда с указанными нами коэффициентами экранирования в течение четырнадцатидневного периода не изменяет поведение животных в лабиринте Барнса, однако наблюдается значимое улучшение показателя УРАИ в период гиперальгезии. Тем не менее итоговая эффективность формирования УРАИ не отличается от контрольной группы. Таким образом, гипомагнитная среда влияет не на когнитивные функции, а лишь на болевую чувствительность.

3. При планировании экспериментов по изучению влияния гипомагнитной среды на когнитивные функции необходимо учитывать феномен двухфазного ее воздействия на болевую чувствительность, т.е. по возможности не применять поведенческие тесты, где оценка когнитивных функций зависит от болевых стимулов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена на базе ЦКП «Экспериментальная физиология и биофизика» Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Коллектив авторов выражает особую благодарность д.ф.-м.н., профессору Б.М. Владимирскому, д.ф.-м.н., профессору В.Н. Бержанскому и инженеру первой категории С.Д. Ляшко.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках инициативной части государственного задания Минобрнауки России в сфере научной деятельности № 6.5452.2017/8.9 (тема «Временная организация физиологических систем человека и животных: феноменология и механизмы генерации и регуляции микро- и мезоритмов»).

#### 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

- Н. А. Темурьянц, А. С. Костюк и К. Н. Туманянц, Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова 99 (11), 1333 (2013).
- Т. А. Замощина, Н. А. Кривова, М. Ю. Ходанович и др., Авиакосмическая и экологическая медицина 46 (1), 17 (2012).
- Н. А. Кривова, К. А. Труханов, Т. А. Замощина и др., Авиакосмическая и экологическая медицина 42 (6), 30 (2008).
- 4. М. Ю. Ходанович, Вестн. Томского гос. ун-та. Биология **1** (21), 146 (2013).
- 5. К. Н. Туманянц, Е. Н. Чуян, Д. Р. Хусаинов и др., Междунар. журн. прикладных и фундаментальных исследований **1**, 199 (2016).
- А. С. Костюк, Н. С. Ярмолюк, К. Н. Туманянц и др., Ученые записки Крымского федерального унта имени В.И. Вернадского 26 (65), 75 (2013).
- C. Del Seppia, S. Ghione, P. Luschi, et al., Neurosci. Biobehav. Rev. **31**, 619 (2007).
- Т. А. Замощина, Е. В. Гуль, А. Е. Зеленская и др., Вестн. Томского гос. ун-та. Биология 1 (21), 146 (2013).
- 9. В. Н. Бинги, В. А. Миляев, Р. М. Саримов и др., Биомедицинские технологии и радиоэлектроника **8**, 48 (2006).
- 10. В. Н. Бинги, Р. М. Саримов и В. А. Миляев, Биофизика **53** (5), 856 (2008).
- Burger, M. Lucova, R. E. Moritz, et al., J. Roy. Soc. Interface 7, 1275 (2010).
- B. Zhanga, H. Lu, W. Xi, et al., Neurosci. Lett. 371, 190 (2004).
- 13. W. Xuebin, L. Guang-Zhe, L. Junfeng, et al., Afr. J. Agricult. Res. 7 (43), 5827 (2012).
- 14. А. С. Штемберг, В. С. Кохан, В. С. Кудрин и др., Нейрохимия **32** (1), 78 (2015).
- Я. Буреш, О. Бурешова и Д. П. Хьюстон, Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения, под ред. А.С. Батуева (Высшая школа, М., 1991).
- C. A. Barnes, J. Comp. Physiol. Psychol. 93 (1), 74 (1979).
- 17. A. Attar, et al., PloS One 8 (11), 80355 (2013).
- 18. Приказ № 742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».
- Е. В. Гуль и А. В. Микрюкова, в сб. Нейронаука для медицины и психологии: материалы 8 международного Междисциплинарного конгресса (Судак, 2011), с. 476.
- М. Ю. Ходанович, Н. А. Кривова, Е. В. Гуль и др., Вестн. Томского гос. ун-та. Биология 348, 155 (2011).

## The Peculiar Features of Cognitive Processes in Rats Exposed to the Hypomagnetic Field by Moderate Magnetic Shielding

## D.R. Khusainov\*, I.I. Koreniyuk\*, V.I. Shakhmatova\*\*, K.N. Tumanyants\*, N.S. Tribrat\*, E.D. Khorolskaya\*\*\*, A.V. Chajka\*, and I.A. Borzova\*

\*Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky, prosp. Vernadskogo 4, Simferopol, 295007 Russia

\*\*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, ul. Karla Marksa 76, Kazan, 420012 Russia

\*\*\*Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

Our research focus was the study of the dynamics of the formation of conditioned responses in rats exposed to fourteen-day moderate magnetic shielding and placed into the "Shelter" setup when conducting Barnes maze task. It was found that the acquisition rate of conditional active avoidance response was faster in rats exposed to magnetic shielding conditions than that in native animals. The direct accelerating effect of a moderate geomagnetic environment on the acquisition of conditional active avoidance response is thought to be extremely unlikely and the observed effect seems to be due to the well-known biorhythmological changes in pain sensitivity in hypomagnetic conditions under which hyperalgesia develops during the first week, it is an additional motivation for the formation of conditional active avoidance response in the "Shelter" setup. A two-phase change in pain sensitivity of male rats for a fourteen-day period is shown in the "Electrostimulation" setup: hyperalgesia develops during the first week and hypoalgesia is induced during the second week. When conducting Barnes maze task, there were no differences between groups of control animals and experimental animals in recorded behavioral indices in hypomagnetic conditions within a fourteen-day period. Therefore, the accelerated formation of conditional active avoidance response in rats exposed to hypomagnetic conditions is most likely due to a significant increase in pain sensitivity during the first week of the experiment.

Keywords: geomagnetic environment, learning and memory, «Shelter» setup

ДИСКУССИИ=

УДК 577.3

# МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ С УЧЕТОМ НЕСКОМПЕНСИРОВАННОГО НЕЙТРОНА В ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЯХ

© 2020 г. А.А. Елкина<sup>\*, \*\*</sup>, Е.Н. Тумаев<sup>\*\*</sup>, А.А. Басов<sup>\*\*, \*\*\*</sup>, А.В. Моисеев<sup>\*\*\*\*</sup>, В.В. Малышко<sup>\*, \*\*\*</sup>, Е.В. Барышева<sup>\*\*\*</sup>, А.В. Чуркина<sup>\*\*</sup>, С.С. Джимак<sup>\*, \*\*</sup>

\*Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41 \*\*Кубанский государственный университет, Краснодар, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149 \*\*\*Кубанский государственный медицинский университет, 350063, Краснодар, ул. Седина, 4 \*\*\*\*Кубанский государственный аграрный университет, 350004, Краснодар, ул. Калинина, 13

> *E-mail: jimack@mail.ru* Поступила в редакцию 10.10.2019 г. После доработки 29.06.2020 г. Принята к публикации 02.07.2020 г.

Изучены физические закономерности, обеспечивающие фракционирование изотопов, которые приводят к накоплению определенных изотопных форм в межклеточном и внутриклеточном пространстве на различных уровнях организма. Рассмотрена новая гипотеза фракционирования стабильных изотопов в биологических объектах посредством реализации нейтронного эффекта. Отмечена следующая особенность: весьма вероятно, что развитие изотопного шока у живых существ наблюдается в основном при наличии ковалентных связей между атомами, имеющих нескомпенсированный нейтрон. Возможное объяснение подобного феномена может быть связано с изменением физических параметров следующих явлений: взаимодействия магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами атомных ядер и взаимодействия магнитных моментов атомных ядер, приводящие к изменению расстояния между атомными ядрами.

Ключевые слова: фракционирование изотопов, изотопные эффекты в организме, нейтрон, гипотеза резонанса.

DOI: 10.31857/S0006302920050221

Понимание механизмов возникновения изотопных эффектов представляет интерес для изучения особенностей физиологических процессов в растениях и животных в зависимости от их географического происхождения и места обитания [1–3].

Однако, несмотря на многочисленные экспериментальные данные о различном соотношении легких и тяжелых изотопов биогенных элементов в биообъектах в зависимости от среды обитания [4, 5], нерешенным в отношении обмена стабильных нерадиоактивных изотопов (С, О, Н и других) остается вопрос, посвященный объяснению возможных механизмов их полиизотопного воздействия. Решение данной задачи необходимо для прогнозирования конечных биоэффектов в организме, при естественных или искусственно создаваемых колебаниях изотопного состава, в том числе при создании различных способов полиизотопной коррекции метаболических нарушений [6, 7].

В связи с этим целенаправленное изменение соотношения тяжелых и легких изотопов во

внутренних средах и органах может обеспечить возможность превентивного повышения адаптационного потенциала организма за счет модификации интенсивности обменных процессов и структурных перестроек на клеточном уровне [8]. Данный эффект может быть объяснен ожидаемым положительным биологическим воздействием на организм путем уменьшения концентрации тяжелых изотопов, обладающих выраженными кинетическими изотопными эффектами [9].

Несомненно, крупным открытием является доказательство наличия парамагнитных изотопных эффектов у некоторых металлов, принимающих участие в биокатализе [10, 11]. В данных работах прежде всего показано изменение активности ферментов, регулирующих энергообмен и передачу генетической информации в клетках в зависимости от изотопного состава среды [12, 13].

Целью настоящего исследования явилось обоснование возможных закономерностей формирования биофизических и биохимических эффектов при полиизотопном взаимодействии макро- и микроэлементов в организме.

Известно, что термодинамическая неравноценность изотопных соединений может приводить к неравномерному распределению изотопов водорода. Это может наблюдаться, например, при достижении равновесия в результате реакций изотопного D/H-обмена между клетками и приводить к преимущественному накоплению одной из изотопных форм в межклеточном или внутриклеточном пространствах. Реакции изотопного обмена в биологических системах могут сопровождаться изменением не только термодинамических (удельный заряд ионов), но прежде всего кинетических (коэффициент диффузии, скорость протекания биохимических реакций) показателей на молекулярном уровне.

Известен межмолекулярный или изотопный эффект, обусловленный более устойчивым взаимодействием дейтерированной сольватирующей оболочки и непосредственно биомолекулы (белок, ДНК и др.) [14]. Данный изотопный эффект сопровождается снижением вовлеченности биомолекулы в биохимические реакции в связи с замедлением десольватации отдельных регулирующих участков молекул при переходе их в функционально активное состояние.

При этом необходимо учитывать, что в живых организмах наблюдается суммирование межмолекулярных и внутримолекулярных кинетических изотопных эффектов. Это обусловлено сложностью организации высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот), которые обладают высокой способностью к сольватации и, следовательно, к изотопному обмену водорода между диссоциирующими группами в макромолекуле и ее гидратационной оболочкой. Такие изменения приводят не только к модификации энергетического взаимодействия ферментов с субстратами (межмолекулярный эффект), но и способны сопровождаться различной скоростью внутримолекулярных конформационных перестроек. Например, вышеописанные вариации в комплексах фермент-субстрат или фермент-кофактор (фермент-кофермент) могут привести к уменьшению времени отдельных этапов биокаталитических превращений или ускорить восстановление фермента в активную форму по завершении отдельного каталитического цикла, повышая таким образом активность биохимических процессов [15, 16].

Наглядным примером изучения вышеуказанного влияния скорости биохимических процессов при различных соотношениях легких и тяжелых изотопов биогенных элементов на функционирование органоидов и субклеточных структур является оценка интенсивности энергетического обмена в митохондриях, позволяющая характеризовать результирующий эффект воздействия изотопных флуктуаций на метаболизм [17–19]. При этом замена дейтерия на протий приводит, по данным ряда исследований, к ускорению переноса протонов в митохондрии и, следовательно, к усилению продукции отдельных субстратов, обеспечивая, в том числе, и более высокий энергообмен. Данное явление повышает резистентность клетки к неблагоприятному внешнему или внутреннему воздействию (например, к гипоксии, интоксикации и т.п.).

Влияние изотопного обмена на каталитические комплексы в некоторых органоидах (митохондриях, лизосомах) может не только изменять интенсивность метаболических процессов на клеточном уровне, но и существенно модифицировать резистентность и/или реактивность биологической ткани в целом.

Например, клетка, находящаяся в различном функциональном состоянии, характеризуется особенным уровнем энергетических и биосинтетических потребностей [20, 21], которые, в свою очередь, могут меняться в определенном диапазоне, модифицируя цепочки метаболических превращений с выраженной конкуренцией за пируватный фонд. Данная зависимость сопровождается изменением соотношений частей пируватного фонда, избирательно извлекающихся для энергетики клетки и синтеза метаболитов, требующихся в данной ситуации, обуславливая селекцию изотопов [22].

В отдельных работах описано разнонаправленное воздействие реакций изотопного обмена на функциональную активность биологических систем, их нативные свойства и структурную организацию [23–28]. Прежде всего это касается влияния пониженных (по отношению к природному уровню) концентраций тяжелых нерадиоактивных изотопов на живые системы [29].

Последнее нередко связано с традиционным объяснением кинетических изотопных эффектов, которое базируется на представлении об увеличении их выраженности, пропорциональном концентрации тяжелых изотопов. При этом нередко не учитываются изотопные эффекты, связанные с целенаправленным понижением концентрации тяжелых нерадиоактивных изотопов по отношению к их природному содержанию, и изотопные эффекты, возникающие в сложноорганизованных живых системах при формировании различных изотопных градиентов [30].

Важным в такого рода научной работе представляется выбор объекта исследования, который бы позволял должным образом оценить всю многогранность влияния реакций изотопного обмена на биологические системы. В связи с чем в научной литературе можно встретить исследования различных одноклеточных и многоклеточных организмов [31–35], что, однако, нередко представлено в дискретном виде, без учета генетической

гетерогенности особей и не подвергалось метаанализу.

При сравнительном анализе ряда данных экспериментальных исследований была выявлена следующая закономерность (таблица): возникновение изотопного шока характерно в тех случаях, когда высока вероятность образования связей с нечетным количеством нейтронов (нескомпенсированным нейтроном) или при наличии в системе химического элемента (обычно металла), имеющего нескомпенсированный нейтрон/нейтроны.

При изучении вероятности возникновения данной закономерности, называемой далее нейтронным эффектом, было установлено, что возможным механизмом его реализации может являться изменение спина ядер атомов в зависимости от количества нейтронов. Это, в свою очередь, способно влиять и на реакционную способность химической связи, образуемой изотопами, имеющими суммарную нескомпенсированность по нейтронам.

Возможное объяснение подобного феномена с нескомпенсированным нейтроном может быть связано с изменением физических параметров следующих явлений: взаимодействия магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами атомных ядер; взаимодействия магнитных моментов атомных ядер, приводящих к изменению расстояния между ними; влияние размера ядра на энергию валентного электрона, в том числе вследствие изменения расстояния между атомами.

Принципиально объяснить механизм возникновения нейтронного эффекта можно нарушением баланса по массе в системах с равновесным зарядом.

Равновесие по массе в атоме достигается как за счет взаимодействия протонов и нейтронов, так и нейтронов попарно между собой:

a.m. 
$$[p^+ + n^0] \approx 1 : 1,$$
  
a.m.  $[n_i^0 + n_{i+1}^0] = 1 : 1.$ 

При этом в триадах «протон, электрон и нейтрон» наблюдается равновесие по заряду и по массе. Более сильное взаимодействие заряженных частиц (протон и электрон) по сравнению с массовыми эффектами объясняет отсутствие дисбаланса по массе в ядрах атомов с меньшим количеством нейтронов, чем протонов. В то же время наличие нескомпенсированного по массе нейтрона может приводить к возникновению массзависимого дисбаланса в системах с равновесным зарядом, что характерно для некоторых тяжелых изотопов или связей, ими образуемыми:

 $[p^+ + e^- + n_i^0] \cdot n_{i+1}^0 = 0$  (равновесный заряд), но ≠ 1 : 1 (отсутствие равновесия по массе).

Влияние нескомпенсированного по массе нейтрона реализуется не на все ядро одномоментно, а стохастически по времени на каждую триаду (протон-электрон-нейтрон), что приводит к возникновению эффекта масс (пропорционального минимум половине равновесного протоннейтронного взаимодействия). Вышеописанный эффект опосредованно приводит к изменению силы взаимодействия заряженных частиц (протон-электрон). Последнее находит подтверждение в том, что именно водородные связи чрезвычайно чувствительны к распределению электронной плотности по всей молекуле в целом [36], поэтому локальное ослабление и усиление протон-электронного взаимодействия может приводить к возникновению эффекта протонного туннелирования [45].

Кроме того, вероятно, что в системе с тремя нейтронами описанный эффект также реализуется ввиду невозможности парных нейтронов компенсировать масс-флуктуации нескомпенсированного нейтрона в объеме атома. В изотопах же с преобладанием нейтронов над протонами на пять и более (семь, девять и т.д.) возможно возникновение частичного равновесия масс за счет определенного распределения в пространстве этих нейтронов, что может снижать выраженность нейтронного эффекта.

Другим вероятным механизмом, способным увеличить скорость ферментативной реакции во много раз, может являться способность нескомпенсированного по массе нейтрона инициировать квантовое туннелирование. Данное явление возможно за счет вовлечения одной из описанных выше атомных триад в этот процесс с последующим высвобождением энергии, достаточной для образования новой химической связи. Это повышает вероятность резкого ускорения образования субстратов, необходимых для роста клеточных структур и развития организма в целом.

Наличие подобного эффекта объясняется феноменом возникновения «изотопного шока» [46] в живых системах при наличии нерадиоактивных изотопов определенных макро- и микроэлементов, а также экспоненциального усиления этих проявлений при комбинировании различных фракций изотопов в биологических объектах.

Необходимо учитывать, что в живых системах в составе органических молекул реализация нейтронного эффекта будет происходить не на чистых (изолированных) изотопах, а в составе групп атомов, связанных ковалентными и нековалентными взаимодействиями. Поэтому расчет нейтронного эффекта должен осуществляться как минимум на атомную пару, имеющую перекрывание электронных облаков. В связи с этим, не будет выявляться линейного нарастания нейтронного эффекта при линейном утяжелении изотопов, образующих химическую связь. На-

Α	Б	В	Г	Д
(изотопный резонанс	(изотопный	(изотопный резонанс	(изотопный резонанс	(изотопный резонанс
отсутствует)	резонанс	наблюдается)	отсутствует)	наблюдается)
$\frac{120}{1100}$ 111 (m. 7m - 1	OTCYTCTBYET) $\frac{12}{2}$ D: 7n - 7n - 0			
-C - H: on - /p = -1	-C - D: /n - /p = 0			
Спин: $0^{+} + \frac{1}{2}^{+} = \frac{1}{2}^{+}$	Спин: 0 + 1 = 1 $\frac{13}{13}$ 11 $\frac{37}{2}$ 7n - 0	13C D [16], $9n$ $7n = 1$		
	$-H^{(-)}$ , $h^{-}/p = 0$	$C = D^{(-1)} \cdot 8n - p = 1$		
$[4_{N}]$ $[11, 7_{n}]$ $[0, -1]$	Спин: $\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$	$C\Pi H$ : $\frac{1}{2} + 1 = \frac{1}{2}$		
N = H. $H = 0p = -1$	$N = D$ . $\delta H = \delta p = 0$			
$CHUH: 1 + \frac{1}{2} = \frac{1}{2}$	$\frac{15}{15} \frac{1}{14} \frac{137}{12} \frac{9}{15} \frac{9}{15$	$15_{\rm N}$ D: $0n = 2n - 1$		
	$N = H^{-1} \cdot . \delta H = \delta p = 0$	N-D. 9II-op - I		
$\frac{160}{14}$ $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{8}$	$170^{1}$ H· 0n 0n = 0	$\frac{180 + 11}{180 + 11} = \frac{172}{110} = \frac{172}{100} = \frac{111}{100} = \frac{1111}{100} = \frac{11111}{100} = \frac{111111}{100} = \frac{111111}{100} = \frac{1111111}{100} = 11111111111111111111111111111111111$		
$0 - H \cdot \delta H - 9p1$	0 = H. 9H = 9p = 0	$O = H^{+}$ , $IOI = 9p = 1$		
CIIИН: 0 $+72 -72$	$\frac{16}{10}$ D: $9n$ $9n = 0$	170 D: 10n 9n = 1	$180 D \cdot 11n 9n - 2$	
	O-D. 9II-9p = 0	0-D. $101-9p-1$	O-D. IIII-9p-2	
32 <sup>1</sup> H: 16n 17n - 1	$\frac{1}{32}$ D: 17p = 0	$\frac{348}{348} \frac{1}{14} + \frac{18n}{17n} \frac{17n}{17n} = 1$	34S D: 10n 17n = 2	
S- H. $10H = 1/p = -1$	S=D. $1/II=1/P=0$	S = H. 18H = 1/P = 1	S=D. $19H=1/P=2$	
$CIIIIH: 0 + \frac{1}{2} = \frac{1}{2}$	12C $12C$ $12n$ $12n = 0$	12C $13C$ $13n$ $12n = 1$	CHUH: 0 + 1 = 1	
	$C = C \cdot 1211 - 12p = 0$	C = C. 1511 = 12p = 1		
	$C_{IIIIH} = 0 + 0 = 0$ $1^{12}C_{I} = 1^{14}N + 13n = 13n = 0$	$\frac{12}{12} C_{15} N \cdot 14n  13n = 1$		
	C = 10.1311 - 13p - 0	C = 10.1411 - 13p = 1		
	CHUH. 0 + 1 - 1	CHUH. 0 + 72 - 72	$13_{C}$ 15 <sub>N</sub> [37, 40, 41].	
		$^{13}C^{-14}N$ : $14n - 13p = 1$	15n - 13n = 2	
		Спин: $\frac{1}{2} + 1^{+} = \frac{1}{2}^{+}$	Спин: ½ <sup>-</sup> + ½ <sup>-</sup> =1 <sup></sup>	
	$^{12}C^{-16}O: 14n - 14p = 0$	${}^{12}\text{C}-{}^{17}\text{O}: 15\text{n}-14\text{p}=1$	$^{12}C^{-18}O: 16n^{-14}p = 2$	
	Спин: $0^+ + 0^+ = 0^{++}$	Спин: $0^+ + 5/2^+ = 5/2^{++}$	Спин: $0^+ + 0^+ = 0^{++}$	
		$^{13}C^{-16}O: 15n^{-14}p = 1$	$^{13}C-^{17}O: 16n-14p = 2$	$^{13}C-^{18}O^{[37]}$ ; $17n-14p=3$
		Спин: $\frac{1}{2}^{-} + 0^{+} = \frac{1}{2}^{-+}$	Спин: $\frac{1}{2}^{-} + \frac{5}{2}^{+} = 3^{-+}$	Спин: $\frac{1}{2} + 0^+ = \frac{1}{2}^+$
	$^{14}N-^{16}O: 15n-15p = 0$	$^{14}N^{-17}O: 16n^{-15}p = 1$	$^{14}N^{-18}O: 17n^{-15}p = 2$	
	Спин: $1^+ + 0^+ = 1^{++}$	Спин: $1^+ + 5/2^+ = 3\frac{1}{2}^{++}$	Спин: $1^+ + 0^+ = 1^{++}$	
		$^{15}N^{-16}O^{[39]}$ : 16n-15p =1	$^{15}N^{-17}O: 17n^{-15}p = 2$	$^{15}N-^{18}O^{[37]}$ ; 18n-15p =3
		Спин: $\frac{1}{2}^{-} + 0^{+} = \frac{1}{2}^{-+}$	Спин: $\frac{1}{2}^{-} + \frac{5}{2}^{+} = 3^{-+}$	Спин: $\frac{1}{2}^{-} + 0^{+} = \frac{1}{2}^{-+}$
	${}^{40}Ca^{[11]}: 20n-20p = 0$			$^{43}Ca^{[11]}: 23n-20p = 3$
	Спин: 0 <sup>+</sup>			Спин: 7/2-
	$^{24}Mg^{[42]}$ : $12n-12p = 0$	$^{25}Mg^{[42]}$ : 13n-12p = 1	$^{26}Mg^{[42]}$ : 14n-12p = 2	0
	Спин: 0 <sup>+</sup>	Спин: 5/2 <sup>+</sup>	Спин: 0 <sup>+</sup>	
		0,2		$^{63}$ Cu $^{18}$ O: 44n $^{-37}$ p = 7
				Спин: $3/2^- + 0^+ = 3/2^{-+}$
				$^{63}$ Cu: 34n-29p = 5
				Спин: 3/2-
				$^{65}$ Cu: 36n-29p = 7
				Спин: 3/2-
			$^{64}Zn^{[43]}$ : 34n-30p = 4	$^{67}Zn^{[44]}: 37n-30p = 7$
			Спин: 0 <sup>+</sup>	Спин: 5/2 <sup>-</sup>
			${}^{66}Zn^{[43]}: 36n-30p = 6$	
			Спин: 0 <sup>+</sup>	
			$^{238}U^{[38]}$ : 146n-92p = 54	$^{235}U^{[38]}$ : 143n-92p = 51
			Спин: 0 <sup>+</sup>	Спин: 7/2

Закономерность возникновения изотопного резонанса в биологических объектах путем вероятной реализации нейтронного эффекта

Примечание: D – дейтерий, x – целое число, спин – суммарный спин, n – нейтрон, p – протон. A: n – p = –1; Б: n – p = 0; B: n – p = 1; Г: n – p = 2 или n – p = 2x; Д: n – p = 2x + 1. пример, для связи <sup>13</sup>С-Н нейтронный эффект равен нулю и вероятность возникновения изотопного резонанса отсутствует [37, 47] (гипотеза изотопного резонанса предполагает, что зависимость скорости реакции от степени обогащения изотопами не является монотонной, напротив, при некоторых «резонансных» изотопных соединениях скорость реакции возрастает, а при «нерезонансных» соединениях те же реакции протекают без изменения), тогда как для связи <sup>13</sup>С–D нейтрон-ный эффект равен единице и высока вероятность возникновения изотопного резонанса Таким же образом, для связи <sup>18</sup>О-Н нейтронный эффект равен единице, в результате ожидается изотопный резонанс, тогда как для связи <sup>18</sup>О-D нейтронный эффект равен двум и, следовательно, изотопный резонанс не ожидается [48]. Этим можно объяснить неоднозначные результаты многих авторов при обогащении биологических систем тяжелыми изотопами и их смесями [49]. Подтверждением этого явления на практике можно, например, считать обогащение раковых клеток <sup>13</sup>С и D, когда ожидаемо возникновение изотопной резонансной пары (для связи <sup>13</sup>С-D нейтронный эффект равен единице). Подобное фракционирование  ${}^{12}C/{}^{13}C$  и  ${}^{1}H/{}^{2}H$  с накоплением тяжелых атомов сопровождается появлением дополнительного энергетического и метаболического преимущества у онкоцитов перед обычными клетками с естественным изотопным составом (для связи <sup>12</sup>С-Н нейтронный эффект при –1 отсутствует).

Кроме этого, увеличение энергии связи и частоты колебаний ядра при уменьшении межъядерного расстояния может происходить с различной скоростью и интенсивностью в связях, образованных изотопами с парными нейтронами (12С-D, 18О-D) и изотопами с нескомпенсированным нейтроном (<sup>13</sup>С-D) [50]. При этом с течением времени наблюдается увеличение в различиях начальной энергии и энергии перед туннелированием. Ограничение свободы в ковалентно-связанных резонансных парах атомов (имеющих нескомпенсированный нейтрон) приводит к возрастанию внутренней атомной энергии, обеспечивающей разрыв связи без необходимости достижения энергии активации. Все это, вероятно, объясняет наличие нейтронного эффекта как одного из механизмов реализации туннельного эффекта при ферментативном катализе [10].

На основании всего вышеизложенного можно заключить, что фракционирование изотопов в биологических системах является лишь предпосылкой для возникновения изотопного резонанса, который наблюдается только в том случае, когда реализуется нейтронный эффект, связанный с особенностями инкорпорирования тяжелых изотопов в биологические молекулы и, прежде всего, с их взаимодействием с другими легкими и тяжелыми изотопами. Поэтому при чрезмерном обогащении среды только тяжелыми изотопами нейтронный эффект, а следовательно, и изотопный резонанс могут отсутствовать, например, в парах <sup>18</sup>O–D, <sup>34</sup>S–D, <sup>13</sup>C–<sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C–<sup>18</sup>O, <sup>13</sup>C–<sup>17</sup>O, <sup>14</sup>N–<sup>18</sup>O, <sup>15</sup>N–<sup>17</sup>O.

Изменение энергии химической связи обусловлено несколькими факторами, рассмотренными далее. Равновесное положение электрона определяет химическую активность соединения, которую можно оценить, вычислив энергию взаимодействия электрона с атомными остовами. Активность валентной связи определяется не только взаимным расположением атомов 1 и 2, но и взаимодействием атомных остовов с парой валентных электронов. Чем ниже энергия, тем менее активна химическая связь, поэтому тем больше внешняя энергия требуется для активации ковалентной химической связи. На расстояние между атомами и энергию химической связи влияет несколько факторов:

1. Кулоновское взаимодействие валентных электронов слабо зависит от изотопного состава химических элементов, поэтому в настоящей статье поправки, связанные с энергией кулоновского взаимодействия валентных электронов, не рассматриваются;

2. Взаимодействие магнитных моментов валентных электронов также слабо зависит от изотопного состава соединения, поэтому в настоящей статье не рассматривается;

3. Взаимодействие магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами ядер атомов, которое в значительной степени определяется изотопным составом, поскольку для разных изотопов одного и того же химического элемента магнитные моменты ядер атомов могут отличаться весьма значительно. Магнитный момент ядра атома связан с его спином гиромагнитным отношением, поэтому магнитные моменты ядер атомов пропорциональны их спинам.

4. Взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, приводящее к изменению расстояния между ними, учитывается нами в этой работе.

5. Эффект влияния размеров ядра на энергию валентного электрона. У разных изотопов одного и того же химического элемента разное количество нейтронов, т.е. разный размер ядра атома, что приводит к искажению кулоновского потенциала ядер атомов и как следствие к изменению энергии электрона. Этот эффект также нами будет учитываться.

6. Еще одним эффектом, вызывающим изменение расстояния между атомами, являются их тепловые колебания. Предполагаем, что колеба-

ния происходят вблизи положения равновесия по гармоническому закону с частотой ω, определяемой параметрами потенциальной ямы, в которой находятся атомы, т.е. в конечном счете параметрами межатомных взаимодействий. Следовательно, амплитуда тепловых колебаний атомов будет зависеть только от их массы и температуры.

В заключение необходимо отметить, что интенсивность проявления изотопных эффектов может изменяться в зависимости от их концентрации. Так, при низких концентрациях потенциально резонансных изотопов (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O и другие) преимущественно реализуются их термодинамические и кинетические эффекты (что характеризуется относительно невысокими различиями в скоростях фракционирования). Тогда как при высоких концентрациях этих же изотопов вероятность образования резонансных пар с дальнейшим возникновением изотопного нейтронного эффекта, позволяющего дополнительно реализовывать туннелирование, приводит к появлению аномальных (или парадоксальных) изотопных эффектов в одних и тех же биологических реакциях. Кроме того, важно подчеркнуть, что в живых системах реализация явления, называемого «изотопный шок», будет реализовываться также путем формирования изотопного градиента, стимулирующего работу системы неспецифической защиты, которая приводит K накоплению биологически активных протективных факторов в организме. Все это вкупе с описанными выше термодинамическими и кинетическими эффектами, а также туннелированием нейтронов является той движущей силой, которая приводит к наблюдаемому в природе выраженному разнообразию изотопного состава в биологических объектах. Описанное разнообразие зависит не только от изотопного состава среды, но и от функциональной активности самого организма, а также особенностей взаимодействия различных изотопов между собой при фракционировании их на разных морфофункциональных уровнях в самом биообъекте.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке за счет государственного задания ЮНЦ РАН (№АААА-А19-119040390083-6) и Российского фонда фундаментальных исследований, проект №19-44-230026.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

БИОФИЗИКА том 65 № 5 2020

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. E. J. Oerter and G. Bowen, Ecohydrology **10** (4), e1841 (2017).
- 2. S. P. Good, D. Noone, N. Kurita, et al., Geophys. Research Lett. **42** (12), 5042 (2015).
- 3. W. D. Walter, C. M. Kurle, and J. B. Hopkins, Isotopes in Environmental and Health Studies **50** (3), 287 (2014).
- 4. K. A. Hobson and A. L. Bond, Marine Ecol. Progr. Series **461**, 233 (2012).
- M. I. Bykov, S. S. Dzhimak, A. A. Basov, et al., Voprosy Pitaniia 84 (4), 89 (2015).
- 6. E. M. Galimov, Geochem. Int. 52 (13), 1190 (2014).
- A. A. Ivlev, Yu. A. Knyazev, and M. F. Logachev, Biofizika 41 (2), 508 (1996).
- S. S. Dzhimak, A. A. Basov, A. A. Elkina, et al., Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod. 13 (2), e69557 (2018). DOI: 10.5812/jjnpp.69557
- 9. V. I. Lobyshev and L. P. Kalinichenko, *Isotopic Effects* of D<sub>2</sub>O in Biological Systems (Nauka, Moscow, 1978).
- 10. A. L. Buchachenko, D. A. Kouznetsov, and N. N. Breslavskaya, Chem. Rev. **112** (4), 2042 (2012).
- 11. A. L. Buchachenko, D. A. Kuznetsov, N. N. Breslavskaya, et al., Chem. Phys. Lett. **505**, 130 (2011).
- V. K. Koltover, R. D. Labyntseva, S. O. Kosterin, et al., Biophysics 61 (2), 200 (2016).
- 13. V. K. Koltover, L. V. Avdeeva, E. A. Kudryashova, et al., Dokl. Biochem. Biophys. **442** (1), 12 (2012).
- 14. A. L. Buchachenko and E. M. Pliss, Rus. Chem. Rev. **85** (6), 557 (2016).
- 15. M. S. Shchepinov, Rejuvenation Res. 10 (1), 47 (2007).
- X. Li and M. P. Snyder, npj Aging and Mechanisms of Disease 2, e16004 (2016). DOI: 10.1038/npjamd.2016.4
- 17. R. Darad and A. S. Aiyar, J. Biosci. 4 (2), 159 (1982).
- O. E. Kolesova and I. A. Pomytkin, Bul. Exp. Biol. Med. 142 (5), 570 (2006).
- A. A. Basov, A. A. Elkina, A. A. Samkov, et al., Iranian Biomed. J. 23 (2), 129 (2019). DOI: 10.29252/.23.2.129
- N. V. Yaglova, D. A. Tsomartova, S. S. Obernikhin, et al., Biol. Bul. 46 (1), 74 (2019). DOI: 10.1134/S1062359018060122
- S. A. Shahmardanova, O. N. Gulevskaya, P. A. Galenko-Yaroshevsky, et al., Res. Result: Pharmacol. and Clin. Pharmacol. 2 (4), 95 (2016).
- 22. L. G. Boros, D. P. D'Agostino, H. E. Katz, et al., Med. Hypotheses 87, 69 (2016).
- 23. С. В. Козин, А. А. Кравцов, А. А. Елкина и др., Биофизика **64** (2), 362 (2019).
- 24. A Zlatska, R. G. Vasyliev, I. M. Gordiienko, et al., Sci. Rep. 10, 5217 (2020).
- 25. T. Halenova, I. Zlatskiy, A. Syroeshkin, et al., Molecules **25** (1), 23 (2020). DOI: 10.3390/molecules25010023
- U. G. Letuta and V. L. Berdinskiy, Bioelectromagnetics 38 (8), 581 (2017).

- 27. G. Somlyai, I. Somlyai, I. Fórizs, et al., Molecules 25, 1376 (2020).
- 28. M. S. Shchepinov, BioEssays 29, 1247 (2007). DOI: 10.1002/bies.20681
- 29. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, et al., Nutrients 11 (8), 1903 (2019). DOI:10.3390/nu11081903
- A. A. Basov, S. V. Kozin, I. M. Bikov, et al., Biol. Bul. 46 (6), 531 (2019). DOI: 10.1134/S1062359019060049
- A. M. L. Karlson, M. Reutgard, A. Garbaras, et al., Royal Soc. Open Sci. 5 (2), e171398 (2018).
- 32. C. Ek, A. Garbaras, Z. Yu, et al., PLoS One 14 (5), e0211304, (2019).
- 33. G. Somlyai, FEBS Lett. 317 (1,2), 1 (1993).
- 34. A. A. Kravtsov, S. V. Kozin, E. R. Vasilevskaya, et al., J. Pharmacy and Nutrition Sci. 8 (2), 42 (2018).
- 35. A. A. Samkov, S. S. Dzhimak, M. G. Barishev, et al., Biophysics **60** (1), 107 (2015).
- L. Sobczyk, M. Obrzud, and A. Filarowski, Molecules 18 (4), 4467 (2013).
- X. Xie, R. A. Zubarev, Sci. Rep. 5, 9215 (2015). DOI: 10.1038/srep09215
- O. B. Lysenko, Y. N. Demikhov, N. A. Skul'skii, et al., Rus. J. Phys. Chem. B 8 (6), 870 (2014).

- 39. E. Andriukonis and E. Gorokhova, Sci. Rep. 7, e44181 (2017). DOI: 10.1038/srep44181
- 40. F. V. Crotty, R. P. Blackshaw, and P. J. Murray, Rapid Comm. Mass Spectrom. **25**, 1479 (2011).
- C. A. Dennis, M. A. MacNeil, J. Y. Rosati, et al., Rapid Comm. Mass Spectrom. 24, 3515 (2010). DOI:10.1002/rcm.4807.
- A. L. Buchachenko and D. A. Kouznetsov, Biophysics 53 (3), 219 (2008).
- 43. Д. М. Шайлина, Докл. РАН 479 (5), 585 (2018).
- 44. У. Г. Летута и В. Л. Бердинский, Изв. РАН. Сер. хим. (9), 1732 (2018).
- 45. Y. -B. Xin, Q. Hu, D. -H. Niu, et al., Acta Physica Sinica **66** (5), e056601 (2017).
- R. A. Zubarev, Genomics Proteomics Bioinformatics 9 (1-2), 15 (2011).
- D. B. Northrop, Phil.Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sci. 361 (1472), 1341 (2006).
- A. Basov, L. Fedulova, E. Vasilevskaya, et al., Molecules 24 (22), 4101 (2019). DOI: 10.3390/molecules24224101
- 49. R. A. Uphaus, et al., Biochim. Biophys. Acta (141), 625 (1967).
- 50. A. Sarsa, J. M. Alcaraz-Pelegrina, and C. Le Sech, J. Phys. Chem. B **119** (45), 14364 (2015).

## Mechanisms of Interaction between Non-Radioactive Isotopes and Biological Objects in the Presence of a Noncompensated Neutron in Chemical Bonds

A.A. Elkina<sup>\*,</sup> \*\*, E.N. Tumaev<sup>\*\*</sup>, A.A. Basov<sup>\*\*,</sup> \*\*\*, A.V. Moiseev<sup>\*\*\*\*</sup>, V.V. Malyshko<sup>\*,</sup> \*\*\*, E.V. Barisheva<sup>\*\*\*</sup>, A.V. Churkina<sup>\*\*</sup>, and S.S. Dzhimak<sup>\*\*\*</sup>

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

\*\*Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

\*\*\*Kuban State Medical University, ul. Sedina 4, Krasnodar, 350063 Russia

\*\*\*\*Kuban State Agrarian University, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350004 Russia

Physical processes which may give rise to isotope fractionation leading to the accumulation of particular isotopic forms in inter- and intracellular space with their effect on the different levels of organism were explored. A new hypothesis for heavy non-radioactive isotope fractionation in biological objects was discussed in terms of neutron effect realization. It was found that "isotopic shock" most probably develops in living organisms due to the presence of covalent bonds between atoms that contain noncompensated neuron. This phenomenon can be explained by the change in physical properties in the events such as interaction of the magnetic moments of valence electrons with the magnetic moments of the atomic nuclei; interaction of the magnetic moments of the atomic nuclei, which leads to a change in the distance between atomic nuclei.

Keywords: isotope fractionation, isotope effect in the organism, neutron, isotopic resonance hypothesis

## ВНИМАНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ

#### Замеченные опечатки

В вып. 3 тома 65 за 2020 год заголовок статьи В.А. Тронова и Е.И. Некрасовой следует читать как «Повреждение ДНК и p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины».