

ISSN 0006-3029

Том 68, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



# БИОФИЗИКА

[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 5, 2023

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

<i>In silico</i> исследование сольватационных эффектов в растворах биомолекул: возможности подхода, основанного на 3D-распределении атомной плотности растворителя	837
<i>С.Е. Кручинин, М.В. Федотова, Е.Е. Кислинская, Г.Н. Чуев</i>	
Оценка эффективности интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние фуллерена в комплексах с аминокислотами	850
<i>А.С. Бучельников, П.А. Соколов, Р.Р. Рамазанов</i>	
Состав и митогенная активность полисахарида из <i>Solanum tuberosum</i> L.	856
<i>Е.А. Генералов, Л.В. Яковенко</i>	
Действие электрохимически активированного водного раствора на растительные полисахариды: феноменология и спектрометрия	863
<i>А.Г. Погорелов, Л.Г. Ипатов, А.И. Панаит, М.А. Погорелова, А.А. Гулин, В.Н. Погорелова</i>	
Конформационные особенности бета-амилоидного пептида 25-35	871
<i>Г.А. Агаева, Г.З. Наджафова</i>	
Исследование с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния конформации флавинадениндинуклеотида – кофермента оксидазы D-аминокислот	878
<i>Ж.В. Бочкова, В. Лю, Н.А. Браже, А.А. Жгун, Г.В. Максимов</i>	
Анализ вторичной структуры линкерных белков хроматина HMGB1, H1 и их комплексов	885
<i>Е.В. Чихиржина, А.М. Поляничко</i>	
Особенности взаимодействия эндоинулиназы из <i>Aspergillus ficuum</i> с моно-, ди- и полисахаридами	892
<i>С.М. Макин, А.Н. Дубовицкая, Д.Ю. Богомолов, М.С. Кондратьев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов</i>	
Механизм действия низкочастотного электромагнитного поля на водные растворы биополимеров	900
<i>Е.Е. Текуцкая, Г.П. Ильченко, М.Г. Барышев</i>	
Уточнение позиций нуклеосом внутри отдельных генов с использованием методов молекулярного моделирования и данных MNASE-секвенирования	911
<i>В.А. Васильев, Д.М. Рябов, А.К. Шайтан, Г.А. Армеев</i>	
Поиск аномалий сигнала покрытия секвенирования, ассоциированных со структурными вариациями генома	920
<i>И.В. Бездворных, Н.А. Черкасов, А.А. Канапин, А.А. Самсонова</i>	

## БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Особенности адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов якутских сусликов в предгибернационный осенний период	926
<i>П.О. Теплова, Н.П. Комелина, К.И. Лизоркина, Н.М. Захарова</i>	
Исследование радиочувствительности и индукции адаптивного ответа в лимфоцитах периферической крови пациентов с синдромом вторичного иммунодефицита	932
<i>О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Т.А. Белякова, Н.С. Стрельникова</i>	
Влияние таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой и нарингенина на функциональную активность нейтрофилов	941
<i>В.С. Шубина, М. И. Кобякова, Ю.В. Шаталин</i>	
Влияние дисульфидсодержащего иммуномодулятора моликсана на транспорт Na <sup>+</sup> в эпителии кожи лягушки	949
<i>А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая</i>	

Клеточный ответ на воздействие ионизирующего излучения и света в присутствии фотосенсибилизатора <i>С.В. Акулиничев, С.И. Глухов, А.В. Ефременко, Д.А. Коконцев, Е.А. Кузнецова, В.В. Мартынова, А.В. Феофанов, И.А. Яковлев</i>	954
Параметры клеточного цикла и активность орнитиндекарбоксилазы в красном костном мозге гибернирующих сусликов <i>Urocitellus undulatus</i> <i>Г.Е. Аксёнова, О.С. Логвинович, В.Н. Афанасьев, К.И. Лизоркина</i>	964
Совместное действие мелатонина и диэтилдитиокарбамата на клетки нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300) <i>С.Н. Мякишева, Ю.Л. Бабурина, М.И. Кобякова, Р.Р. Крестинин, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина</i>	973
Сравнительная цитотоксическая активность лютеина и цисплатина в сочетании с липосомами по отношению к клеткам опухоли молочной железы, прошедшим воздействию радиотерапии <i>Р.А. Лафта, М.В. Шафаа, В.М. Дарвиш, М.С. Эль-Нагди</i>	982

## БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Низкоактивные формы целлюлозолитических микроорганизмов в археологических контекстах <i>Л.Н. Плеханова, С.Н. Удальцов, А.С. Сыроватко, Н.Н. Каширская</i>	999
Глубокая гипотермия инвертирует инотропный эффект изопротеренола в миокарде крысы <i>К.В. Самодурова, Ф.В. Тюрин, А.С. Аверин</i>	1008
Роль оксида азота и ионов кальция в эффектах сероводорода на сократительную активность тощей кишки крысы <i>Д.М. Сорокина, И.Ф. Шайдуллов, А.Р. Гиззатуллин, Ф.Г. Ситдииков, Г.Ф. Ситдикова</i>	1014
Минимальная модель зависимости напряжений в стенке церебрального сосуда от параметров гладкомышечной клетки <i>Н.Х. Шадрина</i>	1022
Протеостаз белка теплового шока HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период гибернации <i>Ю.В. Грицына, С.С. Попова, Г.З. Михайлова, Л.Г. Бобылёва, С.Н. Удальцов, О.С. Моренков, Н.М. Захарова, И.М. Вихлянцева</i>	1031
Моделирование критической частоты слияния мельканий в зрительной системе человека <i>С.И. Ляпунов, И.И. Шошина, И.С. Ляпунов</i>	1038
Сложная система мозга мыши – селекция на успешность решения когнитивного теста <i>И.И. Полетаева, О.В. Перепелкина, З.А. Зорина</i>	1046
Анализ развития трендов современной эпидемической ситуации и факторов их локальной дифференциации <i>А. Ю. Переварюха</i>	1057

## МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота при ВИЧ-инфекции <i>А.В. Пекшев, А.Б. Вагапов, Н.А. Шарипов, А.Ф. Ванин</i>	1074
Структурно-функциональная оценка состояния раны с применением СВЧ-диэлектрметрии и лазерной доплерометрии <i>А.К. Мартусевич, А.В. Суругегина, В.В. Назаров, А.С. Федотова</i>	1081

## ДИСКУССИИ

К вопросу об иллюзии полетов во сне. Механизм их возникновения <i>Г.Р. Иваницкий</i>	1088
---	------

# Contents

Vol. 68, No. 5, 2023

## Molecular Biophysics

<i>In silico</i> Study of Solvation Effects in Solutions of Biomolecules: Possibilities of an Approach Based on the 3D-Distribution of Solvent Atomic Density <i>S.E. Kruchinin, M.V. Fedotova, E.E. Kislinskaya, and G.N. Chuev</i>	837
Evaluation of the Efficiency of Intersystem Crossing to a Triplet State of Fullerene in Complexes with Amino Acids <i>A.S. Buchelnikov, P.A. Sokolov, and R.R. Ramasanoff</i>	850
Composition and Mitogenic Activity of Polysaccharide from <i>Solanum tuberosum</i> L. <i>E.A. Generalov and L.V. Yakovenko</i>	856
Impact of Electrochemically Activated Water Solution on Plant Polysaccharides: Phenomenology and Spectrophotometry <i>A.G. Pogorelov, L.G. Ipatova, A.I. Panait, M.A. Pogorelova, A.A. Gulin, and V.N. Pogorelova</i>	863
Conformational Particularities of Beta-Amyloid Peptide 25-35 <i>G.A. Agaeva and G.Z. Najafova</i>	871
A Raman Spectroscopic Investigation of Conformation of Flavin Adenine Dinucleotide, a CoEnzyme of D-Amino Acid Oxidase <i>J. Bochkova, W. Liu, N.A. Brazhe, A.A. Zhgun, and G.V. Maksimov</i>	878
Analysis of the Secondary Structure of Chromatin Linker Proteins HMGB1, H1 and Their Complexes <i>E.V. Chikhirzhina and A.M. Polyanchko</i>	885
The Specificity of Interactions between Endoinulinase from <i>Aspergillus ficuum</i> and Mono-, Di- and Polysaccharides <i>S.M. Makin, A.N. Dubovitskaya, D. Yu. Bogomolov, M.S. Kondratyev, M.G. Holyavka, and V.G. Artyukhov</i>	892
Mechanism of Action of the Low-Frequency Electromagnetic Field on Aqueous Solutions of Biopolymers <i>E.E. Tekutskaya, G.P. Ilchenko, and M.G. Baryshev</i>	900
Updating Nucleosome Positions within Individual Genes Using Molecular Modeling Methods and MNase Sequencing Data <i>V.A. Vasilev, D.M. Ryabov, A.K. Shaytan, and G.A. Armeev</i>	911
Searching for Sequencing Signal Anomalies Associated with Genome Structural Variations <i>I.V. Bezdvornykh, N.A. Cherkasov, A.A. Kanapin, and A.A. Samsonova</i>	920

## Cell Biophysics

Peculiarities of Adaptational Changes in Leukocytes and Platelets of Yakutian Ground Squirrels during the Pre-Hibernation Period in Autumn <i>P.O. Teplova, N.P. Komelina, K.I. Lizorkina, and N.M. Zakharova</i>	926
A Study on the Radiosensitivity and Induction of Adaptive Response in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Secondary Immunodeficiency Syndrome <i>O.M. Rozanova, E.N. Smirnova, T.A. Belyakova, and N.S. Strelnikova</i>	932
Effect of Taxifolin, a Conjugate of Taxifolin with Glyoxylic Acid, and Naringenin on the Functional Activity of Neutrophils <i>V.S. Shubina, M.I. Kobaykova, and Yu.V. Shatalin</i>	941
The Effect of Molixan, a Disulfide-Containing Immunomodulator, on Na <sup>+</sup> Transport across Frog Skin Epithelium <i>A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, and N.I. Krutetskaya</i>	949

Cellular Response to Exposure to Ionizing Radiation and Light in the Presence of a Photosensitizer <i>S.V. Akulinichev, S.I. Glukhov, A.V. Efremenko, D.A. Kokontsev, E.A. Kuznetsova, V.V. Martynova, A.V. Feofanov, and I.A. Yakovlev</i>	954
Cell Cycle Parameters and Ornithine Decarboxylase Activity in the Red Bone Marrow of Hibernating Ground Squirrels <i>Urocitellus undulatus</i> <i>G.E. Aksyonova, O.S. Logvinovich, V.N. Afanasyev, and K.I. Lizorkina</i>	964
Effect of Combined Use of Melatonin and Diethyldithiocarbamate on the N1E-115 Cell Line (a Clone of Cells from Mouse Neuroblastoma C-1300) <i>S.N. Myakishcheva, Y.L. Baburina, M.I. Kobyakova, R.R. Krestinin, L.D. Sotnikova, and O.V. Krestinina</i>	973
Comparative Cytotoxic Activity of Lutein or Cisplatin Doped with Liposomes against Breast Cancer Cell Lines after Radiotherapy <i>R.A. Lafta, M.W. Shafaa, W.M. Darwish, and M.S. El-Nagdy</i>	982

---

### Complex Systems Biophysics

Low-Active Forms of Cellulosolitic Microorganisms in Archaeological Contexts <i>L.N. Plekhanova, S.N. Udaltsov, A.S. Syrovatko, and N.N. Kashirskaya</i>	999
The Inversion of the Inotropic Effect of Isoproterenol in the Rat Myocardium during Deep Hypothermia <i>C.V. Samodurova, F.V. Turin, and A.S. Averin</i>	1008
Role of Nitric Oxide and Calcium Ions in the Effects of Hydrogen Sulfide on Contractile Activity of Rat Jejunum <i>D.M. Sorokina, I.F. Shaidullov, A.R. Gizzatullin, F.G. Sitdikov, and G.F. Sitdikova</i>	1014
Minimal Model for the Dependence of Stresses in the Wall of a Cerebral Vessel on the Parameters of a Smooth Muscle Cell <i>N.Kh. Shadrina</i>	1022
Proteostasis of Heat Shock Protein 90 in Skeletal Muscles of the Long-Tailed Ground Squirrel during Hibernation <i>Yu.V. Gritsyna, S.S. Popova, G.Z. Mikhailova, L.G. Bobyleva, S.N. Udaltsov, O.S. Morenkov, N.M. Zakharova, and I.M. Vikhlyantsev</i>	1031
Modeling the Critical Flicker Fusion Frequency in the Human Visual System <i>S.I. Lyapunov, I.I. Shoshina, and I.S. Lyapunov</i>	1038
A Complex System of the Mouse Brain – Selection for Successful Solution of a Cognitive Test <i>I.I. Poletaeva, O.V. Perepelkina, and Z.A. Zorina</i>	1046
Trend Analysis of the Current Epidemic Situation and Analysis of Factors Underlying Local Uneven Spread of COVID cases <i>A.Yu. Perevaryukha</i>	1057

---

### Medical Biophysics

High- Dose Nitric Oxide Gas Inhalation for HIV Infection <i>A.V. Pekshev, A.B. Vagapov, N.A. Sharapov, and A.F. Vanin</i>	1074
Structural and Functional Assessment of the Condition of Wound Bed Using Microwave Dielectrometry and Laser Doppler Flowmetry <i>A.K. Martusevich, A.V. Surovegina, V.V. Nazarov, and A.S. Fedotova</i>	1081

---

### Discussion

On Illusion of Flying Dreams. The Mechanism of Their Occurrence <i>G.R. Ivanitskii</i>	1088
---	------

---

УДК 577.322

## ***In silico* ИССЛЕДОВАНИЕ СОЛЬВАТАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ В РАСТВОРАХ БИМОЛЕКУЛ: ВОЗМОЖНОСТИ ПОДХОДА, ОСНОВАННОГО НА 3D-РАСПРЕДЕЛЕНИИ АТОМНОЙ ПЛОТНОСТИ РАСТВОРИТЕЛЯ**

© 2023 г. С.Е. Кручинин\*, М.В. Федотова\*, Е.Е. Кислинская\*\*, Г.Н. Чуев\*\*\*, #

\*Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН, ул. Академическая, 1, Иваново, 153045, Россия

\*\*Ивановский государственный университет, Россия, 153025, Иваново, ул. Ермака, 39

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

#E-mail: genchuev@rambler.ru

Поступила в редакцию 03.07.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

Биомолекулярная сольватация играет одну из ключевых ролей в живой природе. От особенностей протекания данного процесса зависит биологическая активность молекул и выполнение ими своих целевых функций. Однако исследование гидратации биомолекул является нетривиальной задачей как для экспериментальных методов, так и для компьютерного моделирования. В работе демонстрируются возможности неэмпирического подхода 3D-SDFT/3D-RISM, основанного на 3D-распределении атомной плотности растворителя, для исследования особенностей гидратации биомолекул на примере ряда аминокислот – Gly-ZW, L-Ala-ZW, L-Val-ZW, L-Pro-ZW, двух модельных белков – ВРТИ (ингибитора трипсина бычьей поджелудочной железы) и РТР1В (белковой тирозинфосфатазы 1В), а также комплексов белка РТР1В с ингибиторами. Представленные результаты показывают, что подход позволяет в деталях и одновременно целостно описывать структуру гидратной оболочки биомолекул.

*Ключевые слова:* биомолекулы, гидратация, структура гидратной оболочки, методы теории жидкостей.

DOI: 10.31857/S0006302923050010, EDN: PFYCDD

В живом организме биомолекулы вовлечены в большое количество межмолекулярных взаимодействий – с водой (гидратация), между собой (ассоциация, самоагрегация), с присутствующими в среде ионами (ассоциация) или с лигандами (комплексобразование). Среди них одну из ключевых ролей играют взаимодействия с водой, от специфики проявления которых существенным образом зависит биологическая активность молекул. В то же время изучение гидратации биомолекул, особенно биомакромолекул, на атомном и атомно-молекулярном уровнях является нетривиальной задачей из-за динамического поведе-

ния молекул воды в биологической среде. Определение параметров данного процесса с помощью экспериментальных методов во многих случаях представляет значительную проблему, как техническую (исследования требуют больших временных затрат, а интерпретация получаемых данных затруднена необходимостью разделения различных эффектов, определяющихся множеством взаимодействий), так и финансовую (стоимость многих соединений, реактивов довольно высока). Поэтому для подобных исследований используются различные подходы численного моделирования, начиная от квантово-химических расчетов и заканчивая расчетами методом молекулярной динамики. Современные вычислительные методы дают широкие возможности для изучения физико-химических свойств растворов биомолекул, позволяя сузить экспериментальный поиск. Будучи комплементарными к экспериментальным подходам, вычислительные мето-

*Сокращения:* MOZ – молекулярная модель Орнштейна-Цернике, RISM – модель взаимодействующих силовых центров, SDFT – теория классического функционала атомной плотности, 3D-RISM – трехмерная модель взаимодействующих силовых центров, ПФР – пространственные функции распределения, ПГЧ – полное гидратное число, ВРТИ – ингибитор трипсина бычьей поджелудочной железы, РТР1В – белковая тирозинфосфатаза 1В.

ды позволяют, в том числе, исследовать особенности сольватации биомолекул в растворах и определить молекулярные детали структуры их сольватной (гидратной) оболочки, оценить термодинамические и структурные параметры сольватированных (гидратированных) комплексов и пр. Наиболее активно подобные исследования ведутся методами молекулярной динамики. Однако использование этих методов для исследования сольватированных биомолекул ограничено значительными затратами вычислительных ресурсов (объема оперативной памяти и процессорного времени), что, в том числе, связано с необходимостью учитывать влияние растворителя на состояние биомолекулы. Так, при использовании в расчетах моделей явного растворителя эти методы оказываются чрезвычайно дорогостоящими в вычислительном отношении, а сами расчеты (даже на суперкомпьютерах) занимают недели или месяцы при выполнении одной задачи [1–3]. Отметим, что для воды на сегодняшний день предложено более 40 таких моделей [4, 5], однако все они имеют те или иные расхождения с экспериментальными свойствами воды. Наиболее точными с точки зрения воспроизведения экспериментальных структурных характеристик считаются модели SPC/E (Simple Point Charge Extended model) [6] и TIP3P (Transferable Intermolecular Potential with 3 Points) [7], которые очень популярны в моделировании биомолекул [8], включая белки.

Существуют более быстрые, но менее точные методы моделирования, в которых растворитель рассматривается как неявный континуум (модели неявного растворителя), такие как обобщенный метод Борна [9, 10] и метод Пуассона–Больцмана [11]. Вместе с тем, если растворитель представляется как сплошная диэлектрическая среда, то учет эффектов растворителя, связанных с его молекулярной структурой, становится невозможным. Как результат, такой метод не может предсказать расположение молекул растворителя вокруг растворенного вещества. Однако пространственное распределение молекул растворителя имеет решающее значение для понимания того, какую роль сольватация играет в протекании различных физико-химических процессов.

Существует альтернативный вариант вышеописанным методам с явным и неявным моделированием растворителей – это статистико-механические подходы теории жидкостей, в частности, подходы теории классического функционала плотности [12–14] или теории интегральных уравнений, такие как молекулярная модель Орнштейна–Цернике (MOZ) [15–17] и модель взаимодействующих силовых центров (RISM) [18–20]. В этих подходах обычно используется атомарная модель явного растворителя без явного моделирования его движения в растворе. Это позволяет методам теории жидкостей прогнозировать

точное распределение растворителя, подобно методам молекулярной динамики с учетом явного растворителя, но при этом сохранять относительно низкие вычислительные затраты как в случае методов с моделями неявного растворителя.

Методы теории жидкостей основаны на аппарате функций распределения, поскольку они рассматривают жидкость как статистическое распределение частиц (атомов, молекул или ионов). В этом смысле теория классического функционала атомной плотности (SDFT) [21–25], которая оперирует с атомной плотностью растворителя как коллективной переменной, может рассматриваться как обобщенная теория для методов, базирующихся на распределении атомной плотности, например, для RISM-подхода. В таком контексте RISM, как и общий подход SDFT, исследует атомную плотность  $\rho_i(\mathbf{r})$  (жирным шрифтом здесь и далее указывается вектор), определяя распределение  $i$ -ых атомов молекул растворителя ( $s$ ) вокруг растворенного вещества:

$$\rho_i(\mathbf{r}) = \left\langle \sum_{s=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{x}_{si}) \right\rangle, \quad (1)$$

где  $N$  – общее число молекул растворителя,  $\mathbf{x}_{si}$  – их мгновенные положения.

С другой стороны, трехмерную модель взаимодействующих силовых центров (3D-RISM) [26, 27] можно рассматривать как приближение модели MOZ или как 3D-версию SDFT [28], которая учитывает детали уже молекулярной структуры компонентов раствора. Само по себе использование модели MOZ для расчетов биомолекулярной сольватации очень затратно, поскольку модель MOZ требует вычисления шестимерных интегралов. Поэтому такие вычисления не просто очень сложны, но и плохо поддаются анализу и интерпретации. Как результат, вычислительные ресурсы, требуемые для MOZ-расчетов, сопоставимы с теми, что требуются для молекулярной динамики.

3D-RISM подход, оперирующий с 3D-распределением частиц в статистическом ансамбле, постулирует, что молекулярная жидкость может рассматриваться как «эффективный» раствор атомов, но при этом учитывает меж- и внутримолекулярные взаимодействия только через восприимчивость однородной системы (т.е. через атом-атомные структурные факторы невозмущенной молекулярной жидкости). Благодаря этому теоретическому упрощению, метод 3D-RISM стал чрезвычайно популярным и активно используется для расчета свойств систем с различными сольватированными биомолекулами, включая белки и их комплексы с лигандами (см., например, работы [29–50]).

Методы, основанные на 3D-распределении атомной плотности, дают возможность исследовать параметры сольватации молекул с учетом вкладов каждого из компонентов в энергетические и структурные изменения, происходящие в растворах, установить взаимосвязь этих изменений с типом межчастичных взаимодействий, что является принципиальным для понимания на молекулярном и атомно-молекулярном уровне различных эффектов, проявляемых в биологических системах. Отметим, что вышеназванные методы, кроме определения параметров структуры гидратной оболочки, дают также возможность оценить свободную энергию сольватации, конформационную стабильность молекул, энергию и места связывания лигандов с белками.

В данной работе мы продемонстрируем только один аспект применения таких методов, а именно, их применение для описания структуры гидратной оболочки ряда биомолекул по результатам собственных исследований.

### МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА 3D-РАСПРЕДЕЛЕНИИ АТОМНОЙ ПЛОТНОСТИ РАСТВОРИТЕЛЯ

Задача описания структурных особенностей гидратации биомолекулы в методе 3D-SDFT сводится к оценке профилей плотности атомов молекул воды  $\rho_i(\mathbf{r})$  ( $i = O, H$ ), находящейся под действием внешнего потенциала взаимодействия «биомолекула–растворитель»  $v(\mathbf{r})$ . Как было показано нами ранее [24, 25, 51], строгая классическая формулировка SDFT должна быть основана на построении производящего функционала, зависящего от двух связанных переменных – плот-

ности частиц (например, атомов молекул растворителя)  $\rho_i(\mathbf{r})$  и эффективного парного потенциала межчастичных взаимодействий  $J_i(\mathbf{r})$ , и дальнейших его оценках. Плотности и эффективный потенциал должны быть получены соответствующей минимизацией функционала. Опуская все технические детали, которые можно найти в работах [24, 25, 51], мы приводим здесь только окончательные соотношения для плотностей и эффективного потенциала. В векторной форме они могут быть записаны как

$$\begin{cases} \rho(\mathbf{r}) = \rho_0 [1 + \xi([J], \mathbf{r})] e^{-\beta J(\mathbf{r})} \\ J(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \phi(\mathbf{r}) \end{cases} \quad (2)$$

Смысл соотношений (2) довольно прост. Первое уравнение характеризует плотность неоднородной молекулярной жидкости, находящейся под действием эффективного потенциала  $J(\mathbf{r})$ , а второе определяет сам эффективный потенциал, включающий в себя потенциал межмолекулярного взаимодействия «биомолекула–растворитель»  $v(\mathbf{r})$  и потенциал межмолекулярного взаимодействия «растворитель–растворитель»  $\phi(\mathbf{r})$ . Первое из соотношений (2) содержит член  $\xi([J], \mathbf{r})$ , называемый функционалом корреляционной полости, который описывает внутримолекулярные корреляции растворителя. Из-за наличия последних корреляционная полость определяет отклонение распределения атомной плотности растворителя от Больцмановского распределения. Все разнообразие моделей SDFT заключается в выражениях для функционала корреляционной полости и межмолекулярного потенциала  $\phi(\mathbf{r})$ . В общем случае последний можно представить в виде функционала плотности:

$$-\beta\phi(\mathbf{r}) = \int (\mathbf{S}_m^{-1}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) - \mathbf{S}^{-1}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|)) \Delta\rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' + b(\rho(\mathbf{r})), \quad (3)$$

где  $\mathbf{S}_m(\mathbf{r})$  и  $\mathbf{S}(\mathbf{r})$  – структурные факторы одной молекулы растворителя (воды) и однородной жидкости (воды) соответственно,  $b(\rho(\mathbf{r}))$  – мостиковый (бридж-) функционал, учитывающий вклады, выходящие за пределы линейного отклика. Для последнего можно использовать различные приближения, а его зависимость от расстояния можно извлечь из результатов молекулярного моделирования (см., например, работы [52, 53]).

Функционал корреляционной полости может быть представлен как кластерное разложение через функцию Майера,  $f(\mathbf{r}) = e^{-\beta J(\mathbf{r})} - 1$ , и внутримолекулярные корреляционные функции  $s$ -го порядка,  $\mathbf{D}^{(s)}$ :

$$\xi([J], \mathbf{r}) = \sum_{s=2}^M \frac{\text{Tr}[\mathbf{D}^{(s)} f^{s-1}]}{(s-1)!}, \quad (4)$$

где  $M$  – общее количество атомов молекулы растворителя. Отметим, что внутримолекулярная корреляционная функция 2-го порядка  $\mathbf{D}^{(2)}(\mathbf{r})$  зависит только от длин связей  $l_{ij}$ , 3-го порядка – от длин связей и углов между связями, 4-го – от длин связей, углов между связями и двугранных углов и т.д.

В методе 3D-RISM, как и в упрощенной версии SDFT, предполагается, что функционал корреляционной полости зависит только от длин связей и может быть выражен следующим образом [25]:

$$\xi(\mathbf{r}) \approx \xi^{\text{RISM}}(\mathbf{r}) \equiv \exp\left[\int (1 - \mathbf{S}_m^{-1}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|)) \Delta\rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'\right] - 1. \quad (5)$$

Если ввести новую переменную — прямую корреляционную функцию  $c(\mathbf{r})$ :

$$c(\mathbf{r}) \equiv \int S^{-1}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) \Delta\rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}', \quad (6)$$

то 3D-RISM-уравнения могут быть записаны в форме:

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_0 e^{-\beta v(\mathbf{r}) + \frac{\Delta\rho(\mathbf{r})}{\rho_0} - c(\mathbf{r}) + b(\mathbf{r})}, \quad (7a)$$

$$\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho_0 \int S(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|) c(\mathbf{r}') d\mathbf{r}', \quad h(\mathbf{r}) = \frac{\Delta\rho(\mathbf{r})}{\rho_0}. \quad (7b)$$

Второе уравнение (7б) в этой системе является интегральным уравнением Орнштейна–Цернике, которое связывает прямую корреляционную функцию  $c(\mathbf{r})$  с полной корреляционной функцией  $h(\mathbf{r})$ . Так как обе эти функции неизвестны, то используют еще одно уравнение, чтобы замкнуть систему. Таким замыкающим уравнением для (7б) является (7а).

Метод 3D-RISM оперирует с пространственными (3D-) функциями распределения (ПФР)  $g_\gamma(\mathbf{r})$  взаимодействующих атомов молекул растворителя  $\gamma$  вокруг молекулы растворенного вещества, находящейся в положении  $\mathbf{r}$ . ПФР  $g_\gamma(\mathbf{r}) \equiv g_\gamma(r, \Omega)$  представляет собой трехмерную функцию распределения плотности атомов растворителя в локальной системе координат, связанной с молекулой растворенного вещества. Для ее получения молекулу растворенного вещества фиксируют в начале локальной (сферической) системы координат и характеризуют локальные плотности атомов, вычисляя как радиальные  $r$ , так и угловые ( $\Omega = (\theta, \varphi)$ ) координаты вектора  $\mathbf{r}$ .

Конкретизируя схему получения структурных параметров гидратации биомолекул, 3D-RISM уравнение в форме Орнштейна–Цернике для корреляций «растворенное вещество–растворитель» может быть переформулировано следующим образом [54]:

$$h_\gamma(\mathbf{r}) = \sum_\alpha \int d\mathbf{r}' c_\alpha(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \chi_{\alpha\gamma}(r'), \quad (8)$$

где  $h_\gamma(\mathbf{r})$  и  $c_\gamma(\mathbf{r})$  — полная и прямая атомно-молекулярные корреляционные функции атомов  $\gamma$  молекулы растворителя (воды в интересующем нас случае). При этом ПФР определяется как  $g_\gamma(\mathbf{r}) = h_\gamma(\mathbf{r}) + 1$ . Атом-атомная восприимчивость чистого растворителя  $\chi_{\alpha\gamma}(r)$  — существенный параметр для 3D-RISM уравнения, она имеет вид:

$$\chi_{\alpha\gamma}(r) = \omega_{\alpha\gamma}(r) + \rho_\alpha h_{\alpha\gamma}(r), \quad (9)$$

где  $\omega_{\alpha\gamma}(r) = \Delta(r - l_{\alpha\gamma}) / (4\pi l_{\alpha\gamma}^2)$  — внутримолекулярная корреляционная функция растворителя,

$l_{\alpha\gamma}$  — внутримолекулярное расстояние между атомами  $\alpha$  и  $\gamma$  молекулы растворителя,  $h_{\alpha\gamma}(r)$  — межмолекулярная атом-атомная полная корреляционная функция растворителя,  $\rho_\alpha$  — плотность растворителя. Из-за пренебрежения угловыми зависимостями во внутримолекулярных корреляционных функциях вычислительные затраты метода 3D-RISM на два порядка меньше, чем расчеты SDFT по формулам (2)–(4).

В общем виде замыкание для уравнения (8) может быть записано [21] как:

$$g_\gamma(\mathbf{r}) = \exp[-\beta U_\gamma(\mathbf{r}) + h_\gamma(\mathbf{r}) - c_\gamma(\mathbf{r}) + b_\gamma(\mathbf{r})], \quad (10)$$

где  $U_\gamma(\mathbf{r})$  — потенциал взаимодействия атома  $\gamma$  молекулы растворителя и молекулы растворенного вещества,  $\beta = 1/k_B T$ ,  $k_B$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура.

На сегодняшний день предложены несколько видов замыканий, которые отличаются друг от друга математической формулировкой бридж-функционала (или бридж-функции)  $b_\gamma(\mathbf{r})$ . Среди них замыкание Коваленко–Хираты считается одним из лучших с точки зрения как численной стабильности, так и разумной точности [55, 56] получаемого решения, и наиболее часто используется в 3D-RISM-расчетах биомолекулярной сольватации. Оно имеет вид:

$$h_\gamma(\mathbf{r}) = \begin{cases} \exp(d_\gamma(\mathbf{r})) - 1, & d_\gamma(\mathbf{r}) \leq 0 \\ d_\gamma(\mathbf{r}), & d_\gamma(\mathbf{r}) > 0 \end{cases} \quad (11)$$

$$d_\gamma(\mathbf{r}) = -\beta U_\gamma(\mathbf{r}) + h_\gamma(\mathbf{r}) - c_\gamma(\mathbf{r}).$$

Исходя из вышеизложенного, в численной схеме решения интегральных уравнений методами 3D-SDFT/3D-RISM, основанными на 3D-распределении атомной плотности растворителя, входными данными являются межмолекулярный потенциал взаимодействия «биомолекула–растворитель»  $U_\gamma(\mathbf{r})$ ; восприимчивость чистого растворителя  $\chi_{\alpha\gamma}(r)$ , напрямую связанная с его внутримолекулярными корреляционными функциями,  $\omega_{\alpha\gamma}(r)$ ; мостиковая функция (или функционал)  $b(\mathbf{r})$  и параметры, определяющие термодинамическое состояние растворителя ( $T$  и  $\rho$ ) (рис. 1). В наших расчетах мы использовали модель воды SPC/E. Результатом численного решения 3D-интегральных уравнений являются ПФР  $g_\gamma(\mathbf{r})$ , при помощи которых выполняется анализ сольватационных эффектов в растворах биомолекул. Кроме межмолекулярных расстояний, из 3D-функции может быть рассчитано полное гидратное число (ПГЧ) биомолекулы путем интегрирования ПФР «биомолекула–атом кислорода



Рис. 1. Стандартная численная схема решений интегральных уравнений теории классического функционала атомной плотности для молекулярной жидкости (ТФП – теория функционала плотности, БФП – быстрое Фурье-преобразование).

молекулы воды ( $O_w$ )» по объему первой гидратной оболочки:

$$n_{Ow} = \rho_{Ow} \int_{V_i} g_{Ow}(\mathbf{r}) dV. \quad (12)$$

### ОСОБЕННОСТИ ГИДРАТАЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты – важнейшие органические соединения, в числе прочих обеспечивающие существование и функционирование живых систем. В живом организме они могут находиться в свободном состоянии и как отдельные структурные компоненты белков и пептидов. Их молекулы содержат карбоксильную группу и аминогруппу, которые играют существенную роль в управлении гидрофильностью и, таким образом, взаимодействием биомолекулы с водой и растворенными гидрофильными и/или заряженными соединениями. В водных растворах при физиологическом рН аминокислоты существуют преимущественно в цвиттер-ионной (ZW) форме (рис. 2а). Ниже бу-

дут продемонстрированы результаты применения метода 3D-SDFT/3D-RISM к описанию особенностей структуры гидратной оболочки четырех протеиногенных аминокислот с разными радикалами (R) – глицина (Gly-ZW), L-аланина (L-Ala-ZW), L-валина (L-Val-ZW) и L-пролина (L-Pro-ZW) [34–38, 57, 58].

Методы, основанные на 3D-распределении атомной плотности, при помощи ПФР позволяют определить локализацию растворителя вблизи функциональных групп биомолекул. На рис. 3 в качестве примера приведены ПФР атомов кислорода и водорода молекул воды вокруг L-Val-ZW. Из рис. 3 видно, что молекулы воды ориентированы атомами водорода к отрицательно заряженной карбоксильной группе, а атомами кислорода – к положительной заряженной аминогруппе аминокислоты. Соответствующие характеристические расстояния между молекулами растворителя и L-Val-ZW составляют в случае группы  $-\text{COO}^-$  0.29 нм ( $r_{O(W)-\text{COO}}$ ) и 0.16 нм ( $r_{H(W)-\text{COO}}$ ), в случае группы  $-\text{NH}_3^+$  0.29 нм ( $r_{O(W)-\text{NH}_3}$ ) и 0.18 нм ( $r_{H(W)-\text{NH}_3}$ ), в случае метильных групп 0.30–0.35 нм ( $r_{O(W)-\text{CH}_3}$ ). По результатам расчетов ПГЧ данной аминокислоты составляет 26 молекул воды. При этом в ближнем окружении групп  $-\text{COO}^-$  и  $-\text{NH}_3^+$  находится по 5 молекул воды, в ближнем окружении гидрофобной группы  $-\text{CH}_3$ , ближайшей к аминогруппе – 9 молекул воды, в ближнем окружении гидрофобной группы  $-\text{CH}_3$ , удаленной от аминогруппы – 7 молекул воды. В то же время локализация растворителя отсутствует вблизи гидрофобных фрагментов  $-\text{CH}$  аминокислоты.

На основе ПФР можно также определить количество водородных связей, образующихся между L-Val-ZW и растворителем. Так, по полученным данным, из 5 молекул воды, находящихся в первой гидратной оболочке группы  $-\text{COO}^-$ , 4 молекулы формируют Н-связи с группой, а из 5 молекул воды, находящихся в ближнем окружении группы  $-\text{NH}_3^+$ , – только 2 молекулы Н-связаны с ней. Как показали результаты исследова-

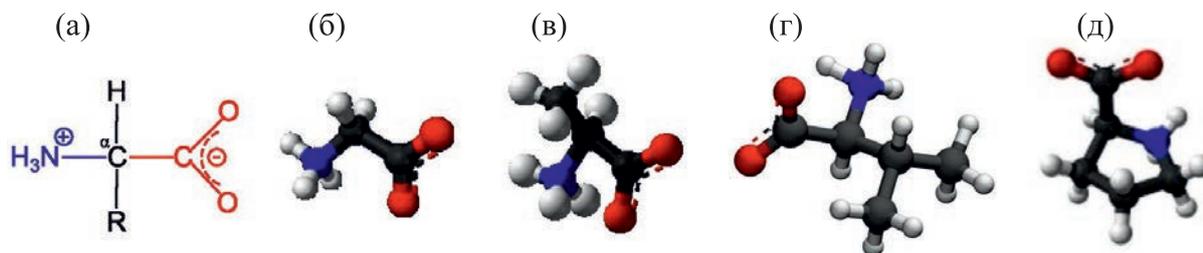
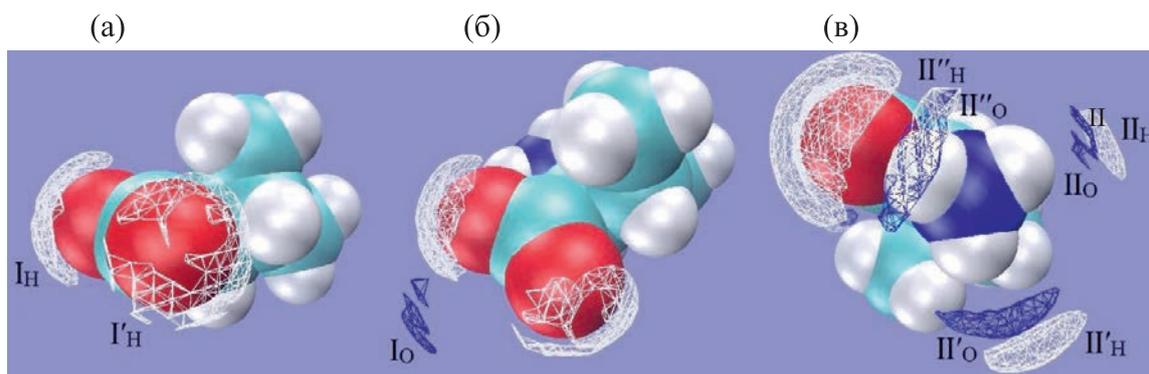


Рис. 2. Структурная формула аминокислоты в цвиттер-ионной (ZW) форме (а). Пространственные конфигурации Gly-ZW (б), L-Ala-ZW (в), L-Val-ZW (г) и L-Pro-ZW (д).



**Рис. 3.** ПФР атомов кислорода (синий цвет) и водорода (белый цвет) молекул воды вокруг L-Val-ZW. (а) – Изоповерхности (I) ПФР вблизи карбоксильной группы соответствуют  $g_{\text{Val-H}_2\text{O}}(\mathbf{r}) = 3.7$ ; (б) – изоповерхности (I) ПФР вблизи карбоксильной группы соответствуют  $g_{\text{Val-OH}_2}(\mathbf{r}) = 3.7$  и  $g_{\text{Val-H}_2\text{O}}(\mathbf{r}) = 3.4$ ; (в) – изоповерхности (II) ПФР вблизи аминогруппы и гидрофобной части соответствуют  $g_{\text{Val-OH}_2}(\mathbf{r}) = 4.0$  и  $g_{\text{Val-H}_2\text{O}}(\mathbf{r}) = 1.9$ .

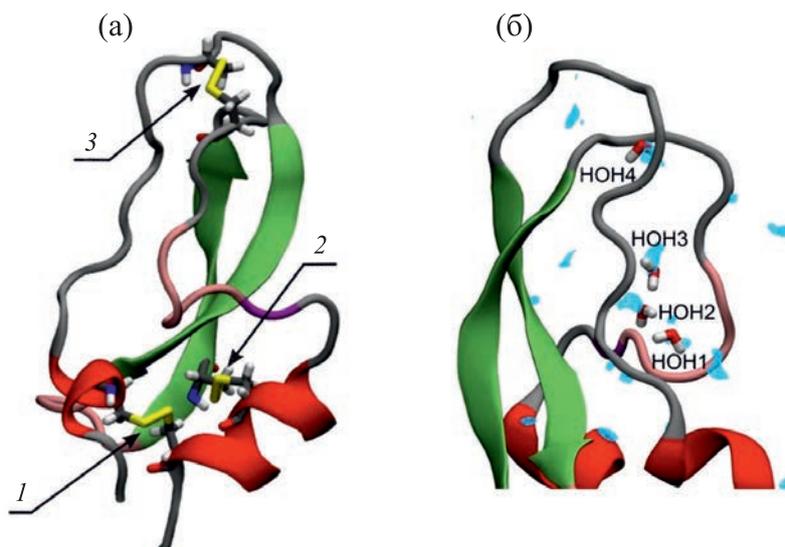
ний, возможность образования Н-связей между метильными группами и молекулами воды существует, но вероятность такого Н-связывания очень низка.

В табл. 1 приведена обобщенная информации о структуре гидратной оболочки исследованных аминокислот, согласно которой, все биомолекулы хорошо гидратированы, что следует из их ПГЧ, а также количества молекул воды в ближнем окружении их функциональных групп. Следует отметить, что ПГЧ увеличивается в ряду Gly-ZW  $\rightarrow$  L-Ala-ZW  $\rightarrow$  L-Val-ZW, т.е. по мере усложнения строения, а именно, радикала молекулы аминокислоты (табл. 1, рис. 2). Однако ПГЧ L-Pro-ZW оказывается меньше, чем у L-Val-ZW (табл. 1), что связано с компактным пространственным расположением пирролидинового кольца, и соответственно, меньшим объемом, который занимает гидратная оболочка пролина. Сравнительный анализ структурных параметров гидратации Gly-ZW, L-Ala-ZW, L-Val-ZW и L-

Pro-ZW (табл. 1) показывает, что карбоксильная группа более гидрофильна и образует большее количество Н-связей с молекулами воды, чем аминогруппа. При этом число молекул воды вблизи аминогруппы (иминогруппы в случае пролина) и число образуемых ею Н-связей практически одинаковы для всех аминокислот, а аналогичные параметры карбоксильной группы отличаются (табл. 1). Данная структурная особенность связана со стерическими ограничениями по отношению к карбоксильной группе, которые появляются из-за конкретной локализации радикала в L-Ala-ZW, L-Val-ZW и L-Pro-ZW в сравнении с Gly-ZW, где радикал отсутствует (рис. 2). Отметим также, что количество растворителя в ближнем окружении группы  $-\text{COO}^-$  пролина существенно выше по сравнению с таковым у других аминокислот, что обусловлено особенностями его структуры - карбоксильная группа L-Pro-ZW значительно удалена от его пирролидинового

**Таблица 1.** Структурные параметры гидратации Gly-ZW, L-Ala-ZW, L-Val-ZW и L-Pro-ZW

Функциональная группа	Гидратное число (ГЧ) и число Н-связей	Gly-ZW	L-Ala-ZW	L-Val-ZW	L-Pro-ZW
Карбоксильная группа	ГЧ	6	6	5	8
	Н-связи	6	4	4	4
Амино(имино) группа	ГЧ	5	5	5	4
	Н-связи	2	2	2	2
Гидрофобная часть	ГЧ	6 (группа $-\text{CH}_2$ )	11 (группа $-\text{CH}_3$ )	16 (группы $-\text{CH}_3$ )	13 (пирролидиновое кольцо)
Аминокислота	Полное ГЧ	17	21	26	25



**Рис. 4.** (а) – Визуализация 3D-конформации белка ВРТИ в кристаллической форме II (PDB id: 5PTI). Дисульфидные связи обозначены 1 (Cys5-Cys55), 2 (Cys30-Cys51), 3 (Cys14-Cys38). (б) – Расположение внутренних молекул воды (НОН1, НОН 2, НОН 3 и НОН 4) в структуре ВРТИ, полученное из 3D-SDFT/3D-RISM расчета (показаны голубым цветом) и найденное в эксперименте (показаны в виде молекул) [59].

кольца и, таким образом, доступна для взаимодействия с молекулами воды.

Как видно из представленных результатов, подход, основанный на 3D-распределении атомной плотности растворителя, позволяет в деталях и одновременно целостно описывать структуру гидратной оболочки аминокислот.

### ОСОБЕННОСТИ ГИДРАТАЦИИ БЕЛКОВ

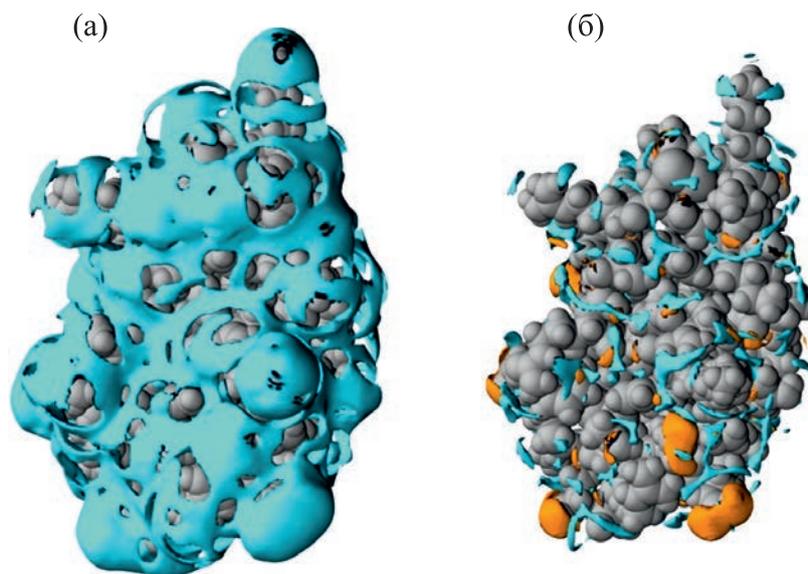
Хорошо известно, что гидратация белков в растворах играет одну из определяющих ролей в протекании множества жизненно важных процессов. Взаимодействия белков с водой имеют решающее значение для их структуры, динамики, фолдинга, функционирования, а также могут оказывать существенное влияние на стабилизацию их комплексов с лигандами. Метод 3D-SDFT/3D-RISM, как было неоднократно показано (см., напр., [30, 32, 42, 46, 47]), довольно точно воспроизводит 3D-молекулярную картину гидратации белка с уровнем детализации, как правило, не доступным эксперименту. Ниже будут продемонстрированы результаты его применения к описанию особенностей структуры гидратной оболочки белков на примере ингибитора трипсина бычьей поджелудочной железы (ВРТИ) и белковой тирозинфосфатазы 1В (РТР1В), а также комплексов РТР1В с ингибиторами [49, 50].

### БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР ТРИПСИНА

Ингибитор трипсина бычьей поджелудочной железы (PDB id: 5PTI [59]) – один из самых ма-

леньких и простых глобулярных белков с молекулярной массой 6.62 кДа (рис. 4а). Его аминокислотная последовательность, состоящая из 58 аминокислотных остатков, стабилизирована тремя дисульфидными связями (рис. 4а) [60], что обеспечивает формирование компактной и очень стабильной третичной структуры, которая даже в водном растворе близка к кристаллической [61].

Помимо дисульфидных связей, дополнительную стабилизацию структуры ВРТИ обеспечивают четыре молекулы воды, «заглубленные» внутри белка («внутренние» молекулы воды) [62]. Эти сильно и специфически связанные (Н-связями) молекулы воды являются неотъемлемым элементом нативной структуры белка не только в его кристаллической форме, но и в водном растворе [61, 64]. Как видно из рис. 4б, результаты 3D-SDFT/3D-RISM-расчетов [49] хорошо согласуются с рентгенокристаллографическими данными [59] – «внутренние» молекулы воды находятся в положениях, близких к экспериментальным, а именно, внутри белка вблизи остатков Glu7, Tyr10, Pro13, Arg39 и Lys41. Положения были определены из ПФР  $g_{\text{ВРТИ-O}_w}(\mathbf{r})$  (рис. 5). При этом молекула воды W4 пространственно изолирована в небольшой полости ВРТИ, а остальные молекулы W1, W2 и W3 образуют Н-связанный кластер в большой щели (рис. 4б). Как показал анализ ПФР  $g_{\text{ВРТИ-H}_w}(\mathbf{r})$  (рис. 5б), все «внутренние» молекулы воды образуют водородные связи с соответствующими остатками белка: W4 с остатками Cys38, Cys14, Thr11, а W1, W2 и W3 с остатками Pro8, Tyr10, Asn43, Lys41 и Asn44 [49].



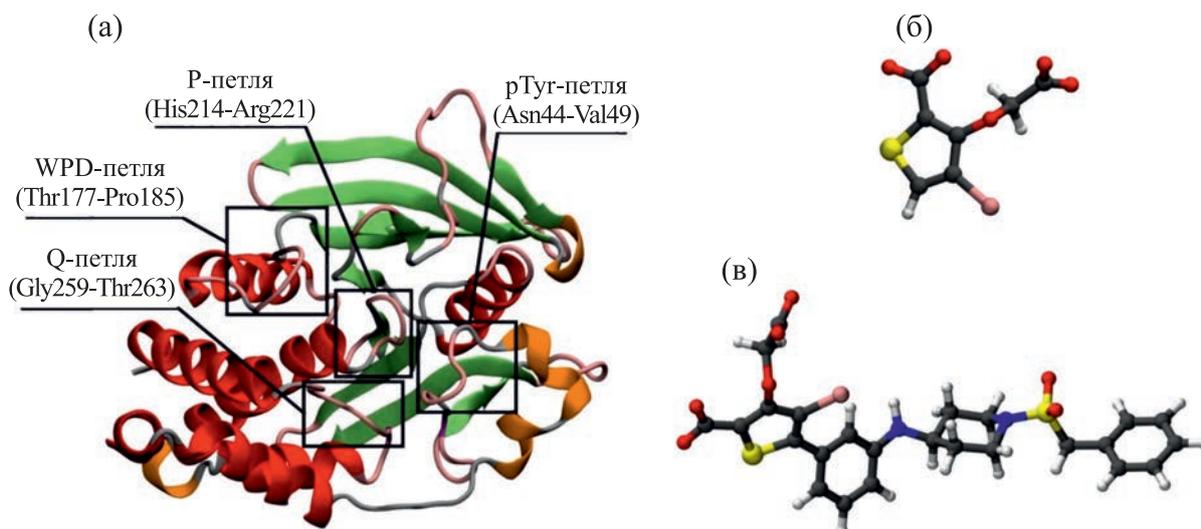
**Рис. 5.** Изоповерхности ПФР атомов растворителя вокруг ВРТИ: (а) – изоповерхность ПФР атомов кислорода (голубой) молекул воды при  $g_{\text{BPTI-O}_W}(\mathbf{r}) = 2$ ; (б) – изоповерхности ПФР атомов кислорода (голубой) при  $g_{\text{BPTI-O}_W}(\mathbf{r}) = 4$  и атомов водорода (оранжевый) молекул воды при  $g_{\text{BPTI-H}_W}(\mathbf{r}) = 3$ .

На рис. 5 приведены пространственные функции распределения атомов кислорода и водорода молекул воды вокруг и внутри ВРТИ, которые позволяют описать структуру гидратной оболочки белка. Практически полностью окружающая белок изоповерхность при  $g_{\text{BPTI-O}_W}(\mathbf{r}) = 2$  (рис. 5а) характеризует протяженный гидратный слой толщиной 0.39 нм и свидетельствует о том, что ВРТИ хорошо гидратирован. Подтверждением служит также рассчитанное по формуле (12) полное гидратное число, которое составляет 332.6 молекул воды [49]. Изоповерхности атомов кислорода и водорода молекул воды при  $g_{\text{BPTI-O}_W}(\mathbf{r}) = 4$  и  $g_{\text{BPTI-H}_W}(\mathbf{r}) = 3$  соответственно (рис. 5б) характеризуют распределение растворителя, локализованное вблизи гидрофильных участков поверхности ВРТИ. При этом, как следует из полученных данных (рис. 5б), изоповерхности ПФР атомов водорода преимущественно находятся около групп, которые могут выступать акцепторами Н-связей (карбоксильные и гидроксильные группы), а изоповерхности ПФР атомов кислорода – вблизи групп, способных быть донорами Н-связей (аминогруппы, гидроксильные группы и т.д.). Таким образом, изоповерхности на рис. 5б демонстрируют распределение молекул воды первой гидратной оболочки, образующих Н-связи с полярными участками ВРТИ, и позволяют определить их расположение, включая расположение «внутренних» молекул воды, о чем было сказано выше.

#### БЕЛКОВАЯ ТИРОЗИНФОСФАТАЗА 1В И ЕЕ КОМПЛЕКСЫ С ИНГИБИТОРАМИ

Белковая тирозинфосфатаза 1В (PDB ID: 2HNP) – внутриклеточный фермент, который является одним из членов-основателей семейства белковых тирозинфосфатаз и поэтому часто используется как модельная система для изучения свойств этого семейства. Его аминокислотная последовательность состоит из 435 аминокислотных остатков. Однако только первые 298 остатков соответствуют домену активного центра, состоящего из сайта связывания и каталитического сайта. Этот домен, имеющий 8  $\alpha$ -спиралей и 12  $\beta$ -цепей, практически одинаков для всех других нерецепторных белковых тирозинфосфатаз (рис. 6а). Он содержит 6 петель, из которых только 4 являются структурно важными областями для связывания ингибитора [64]: рТур-петля (остатки Asn44-Val49), WPD-петля (остатки Thr177-Pro185), Р-петля (остатки His214-Arg221) и Q-петля (остатки Gly259-Thr263) (рис. 6а). Следует отметить, что WPD-петля имеет две различные конформации: открытую в несвязанном состоянии и закрытую, активную в комплексе «белок–ингибитор» [65, 66].

Рассмотрим сначала особенности гидратации белка РТР1В с открытой конформацией WPD-петли (PDB id: 2HNP, молекулярная масса ~37 кДа [67]). Полученные результаты показывают [50], что подобно ВРТИ, белок РТР1В хорошо гидратирован, о чем свидетельствует полное гидратное число, равное 1071.9, и протяженный гид-



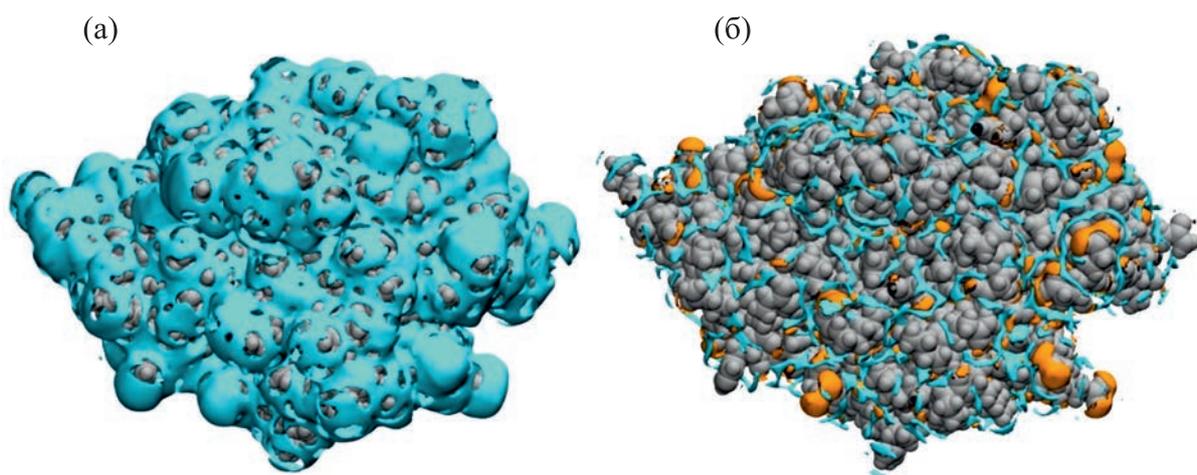
**Рис. 6.** Визуализация 3D-структуры белка РТР1В (PDB id: 2HNP [67]) (а) и пространственные структуры ингибиторов в комплексах 2HB1 (б) и 2QBP (в).

ратный слой толщиной 0.39 нм (изоповерхность при  $g_{\text{РТР1В-O}_w}(\mathbf{r}) = 2$  на рис. 7а). Как следует из анализа распределения растворителя, локализованного вблизи гидрофильных участков РТР1В (рис. 7б), белок способен к Н-связыванию с молекулами воды при помощи функциональных групп, которые могут действовать как доноры (амино-, гидроксильные группы и др.,  $g_{\text{РТР1В-O}_w}(\mathbf{r}) = 4$  на рис. 7б) или акцепторы (карбокисильные, гидроксильные группы, фрагменты  $-\text{SO}_2-$ ,  $g_{\text{РТР1В-H}_w}(\mathbf{r}) = 3$  на рис. 7б) Н-связи.

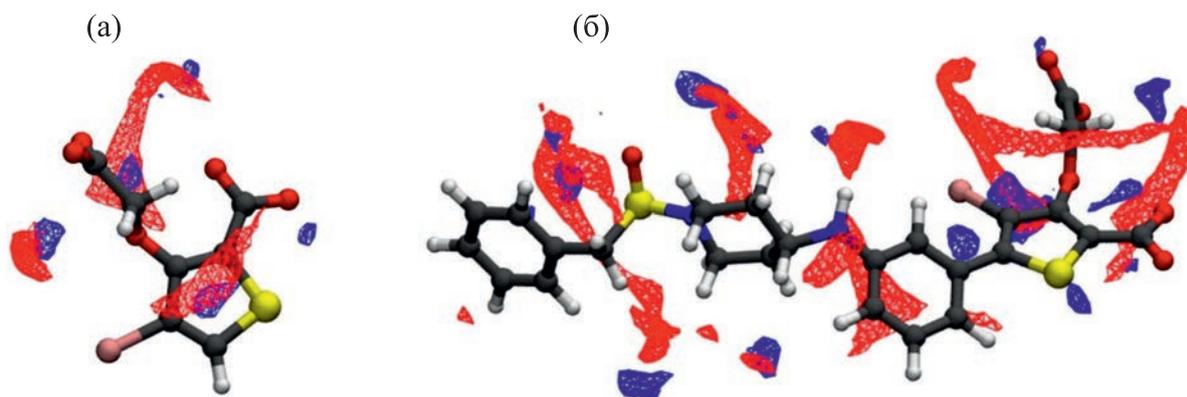
Как потенциальная мишень для лекарственных препаратов, РТР1В имеет довольно значи-

тельное количество комплексов с ингибиторами, структуры которых задепонированы в онлайн-банке данных трехмерных структур белков (PDB-банке). Для исследования нами были выбраны два комплекса с ингибиторами компактного (PDB id: 2HB1 [68]) и разветвленного (PDB id: 2QBP [69]) строения (рис. 6 б,в). Отметим, что структура РТР1В в комплексе с лигандом, как правило, имеет закрытую конформацию WPD-петли.

Как известно, ингибиторы нацелены на сайт связывания, и, таким образом, ингибитор как лиганд изменяет структуру гидратной оболочки лишь локально – вблизи того места, где он присо-



**Рис. 7.** Изоповерхности ПФР атомов растворителя вокруг РТР1В в апо-состоянии: (а) – изоповерхности ПФР атомов кислорода (голубой) молекул воды при  $g_{\text{РТР1В-O}_w}(\mathbf{r}) = 2$ ; (б) –изоповерхности ПФР атомов кислорода (голубой) при  $g_{\text{РТР1В-O}_w}(\mathbf{r}) = 4$  и атомов водорода (оранжевый) молекул воды при  $g_{\text{РТР1В-H}_w}(\mathbf{r}) = 3$ .



**Рис. 8.** Изоповерхности ПФР атомов кислорода молекул воды вокруг ингибиторов в области активного сайта связывания в комплексах 2NB1 (а) и 2QBP (б). Изоповерхности ПФР обозначены красным цветом в случае свободного ингибитора ( $g_{Ow}(r) = 4$ ), синим цветом – в случае связанного ингибитора ( $g_{Ow}(r) = 10$ ).

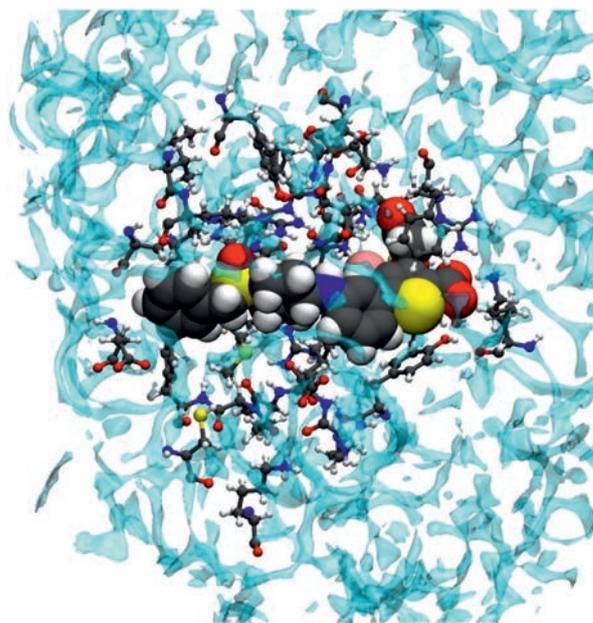
единяется к белку. Поэтому особенности гидратации комплексов далее рассматриваются именно в этой области гидратной оболочки.

Первое, что можно определить при помощи метода 3D-SDFT/3D-RISM, – это изменения в структуре гидратной оболочки ингибитора при его переходе из несвязанного состояния в связанное. На рис. 8 представлены изоповерхности ПФР растворителя вокруг лигандов в несвязанном (свободном) состоянии и связанном состоянии, т.е. в комплексе с РТР1В в области сайта связывания. Как видно из рисунка, при формировании комплекса области с наиболее вероятным расположением атомов кислорода воды вокруг ингибиторов существенно уменьшаются, что свидетельствует об их значительной дегидратации при связывании с РТР1В [50]. Подтверждением этому служат также изменения в гидратных числах лигандов. По результатам расчетов, в результате связывания количество молекул воды вблизи ингибиторов значительно снижается: в случае комплекса 2NB1 – с 32.4 (свободный ингибитор) до 5.5 (связанный ингибитор), в случае комплекса 2QBP – с 71.3 (свободный ингибитор) до 23.6 (связанный ингибитор) [50].

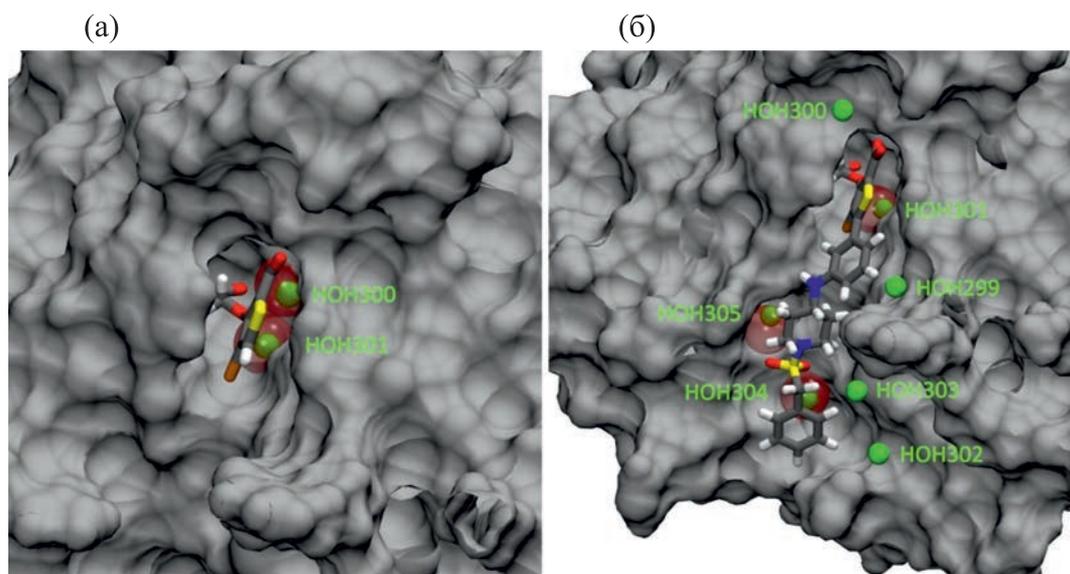
Другие результаты, полученные методом 3D-SDFT/3D-RISM, позволяют охарактеризовать состояние сайта связывания белка. Для этого сравнивались данные для белка с удаленным из структуры лигандом («нелигандный» белок) с данными для белка в комплексе с лигандом. В первом случае гидратное число составило 48.4 для 2NB1 и 130.3 для 2QBP [50], что свидетельствует о том, что домен активного центра «нелигандного» белка хорошо гидратирован. При связывании белка с ингибитором домен частично дегидратируется: его гидратное число уменьшается на ~10% и становится равным 43.7 в случае комплекса 2NB1 и на ~19% до 105.4 – в случае комплекса 2QBP [50]. Данный процесс обусловлен вытесне-

нием ингибитором части молекул воды из области активного центра, что неоднократно отмечалось в литературе [70, 71]. В качестве примера на рис. 9 показано распределение атомов кислорода молекул воды внутри и вблизи области активного центра для белка в комплексе с лигандом (2QBP).

Кристаллографические структуры комплексов 2NB1 и 2QBP содержат соответственно 171 и 117 молекул воды, часть которых локализована внутри домена активного центра. Эти локализованные молекулы воды прочно связаны с комплексом и способствуют стабильности его структуры. При помощи ПФР, рассчитанных методом 3D-SDFT/3D-RISM, с использованием программы



**Рис. 9.** Распределение атомов кислорода молекул воды внутри и вблизи области активного центра белка в случае комплекса 2QBP.



**Рис. 10.** Расположение атомов кислорода молекул воды внутри области активного центра по данным PDB банка (красные полупрозрачные сферы) и данным 3D-RISM (зеленые сферы) для комплексов 2HB1 (а) и 2QBP (б). Воспроизведено из работы [50] с разрешения издательства Elsevier, © 2023.

metatwist [72] были определены наиболее вероятные положения молекул воды в области активного центра (рис. 10, показаны только атомы кислорода молекул воды). Как видно из рис. 10, внутри домена активного центра присутствуют две молекулы растворителя в случае комплекса 2HB1 (рис. 10а) и семь молекул растворителя в случае комплекса 2QBP (рис. 10б). При этом расположение двух молекул (комплекс 2HB1) и трех молекул (комплекс 2QBP) воды, наиболее прочно связанных с комплексом, совпадает с соответствующими экспериментальными данными из PDB банка [68, 69]. О наличии таких прочно связанных молекул воды также сообщается в работах [73, 74], где исследовались комплексы РТР1В с другими ингибиторами.

Основываясь на представленных результатах, можно констатировать, что подход, основанный на 3D-распределении атомной плотности растворителя, позволяет в деталях описывать структурные особенности гидратации белков и белковых комплексов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биомолекулярная сольватация играет одну из определяющих ролей в протекании множества жизненно важных процессов. Знание ее особенностей на молекулярном и атомно-молекулярном уровнях необходимо для установления влияния данного процесса на выполнение биомолекулами своих целевых функций, и, как результат, для понимания молекулярных механизмов их действия.

Вместе с тем, в силу динамического поведения молекул воды в биологической среде, во многих случаях экспериментальное определение параметров гидратации биомолекул представляет значительные трудности. В данной работе мы продемонстрировали возможности неэмпирического подхода, основанного на 3D-распределении атомной плотности растворителя, для исследования особенностей гидратации биомолекул на примере ряда аминокислот (Gly-ZW, L-Ala-ZW, L-Val-ZW, L-Pro-ZW), белков (BPTI, РТР1В) и комплексов белка РТР1В с ингибиторами. Представленные результаты показали, что метод 3D-SDFT/3D-RISM позволяет успешно в деталях и одновременно целостно описывать структуру гидратной оболочки биомолекул. В частности, подход дает возможность пространственного представления их ближнего окружения с определением локализации растворителя вблизи их полярных и неполярных участков, а также количественной оценки их гидратации с помощью гидратных чисел и количества Н-связей, как для биомолекулы целиком, так и для ее функциональных групп. Кроме того, в случае биомолекул метод позволяет найти расположение «внутренних» молекул воды, которые обеспечивают стабилизацию структуры белков и белковых комплексов, а также описать особенности гидратации в области активного сайта связывания белков с ингибиторами.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-23-00184 (<https://rscf.ru/project/22-23-00184/>).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. J. Rocklin, D. L. Mobley, K. A. Dill, et al., *J. Chem. Phys.*, **139** (18), 184103 (2013).
- J. W. Kaus, L. T. Pierce, R. C. Walker, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **9** (9), 4131 (2013).
- P. Mikulskis, S. Genheden, and U. Ryde, *J. Chem. Inf. Model.*, **54** (10), 2794 (2014).
- B. Guillot, *J. Mol. Liq.*, **101** (1–3), 219 (2002).
- J. F. Ouyang and R. P. Bettens, *Chimia (Aarau)*, **69** (3), 104 (2015).
- H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, and T. P. Straatsma, *J. Phys. Chem.*, **91** (24), 6269 (1987).
- W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, et al., *J. Chem. Phys.*, **79** (2), 926 (1983).
- A. V. Onufriev and S. Izadi, *Wiley Interdisc. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, **8** (2), e1347 (2017).
- W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (16), 6127 (1990).
- B. N. Dominy and C. L. Brook, *J. Phys. Chem B*, **103** (18), 3765 (1999).
- B. Honig and A. Nicholls, *Science*, **268** (5214), 1144 (1995).
- J. Wu, *AICHE J.*, **52** (3), 1169 (2006).
- J. Wu and Z. Li, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **58** (1), 85 (2007).
- S. Zhao, R. Ramirez, R. Vuilleumier, et al., *J. Chem. Phys.*, **134** (19), 194102 (2011).
- L. Blum, *J. Chem. Phys.*, **57**, 1862 (1972).
- M. Ikeguchi and J. Doi, *J. Chem. Phys.*, **103** (12), 5011 (1995).
- R. Ishizuka and N. Yoshida, *J. Chem. Phys.*, **139** (8), 084119 (2013).
- D. Chandler and H. C. Andersen, *J. Chem. Phys.*, **57** (5), 1930 (1972).
- F. Hirata, P. J. Rossky and B. M. Pettitt, *J. Chem. Phys.*, **78** (6), 4133 (1983).
- J. Perkyns and B. M. Pettitt, *J. Chem. Phys.*, **97** (10), 7656 (1992).
- D. Chandler, J. D. McCoy, and S. J. Singer, *J. Chem. Phys.*, **85** (10), 5971 (1986).
- Y. Liu, J. Fu, and J. Wu, *J. Phys. Chem. Lett.*, **4** (21), 3687 (2013);
- Y. Liu, S. Zhao, and J. Wu, *J. Chem. Theory Comput.*, **9** (4), 1896 (2013).
- M. Valiev and G. N. Chuev, *J. Stat. Mech. Theory Exp.*, **2018** (9), 093201 (2018).
- G. N. Chuev, M. V. Fedotova, and M. Valiev, *J. Chem. Phys.*, **152** (4), 041101 (2020).
- Q. H. Du, D. Beglov, and B. Roux, *J. Phys. Chem. B*, **104** (4) 796 (2000);
- A. Kovalenko and F. Hirata, *J. Chem. Phys.*, **110** (20), 10095 (1999).
- Y. Liu, S. Zhao, and J. Wu, *J. Chem. Theory Comput.*, **9** (4), 1896 (2013).
- T. Imai, A. Kovalenko, and F. Hirata, *Chem. Phys. Lett.*, 395 (1–3), 1 (2004).
- N. Yoshida, S. Phongphanphanee, and F. Hirata, *J. Phys. Chem. B*, **111** (17), 4588 (2007).
- J. S. Perkyns, G. C. Lynch, J. J. Howard, et al., *J. Chem. Phys.* **132** (6), 064106 (2010);
- D.J. Sindhikara and F. Hirata, *J. Phys. Chem. B*, **117** (22), 6718 (2013).
- S. Gusarov, B. S. Pujari, and A. Kovalenko, *J. Comput. Chem.*, **33** (17), 1478 (2012).
- M. V. Fedotova and S. E. Kruchinin, *Biophys. Chem.*, **190–191**, 25 (2014).
- O. A. Dmitrieva and M. V. Fedotova, *New J. Chem.*, **39** (11), 8594 (2015).
- A. Eiberweiser, A. Nazet, M. V. Fedotova, et al., *J. Phys. Chem. B*, **119** (49), 15203 (2015).
- M. V. Fedotova and O.A. Dmitrieva, *Amino Acids*, **48** (7), 1685 (2016).
- O. A. Dmitrieva, M. V. Fedotova, and R. Buchner, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19** (31), 20474 (2017).
- M. V. Fedotova, S. E. Kruchinin, and G. N. Chuev, *New J. Chem.*, **41** (3), 1219 (2017).
- M. V. Fedotova and S. E. Kruchinin, *J. Mol. Liq.*, **244**, 489 (2017).
- S. Güssregen, H. Matter, G. Hessler, et al., *J. Chem. Inf. Model.*, **57** (7), 1652 (2017).
- N. Yoshida, *J. Chem. Inf. Model.*, **57** (11), 2646 (2017).
- M. V. Fedotova, *J. Mol. Liq.*, **292**, 111339 (2019).
- M. V. Fedotova, S. E. Kruchinin, and G. N. Chuev, *J. Mol. Liq.*, **304**, 112757 (2020).
- S. Friesen, M. V. Fedotova, S. E. Kruchinin, et al., *Phys Chem Chem Phys* **23** (2), 1590 (2021).
- M. Sugita, I. Onishi, M. Irida, et al., *Molecules*, **26** (2), 271 (2021).
- D. Roy and A. Kovalenko, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (10), 5061 (2021).
- N. Kumawat, A. Tucs, S. Bera, et al., *Molecules*, **27** (3), 799 (2022).
- S. E. Kruchinin, E. E. Kislinkaya, G. N. Chuev, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (23), 14785 (2022).
- S. E. Kruchinin, G. N. Chuev, and M. V. Fedotova, *J. Mol. Liq.*, **384**, 122281 (2023).
- G. N. Chuev, M. V. Fedotova, and M. Valiev, *J. Stat. Mech.*, **2021**, 033205 (2021).

52. B. Kezic and A. Perera, *J. Chem. Phys.*, **135** (24), 234104 (2011).
53. G. N. Chuev, I. Vyalov, and N. Georgi, *J. Comput. Chem.*, **35** (13), 1010 (2014).
54. A. Kovalenko, In *Molecular Theory of Solvation*, Ed. By F. Hirata (Kluwer Acad. Publ.: Dordrecht, The Netherlands, 2003), pp.169–275.
55. A. Kovalenko and F. Hirata, *J. Chem. Phys.*, **112** (23), 10391 (2000).
56. A. Kovalenko, *Pure Appl. Chem.*, **85** (1), 159 (2013).
57. M. V. Fedotova and S. E. Kruchinin, *J. Mol. Liq.*, **169**, 1 (2012).
58. M. V. Fedotova and O. A. Dmitrieva, *Amino acids*, **47** (6), 1015 (2015).
59. A. Wlodawer, J. Walter, R. Huber, et al., *J. Mol. Biol.*, **180** (2), 301 (1984).
60. B. Kassell and M. Laskowski Sr, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20** (4), 463 (1965).
61. K. D. Berndt, P. Güntert, L. P. Orbons, et al., *J. Mol. Biol.*, **227** (3), 757 (1992).
62. V. P. Denisov, J. Peters, H. D. Hörlein, et al., *Biochemistry*, **43** (38), 12020 (2004).
63. G. Otting, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (5), 1871 (1989).
64. D. S. Cui, J. M. Lipchock, D. Brookner, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **141** (32), 12634 (2019).
65. L. Tabernero, A. R. Aricescu, E. Y. Jones, et al., *FEBS J.*, **275** (5), 867 (2008).
66. A. J. Barr, E. Ugochukwu, W. H. Lee, et al., *Cell*, **136** (2), 352 (2009).
67. D. Barford, A. J. Flint, and N. K. Tonks, *Science*, **263** (5152), 1397 (1994).
68. Z.-K. Wan, J. Lee, W. Xu, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (18), 4941 (2006).
69. D. P. Wilson, Z.-K. Wan, W.-X. Xu, et al., *J. Med. Chem.*, **50** (19), 4681 (2007).
70. J. L. Thomaston, N. F. Polizzi, A. Konstantinidi, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **140** (45), 15219 (2018).
71. B. Z. Zsidó and C. Hetényi, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **67**, 1 (2021).
72. D. A. Giambasu, D. M. Case, and G. M. York, *J. Am. Chem. Soc.*, **141** (6), 2435 (2019).
73. A. K. Pedersen, G. H. Peters, K. B. Møller, et al., *Acta Crystallogr. D – Biol. Crystallogr.*, **60** (Pt 9), 1527 (2004).
74. A. Özcan, E. O. Olmez, and B. Alakent, *Prot. Struct. Funct. Bioinf.*, **81** (5), 788 (2013).

## ***In silico* Study of Solvation Effects in Solutions of Biomolecules: Possibilities of an Approach Based on the 3D-Distribution of Solvent Atomic Density**

**S.E. Kruchinin\*, M.V. Fedotova\*, E.E. Kislinskaya\*\*, and G.N. Chuev\*\*\***

\*G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya ul. 1, Ivanovo, 153045 Russia

\*\*Ivanovo State University, ul. Ermaka 39, Ivanovo, 153025 Russia

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

Biomolecular solvation plays one of the key roles in nature. The biological activity of molecules and the performance of their target functions depend on the features of this process. However, the study of the biomolecule hydration is a non-trivial task for both experimental methods and computer simulations. The paper demonstrates the possibilities of the non-empirical 3D-SDFT/3D-RISM approach based on the 3D-distribution of the solvent atomic density to study the features of biomolecule hydration using the example of a number of amino acids such as Gly-ZW, L-Ala-ZW, L-Val-ZW, L-Pro-ZW, two model proteins such as BP-TI (bovine pancreatic trypsin inhibitor) and PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B), as well as complexes of the PTP1B protein with inhibitors. The presented results show that the approach allows one to describe in detail and at the same time a holistic description of the hydration shell structure of biomolecules.

*Keywords: biomolecules, hydration, hydration shell structure, methods of the theory of liquids*

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНТЕРКОМБИНАЦИОННОЙ КОНВЕРСИИ В ТРИПЛЕТНОЕ СОСТОЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА В КОМПЛЕКСАХ С АМИНОКИСЛОТАМИ

© 2023 г. А.С. Бучельников<sup>\*,#</sup>, П.А. Соколов<sup>\*,\*\*</sup>, Р.Р. Рамазанов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Севастопольский государственный университет, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

<sup>\*\*</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

<sup>#</sup>E-mail: tolybas@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Важным фотофизическим процессом, определяющим эффективность фотосенсибилизаторов, является насыщение триплетного состояния посредством интеркомбинационной конверсии при поглощении света. В настоящей работе мы рассмотрели перспективные в качестве фотосенсибилизаторов комплексы фуллерена C<sub>60</sub> с аминокислотами глицином, лизином, метионином и треонином. Расчеты демонстрируют высокие значения констант скоростей перехода в триплетные состояния и высокую вероятность способности генерировать активные формы кислорода при возбуждении в видимом диапазоне. При этом карбоксильные группы аминокислот, не участвующие в электронном возбуждении, могут быть использованы для конъюгации фотоактивных комплексов со средствами доставки к опухолям, такими как специфичные ДНК-аптамеры.

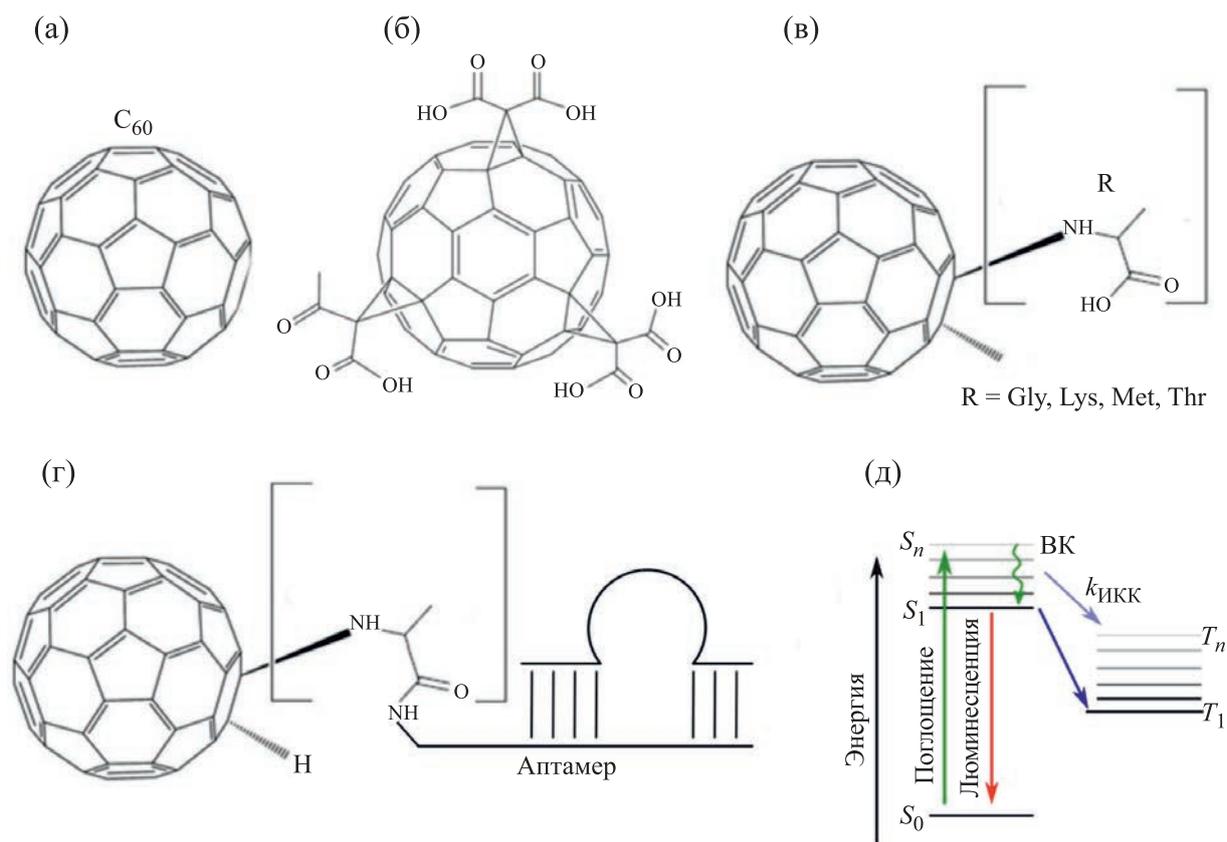
*Ключевые слова:* аминокислота, аптамер, конъюгат, синглетный кислород, фотодинамическая терапия, фуллерен.

DOI: 10.31857/S0006302923030022, EDN: PGDRZM

Проведение химиотерапии вызывает тяжелые побочные эффекты для организма человека. Эта проблема обуславливает поиск новых неинвазивных методов [1]. Одним из наиболее эффективных неинвазивных методов лечения различных злокачественных опухолей является фотодинамическая терапия, использующая фотосенсибилизаторы [2]. Такая терапия оказывает наиболее мягкое воздействие на организм, снижая уровень побочных эффектов. Однако, как правило, в рамках нецелевых механизмов доставки фотосенсибилизаторов только небольшое их количество способно пассивно накапливаться в очагах опухолей, а остальная часть распределяется в здоровых тканях, вызывая побочные эффекты [3]. Таким образом, для повышения эффективности фотодинамической терапии в настоящее время исследования направлены на разработку носителей фотосенсибилизаторов на основе специфических рецепторов клеточных белков, способствующих активному захвату и адсорбции фотосенсибилизаторов только в опухолевых участках.

Последние разработки направлены на повышение фотостабильности фотосенсибилизаторов с последующим снижением рабочей концентрации в живой ткани [4]. В качестве решения был предложен фуллерен C<sub>60</sub> [5], который имеет расширенное π-сопряжение, что позволяет ему поглощать свет в широком диапазоне вплоть до инфракрасной области, а также обладает высоким выходом в долгоживущее триплетное состояние (рис. 1а). Это позволяет ему эффективно генерировать активную форму синглетного кислорода <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в водной среде при облучении. Долгоживущее триплетное состояние T<sub>1</sub> образуется в результате процесса интеркомбинационной конверсии (ИКК) из возбужденного синглетного состояния S<sub>1</sub>, когда фуллерен в основном состоянии поглощает фотон. После перехода в триплетное состояние фуллерен может передать возбуждение молекуле кислорода, которая находится в триплетном состоянии <sup>3</sup>O<sub>2</sub>, после чего образуется синглетная форма кислорода. Молекула <sup>1</sup>O<sub>2</sub> обладает высокой химической активностью и спо-

*Сокращения:* ИКК – интеркомбинационная конверсия, НТФП – нестационарная теория функционала плотности.



**Рис. 1.** Структуры: (а) – фуллерена C<sub>60</sub>; (б) – комплекса фуллерена C<sub>60</sub> с трималеновой кислотой; (в) – рассматриваемых в данной работе комплексов фуллеренов C<sub>60</sub> с различными аминокислотными заместителями: R = Gly, Lys, Met, Thr; (г) – схема конъюгации аптамера ДНК с модифицированным фуллереном; (д) – диаграмма Яблонского с указанием процесса интеркомбинационной конверсии (ИКК) из состояния S<sub>1</sub> в T<sub>1</sub>.

собна окислять липиды, белки и нуклеиновые кислоты, вызывая гибель клеток [6].

Поскольку сам фуллерен плохо растворим в воде, используют его водорастворимые производные [7]. Для его функционализации применяют различные заряженные группы — гидроксилы, кислоты или аммониевые группы [8]. Модификация фуллерена позволяет не только влиять на его фотофизические характеристики, но и открывает возможность создания конъюгата с транспортным носителем, который специфичен к белкам клеточной поверхности. Предполагается, что такой носитель не должен влиять на эффективность генерации активного кислорода фуллерена, но при этом должен доставлять фотосенсибилизаторы непосредственно к поверхности злокачественных клеток. ДНК-аптамеры могут быть использованы в качестве носителей фуллерена [9], которые проявляют специфичность к клеточной поверхности и могут улучшать адсорбцию фотосенсибилизаторов. Было показано, что конъюгация фуллерена, модифицированного трималеновой кислотой (рис. 1б), с аптамером ДНК-носи-

теля адресной доставки к клеткам рака легкого A549, которые стабильно экспрессируют эпидермальный фактор роста, позволяет фотосенсибилизаторам эффективно накапливаться в клеточных лизосомах [10]. Такое расположение конъюгата «фуллерен–аптамер» способствует продукции внутриклеточных активных форм кислорода при световом облучении, что позволяет эффективно уничтожать раковые клетки. В этом смысле возник интерес к рассмотрению биосовместимых водорастворимых органических соединений, таких как аминокислоты, в качестве присоединенных функциональных групп, которые могут действовать как линкер между аптамером и фуллереном C<sub>60</sub>. Такие конъюгаты могут быть получены с помощью простых и дешевых методов органической химии, обеспечивающих доступное разнообразие благодаря достаточному количеству природных аминокислот [8].

В данной работе мы провели теоретическую оценку эффективности выхода в триплетное состояние за счет интеркомбинационной конверсии и возможности использования производных

фуллеренов в комплексе с различными аминокислотами, протоколы синтеза которых хорошо отработаны в литературе (рис. 1в). В качестве объектов были рассмотрены конъюгаты фуллерена с полярными незаряженными (метионином [11] и треонином [12]), неполярными (глицином [13]) и полярными заряженными положительно (лизин) аминокислотами в сравнении с хорошо изученным нефункционализированным  $C_{60}$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Когда фуллерен поглощает фотон, он переходит из основного состояния  $S_0$  в возбужденное состояние  $S_n$  в зависимости от энергии фотона, затем может безызлучательно релаксировать путем внутренней конверсии в состояние  $S_1$ , а затем либо по правилу Каша высветить фотон люминесценции, либо через интеркомбинационную конверсию перейти в триплетное состояние  $T_1$  (рис. 1д). Прежде всего, мы получили информацию о равновесной геометрии комплексов в основном состоянии  $S_0$  и рассчитали энергии Франка–Кондона синглетных и триплетных возбужденных состояний. Геометрические параметры основного состояния  $S_0$  всех молекул были оптимизированы на уровне теории функционала плотности [14] с использованием гибридного функционала B3LYP [15] и базисного набора 6-31G(d,p) [16], реализованных в пакете Gaussian 09 [17]. Такой уровень теории в достаточной степени удовлетворяет качественной оценке электронных свойств фуллеренов [18]. Расчеты энергий возбуждения первых десяти синглетных ( $S_n$ ) и триплетных ( $T_n$ ) электронных состояний проводились с использованием нестационарной теории функционала плотности (НТФП) с функционалом B3LYP для всех молекул. Поскольку ИКК вызвано спин-орбитальным взаимодействием, необходимо рассчитать матричные элементы спин-орбитального взаимодействия. Для расчета константы скорости интеркомбинационной конверсии ( $k_{ИКК}$ ) использовался одноэлектронный оператор спин-орбитального взаимодействия гамма-матрицы Паули–Брейта. Энергии возбуждения, рассчитанные на уровне НТФП, использовались в качестве значений нулевого порядка. Спин-орбитальное взаимодействие является оператором возмущения процесса ИКК и зависит только от пространственных и спиновых координат электронов [19]. Элементы матрицы спин-орбитального взаимодействия  $\langle S_n | H_{CO} | T_n \rangle$  между синглетными и триплетными состояниями были рассчитаны на уровне НТФП/B3LYP с использованием программы MOLSOC [20] для всех структур. При расчете элементов матрицы учитывались десять низших синглет-синглетных и син-

глет-триплетных электронных переходов. В целом значения  $k_{ИКК}$  между состояниями  $S_n$  и  $T_n$  были рассчитаны с использованием метода, описанного ранее [21]. Согласно этому методу, если предположить в качестве обобщающего усреднения, что в процессе ИКК главная определяющая колебательная мода имеет частоту  $1400 \text{ см}^{-1}$ , то можно использовать следующую формулу:

$$k_{ИКК} = 1.6 \cdot 10^9 \langle \phi(T_n) | H_{CO} | \phi(S_n) \rangle^2 F_{0m},$$

где  $\langle \phi(T_n) | H_{CO} | \phi(S_n) \rangle$  – матрица спин-орбитального взаимодействия;  $F_{0m} = y^m \exp(-y)/m!$ , где фактор Хуанга–Рисса  $y$  имеет значение 0.3; при этом  $m \approx E(T_n) - E(S_n)$ , где  $E(T_n)$  и  $E(S_n)$  – энергии триплетных и синглетных состояний в  $\text{см}^{-1}$ .

Натуральные переходные орбитали для перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  процессов изображены с величиной изоповерхности 0.03 условных единиц.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно модельным представлениям константа скорости интеркомбинационной конверсии, обуславливающая эффективность насыщения триплетного состояния  $T_1$ , при условии, что эта скорость больше или сопоставима с константами излучательных процессов, определяется величиной спин-орбитального взаимодействия и величиной разницы в энергии между  $S_1$ - и  $T_1$ -состояниями. Из литературы известно, что фуллерены обладают слабой люминесценцией, поэтому даже при относительно небольших величинах  $k_{ИКК}$  процесс безызлучательного перехода в триплетное состояние может конкурировать с излучательным. Расчеты констант проводились с учетом синглетных возбужденных состояний, энергия которых не превосходит 0.1 эВ энергии  $S_1$  состояния, поскольку заселенность более высокоэнергетических состояний при комнатной температуре пренебрежимо мала.

В предыдущем исследовании было показано, что в спектре чистого фуллерена наблюдаются квазивырожденные синглетные и триплетные возбужденные состояния [21]. При этом все десять синглетных и триплетных возбужденных состояний находились в диапазоне 1.5 ... 2.1 эВ: три триплета с энергией 1.59 эВ, три триплета с энергией 1.92 эВ, четыре триплета с энергией 1.95 эВ и четыре синглета с энергией 2.09 эВ. Для правильной оценки константы интеркомбинационной конверсии необходимо было провести усреднение с учетом больцмановской заселенности по всем синглетным переходам и суммирование по всем триплетным переходам по формулам:

Таблица 1. НТФП энергии возбужденных состояний исследуемых комплексов

Конъюгат	$T_1$ , эВ	$T_2$ , эВ	$T_3$ , эВ	$T_4$ , эВ	$T_5$ , эВ	$S_1$ , эВ	$S_2$ , эВ
C <sub>60</sub> -Gly	1.5219	1.6407	1.6620	1.8752	1.8807	1.9071	2.0095
C <sub>60</sub> -Lys	1.5288	1.6444	1.6671	1.8784	1.8849	1.9087	2.0125
C <sub>60</sub> -Met	1.5288	1.6437	1.6681	1.8778	1.8856	1.9095	2.0132
C <sub>60</sub> -Thr	1.5285	1.6442	1.6657	1.8766	1.8846	1.9069	2.0118

$$k_{\text{ИКК}} = \sum_i a_i k_i^{\text{ИКК}}, k_i^{\text{ИКК}} = \sum_j k_{ij}^{\text{ИКК}},$$

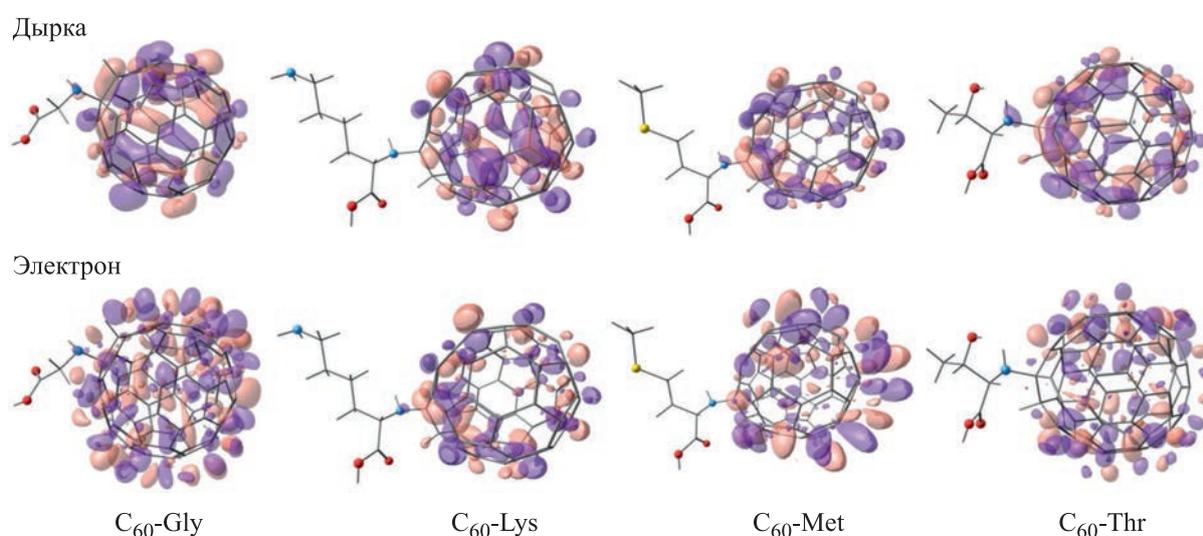
где  $i$  — начальное  $S$ -состояние,  $a_i$  представляет бoльцмановскую заселенность  $i$ -го состояния,  $j$  определяет триплетное  $T$ -состояние.

В результате оценки была получена константа  $k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_n) = 1.34 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ . В табл. 1 представлены первые семь возбужденных состояний в исследуемых комплексах. Энергии триплетов и синглетов смещаются в красную область относительно спектра нефункционализированного фуллерена. Необходимо отметить главные закономерности, которые учитывались при расчете констант ИКК. Во-первых, отличие между  $S_2$  и  $S_1$  составляет порядка 0.1 эВ, поэтому мы рассмотрели процесс ИКК только из  $S_1$ -состояния. Во-вторых, ниже  $S_1$ -состояния находятся пять триплетов, которые могут участвовать в ИКК. Заметим, что добавление различных заместителей аминокислот практически не влияет на энергии возбужденных состояний. Внимательное рассмотрение натуральных переходных орбиталей,

соответствующих переходу  $S_0 \rightarrow S_1$  или  $S_1 \rightarrow T_1$ , показывает, что основные орбитали, участвующие в возбуждении, локализованы на  $\pi$ -сопряжении фуллерена (рис. 2). Большое количество квазивырожденных орбиталей фуллерена заполняют все верхние молекулярные орбитали комплекса.

Необходимо отметить, что орбитали, участвующие в переходе  $S_0 \rightarrow S_1$ , не затрагивают карбоксильные группы аминокислот, которые должны быть использованы для конъюгации с аптамерами. Карбоксильные группы оптически активны в области 5 эВ, поэтому молекулярные орбитали карбоксилатов лежат гораздо ниже высшей занятой молекулярной орбитали полиароматической поверхности фуллерена. Это позволяет сделать вывод, что пришивка аптамера к фуллерену посредством аминокислот не должна оказывать влияния на фотосистему, а соответственно на процесс перехода в триплетное состояние и последующую генерацию активного кислорода.

Рассмотрим результаты расчета констант ИКК. В табл. 2 представлены матричные элементы спин-орбитального взаимодействия и константы ИКК. Полученные значения констант

Рис. 2. Натуральные переходные орбитали, соответствующие переходу  $S_0 \rightarrow S_1$  в исследуемых комплексах.

**Таблица 2.** Матричные элементы спин-орбитального взаимодействия и константы интеркомбинационной конверсии для исследуемых комплексов

Конъюгат	C <sub>60</sub> -Gly	C <sub>60</sub> -Lys	C <sub>60</sub> -Met	C <sub>60</sub> -Thr
$\langle S_1   H_{CO}   T_1 \rangle, \text{см}^{-1}$	0.56	0.58	0.57	0.56
$\langle S_1   H_{CO}   T_2 \rangle, \text{см}^{-1}$	0.30	0.31	0.30	0.31
$\langle S_1   H_{CO}   T_3 \rangle, \text{см}^{-1}$	0.07	0.07	0.07	0.07
$\langle S_1   H_{CO}   T_4 \rangle, \text{см}^{-1}$	0.78	0.77	0.79	0.78
$\langle S_1   H_{CO}   T_5 \rangle, \text{см}^{-1}$	0.48	0.49	0.49	0.48
$k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_1), \text{с}^{-1}$	$1.0 \cdot 10^7$	$1.2 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^7$
$k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_2), \text{с}^{-1}$	$4.4 \cdot 10^7$	$1.3 \cdot 10^7$	$1.3 \cdot 10^7$	$1.4 \cdot 10^7$
$k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_3), \text{с}^{-1}$	$5.8 \cdot 10^6$	$0.9 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^6$
$k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_4), \text{с}^{-1}$	$6.0 \cdot 10^7$	$6.2 \cdot 10^7$	$6.4 \cdot 10^7$	$6.4 \cdot 10^7$
$k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_5), \text{с}^{-1}$	$2.9 \cdot 10^8$	$2.6 \cdot 10^8$	$2.5 \cdot 10^8$	$2.5 \cdot 10^8$
$k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_n), \text{с}^{-1}$	$3.6 \cdot 10^8$	$3.5 \cdot 10^8$	$3.4 \cdot 10^8$	$3.4 \cdot 10^8$

слабо отличаются друг от друга, поскольку влияние привитых аминокислот на фотосистему фуллерена незначительно. Как было показано ранее [21], нефункционализированный фуллерен и фуллерен, модифицированный трималоновой кислотой, имеют константы  $k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_n) = 1.34 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$  и  $k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_n) = 9.16 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$  соответственно. Для комплексов фуллерена с аминокислотами константы лежат в пределах  $(3.4 \dots 3.6) \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$  и немного превосходят константу для нефункционализированного C<sub>60</sub>. Эти константы хорошо соответствуют экспериментальной оценке  $k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_n) = 7.1 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$  для подобного модифицированного фуллерена PC<sub>60</sub>BM (метиловый эфир [6,6]-фенил-C<sub>61</sub>-масляной кислоты). Поскольку экспериментально показано, что эффективность выхода в триплетное состояние с последующей генерацией активного кислорода у нефункционализированного фуллерена и модифицированного трималоновой кислотой велики, можно ожидать, что исследуемые модифицированные комплексы с аминокислотами также будут активны.

## ВЫВОДЫ

Процессы интеркомбинационной конверсии модифицированного аминокислотами (Gly, Met, Thr, Lys) фуллерена C<sub>60</sub> исследованы путем рас-

чета матричных элементов спин-орбитального взаимодействия и соответствующих констант ИКК. Сравнительные результаты показывают, что модификация фуллерена аминокислотами, так же, как и трималоновой кислотой, существенно не меняет диапазон энергий возбуждения фуллерена. Это означает, что такие модификации можно использовать в аналогичных протоколах фотодинамической терапии.

Расчитанные значения  $k_{\text{ИКК}} (S_1 \rightarrow T_n)$  свидетельствуют о достаточно эффективном процессе насыщения триплетного состояния через ИКК, что не противоречит экспериментам для подобных систем. Комплексы фуллерена с аминокислотами являются хорошими кандидатами на фотоактивные системы. При возбуждении комплексов с аминокислотами в возбуждении не участвуют карбоксильные группы, которые могут быть необходимы для образования линкера с ДНК-аптамером. Это означает, что образование таких надмолекулярных структур может не затрагивать электронную структуру фотоактивной части конъюгата, что также существенно расширяет возможности использования аминокислот в области создания фотосенсибилизаторов нового поколения.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-01066).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. G. Mokwena, C. A. Kruger, M. T. Ivan, et al., *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **22**, 147 (2018).
2. Y. N. Konan, R. Gurny, and E. Allémann, *J. Photochem. Photobiol. B*, **66** (2), 89 (2002).
3. N. Hodgkinson, C. A. Kruger, and H. Abrahamse, *Tumor Biol.*, **39** (10), 1 (2017).
4. L. Benov, *Med. Princ. Pract.*, **24** (Suppl. 1), 14 (2015).
5. H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, et al., *Nature*, **318** (6042), 162 (1985).
6. Y. Zhang, B. Wang, R. Zhao, et al., *Mater. Sci. Eng. C*, **115**, 111099 (2020).
7. M. R. Hamblin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **17** (11), 1515 (2018).
8. V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, N. E. Podolsky, et al., *J. Mol. Liq.*, **323**, 114990 (2021).
9. R. Yazdian-Robati, P. Bayat, F. Oroojalian, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **155**, 1420 (2020).
10. Q. Liu, L. Xu, X. Zhang, et al., *Chem. Asian J.*, **8** (10), 2370 (2013).
11. V. V. Sharoyko, O. S. Shemchuk, A. A. Meshcheriakov, et al., *Nanomedicine NBM*, **40**, 102500 (2022).
12. G. G. Panova, E. B. Serebryakov, K. N. Semenov, et al., *J. Nanomater.*, **2019**, 2306518 (2019).
13. G. Jiang, F. Yin, J. Duan, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **26** (1), 24 (2015).
14. M. E. Casida, in *Recent Advances in Density Functional Methods. Part I*, Ed. by D. P. Chong (World Scientific, Singapore, 1995), Chap. 5, pp. 155–192.
15. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, **98** (7), 5648 (1993).
16. G. A. Petersson, A. Bennett, T. G. Tensfeldt, et al., *J. Chem. Phys.*, **89** (4), 2193 (1988).
17. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, et al., *Gaussian 09 Revision A.01* (Gaussian, Inc., Wallingford CT (USA), 2016).
18. R. H. Xie, G. W. Bryant, L. Jensen, et al., *J. Chem. Phys.*, **118** (19), 8621 (2003).
19. C. M. Marian, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, **2** (2), 187 (2012).
20. S. G. Chiodo and M. Leopoldini, *Comput. Phys. Commun.*, **185** (2), 676 (2014).
21. R. R. Ramasanoff and P. A. Sokolov, *Chem. Phys. Lett.*, **807**, 140076 (2022).

## Evaluation of the Efficiency of Intersystem Crossing to a Triplet State of Fullerene in Complexes with Amino Acids

A.S. Buchelnikov\*, P.A. Sokolov\*, \*\*, and R.R. Ramasanoff\*

\*Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

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

The important photophysical process that determines the efficiency of photosensitizers is saturation of a triplet state by intersystem crossing during light absorption. In the present work, C<sub>60</sub> fullerene complexes with amino acids glycine, lysine, methionine and threonine were studied as promising photosensitizers. All these complexes, for which the calculations were done, demonstrate high values of rate constants of transition to triplet states and a high probability of the ability to generate reactive oxygen species through excitation in the visible spectrum. The carboxyl groups of amino acids that are not involved in electronic excitation can be used as the component of specific DNA aptamers for conjugation to photoactive complexes for a tumor-targeting drug delivery system.

*Keywords: amino acid, aptamer, conjugate, singlet oxygen, photodynamic therapy, fullerene*

## СОСТАВ И МИТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *Solanum tuberosum* L.

© 2023 г. Е.А. Генералов\*, \*\*, #, Л.В. Яковенко\*

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

#E-mail: generals1179@gmail.com

\*\*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России  
(Сеченовский университет), Трубецкая ул., 8/2, Москва, 119991, Россия

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

Полисахарид STP был выделен из водного экстракта *Solanum tuberosum* L. и очищен с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Его молекулярную массу определяли с помощью гельпроницающей хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии, а его моносахаридный состав анализировали методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии с использованием пламенно-ионизационного детектора и капиллярной колонки. Было показано, что полисахарид STP состоял из галактозы и арабинозы в количествах 37.5% и 23.5% соответственно, а также урановых кислот (9.7%), остатков моносахарида глюкозы (15%) и белков (не менее 9%). Молекулярная масса STP составляла 70 кДа. Для структурного анализа STP использовали метод ИК-Фурье-спектроскопии. Митогенная активность экстрагированного полисахарида сравнима с активностью липополисахарида.

*Ключевые слова:* *Solanum tuberosum*, полисахариды, моносахаридный состав, митогенная активность.

DOI: 10.31857/S0006302923050034, EDN: PGFGEA

*Solanum tuberosum* L. (картофель) относится к семейству пасленовых. Это всемирно известное культурное растение, дающее высокие урожаи ценных в питательном отношении продуктов питания в виде клубней. Сырой картофель, картофельный сок и ткани использовались в качестве лекарственного средства [1, 2] для лечения желудочно-кишечных дисфункций и в качестве противовоспалительного средства [3–6]. Существуют хорошо известные способы экстракции клеточных стенок картофеля и исследования их состава и структуры содержащихся в них полисахаридов [7–9]. К сожалению, нет данных по растворимым полисахаридам картофельного сока. В настоящем исследовании мы экстрагировали, выделили и очистили полисахаридные компоненты из *Solanum tuberosum*, определили их молекулярные массы, а также их моносахаридный состав для дальнейшего изучения механизма их действия.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стандарты (моносахариды, урановые кислоты, производные моносахаридов, декстраны) бы-

ли приобретены у Sigma (США), DEAE-целлюлоза и сефадекс G-100 – у Whatman (Великобритания) и Pharmacia LKB Biotechnology AB (Швеция) соответственно. Содержание углеводов в различных фракциях элюата контролировали с использованием фенол-сернокислотного метода с помощью спектрофотометра UV-1800 UV-Vis (Shimadzu Corporation, Япония).

**Растительный материал.** Полисахариды были экстрагированы из клубней картофеля сортов Жуковский Ранний и Red Scarlet, отобранных в Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева. Использовали клубни технической спелости.

**Приготовление экстрактов.** Клубни картофеля промывали под проточной водой и высушивали на воздухе. Затем 1 кг клубней гомогенизировали в 1 л ледяной деионизированной воды, содержащей 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, в охлажденном блендере для измельчения. После шнекового прессования гомогената оставшуюся выжимку снова смешивали с 1 л ледяной деионизированной воды, содержащей 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, и перемешивали при 40°C. Полученную суспензию снова отжимали и цен-

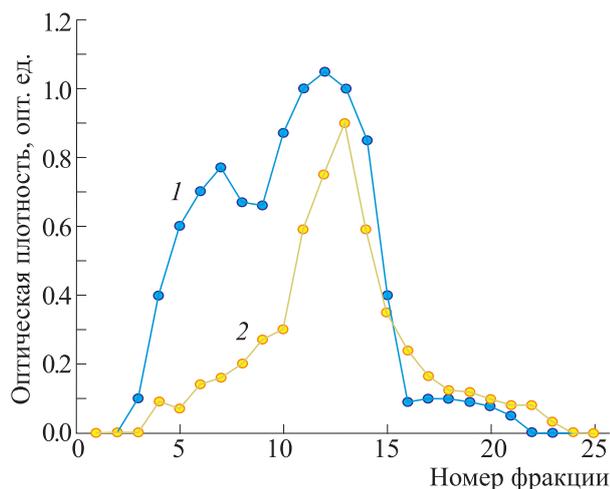


Рис. 1. Кривые элюирования при 490 нм (1) и 220 нм (2) на ДЭАЭ-целлюлозе.

трифугировали при 4°C/20000 g в течение 30 мин. Супернатанты объединяли и фракционировали методом ультрафильтрации на системе Slice Crossflow System (Sartorius Stedim Biotech, США). Фракции с молекулярной массой 10–100 кДа собирали с помощью соответствующих кассет Sartoson Slice Cassettes. Концентрат нагревали до 100°C при постоянном перемешивании. Затем экстракт охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 4°C/15000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант подвергали сублимационной сушке для фракционирования и дальнейшего анализа.

**Выделение и очистка.** Лиофилизированную фракцию растворяли в цитратном буфере (0.01 M, pH 6.6) до концентрации 1% (вес.), центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин и подвергали хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (650 S TSK (2.6 × 35 см) с элюированием дистиллированной водой и ступенчатым градиентом хлорида калия (0.1–1 M). На рис. 1 представлены кривые элюирования при 220 нм и 490 нм. На кривой элюирования при 490 нм видны три пика, поэтому для дальнейшего анализа были выбраны фракции 11–14, которые объединили, концентрировали и лиофилизировали. Затем смесь подвергали колоночной хроматографии с ДЭАЭ-целлюлозой. Содержание углеводов во фракциях контролировали фенол-сернокислотным методом [14]. На рис. 2 представлены кривые элюирования объединенных фракций 11–14. Далее этот материал подвергали хроматографии на колонке с сефадексом G-100 (5.0 × 100 см) с элюированием дистиллированной водой и контролем фенол-сернокислотным методом. Соответствующая кривая элюции показана на рис. 3. Фракции с объемом элюции 600–800 мл были объединены,

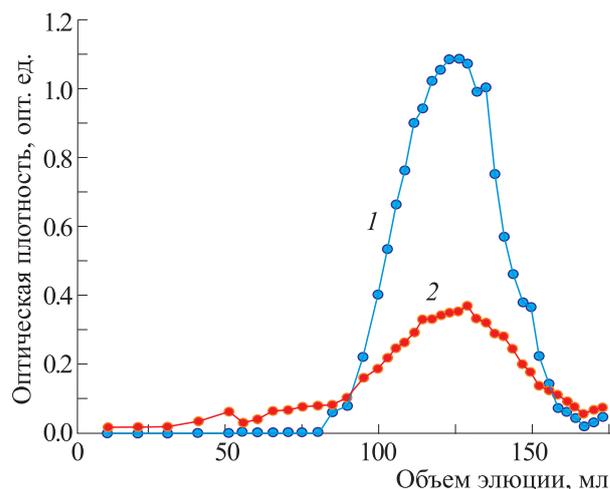


Рис. 2. Кривые элюирования объединенных фракций 11–14 при 490 нм (1) и 220 нм (2) на ДЭАЭ-целлюлозе.

сконцентрированы и в дальнейшем обозначены как фракция STP.

**Определение молекулярной массы.** Молекулярную массу фракции STP рассчитывали с использованием калибровочной кривой, на которой логарифм молекулярной массы стандартов декстрана в диапазоне от 1 до 100 кДа откладывался в зависимости от коэффициента распределения для гель-фазы  $K_{av}$ :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0},$$

где  $V_e$  – объем элюирования;  $V_0$  – свободный объем в колонке (определяется с использованием синего декстрана) и  $V_c$  – объем колонки.

**Метод ВЭЖХ-ГПХ.** Была использована система ВЭЖХ серии Prominence (Shimadzu Corpora-

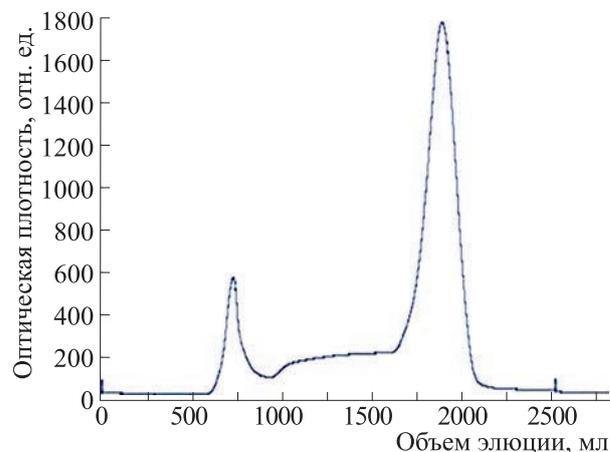


Рис. 3. Кривая элюирования STP на колонке с сефадексом G-100.

tion, Япония) с детектором на фотодиодной матрице (для детектирования был выбран диапазон 220 нм) и колонкой TSKgel G4000PW из нержавеющей стали ( $7.5 \times 300$  мм) (Tosoh Bioscience GmbH, Германия). Хроматографию проводили в обычном режиме с использованием буферного раствора  $0.1$  М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  с  $0.1$  М  $\text{NaCl}$  (рН 6.8) при постоянной скорости потока  $1$  мл/мин при температуре окружающей среды. Обычно  $10$  мкл  $1\%$ -го раствора образца растворяли в подвижной фазе и вводили в колонку.

**Анализ моносахаридного состава.** Гидролиз полисахаридов проводили  $2$  М трифторуксусной кислотой с дальнейшим восстановлением моносахаридов до соответствующих полиолацетатов [10, 11]. После гидролиза образцы центрифугировали при  $6000$  г в течение  $5$  мин и фильтровали через шприц-фильтр  $0.22$  мкм (Millipore, США). Конечные полиолацетаты анализировали методом ГХ-ПИД.

Перед анализом ГХ-ПИД для метанолиза полисахаридов использовали  $0.5$  М  $\text{HCl}$  в метаноле ( $4$  ч при  $85^\circ\text{C}$ ) и триметилсилил для дериватизации [12]. Затем состав определяли путем калибровки со стандартными моносахаридами/уроновыми кислотами и количественно определяли с использованием внутреннего стандарта сциллоинозитола.

Гидролиз полисахаридов проводили с помощью  $2$  М трифторуксусной кислоты [10, 11]. После гидролиза образцы центрифугировали при  $6000$  г в течение  $5$  мин и фильтровали через шприц-фильтр  $0.22$  мкм. Окончательное разделение моносахаридов проводили с помощью ВЭЖХ. Затем состав определяли путем калибровки стандартными моносахаридами/уроновыми кислотами и количественно определяли с использованием внутреннего стандарта мальтита.

**Метод ВЭЖХ.** Были использованы ВЭЖХ-система Prominence Series (Shimadzu Corporation, Япония) с матричным фотодиодным детектором (для детектирования была выбрана полоса  $190$  нм), колонка Shodex Asahipak NH2P-50 4E ( $4.6 \times 250$  мм) (Showa Denko America, Inc., США) и защитная колонка NH2P-50G 4A ( $4.6 \times 10$  мм) (Showa Denko America, Inc., США). Хроматографию проводили в низкоградиентном режиме при  $50^\circ\text{C}$  с использованием в качестве элюента ацетонитрила и смеси  $3\%$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $75/25\%$ ). Скорость потока —  $1$  мл/мин, объем ввода —  $5$  мкл.

**Метод ГХ-ПИД.** В этом методе систему Shimadzu GC-2014 GC-FID (Shimadzu Corporation, Япония) с колонкой ZB5-ms ( $30$  м, внутр. диаметр  $0.25$  мм, толщина пленки  $0.25$  мкм) (Phenomenex Inc., США) и Shimadzu Split/Splitless FocusLiner, инжектор с внутренним диаметром  $3.4$  мм был установлен на  $300^\circ\text{C}$ , вводили  $1$  мкл, детектор был установлен на  $300^\circ\text{C}$ . Программа печи:  $140^\circ\text{C}$ , вы-

держка  $2$  мин, подъем до  $250^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ ), выдержка  $10$  мин, подъем до  $265^\circ\text{C}$  ( $15^\circ\text{C}/\text{мин}$ ), выдержка  $5$  мин.

**ИК-Фурье-спектроскопия.** Инфракрасные спектры образца/таблетки  $\text{KBr}$  регистрировали на спектрометре Spectrum 100 FT-IR (Shimadzu Corporation, Япония) при комнатной температуре в диапазоне  $4000\text{--}400$   $\text{cm}^{-1}$ .

**Животные.** Мыши ( $F_1(\text{CBA} \times \text{C57Bl}/6)$ , самцы, возраст  $8$  недель) были получены из филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН в Пущино (Московская область). Животных помещали в карантин на  $2$  недели. Селезенки собирали асептическим методом.

**Забор селезенки и выделение клеток.** Удаленные у мышей селезенки собирали в стерильный сбалансированный солевой раствор Хэнка (Millipore, Sigma-Aldrich, Supelco) в стерильную центрифужную пробирку объемом  $15$  мл на льду. С помощью стерильных пинцетов и марли селезенки промокали для удаления лишней жидкости и взвешивали. После регистрации веса селезенки промывали примерно в  $5$  мл среды RPMI с добавками в стерильной культуральной чашке. Среда RPMI с добавками содержала  $10\%$  эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США),  $1\%$  пенициллина/стрептомицина (Cambrex, США) и  $1\%$  L-глутамина (Cambrex, США). Предметные стекла микроскопа стерилизовали пламенем и их охлажденные концы использовали для гомогенизации селезенки. Изолированные спленоциты оставляли на льду до тех пор, пока не были выделены все образцы, а затем центрифугировали при  $400$  г в течение  $20$  мин. Осажденные спленоциты ресуспендировали в  $2$  мл среды RPMI с указанными добавками. Лимфоциты подсчитывали и определяли жизнеспособность каждого образца путем исключения трипанового синего на гемоцитометре. Количество и жизнеспособность регистрировали и использовали для нормализации количества лимфоцитов во время посева клеток для анализа иммунной функции.

**Митогенная активность.** Митогенную активность исследовали с использованием метода Эрне–Нордина [13]. В этих экспериментах использовали мышей линий  $F_1(\text{CBA} \times \text{C57Bl}/6)$  — самцов с массой тела  $18\text{--}20$  г. В качестве антигена для иммунизации использовали эритроциты барана.

Субстанцию STP растворяли в  $0.9\%$   $\text{NaCl}$ , фильтровали через фильтр  $0.22$  мкм и вводили мышам внутрибрюшинно в дозах  $100$  мкг/мышь или  $500$  мкг/мышь однократно в  $0.5$  мл раствора.

Мышей умерщвляли на пятые сутки после иммунизации путем смещения шейных позвонков и извлекали селезенки. Селезенки помещали в сре-

ду RPMI, содержащую глутамат (4 мл на одну селезенку).

Эритроциты дефибринированной бараньей крови трижды промывали центрифугированием в 50-кратном объеме раствора Хэнка, затем ресуспендировали в том же растворе. Контрольным мышам вводили эритроциты барана ( $2 \times 10^6$ ), опытным мышам вводили эритроциты барана ( $2 \times 10^6$ ) и STP в количестве 100 или 500 мкг/мышь, мышам из группы положительного контроля вводили эритроциты барана ( $2 \times 10^6$ ) и 10 мкг/мл липополисахарида (LPS из *E. coli* 0127:B8, Sigma-Aldrich, США) внутривенно. Каждая группа состояла из десяти подопытных животных. Уровень иммунного ответа у мышей F<sub>1</sub>(СВАхС57В1/6), иммунизированных эритроцитами барана, определяли по количеству антителообразующих клеток, выявляемых в селезенке по количеству зон лизиса в агаре и клеточности селезенки прямым подсчетом клеток через пять суток после иммунизации. Эксперимент был повторен три раза.

Для формирования агарозного слоя 150 мг 3% агарозы растворяли в 48 мл раствора PBS:RPMI (1:2 по объему) на кипящей водяной бане в течение часа. Доводили pH до диапазона  $6.9 \pm 0.5$  и раствор помещали на кипящую баню на 5 мин. Горячую агарозу термостатировали при 47°C в течение 10 мин и добавляли предварительно промытые эритроциты до 20% конечного объема. Полученный раствор тщательно перемешивали и аликвотами по 3 мл разливали в чашки Петри ( $d = 8.5$  см), нагретые до 47°C, встряхивая для равномерного распределения раствора. Агарозному слою давали остыть на равновесном столе, после чего его накрывали крышкой и термостатировали в течение 90 мин при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. Раствор комплемента (1 ампула объемом 1 мл сухого комплемента на 10 мл стерильного изотонического разового фосфатно-солевого буфера) медленно добавляли по 0.5 мл вдоль стенки, покрывая слой агарозы, после чего инкубировали в течение 15 мин – 1 ч (в зависимости от активности реакции комплемента для предотвращения полного лизиса) и подсчитывали зоны лизиса. Количество зон лизиса соответствует количеству антителообразующих клеток. Рассчитывали количество антителообразующих клеток на селезенку и коэффициент стимуляции.

Клетки селезенки суспендировали в 3 мл среды RPMI с добавками в концентрации  $4 \times 10^6$  клеток/мл. Для анализа бляшек по Эрне–Нордину среда с добавками содержала инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку (HyClone, США), 1% пенициллина/стрептомицина (Cambrex, США), 1% L-глутамин (Cambrex, США), 0.09% 55 мМ 2-меркаптоэтанола (Gibco,

США), 1% 100 мМ пирувата натрия (Cambrex, США) и 0.5% гентамицина (Gibco, США). Эритроциты барана (1% клеток в среде по объему) (Colorado Serum, США) промывали и суспендировали в среде RPMI с добавками и добавляли в соответствующие лунки 48-луночного планшета. Каждый образец иммунизировали эритроцитами барана в двух повторностях. Среду, не содержащую эритроцитов, использовали для неиммунизированных контрольных лунок для каждого образца. Клетки инкубировали в течение четырех суток при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После иммунизации клеток селезенки их промывали и ресуспендировали в среде с указанными добавками. Раствор 0.8% агарозы (SeaPlaque, Cambrex, Rockland, ME) в среде 2×RPMI (Gibco, США) нагревали до 43°C в стеклянных пробирках. В пробирки добавляли эритроциты барана и клетки селезенки, затем распределяли на предметные стекла микроскопа, покрытые агарозой, и инкубировали лицевой стороной вниз на специальных лотках для предметных стекол во влажном пластиковом боксе при 37°C в течение 1 ч.

Комплемент морской свинки (Colorado Serum, США) разбавляли 1:20 в фосфатно-солевом буфере Дульбекко, содержащем Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (Sigma-Aldrich, США), и нагревали до 37°C на водяной бане. Предметные стекла заливали разбавленным комплементом после инкубации в течение 1 ч. Предметные стекла извлекали из инкубатора и хранили в холодном 0.85% растворе хлорида натрия. Лизис эритроцитов барана определяли количественно путем подсчета бляшек на газоне «эритроциты барана/агар» с использованием препаративного микроскопа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем способе приготовления картофельного сока мы применили мягкое разрушение мякоти картофеля, что позволяет сохранить структуру пектина из клеточных стенок. Клубни картофельного пюре гомогенизировали в деионизированной воде с фенолметилсульфонилфторидом. После шнекового прессования гомогената, последующего повторного смешивания с деионизированной водой с фенолметилсульфонилфторидом и центрифугирования полученные супернатанты объединяли и фракционировали ультрафильтрацией. Собранные фракции с молекулярной массой 10–100 кДа повторно центрифугировали и полученный супернатант лиофилизировали для фракционирования и дальнейшего анализа.

После окончательной хроматографической очистки выделяли и концентрировали фракцию с молекулярной массой ~70 кДа (STP-фракцию). Молекулярную массу (MW) STP-фракции рас-

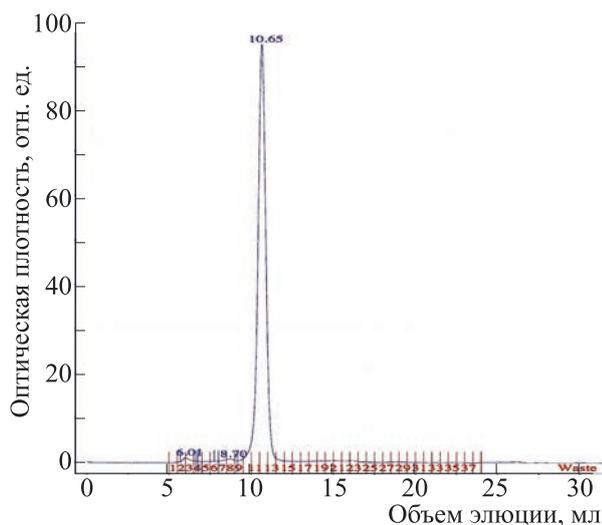


Рис. 4. Хроматограмма STP, полученная методом ВЭЖХ-ГПХ.

считывали на основе калибровочной кривой для декстрана, описываемой уравнением  $\lg(MW) = 5.0354 - 0.7553K_{av} - 3.6489K_{av}^2$ , где  $K_{av}$  – коэффициент распределения для гелевой фазы) [15].

Далее фракцию STP подвергали ВЭЖХ-ГПХ-хроматографии. На хроматограмме, приведенной

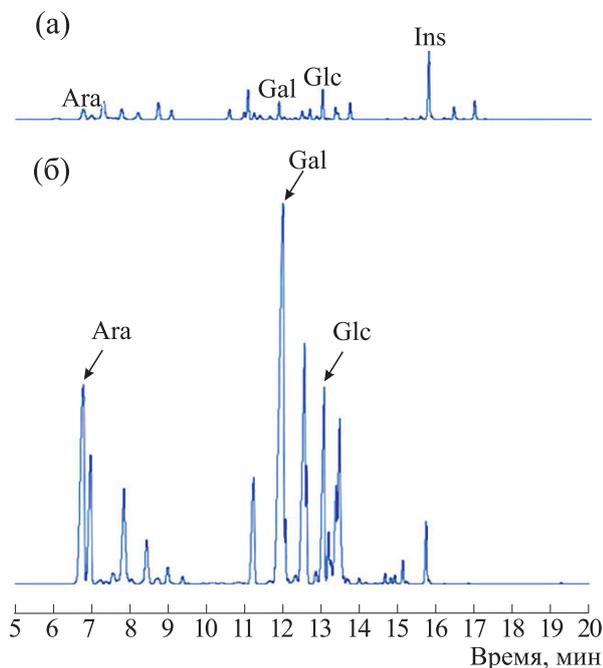


Рис. 5. Анализ методом ГХ-ПИД: (а) – смешанные стандарты: арабиноза, рамноза, фукоза, ксилоза, манноза, галактоза, глюкоза, глюкуроновая кислота, галактурановая кислота, N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин; (б) – STP после кислотного гидролиза с последующей дериватизацией.

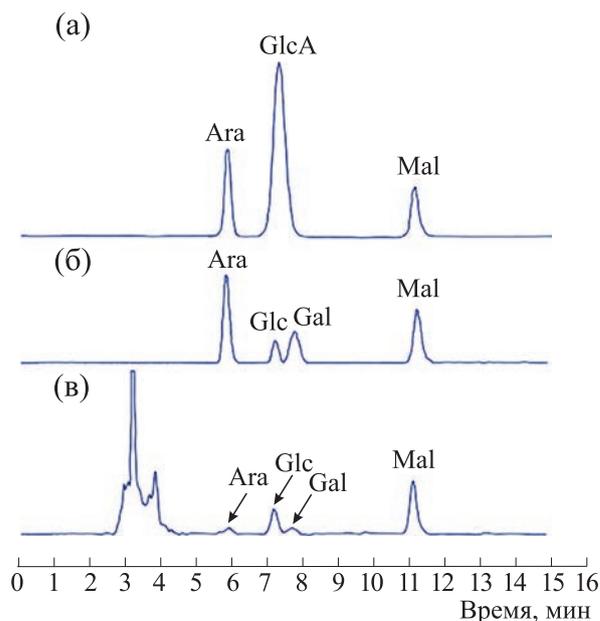


Рис. 6. Анализ методом ВЭЖХ: (а) – смешанные стандарты (арабиноза, глюкуроновая кислота, мальтит); (б) – смешанные стандарты (арабиноза, галактоза, глюкоза, мальтит); (в) – гидролизат STP.

на рис. 4, наблюдался симметричный пик, что указывает на гомогенность полисахаридного компонента. Молекулярную массу STP (70 кДа) рассчитывали на основе калибровочной кривой для декстрана:  $\lg(MW) = -3.1086 + 1.8812RT - 0.1103 RT^2$  ( $RT$  – время удерживания).

Анализ моносахаридного состава проводили методом ГХ-ПИД. Хроматограмма, представленная на рис. 5, показывает, что STP в основном состоит из галактозы и арабинозы – 39.7–41.9% и 27.1–28.3% соответственно, а также остатков моносахаридов глюкозы (8.5–9.2%), других веществ, идентифицированных колориметрическим методом с 3,5-диметилфенолом с использованием d-галактурановой кислоты в качестве стандарта [16] как уруновые кислоты (9.2–10.1%), и белков, определенных методом Бредфорда с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [13] (не менее 9%).

ВЭЖХ-хроматограмма на рис. 6 показывает присутствие галактозы и арабинозы (37.5% и 23.5% соответственно), а также остатков моносахаридов глюкозы и глюкуроновой кислоты.

Пики на ИК-Фурье-спектре представлены на рис. 7 и перечислены в табл. 1. Пики при 3442, 3377 и 3130  $\text{см}^{-1}$  соответствуют –С–Н групп  $\text{CH}_2$ . Растягивающие колебания С–О, С–С и кольцевых структур доминируют в области 1200–800  $\text{см}^{-1}$ .

Было обнаружено, что изгибные колебания (деформации) групп  $\text{CH}_2$  полезны для идентифи-

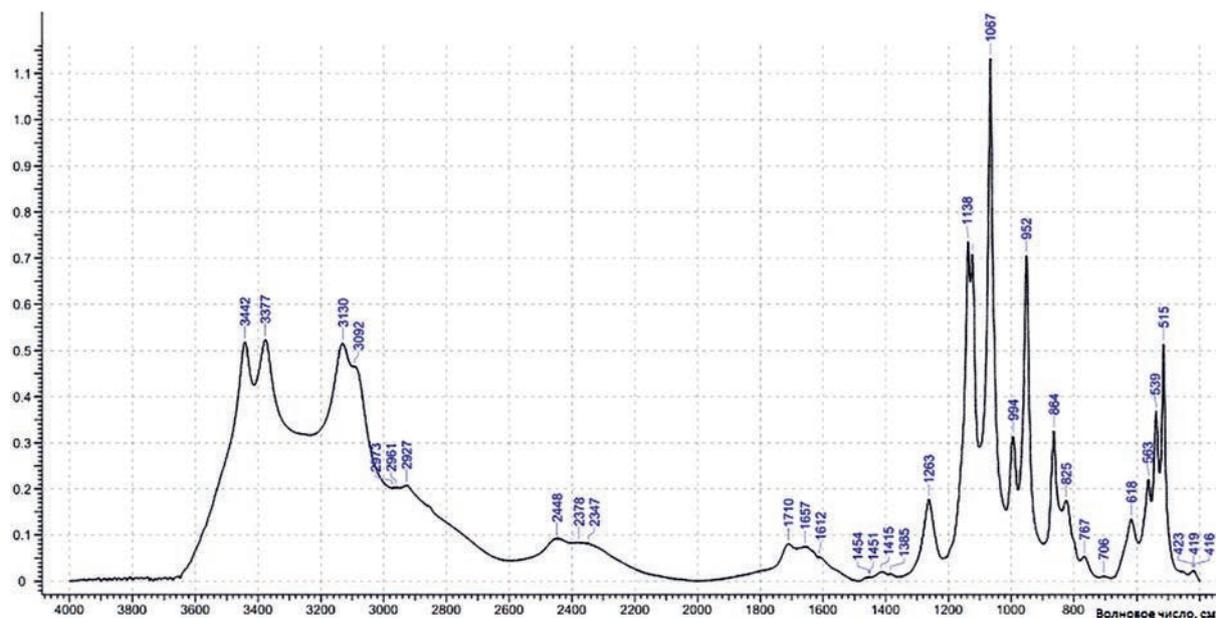


Рис. 7. ИК-Фурье-спектр STP.

кации полисахаридов. Сообщалось, что полосы при 1138, 1124 и  $1067\text{ см}^{-1}$  являются основными областями поглощения уруновых кислот. Полоса поглощения в диапазоне  $1100\text{--}1030\text{ см}^{-1}$  с максимумом при  $1067\text{ см}^{-1}$  может быть отнесена к галактозе [17, 18]. В ИК-спектрах представлены общие для всех углеводов пики [10, 11, 19].

Результаты анализа митогенной активности представлены в табл. 2. STP статистически значимо стимулирует как количество клеток селезенки, так и зоны лизиса в чашке с агаром. Таким образом, можно сделать вывод, что STP проявляет митогенную активность.

Была выделена одна значимая по биологической активности фракция с молекулярной массой 70 кДа, установлен ее моносахаридный состав и некоторые оптические свойства.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сочетание различных методов экстракции (ультрафильтрация) и очистки (гель-фильтрация, ионообменная хроматография) позволило получить гомогенную высокоочищенную полисахаридную фракцию. Данные ИК-Фурье-спектроскопии свидетельствовали о наличии уруновых кислот и галактозы в структуре соединения. Данные ВЭЖХ-ГПХ и ГХ-ПИД позволяют заклю-

Таблица 1. Данные ИК-Фурье-спектроскопии STP

Метод анализа	Пики ( $\text{см}^{-1}$ )
ИК-Фурье	3442, 3377, 3130, 2448, 1710, 1415, 1263, 1138, 1124, 1067, 994, 952, 864, 825, 618, 563, 539, 515, 419

Таблица 2. Данные анализа митогенной активности STP в селезенке мышей

	Количество клеток селезенки, млн	Количество антителообразующих клеток на селезенку
Контроль	$102,4 \pm 11,3$	$70,5 \pm 9,1$
LPS (10 мкг/мл)	$223,9 \pm 14,8^*$	$69,4 \pm 8,9$
STP 100 мкг/мышь	$216,0 \pm 22,5^*$	$102,3 \pm 13,9^*$
STP 500 мкг/мышь	$240,7 \pm 17,7^*$	$144,0 \pm 12,1^*$

Примечание. Приведены средние значения  $\pm$  средние квадратичные отклонения; \* $p < 0.05$  – статистически значимое отклонение от контроля.

чить, что данная молекула полисахарида, возможно, относится к группе арабиногалактана. Данный полисахарид показал высокую биологическую активность у мышей – митогенную активность, что, скорее всего, связано с его структурой.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность компании GlycoMar Limited, в частности доктору Ч.Д. Бэвингтону и доктору Д.С. Томсону за проведение анализа STP методом ГХ-ПИД, SGS Testing & Control Services Singapore Pte Ltd, в частности С. Рагупати и Ч. М. Э. Орзалес за ИК-спектроскопию STP.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в экспериментах, выполненных кем-либо из авторов, в отношении использованных в исследовании животных были соблюдены применимые стандарты исследований.

#### ДОСТУПНОСТЬ ОБРАЗЦОВ

Образцы соединений *Solanum tuberosum* L. доступны по запросу.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. E. Camire, S. Kubow, and D. J. Donnelly, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **49** (10), 823 (2009).
2. M. Kujawska, A. Olejnik, G. Lewandowicz, et al., *Nutrients*, **10** (2), 259 (2018).
3. J. E. Vlachojannis, M. Cameron, and S. Chrubasik, *Phytother. Res.*, **24** (2), 159 (2010).
4. H. Chen, J. Sun, J. Liu, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **131**, 484 (2019).
5. S. Chrubasik, T. Boyko, Y. Filippov, and T. Torda, *Phytomedicine*, **13** (8), 596 (2006).
6. M. G. Basilicata, G. Pepe, S. F. Rapa, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (23), 6087 (2019).
7. W. G. Jardine, C. H. L. Doeswijk-Voragen, I. M. R. MacKinnon, et al., *J. Sci. Food Agric.*, **82** (8), 834 (2002).
8. D. T. Do, J. Singh, I. Oey, and H. Singh, *Food Hydrocolloids*, **108**, 105972 (2020).
9. M. C. Jarvis, M. A. Hall, D. R. Threlfall, J. Friend, *Planta*, **152** (2), 93 (1981).
10. A. I. Usov, M. I. Bilan, and N. G. Klochkova, *Botanica Marina*, **38**, 43 (1995).
11. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72** (1–2), 248 (1976).
12. R. Hori and J. Sugiyama, *Carbohydr. Polym.*, **52** (4), 449 (2003).
13. N. K. Jerne, A. A. Nordin, *Science*, **140** (3565), 405 (1963).
14. W. S. York, A. G. Darvill, M. McNeil, et al., in *Methods in Enzymology*, vol. 118, Plant Molecular Biology, Ed. by A. Weissbach and H. Weissbach (Acad. Press, London, New York, San Diego, 1986), pp. 3–40.
15. C. C. Sweeley, R. V. P. Tao, in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Ed. by R. L. Whistler (Acad. Press, London, New York, San Diego, 1972), pp. 23–25.
16. C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, and W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (16), 2497 (1963).
17. M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, et al., *Anal. Chem.*, **28** (3), 350 (1956).
18. K. Wilson, and J. Walker, *Principles and Techniques of Practical Biochemistry* (Cambridge University Press, Cambridge, 2000).
19. M. Černá, A. S. Barros, A. Nunes, et al., *Carbohydr. Polym.*, **51** (4), 383 (2003).

## Composition and Mitogenic Activity of Polysaccharide from *Solanum tuberosum* L.

E.A. Generalov\*<sup>\*\*</sup> and L.V. Yakovenko\*

\*Department of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia

\*\*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia

*Solanum tuberosum* polysaccharide (STP) was isolated from the water extract of *Solanum tuberosum* L. and purified by ion-exchange and gel-filtration chromatography. Its molecular weight was determined by using gel permeation chromatography method and high performance liquid chromatography technique and its monosaccharide composition was analyzed using high performance liquid chromatography and gas chromatography with a flame ionization detector and a capillary column. It was shown that STP was consisted of galactose (Gal) and arabinose (Ara) (37.5 and 23.5%, respectively), along with uronic acids (9.7%), glucose monosaccharide residues (15%) and proteins (no less than 9%). The molecular weight of STP was 70 kDa. The Fourier-transform infrared technique was used for structural analysis of STP. The mitogenic activity of extracted polysaccharide is comparable to that of lipopolysaccharide.

*Keywords:* *Solanum tuberosum*, polysaccharides; monosaccharide composition, mitogenic activity

УДК 543.645.9

## ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННОГО ВОДНОГО РАСТВОРА НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ: ФЕНОМЕНОЛОГИЯ И СПЕКТРОМЕТРИЯ

© 2023 г. А.Г. Погорелов\*, #, Л.Г. Ипатова\*, А.И. Панаит\*, М.А. Погорелова\*, А.А. Гулин\*\*, В.Н. Погорелова\*

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

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

#E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 12.05.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

С использованием UV-Vis спектроскопии, времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов и сканирующей электронной микроскопии изучено изменение свойств полисахаридов в электрохимически активированном водном растворе. Показано, что исследуемые растворы полисахаридов растительного происхождения (агар, растворимый крахмал, пищевой крахмал) подвержены модификации, направленность которой обусловлена используемой фракцией электрохимически активированного раствора (католит или анолит). Выявленные особенности могут быть востребованы при разработке новых способов управления свойствами биологического сырья в технологии производства пищевых продуктов. Отмечено, что технология электрохимически активированного водного раствора, которую относят к разряду «зеленых», может быть воспроизведена в промышленных масштабах.

*Ключевые слова:* электрохимически активированный водный раствор, агар, крахмал, полисахарид, олигосахар, UV-Vis спектроскопия, масс-спектрометрия вторичных ионов, сканирующая электронная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302923050046, EDN: PGOKRQ

Исходным сырьем для пищевых технологий является биологическая матрица, основу которой составляют органические молекулы, включая полисахариды растительного происхождения. В производственном цикле данный класс макро-нутриентов, в зависимости от амфифильности, используют в виде раствора (модифицированный крахмал, агар) или суспензии (крахмал). При обработке сырья, а также в процессе получения полуфабрикатов и конечного продукта, вещество преобразуют так, чтобы улучшить его реологические свойства, ускорить или оптимизировать технологические процессы, улучшить органолептические характеристики готовой продукции. Для безреагентного управления свойствами пищевых систем применяют фракции электрохимически

активированного водного раствора (ЭХАР). Отметим, что подходы, разработанные на основе ЭХАР, относят к «зеленым» технологиям, так как воздействие остается экологически безопасным и не несет техногенной нагрузки.

Принцип получения ЭХАР состоит в накоплении метастабильной фракции воды в области, прилегающей к аноду или катоду электролизера, анолита или католита соответственно [1, 2]. В интервале релаксации длительностью до нескольких дней эти фракции обладают характерными свойствами [3, 4]. После катодной обработки водный раствор приобретает щелочную реакцию, а его окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) может снизиться до отрицательных значений, в нем уменьшается содержание растворенного кислорода, но возрастает уровень молекулярного водорода. Наоборот, в результате анодной обработки возрастает до аномально высокого значения ОВП раствора, увеличивается его кис-

*Сокращения:* ЭХАР – электрохимически активированный водный раствор, ОВП – окислительно-восстановительный потенциал,ToF-SIMS – масс-спектрометрия вторичных ионов.

лотность, а также содержание растворенного кислорода.

Фракции ЭХАР показали себя в качестве перспективных экстрагирующих и гидролизующих агентов. Например, в области переработки растительного сырья разработан метод экстрактивного получения красителя из кожуры лука в среде католита [5]. Извлечение виннокислых соединений из виноградной выжимки в непрерывном потоке анолита повышает выход виннокислых соединений, сокращает длительность процесса и снижает потребление энергии [6]. Похожий метод использован для обработки бурых водорослей, что делает более эффективным производство альгиновой кислоты и альгината натрия, улучшает санитарно-гигиенические условия и экологическую безопасность, а также упрощает технологические процессы [7]. Сравнительные исследования показали, что эффективность экстракции белка из абрикоса или муки рапса у электролизной воды выше, по сравнению с обычной водой [8, 9].

Схожие процессы описаны для такой сложной физико-химической системы, как тесто. Показано, что использование католита ускоряют набухание крахмальных зерен, способствуя формированию однородной структуры конечного продукта, увеличению выхода клейковины и количества адсорбированной влаги [10]. В цитируемой работе установлено влияние католита на удельный объем и пространственную структуру готового продукта. Описанные закономерности наблюдали и в других исследованиях, где для опытных образцов отмечали изменение цвета, удельного объема, текстуры, степени желатинизации и твердости [11–13]. Показано, что применение ЭХАР способствует интенсификации получения сула за счет более глубокого гидролиза полисахаридов [14, 15]. При этом обработка сырья анолитом увеличивает амилолитический эффект за счет активизации фермента амилазы [14, 16].

Таким образом, в области пищевых производств накоплен значительный эмпирический опыт использования ЭХАР притом, что механизмы действия фракций электрохимически активированного водного раствора на растительные полисахариды остаются мало изученными. Поэтому целью данной работы было сравнительное исследование *in vitro* взаимодействия католита и анолита с крахмалом или агаром, которые представляют важный класс макронутриентов. Модифицируя методику подготовки препарата, в эксперименте применили ряд аналитических методов спектromетрии и сканирующую электронную микроскопию.

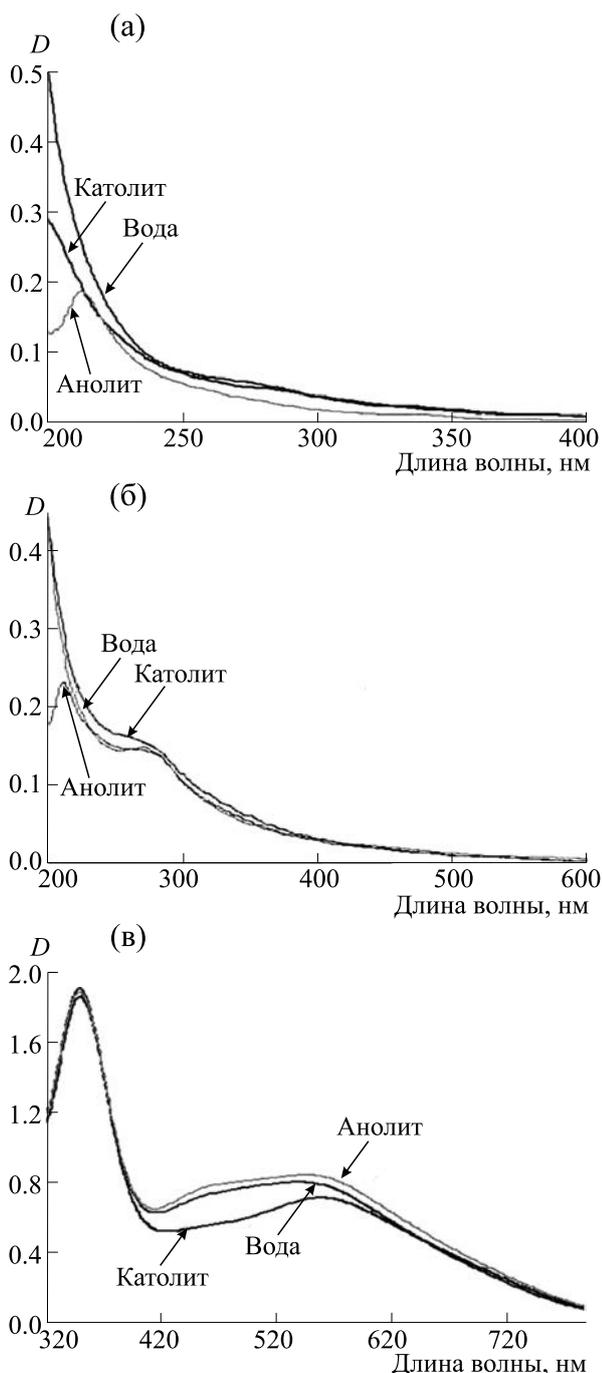
## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Подготовка образцов.** Для экспериментов брали артезианскую воду (рН 7.2, ОВП +360 мВ) из городского водопровода (г. Пушкино Московской области). На установке «Стел» («Делфин Аква», Россия), рекомендованной для бытового использования, получали фракции ЭХАР: католит (рН 8.2, ОВП –800 мВ) или анолит (рН 2.2, ОВП +800 мВ). Исследование проводили на трех образцах полисахаридов растительного происхождения: растворимый в воде модифицированный крахмал или агар марки Gelagar (B&V S.R.L., Италия), а также нерастворимый в воде пищевой крахмал. Из растворимых препаратов готовили маточный водный раствор, который в пропорции 1 : 4 разводили водой или одной из фракций ЭХАР. Для агара, учитывая его низкую растворимость, в маточном растворе весовая концентрация составляла 0.3%, для модифицированного крахмала – 2.5%. Полученные растворы изучали посредством UV-спектromетрии и молекулярной масс-спектromетрии вторичных ионов (ToF-SIMS).

Для пищевого крахмала, нерастворимого в воде, препараты готовили следующим образом. Одинаковые объемы (27 мл) воды (контроль) или фракций ЭХАР (католит, анолит) добавляли к навеске крахмала (3 г). Полученную взвесь выдерживали в течение суток при горизонтальном встряхивании при комнатной температуре. Затем частицы крахмала осаждали 15 мин в центрифуге при 600 g. Жидкость, полученную над осадком, анализировали с помощью UV-vis-спектromетрии и молекулярной масс-спектromетрии. Поверхность частиц крахмала, содержащихся в осадке, исследовали методом сканирующей электронной микроскопии.

**UV-Vis спектromетрия.** Наличие эффекта действия ЭХАР оценивали посредством спектromетрии водных растворов полисахаридов (агар, крахмал). Для этого регистрировали оптическую плотность в спектре поглощения образца на длине волны 225 нм на спектрофотометре UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Растворы крахмала дополнительно окрашивали иодитным методом, что позволило получить в видимой области специфичные спектры поглощения олигосахаров. Данную реакцию проводили в среде с избытком йода, чему соответствует наличие характерного пика на длине волны 355 нм в спектре поглощения анализируемого раствора.

**Времяпролетная масс-спектromетрия вторичных ионов.** Образцы для масс-спектromетрии получали следующим образом. Капли препарата объемом 2 мкл наносили на чистую стеклянную подложку, поверхность которой покрыта токопроводящей пленкой. После высушивания в струе инертного газа образец переносили в каме-



**Рис. 1.** Спектры поглощения растворов полисахарида растительного происхождения в воде (контроль) или фракциях ЭХАР (анолит, католит): (а) – неспецифические UV-спектры агара, (б) – неспецифические UV-спектры модифицированного крахмала, (в) – характерные спектры раствора модифицированного крахмала после окраски олигосахаров посредством иодитной реакции.

ру масс-спектрометра вторичных ионов TOF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Германия). Препарат ионизировали пучком первичных ионов  $\text{Bi}_3^+$  с энергией 30 кэВ, диаметром 200 нм. После воз-

действия длительностью 70 нс и последующей регистрации вторичных ионов ( $\sim 80$  мкс) пучок перемещался в следующую точку поверхности. Плотность дозы облучения первичными ионами не превышала  $5 \cdot 10^{12}$  ионов/ $\text{см}^2$ . Для оценки различий между полученными масс-спектрами применили метод главных компонент (PCA – principal component analysis) [17–19].

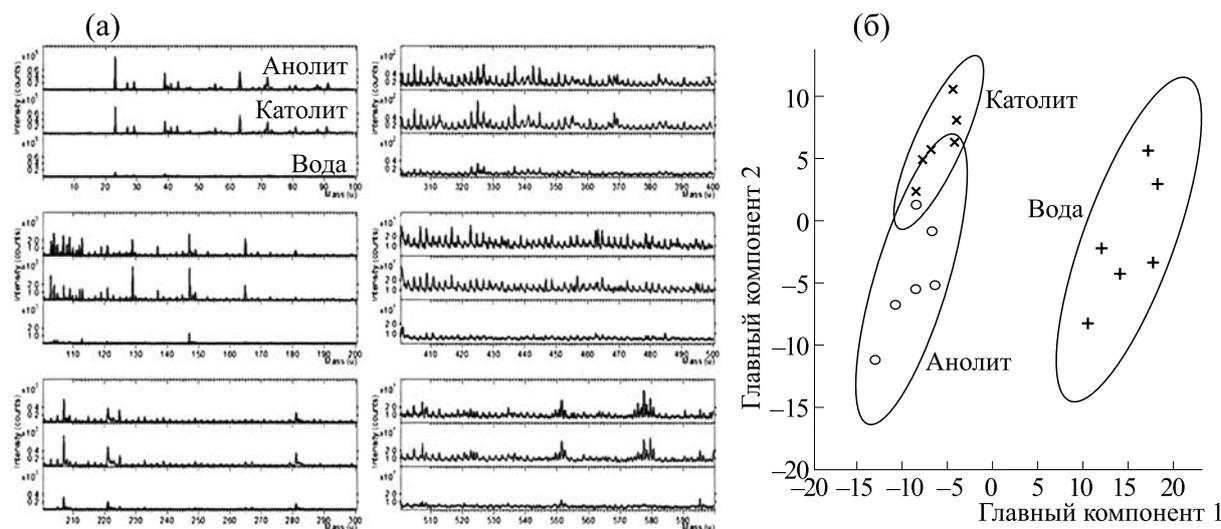
**Сканирующая электронная микроскопия.** Данный метод применили для визуализации поверхности зерен пищевого крахмала. Образец нерастворимого в воде полисахарида, обработанного водой или фракциями ЭХАР, отмывали дистиллированной водой. Каплю ( $\sim 2$  мкл) полученной суспензии частиц крахмала наносили на поверхность держателя образцов электронного микроскопа и сушили в потоке чистого инертного газа ( $\text{N}_2$ ) при комнатной температуре. Затем в среде аргоновой плазмы на поверхность напыляли слой платины, используя установку JFC-1600 (JEOL, Япония). Тонкую структуру рельефа изучали в сканирующей электронной микроскопе JSM-6390A (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме вторичных электронов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Спектрометрия водных растворов агара и модифицированного крахмала.** Изучали полисахариды растительного происхождения со свойствами гидроколлоидов, которые в воде образуют вязкие растворы. Гидроколлоиды применяют в пищевых технологиях в качестве добавок с функциями загустителей, стабилизаторов и гелеобразователей. Спектры поглощения водных растворов полисахарида (агар, модифицированный крахмал) показаны на рис. 1.

По сравнению с раствором в воде, качественное изменение спектра поглощения обоих полисахаридов наблюдается только в среде анолита (рис. 1а,б), что характеризует пик в области 225 нм. Отметим, что для агара в растворе католита также наблюдается тенденция к трансформации спектра (рис. 1а), который соответствует промежуточному состоянию между контролем и раствором в анолите. Возможно, завершение перехода требует более длительного воздействия восстановленной фракцией ЭХАР.

Растворы модифицированного крахмала дополнительно окрашивали иодитным методом, что позволило получить специфические спектры поглощения в видимой области (рис. 1в). Данную цветную реакцию проводят на олигосахара с пиком в характерной области 520 нм при условии насыщения раствора йодом (пик 355 нм). Значимое снижение интенсивности характерного спектра наблюдается только для раствора крахмала в католите (рис. 1в). Учитывая то, что во всех вари-



**Рис. 2.** Результаты ToF-SIMS-анализа образцов агара, приготовленных из раствора полисахарида в воде (контроль) или фракциях ЭХАР (анолит, католит): (а) — диапазоны молекулярных масс, где везде нижний масс-спектр соответствует контролю (вода), средний масс-спектр — после обработки католитом, верхний масс-спектр — после обработки анолитом; (б) — график счетов в координатах первых двух главных компонент, эллипсами обозначены 95%-е доверительные интервалы для групп из шести измерений в каждой.

антах исходный маточный раствор модифицированного крахмала разбавляли одинаковым способом, уменьшение содержания олигосахаров можно объяснить наличием амилолитической активности у католита. Дело в том, что модифицированный крахмал представляет собой смесь олигосахаров, фрагментация которых  $\alpha$ -амилазой или, например, католитом приводит к образованию моносахаров и, следовательно, к уменьшению интенсивности цветной окраски.

Характерные масс-спектры молекулярного состава раствора агара в воде, анолите и католите приведены на рис. 2а. Для выявления отличий между образцами проводили анализ методом главных компонент. Суть анализа заключается в уменьшении размерности матрицы больших данных, т. е.  $n$  выборок с  $m$  массовыми пиками до комбинации нескольких ключевых переменных, описывающих основные различия (вариацию) в результатах. Уменьшение размерности достигается путем линейного преобразования данных в новую систему координат, в которой большую часть вариации можно описать меньшим количеством параметров. Таким образом, формируются оси главных компонент PC1, PC2 и т.д. В большинстве случаев используются первые две главные компоненты, чтобы отображать данные в двух измерениях (плоскостях) и визуально идентифицировать кластеры связанных экспериментальных измерений. Такой способ отображения данных называется графиком счетов и он показывает, отличаются ли образцы или группа образцов в координатах PC1–PC2. Соответствующий график показывает различие в масс-спектрах и позволяет

выявить пики, вносящие наибольший вклад в это различие. Анализ проводили по наиболее интенсивным пикам. Эллипсы, ограничивающие на графике область результатов, при условии, что они не пересекаются, отражают достоверность различий в составе сравниваемых образцов с 95%-м доверительным интервалом (рис. 2б).

Полученные данные (рис. 2б) свидетельствуют о значимом отличии масс-спектра агара в водном растворе (контроль) от масс-спектров полисахарида, обработанного фракциями ЭХАР. Масс-спектры агара в анолите и католите между собой достоверно не различаются, что соответствует тенденции на сближение, отмеченной для UV-спектров (рис. 1а). Характерные масс-спектры молекулярного состава раствора модифицированного крахмала в воде, анолите и католите приведены на рис. 3а. Для указанных вариантов с помощью метода главных компонент проведен сравнительный анализ данных молекулярного анализа (рис. 3б).

Ситуация для образцов модифицированного крахмала (рис. 3) отличается от той, что наблюдается для агара (рис. 2). Отметим значимое различие в молекулярном составе между фракциями ЭХАР (рис. 3б), что соответствует данным UV-vis-спектрометрии (рис. 1б). Однако различие между масс-спектрами для образца крахмала в воде и католите более выражено, по сравнению с тем, что регистрируется на UV-спектрах. Возможно, в указанном диапазоне изменение в молекулярном составе, обусловленное обработкой католитом, существенно не повлияло на спектральные ха-

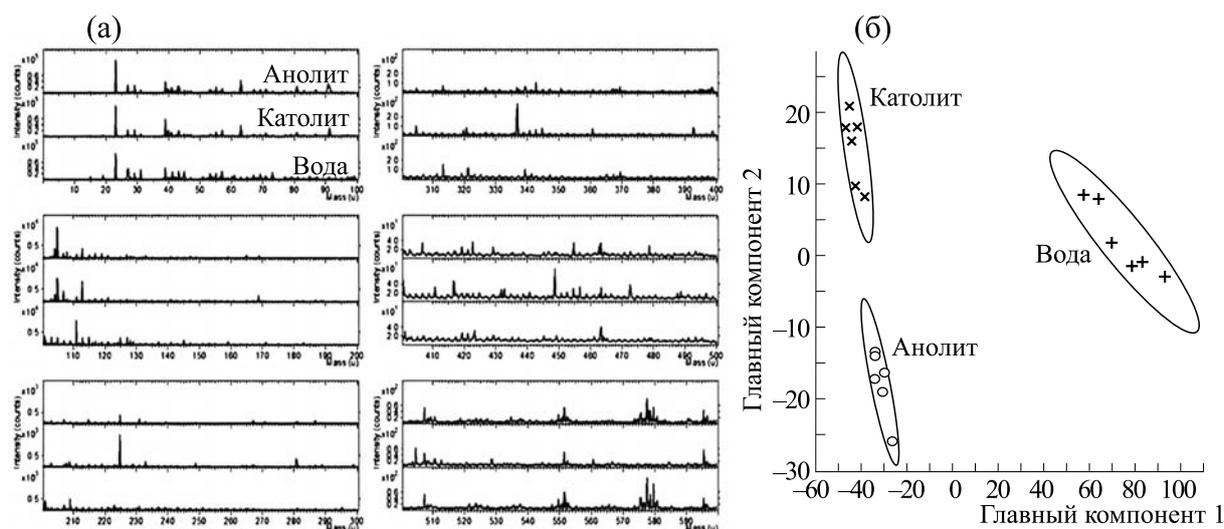


Рис. 3. Результаты ToF-SIMS-анализа образцов модифицированного крахмала, приготовленных из раствора полисахарида в воде (контроль) или фракциях ЭХАР (анолит, католит): (а) — диапазоны молекулярных масс, где везде нижний масс-спектр соответствует контролю, средний масс-спектр — после обработки католитом, верхний масс-спектр — после обработки анолитом; (б) — график счетов в координатах первых двух главных компонент, эллипсами обозначены 95%-е доверительные интервалы для групп из шести измерений в каждой.

рактические характеристики раствора модифицированного крахмала.

**Спектрометрия нерастворимого в воде пищевого крахмала.** Многие виды сырья для пищевой промышленности содержат макронутриенты в нерастворимой форме. В их ряду наиболее представлены крахмалосодержащие материалы, технология подготовки которых предполагает обработку водой. В результате чего получают водную суспензию крахмала, которая является объектом исследования данного раздела. На рис. 4 показаны спектры поглощения супернатанта, полученного в результате осаждения частиц пищевого крахмала, обработанных предварительно водой, анолитом или католитом.

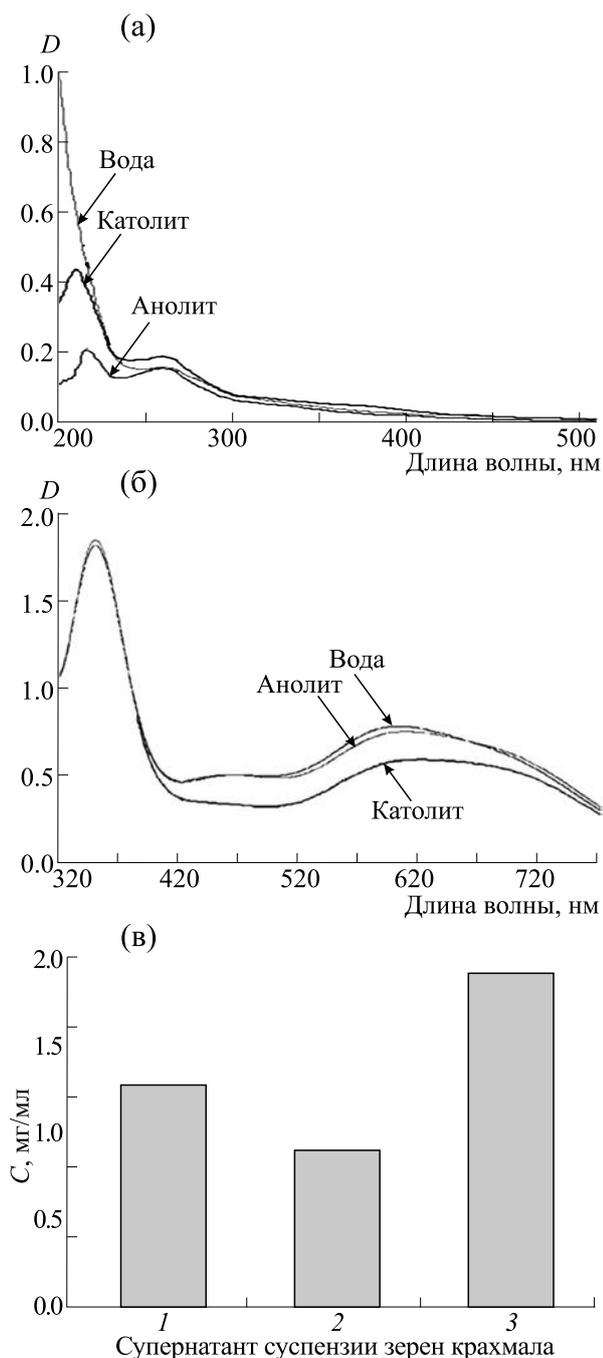
Анализ UV-спектров (рис. 4а) супернатанта суспензии частиц пищевого крахмала показывает, что обе фракции ЭХАР одинаковым образом влияют на образец с появлением пиков в областях 230 и 275 нм. Специфичные спектры поглощения (рис. 4б), полученные после иодитной окраски, соответствуют таким же спектрам для модифицированного крахмала (рис. 1в). Отметим, что в отличие от данных UV-спектрометрии цветная реакция на олигосахара не показывает различия между образцами, обработанными водой или анолитом (рис. 4б). Этот факт свидетельствует о том, что обработка анолитом пищевого крахмала не вызывает изменение содержания олигосахаров в супернатанте, но влияет на вид спектра в UV области (рис. 4а). После обработки крахмала католитом уровень олигосахаров в растворе значительно ниже, чем в воде или анолите (рис. 4б). Такой результат может означать наличие у католита

псевдоферментативной активности и/или ослабление экстракции материала из зерен крахмала. Микровзвешивание с помощью кварцевого измерителя сухого остатка в капле (2 мкл) супернатанта позволило установить, что относительное уменьшение уровня олигосахаров, растворенных в католите, не обусловлено снижением количества экстрагированного вещества (рис. 4в). Наоборот, в этом случае содержание материала в растворе возросло, имитируя сочетанную активность  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы.

Результаты ToF-SIMS-анализа супернатанта, полученного после центрифугирования суспензии зерен крахмала, которые обрабатывали водой или фракциями ЭХАР, приведены на рис. 5.

Для масс-спектров экстрактов пищевого крахмала (рис. 5а) посредством метода главных компонент проведен статистический анализ (рис. 5б). Сравнение данных молекулярного анализа показывает значимое отличие между контрольным образцом (вода) и парой экспериментальных групп, а также наличие различия между фракциями ЭХАР, что согласуется с данными UV-спектрометрии (рис. 4а). Учитывая выраженный амилитический эффект католита, можно ожидать изменение рельефа поверхности зерен крахмала. Данное предположение исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 6).

Сравнение изображений, полученных при высоком увеличении, позволяет установить связь качества поверхности зерен пищевого крахмала со способом обработки. Видно, что для образца после воздействия водой (рис. 6а3) характерен



**Рис. 4.** Параметры образцов супернатанта, полученного после центрифугирования суспензии зерен пищевого крахмала, обработанных предварительно водой или фракциями ЭХАР (анолит, католизит): (а) – неспецифические UV спектры супернатанта; (б) – характерные спектры супернатанта после окраски олигосахаров посредством иодитной реакции; (в) – содержание вещества, экстрагированного из зерен крахмала (1) водой, (2) анолизитом или (3) католизитом.

более грубый рельеф, чем после фракций ЭХАР (рис. 6б3, в3). Таким образом, результаты ультраструктурного анализа визуально демонстрируют эффект травления фракциями ЭХАР рельефа

поверхности зерен крахмала. Такой результат согласуется с данными спектрометрии, которые показывают действие о ЭХАР на пищевой крахмал. Отметим, что после обработки католизитом в растворе уменьшается концентрация олигосахаров, но при этом увеличивается масса экстрагируемого вещества, что показано микро взвешиванием сухого остатка. Другими словами, католизит демонстрирует псевдоферментативную активность, свойственную одновременно  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазе.

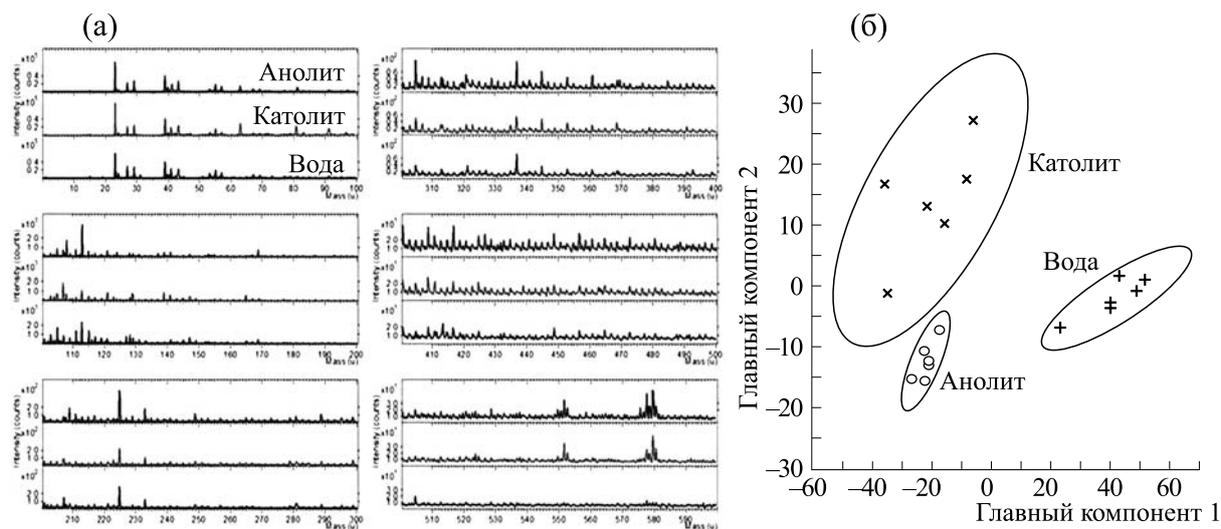
Завершая обсуждение результатов, можно прийти к следующему заключению. Полисахариды растительного происхождения (агар, крахмал) подвержены действию фракций ЭХАР. Анализ проб агара показывает идентичность эффекта обработки полисахарида обеими фракциями ЭХАР. Для модифицированного крахмала методомToF-SIMS показано статистически значимое различие молекулярного состава олигосахаров в зависимости от фракции ЭХАР. При использовании специфической цветной реакции с йодом было показано амилалитическое действие католизита на раствор модифицированного крахмала, что обусловлено снижением содержания олигосахаров. Под действием католизита также уменьшается концентрация олигосахаров в супернатанте суспензии зерен пищевого крахмала, что может быть следствием снижения экстрагирующей способности данной фракции ЭХАР. Однако методом микровзвешивания сухого остатка показано наоборот увеличение массы растворенного вещества. Этот результат согласуется с ультраструктурным анализом, который визуально демонстрирует травление католизитом поверхности зерен крахмала. Другими словами, подтверждено наличие у католизита псевдо ферментативной активности по типу одновременно  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы. Учитывая широкое применение гидроколлоидов полисахаридной природы в качестве загустителей и гелеобразователей, использование ЭХАР можно рассматривать как перспективное технологическое решение для производства пищевых продуктов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

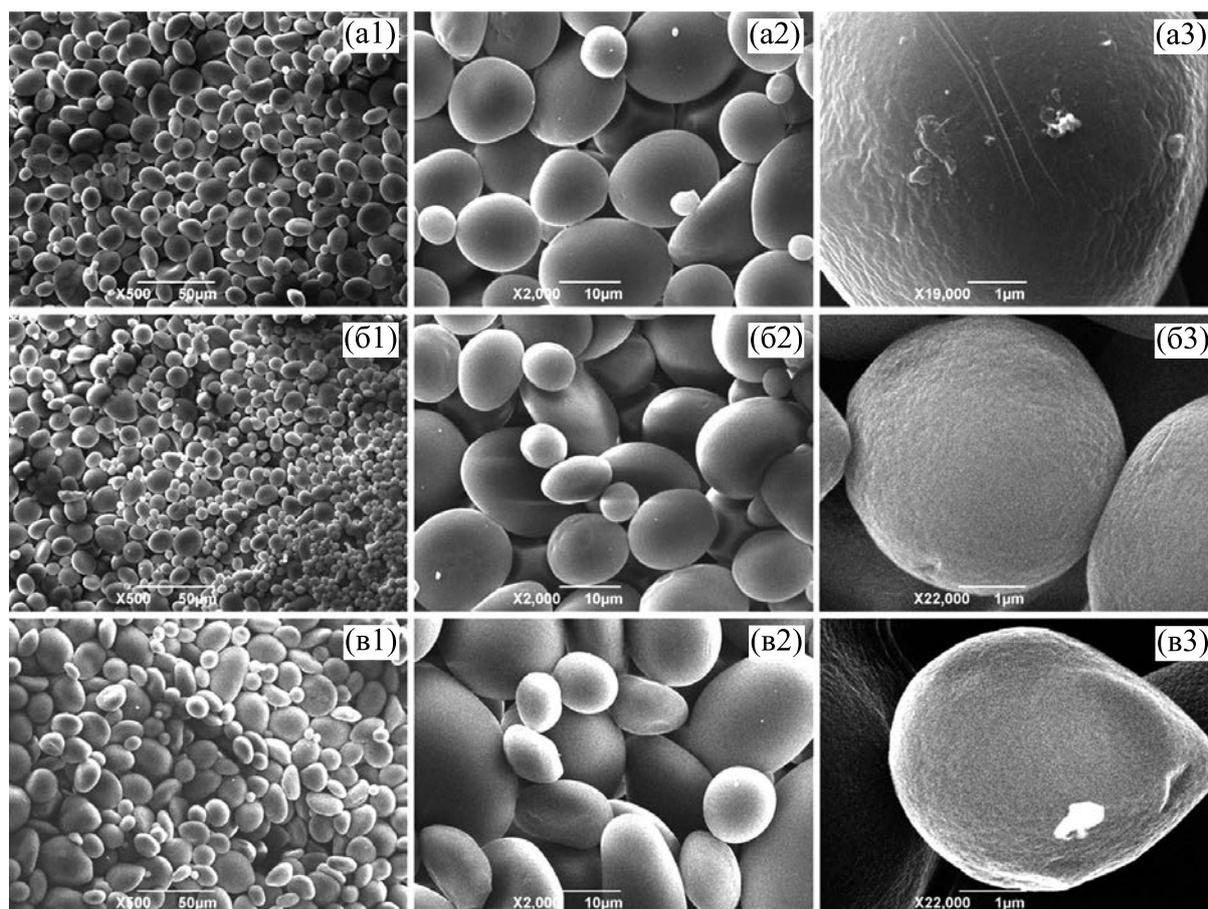
ToF-SIMS-анализ проведен на оборудовании ЦКП АХБС ФИЦ ХФ РАН (№ 506694).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00019-П, <https://rscf.ru/project/20-16-00019>).



**Рис. 5.** Результаты ToF-SIMS-анализа образцов пищевого крахмала, приготовленных из супернатанта суспензии зерен полисахарида в воде (контроль) или фракциях ЭХАР (анолит, католит): (а) – диапазоны молекулярных масс, где везде нижний масс-спектр соответствует контролю, средний масс-спектр – после обработки католином, верхний масс-спектр – после обработки анолитом; (б) – график счетов в координатах первых двух главных компонент, эллипсами обозначены 95%-е доверительные интервалы для групп из шести измерений в каждой.



**Рис. 6.** Микрофотографии рельефа поверхности зерен пищевого крахмала, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, режим вторичных электронов: (серия а1–а3) – зерна крахмала после обработки водой, (серия б1–б3) – зерна крахмала после обработки католином, (серия в1–в3) – зерна крахмала после обработки анолитом.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. М. Бахир, *Электрохимическая активация: обзор ретения, техника, технологии* (Вива-Стар, М., 2014).
2. V. M. Bakhir and A. G. Pogorelov, *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.*, **7**, 41 (2018).
3. K. Chyer, H. Yen-Con, and R. E. Brackett, *J. Food Protection*, **63**, 19 (2000).
4. T. Takenouchi and S. Wakabayashi, *J. Appl. Electrochem.*, **36**, 1127 (2006).
5. Патент RU 2130472, *Способ производства красителя из шелухи лука* (1999).
6. Патент RU 2372399, *Способ извлечения виннокислых соединений из виноградных выжимок* (2009).
7. Патент RU 2197840, *Способ получения альгиновой кислоты и альгината натрия из бурых водорослей* (2003).
8. A. Gerzhova, M. Benali, M. Mondor, and M. Aider, *Food Biosci.*, **11**, 56 (2015).
9. Z. H. Li, B. Zhou, X. T. Li, and S. G. Li, *Food Sci. Biotechnol.*, **28**, 15 (2018).
10. Н. В. Науменко, Дис. ... канд. техн. наук (М., 2007).
11. K. Kobayashi, N. Tosa, Y. Hara, and S. Horie, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaisha*, **43**, 930 (1996).
12. R. Onishi, Y. Hara, and E. Arai, *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, 388 (1999).
13. Патент US 6326048, *Preparation method of dough for flour foods* (2001).
14. С. Н. Храпенков, М. В. Гернет, Д. А. Свиридов и др., *Пиво и напитки*, **4**, 18 (2003).
15. Б. В. Кругликов, М. В. Гернет и И. В. Козлов, *Пиво и напитки*, **5**, 36 (2008).
16. С. Н. Храпенков, М. В. Гернет и В. М. Бахир, *Пиво и напитки*, **5**, 20 (2002).
17. M. S. Wagner and D. G. Castner, *Langmuir*, **17**, 4649 (2001).
18. D. J. Graham, M. S. Wagner, and D. G. Castner, *Appl. Surf. Sci.*, **252**, 6860 (2006).
19. D. J. Graham and D. G. Castner, *Biointerphases*, **7**, 49 (2012).

## Impact of Electrochemically Activated Water Solution on Plant Polysaccharides: Phenomenology and Spectrophotometry

A.G. Pogorelov\*, L.G. Ipatova\*, A.I. Panait\*, M.A. Pogorelova\*, A.A. Gulin\*\*, and V.N. Pogorelova\*

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

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

The determination of changes in the properties of polysaccharides in electrochemically activated water solution were carried out by means of UV-Vis spectrophotometry, time-of-flight secondary ion mass spectrometry and scanning electron microscopy. It was shown how the properties of samples analyzed (agar, modified starch, edible starch) changed depending on a fraction of electrochemically activated water solution (catholyte/anolyte). Our findings demonstrate that the determined changes can be valuable information in designing novel approaches to managing the properties of biological raw material used for food manufacturing process. Furthermore, the technology of electrochemically activated water solutions is a suitable green chemical process that can be translated to industrial level.

*Keywords: electrochemically activated water solution, agar, starch, polysaccharide, oligosugar, UV-Vis spectrophotometry, time-of-flight secondary ion mass spectrometry, scanning electron microscopy*

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕТА-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА 25-35

© 2023 г. Г.А. Агаева\*, #, Г.З. Наджафова\*\*

\*Институт физических проблем Бакинского государственного университета,  
ул. З. Халилова, 23, Баку, AZ-1148, Азербайджан

\*\*Азербайджано-французский университет, ул. Низами, 183, Баку, AZ1010, Азербайджан

#E-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию 21.12.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

При болезни Альцгеймера в механизме нейродегенерации важную роль играет бета-амилоидный пептид (Аβ). Отдельный фрагмент бета-амилоидного пептида Аβ(25-35) (с последовательностью GSNKGAIIGLM) считается функциональным доменом амилоидного пептида Аβ, ответственным за его нейротоксические свойства и биологически активной областью Аβ. Конформационный анализ методом молекулярной механики каждого пептидного сегмента С-концевой части пептида выявил ограниченное число наиболее вероятных конформаций и достаточно четко определил силы, стабилизирующие структуры. Полученные результаты показали, что пептид Аβ(25-35) энергетически предпочтительно принимает α-спиральную конформацию на С-концевом октапептидном сегменте. Для моделирования картины внутримолекулярной подвижности молекулы пептида Аβ(25-35) был применен метод молекулярной динамики. Показано, что в низкоэнергетических конформациях пептида Аβ(25-35) гибкие структуры в его N-концевой области по-разному ориентированы по отношению к структурам в С-концевой части.

*Ключевые слова:* бета-амилоидный пептид 25-35, конформация, метод молекулярной механики, метод молекулярной динамики.

DOI: 10.31857/S0006302923050058, EDN: PGRHNS

Как известно, болезнь Альцгеймера является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний и причиной деменции. Заболевание патологически характеризуется агрегацией двух белков в тканях головного мозга, а именно бета-амилоида (Аβ) и тау-белка, специфичного для мозга. Имеются совокупные доказательства того, что пептиды Аβ самообразуются в растворимые олигомеры и нерастворимые фибриллы [1]. Пептид Аβ(25-35) обладает многими характеристиками полноразмерного Аβ(1-40/42), включая его амфифильную природу и склонность к агрегации. Его присутствие *in vivo* было доказано лишь недавно, но токсичность фибриллярного Аβ(25-35) по отношению к нейрональным клеткам *in vitro* была показана ранее [2, 3]. Имеются также данные о том, что мономерная форма этого пептида сама по себе может быть цитотоксичной [3]. Механизм токсичности амилоидного пептида остается невыясненным. Тем не менее, многие важные детали о растворимом пептиде Аβ, включая его пространственную структуру, отсутствуют или противоречат друг другу. Следовательно,

изучение конформационных свойств пептида Аβ(25-35) в его растворимой мономерной форме может сыграть существенную роль в определении природы более ранних его видов до олигомерации. Можно сделать предположение, что конформации, принимаемые пептидом Аβ(25-35) в растворе, чрезвычайно чувствительны к используемым методам и экспериментальным условиям. Среди стабильных структур с общей α-спиральной конформацией на С-конце наблюдается значительное разнообразие различных конформаций на N-концевом тетрапептиде.

Одни исследования были направлены на исследование мембрано-опосредованной структуры амилоидного пептида Аβ(25-35) для выяснения структурно-функциональных взаимосвязей пептида [4, 5]. В других исследованиях была определена конформация раствора пептида Аβ(25-35) с использованием гидрофобных растворителей, таких как трифторэтанол и гексафторизопропанол. Например, исследование методом кругового дихроизма показало, что Аβ(25-35) принимает упорядоченную конформацию, включающую не-

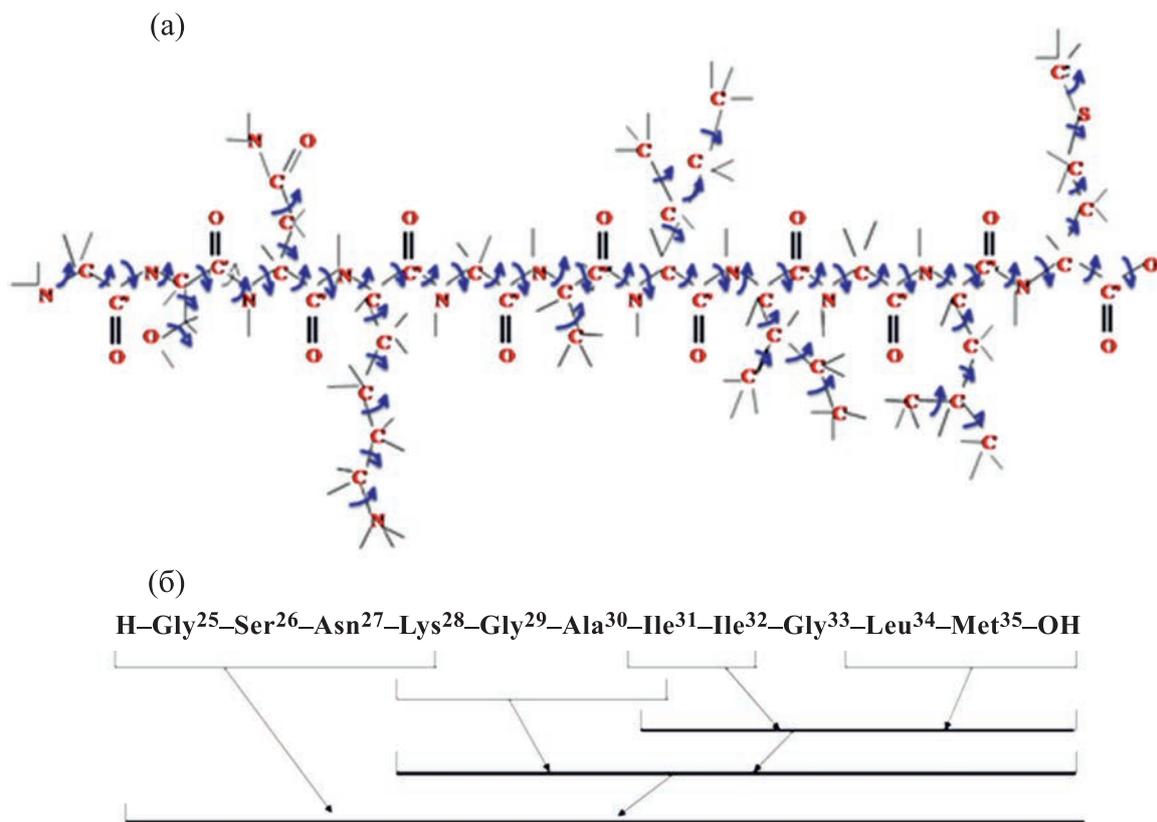
которую  $\alpha$ -спираль, с увеличением концентрации трифторэтанола [6], или же дает неупорядоченные структуры в метаноле [7]. В исследовании с использованием спектроскопии колебательно-го кругового дихроизма было показано, что A $\beta$ (25-35) в растворе диметилсульфоксида принимает структуру  $\beta$ -витка [8]. Кроме того, с помощью метода ядерно-магнитного резонанса была определена трехмерная структура A $\beta$ (25-35), было показано, что в растворе, содержащем гексафторизопропанол/воду (20/80 по объему), пептид имеет менее регулярную свернутую форму в С-концевой области пептида с  $\beta$ -поворотом в сегменте 25–28 [9]. Другое ЯМР-исследование показало, что A $\beta$ (25-35) принимает спирально-витковую структуру в растворе, содержащем по меньшей мере 50% гексафторизопропанола. Эта структура имеет частично упорядоченный поворот на N-конце (остатки 26–28), за которым следует  $\alpha$ -спираль из остатков 28–31 и  $3_{10}$ -спираль, охватывающая С-концевые остатки 32–34 [10]. В то же время было обнаружено, что в растворе, содержащем 50% трифторэтанола, на участке от Ala30 до Met35 пептид A $\beta$ (25-35) принимает  $\alpha$ -спиральную конформацию [11]. Были предприняты попытки охарактеризовать конформацию A $\beta$ (25-35) в водных растворителях [10, 12–15]. В то же время расчеты энергетического ландшафта показывают, что развернутые конформации пептида вместе с  $\alpha$ -спиралью являются важными промежуточными продуктами для олигомеризации пептида A $\beta$ (25-35), приводящей к образованию амилоида [13]. Тем не менее, многие важные детали о мономерном A $\beta$ (25-35), включая его пространственную структуру, отсутствуют или противоречат друг другу. Следовательно изучение конформационных свойств пептида A $\beta$ (25-35) в его растворимой мономерной форме может сыграть существенную роль в определении природы более ранних его видов до олигомеризации. Известно, что для выяснения механизма биологического эффекта пептидной молекулы необходимо знание пространственного строения и конформационных возможностей этого пептида. Поэтому основной целью настоящей работы является исследование конформационных свойств молекулы бета-амилоидного пептида (25-35), необходимых для определения основных структурных требований для межмолекулярного взаимодействия.

## МЕТОД РАСЧЕТА

Исследование пространственного строения молекулы бета-амилоидного пептида (25-35) проводили методом молекулярной механики с использованием стандартной геометрии. При конформационном расчете пептида учитывали невалентные и электростатические взаимодействия,

водородные связи и торсионные потенциалы. Расчет проводили согласно фрагментарному анализу молекулы. Используемая в данном исследовании классификация пептидных структур и потенциальные функции расчетной схемы полуэмпирического конформационного анализа и их параметризация описана в работах [16–19]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [20]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  основной цепи и  $\chi^i$  боковых цепей. Углы  $\phi$  и  $\psi$  основной цепи в конформациях находятся в низкоэнергетических областях стерической карты: R ( $\phi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ), B ( $\phi = -180^\circ \div 0^\circ$ ,  $\psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ), L ( $\phi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ) и P ( $\phi = 0^\circ \div 180^\circ$ ,  $\psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ). Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов  $\phi$  и  $\psi$ . Поиск минимумов потенциальной энергии осуществляли методом сопряженных градиентов, ранее описанным и примененным в работе [20]. Расчет стабильных конформаций молекулы проводили с помощью программы [21], основанной на матричном методе определения координат атомов, предложенном Германсом и Ферро [22], и потенциальных функциях с параметризацией, разработанных Шерагой и др. [23]. Представленная программа позволяет рассчитывать энергетические и геометрические параметры исследуемых молекул. В текущей версии этой программы энергия рассчитывается как сумма независимых вкладов энергий невалентных, электростатических взаимодействий, энергий торсионных барьеров и водородных связей. Затем минимизируют энергию поглощенной молекулы по методу Пауэлла–Дэвидсона–Флетчера [24]. Невалентные взаимодействия оценивали сначала с использованием потенциала Леннарда–Джонса с параметрами, предложенными Шерагой [23], а затем с использованием потенциалов, опубликованных в работах [18, 19] с учетом известных экспериментальных ограничений на расстояния и двугранные углы. Отсчет двугранных углов вращения  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi^i$  проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [25].

Метод молекулярной динамики, основанный на компьютерном решении уравнения движения Ньютона, позволяет проследить конформационное поведение молекулы во времени. Достаточно широкие диапазоны этого метода позволяют обратиться к исследованию от небольших пептидных молекул до белков, в вакууме и в присутствии растворителя [26–32]. Молекулярная динамика молекул проводилась в следующей последовательности: 1) ввод начальных данных, 2) минимизация энергии, 3) нагрев до 300К, 4) равновесные симуляции, 5) молекулярное моделирование.



**Рис. 1.** Атомная расчетная модель и переменные двугранные углы молекулы бета-амилоидного пептида (25-35) (а) и схема его фрагментарного расчета (б).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчетная атомная модель амилоидного пептида Aβ(25-35), содержащая 157 атомов и 59 углов вращения, показана на рис. 1а. Конформационный анализ этой молекулы был проведен на основе расчетной схемы, представленной на рис. 1б. Конформацию пептида Aβ(25-35) анализировали с использованием пошагового подхода для сравнения конформационных свойств фрагментов. Каждый шаг был разбит на несколько последовательно решаемых структурных задач. На первом этапе конформационного анализа амилоидного пептида Aβ(25-35) исследовали конформационные свойства его N-концевого тетрапептидного фрагмента Gly<sup>25</sup>-Ser<sup>26</sup>-Asn<sup>27</sup>-Lys<sup>28</sup>. Этот фрагмент содержит гидрофильный остаток лизина с положительно заряженной боковой цепью, подвижный остаток глицина и два полярных остатка, серин и аспарагин. Варианты структуры этого фрагмента составлены с учетом характеристик всех восьми возможных форм тетрапептида. Начальные приближения конформационных состояний пептида основывались на низкоэнергетических конформационных состояниях соответствующих монопептидов, тогда как боковые цепи остатков тетрапептида могли быть координиро-

ваны либо наружу, либо внутрь. Остаток глицина, у которого отсутствует боковая цепь, действует как шарнирный элемент в этой тетрапептидной цепи. Оптимальные конформации глицина представляют все четыре области графика конформации: R, B, L и P. Энергетическое распределение оптимальных конформаций тетрапептида свидетельствует о том, что этот фрагмент обладает значительной конформационной гибкостью. Но самые низкоэнергетические конформации этого фрагмента принимают полностью свернутую структуру. Некоторые низкоэнергетические конформации содержат повороты, на что указывает расстояние между атомами Cα первого и четвертого остатков, составляющее менее 7 Å. Остальные конформации характеризуются полностью развернутой формой остова, что свидетельствует о наличии неупорядоченных структур. Наиболее низкоэнергетическими конформациями среднего тетрапептида Lys<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>-Ala<sup>30</sup>-Ile<sup>31</sup> были структуры, содержащие только две основные формы. Один из них принимает полную α-спиральную структуру, в то время как в другой основной форме остаток Lys существует в конформационном состоянии B ( $\varphi = -180^\circ - 0^\circ$ ,  $\psi = 0^\circ - 180^\circ$ ), за которым следует короткий α-спиральный сег-

**Таблица 1.** Энергетические вклады в низкоэнергетических конформациях молекулы бета-амилоидного пептида (25–35)

Конформация	Энергетические вклады, ккал/мол				
	$E_{\text{нев}}$	$E_{\text{элс}}$	$E_{\text{торс}}$	$E_{\text{абс}}$	$E_{\text{отн}}$
RR <sub>1</sub> R <sub>1</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–57.8	17.9	7.6	–32.3	0
RR <sub>1</sub> B <sub>3</sub> B <sub>12</sub> R <sub>R1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–56.3	17.9	7.3	–31.1	1.2
BR <sub>1</sub> R <sub>3</sub> R <sub>22</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–55.0	17.0	7.1	–30.9	1.4
RB <sub>1</sub> R <sub>3</sub> R <sub>22</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–53.7	16.1	6.9	–30.8	1.5
BB <sub>1</sub> B <sub>1</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–52.3	15.4	7.1	–29.9	2.4
BB <sub>1</sub> R <sub>1</sub> R <sub>22</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–52.7	16.4	6.8	–29.6	2.7
RB <sub>1</sub> B <sub>1</sub> R <sub>22</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–54.0	16.1	8.6	–29.3	3.0
BR <sub>1</sub> B <sub>3</sub> B <sub>12</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–51.5	16.4	7.2	–27.9	4.4
BB <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>32</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–48.4	16.6	6.8	–25.0	7.3
RR <sub>2</sub> B <sub>2</sub> R <sub>22</sub> RR <sub>1</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	–48.4	15.9	7.6	–24.9	7.4
BR <sub>1</sub> B <sub>3</sub> B <sub>12</sub> BB <sub>2</sub> R <sub>32</sub> R <sub>32</sub> BB <sub>21</sub> B <sub>32</sub>	–46.4	16.1	5.9	–24.4	7.9

мент. С-концевая часть пептидной последовательности содержит в основном аминокислотные остатки с объемными гидрофобными боковыми цепями. Почти все остатки С-концевого пептида несут большие неполярные боковые цепи, за исключением глицинового остатка, который вообще не имеет боковой цепи. Чтобы уменьшить количество возможных начальных приближений энергии для С-концевого пептида, мы сначала определили оптимальные конформации фрагментов дипептида Ile31–Ile32 и Leu34–Met35. Их конформационный анализ определил набор допустимых конформаций для каждого дипептида; эти наборы использовали для отбора исходных вариантов структуры С-концевого пептида. Полученное энергетическое распределение оптимальных структур данного пептида приводит только к одной энергетически предпочтительной конформации только с  $\alpha$ -спиральной структурой. Спиральный виток сближает N- и С-концевые участки фрагмента с образованием водородной связи NH(Met35)...CO(Ile31). В то же время боковая цепь Ile31 сближена с боковыми цепями Leu34 и Met35, что облегчает их невалентные взаимодействия. Последующий анализ С-концевого октапептида проводили со стабильными конформациями, представляющими все восемь форм тетрапептида Lys28–Gly29–Ala30–Ile31, и наиболее стабильными конформациями С-концевого пептида. Анализ рассчитанных вариантов С-концевого октапептида (28–35) показал, что полностью  $\alpha$ -спиральная конформация имеет наименьшую энер-

гию, а все остальные низкоэнергетические конформации имеют короткий  $\alpha$ -спиральный виток на С-конце молекулы. Другими словами, более длинная  $\alpha$ -спиральная структура на С-конце пептида является наиболее благоприятной конформацией для октапептида. Следующий этап нашего анализа касался оптимальных конформаций полноразмерной молекулы ундекапептида A $\beta$ (25–35) на основе стабильных конформаций N-концевого тетрапептида Gly25–Ser26–Asn27–Lys28 и С-концевого (28–35) октапептида. Конформационный анализ каждого пептидного сегмента С-концевой части выявил ограниченное число наиболее вероятных конформаций и достаточно четко определил силы, стабилизирующие структуры. Конформационный анализ всей молекулы пептида A $\beta$ (25–35) выявил ограниченное количество низкоэнергетических структур. Поэтому в качестве исходных конформаций пептида A $\beta$ (25–35) мы рассмотрели 600 конформаций, относящихся к разным формам пептидного остова, и оптимизировали их геометрию за счет минимизации энергии. Наши расчеты показали, что пептид в свободном состоянии принимает конформации с  $\alpha$ -спиральной структурой RR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>R<sub>32</sub>RR<sub>1</sub>R<sub>32</sub>R<sub>32</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub>. Водородные связи между карбонильным кислородом и амидными группами пептидных звеньев NH(Gly33)...OC(Gly29), NH(Leu34)...OC(Ala30) и NH(Met35)...OC(Ile31) характерны для всех низкоэнергетических структур, содержащих  $\alpha$ -спиральную структуру на С-конце. В табл. 1 представлены энергетические вклады всех типов взаимодей-

**Таблица 2.** Величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков ундекапептида бета-амилоидного пептида (25-35) в низкоэнергетических конформациях

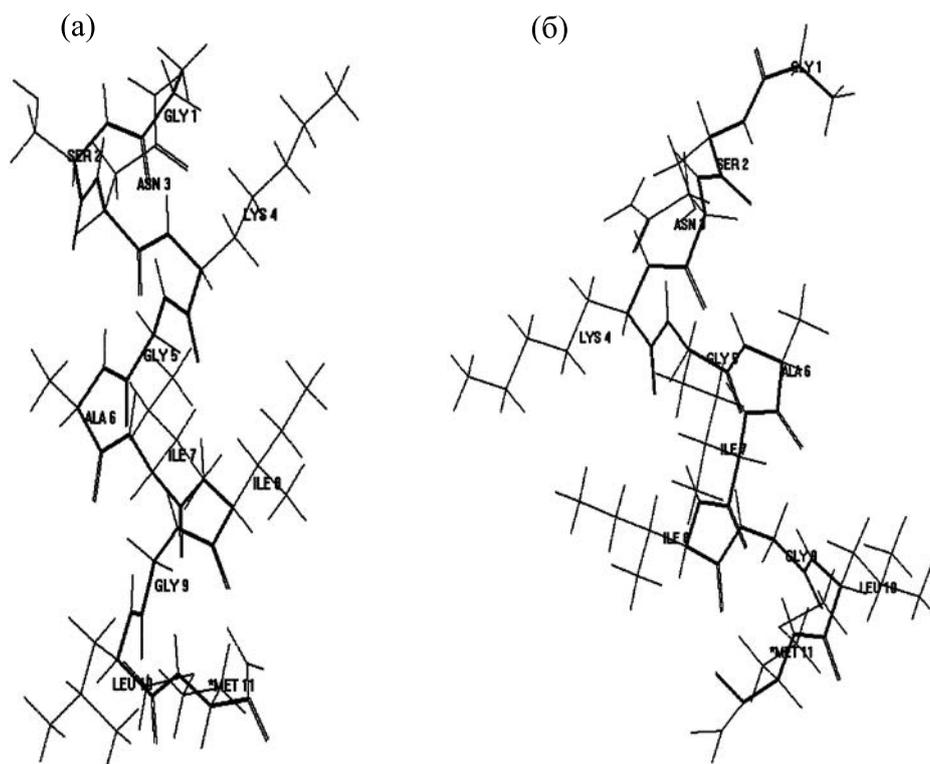
Остаток	№ конформации	Основная цепь			Боковая цепь				
		j	y	w	c1	c2	c3	c4	c5
Gly <sup>25</sup>	I	-51	-57	181					
	II	-61	-75	172					
Ser <sup>26</sup>	I	-78	-40	179	-59	180			
	II	-64	-46	170	-59	180			
Asn <sup>27</sup>	I	-70	-31	-184	67	-94			
	II	-89	133	183	182	93			
Lys <sup>28</sup>	I	-75	-45	-186	-65	181	180	180	180
	II	-120	108	183	-59	180	180	181	180
Gly <sup>29</sup>	I	-65	-30	181					
	II	-73	-31	183					
Ala <sup>30</sup>	I	-70	-50	185	60				
	II	-69	-42	184	60				
Ile <sup>31</sup>	I	-70	-50	182	-65	184	173	187	
	II	-80	-47	182	-60	185	175	188	
Ile <sup>32</sup>	I	-66	-35	-183	-64	183	173	186	
	II	-68	-37	178	-64	184	172	186	
Gly <sup>33</sup>	I	-62	-38	-178					
	II	-64	-34	182					
Leu <sup>34</sup>	I	-79	-64	-175	175	65	59	57	
	II	-79	-64	185	175	65	60	57	
Met <sup>35</sup>	I	-98	-52	-181	-59	180	181	180	
	II	-98	-52	179	-54	181	181	180	

Примечание. Конформация I – RR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>R<sub>32</sub>RR<sub>1</sub>R<sub>32</sub>R<sub>32</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> ( $E_{отн} = 0.0$  ккал/моль), конформация II – RR<sub>1</sub>V<sub>3</sub>V<sub>12</sub>RR<sub>1</sub>R<sub>32</sub>R<sub>32</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> ( $E_{отн} = 1.2$  ккал/моль).

ствий, связанных с низкоэнергетическими конформациями пептида Aβ(25-35). Исследование показало, что конформации молекулы ундекапептида Aβ(25-35) характеризуются подвижностью его N-концевого трипептида и в то же время значительной жесткостью его C-концевого октапептидного фрагмента. Среди стабильных структур с общей α-спиральной конформацией на C-конце наблюдается значительное разнообразие различных конформаций на N-концевом тетрапептиде. В табл. 2 приведены величины двугранных углов двух стабильных конформационных состояний бета-амилоидного пептида (25-35). Как можно видеть, в результате расчетов были определены энергетически предпочтительные области двугранных углов, взаимное расположение остатков и выявлена тенденция к образованию регулярной α-спиральной структуры в низкоэнергетических конформациях бета-амилоидного пептида (25-35). Соответственно, гибкие структуры в N-концевой области Aβ(25-35) по-разному ориентированы по отношению к структурам в C-концевой части в низкоэнергетических конформациях. Вполне вероятно, что укладка мономера Aβ(25-35) в виде α-спиральной струк-

туры необходима для облегчения межмолекулярной упаковки Aβ внутри олигомеров. Образование внутримолекулярной α-спирали может происходить как естественное следствие пространственной укладки мономера Aβ(25-35). После формирования межмолекулярных взаимодействий между этими спиральными мономерами Aβ происходит олигомеризация пептидов с их последующей конформационной реорганизацией и образованием удлиненных β-листов, которые составляют зрелые амилоидные фибриллы. Этот механизм подтверждается предыдущими исследованиями фибриллогенеза пептидов Aβ [33], где было показано, что он действует при фибриллогенезе модельного пептида «спираль–поворот–спираль» [34]. В то же время α-спиральный компонент в мономерной структуре пептида Aβ(25-35) в водном растворителе, по-видимому, играет роль в иницировании агрегации пептидов.

На втором этапе исследования использовали метод молекулярной динамики, который позволил моделировать картину внутримолекулярной подвижности молекулы бета-амилоидного пептида (25-35). В качестве начальных приближений



**Рис. 2.** Исходная структура и оптимизированная структура молекулы бета-амилоидного пептида (25-35) в условиях вакуума (а) и явно заданного водного окружения (б). Жирной линией указан ход основной цепи.

были использованы наиболее стабильные конформационные состояния молекулы. Молекулярно-динамическое моделирование для молекулы бета-амилоидного пептида (25-35) в конформации с минимальным значением полной энергии проводили сначала в условиях вакуума, а затем в гипотетическом кубическом объеме с молекулами воды с наложенными периодическими граничными условиями. Размер ящика с водой подбирали в соответствии с размерами исследуемой молекулы. Далее проводили релаксацию молекулы с учетом реального водного окружения. Для имитации водного окружения частота столкновений атомов с молекулами воды задана равной  $50 \text{ пс}^{-1}$ . Исходная структура и оптимизированная структура молекулы бета-амилоидного пептида (25-35) в условиях вакуума и явно заданного водного окружения представлены на рис. 2.

Согласно результатам проведенного расчета молекула бета-амилоидного пептида (25-35) сохраняет свернутый характер пептидной цепи до и после оптимизации. В стабильных конформациях водородные связи между СО- и NH-группами пептидной цепи не разрушаются в процессе молекулярной динамики, несмотря на изменения во внутримолекулярной энергии пептида на 10–15 ккал/моль. Устойчивость структуры отдельных фрагментов подтверждают также значения двугранных углов в основной цепи молекулы. Полу-

ченные данные позволяют заключить, что глобальная конформация бета-амилоидного пептида (25-35) содержит устойчивые элементы пространственной структуры, которые могут быть ответственны за формирование стабильной конформации, необходимой для связывания с рецепторами белков. Допустимые изменения величин двугранных углов внутреннего вращения при моделировании методом молекулярной динамики в вакууме и водном окружении наблюдаются и в энергетически самой предпочтительной конформации пептида. Согласно полученным расчетным результатам в течение симуляции в вакууме молекулярного движения в предпочтительной конформации молекулы бета-амилоидного пептида (25-35) имеют место заметные флуктуации остатков, главным образом, в N-концевой части молекулы. Следует отметить, что такая тенденция к изменению конформационного состояния остатка Gly<sup>25</sup> в пределах глобальной конформации молекулы наблюдалась и в результатах теоретического конформационного анализа, т.е. было получено несколько сравнимых по стабильности конформаций, различающихся лишь конформационным состоянием остатка Gly<sup>25</sup>. Полученные результаты могут быть полезны при исследовании механизма действия бета-амилоидного пептида (25-35).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. N. Zhao, L. Lu, L. Y. Chew, and Y. Mu, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 12631 (2014).
2. E. Cerf, R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, et al., *Biochem. J.*, **421**, 415 (2009).
3. R. Sultana, H. F. Poon, J. Cai, et al., *Neurobiol. Dis.*, **22**, 76 (2006).
4. T. Kohno, K. Kobayashi, T. Maeda, et al., *Biochemistry*, **35**, 16094 (1996).
5. M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, et al., *Biochemistry*, **37**, 11064 (1998).
6. O. M. A. El-Agnaf, G. B. Irvine, G. Fitzpatrick, et al., *Biochem. J.*, **336** (Pt 2), 419 (1998)
7. G. Shanmugam and R. Jayakumar, *Biopolymers*, **33**, 421 (2004).
8. G. Shanmugam, P. L. Polavarapu, *Biophys. J.*, **87**, 622 (2004).
9. A. M. D'Ursi, M. R. Armenante, R. Guerrini, et al., *J. Med. Chem.*, **12**, 4231 (2004).
10. G. Wei and J. E. Shea, *Biophys. J.*, **91**, 1638 (2006).
11. S. Lee and Y. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **25**, 838 (2004).
12. L. Millucci, L. Ghezzi, G. Bernardini, and A. Santucci, *Curr. Prot. Peptide Sci.*, **11**, 54 (2010).
13. B. Ma and R. Nussinov, *Biophys. J.*, **90**, 3365 (2006).
14. E. Terzi, G. Holzemann, and J. Seelig, *Biochemistry*, **33**, 1345 (1994).
15. Y. Song, P. Li, L. Liu, et al., *Sci. Rep.*, **8**, 765 (2018).
16. R. F. McGuire, F. A. Momany, and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **76**, 375 (1972).
17. F. A. Momany, R. F. McGuire, A. W. Burgess, and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **79**, 2361 (1975).
18. H.A. Scheraga, *Biopolymers*, **22**, 1 (1983) .
19. G. Nemethy, M. S. Pottle, and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **87**, 1883 (1983).
20. E. M. Popov, *Int. J. Quant. Chem.*, **16**, 707 (1979).
21. I. S. Maksumov, L. I. Ismailova, and N. M. Godjaev, *J. Struct. Khim.*, **24**, 147 (1983).
22. J. Jr. Hermans and D. Ferro, *Biopolymers*, **10**, 1121 (1971).
23. W. C. Davidon, *AEC Res. Develop. Rep.*, ANL-5990 (1959).
24. R. Fletcher and M. J. D. Powell, *J. Computer*, **6**, 163 (1963).
25. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains, *Pure Appl. Chem.*, **40**, 291 (1974).
26. S. Weiner, P. Kollman, D. T. Nguyen, and D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, **7**, 230 (1986).
27. N. L. Allinger and Y. Yuh, *MM2 Program, QCPE 395* (Indiana University, Indiana, 1982).
28. D. White, J. Kuddock, and P. Edgington, in *CHEM-MIN Program in Computer Aided Molecular Design*, Ed. by W. G. Richards (IBC Technical Services, 1989).
29. W. C. Still, *MacroModel* (Columbia University, NY, USA).
30. *Quanta/CHARMm, Molecular Simulations* (Warmshurst, Mass., USA).
31. J. W. Pitera, M. Falta, and W. F. van Gunsteren, *Biophys. J.*, **80**, 2546 (2001).
32. G. A. Agaeva, U. T. Agaeva, and N. M. Godjaev, *Biophysics (Springer)*, **60**, 365 (2015).
33. M. D. Kirkitadze, M. M. Condrón, and D. B. Teplow, *J. Mol. Biol.*, **312**, 1103 (2001).
34. Y. Fezoui, D. M. Hartley, D. M. Walsh, et al., *Nature Struct. Biol*, **7**, 1095 (2000).

Conformational Particularities of Beta-Amyloid Peptide 25-35

G.A. Agaeva\* and G.Z. Najafova\*\*

\*Institute for Physical Problems, Baku State University, ul. Z. Khalilova 23, Baku, AZ-1148 Azerbaijan

\*\*French-Azerbaijani University, ul. Nizami 183, Baku, AZ1010 Azerbaijan

In Alzheimer's disease, beta-amyloid peptide (A $\beta$ ) plays an important role in the mechanism of neurodegeneration. A small fragment of A $\beta$ (25-35) (with the sequence GSNKGAIIGLLM) is regarded to be the functional domain of A $\beta$ , responsible for its neurotoxic properties and represents the biological active region of A $\beta$ . Conformational analysis of each C-terminal segment of the peptide by the method of molecular mechanics revealed a limited number of most probable conformations and quite clearly helped to clarify what forces stabilize the structures. The obtained results showed that A $\beta$ (25-35) energetically has a propensity for adopting alpha-helix conformation of the C-terminal octapeptide segment. A molecular dynamics method was used to build a model of intramolecular mobility in the A $\beta$ (25-35) molecule. It was demonstrated that in low-energy conformations, A $\beta$ (25-35), the orientation of flexible structures of the N-terminal region with respect to the structures of the C-terminal region is different.

*Keywords: beta-amyloid peptide 25-35, conformation, molecular mechanics method, molecular dynamics method*

УДК 577.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ КОНФОРМАЦИИ ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА – КОФЕРМЕНТА ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ

© 2023 г. Ж.В. Бочкова\*, В. Лю\*\*, Н.А. Браже\*, А.А. Жгун\*\*\*, Г.В. Максимов\*,#

\*Биологический факультет, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 2/12, Москва, 119234, Россия

\*\*Биологический факультет Университета МГУ-ППИ,

ул. Гоцзидасюеюань, 1, район Лунган, Даюньсиньчэн, Шэньчжэнь, Провинция Гуандун, 518172, Китай

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

#E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2023 г.

После доработки 26.06.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

С помощью серебряных наночастиц зарегистрированы и проанализированы спектры гигантского комбинационного рассеяния оксидазы D-аминокислот из почки свиньи, а также выявлены характерные спектральные параметры изменения конформации кофактора флавинадениндинуклеотида при активации фермента D-аминокислотами. Установлено, что от субстратной специфичности фермента зависит время, в течение которого регистрируются изменения конформации флавинадениндинуклеотида: в присутствии D-аланина на это требуется несколько секунд, а в присутствии D-серина — минуты.

*Ключевые слова:* спектроскопия комбинационного рассеяния, серебряные наноструктуры, FAD, оксидаза D-аминокислот.

DOI: 10.31857/S000630292305006X, EDN: PGUDSC

Известно, что оксидаза D-аминокислот (DAAO) является флавопротеином, активным центром которого служит флавинадениндинуклеотид (FAD). DAAO вступает в окислительно-восстановительные реакции селективно с D-аминокислотами (преимущественно нейтральными, такими как D-аланин, D-пролин и D-серин) [1]. На первой стадии ферментативной реакции образуется промежуточный комплекс (так называемый *ripple complex*), включающий восстановленный фермент и производную аминокислоты — иминокислоту [2]. Далее, в аэробных условиях фермент окисляется кислородом, продуцируя пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), а иминокислота гидролизуется с образованием

соответствующей  $\alpha$ -кетокислоты и аммиака [3].

Известно, что фермент DAAO содержится в клетках дрожжей (например, *Rhodotorula gracilis*, *Trigonopsis variabilis* [4]) и тканей высших организмов, в том числе человека. Различия в функциональности фермента DAAO, полученного из разных источников, определяются минимальными отличиями в его трехмерной структуре [5]. Начиная с 1940-х годов структура фермента и его физиологическая роль активно изучались. С одной стороны, DAAO представляет интерес в качестве участника катаболизма D-аминокислот, вовлеченных в регуляторные процессы, например, нейромодулятора D-серина в центральной нервной системе. D-серин является ко-агонистом N-метил-D-аспаратных рецепторов (NMDAR) и накапливается в астроцитах. Там же синтезируется фермент DAAO, который контролирует доступность этой аминокислоты в синапсах, в конечном счете влияя на уровень активации

*Сокращения:* DAAO — оксидаза D-аминокислот, FAD — флавинадениндинуклеотид, КР — комбинационное рассеяние, ГКР — гигантское комбинационное рассеяние.

NMDAR-рецепторов, критически важных для обучения и памяти [5].

С другой стороны,  $H_2O_2$ , как продукт реакции, также может влиять на ряд клеточных процессов в качестве сигнальной молекулы, окислителя и защитного агента. Так, нарушения в продукции  $H_2O_2$  за счет изменений работы DAAO связывают с хроническими болезнями почек, где этот фермент содержится в наибольшем количестве [6]. Ранее была доказана роль DAAO в нейронах спинного мозга, как фактора, участвующего в развитии гиперчувствительности к боли [7]. Также известно, что в эпителиальных клетках кишечника фермент DAAO метаболизирует D-аминокислоты, образуемые микробиотой, и выделяемый пероксид водорода защищает организм от возбудителя холеры и участвует в изменении состава микробиоты [8].

В последнее время DAAO приобретает значимость в качестве инструмента локальной контролируемой продукции  $H_2O_2$  для проведения исследований влияния активных форм кислорода на конкретные процессы, например, синаптическую передачу в нейронах [9] и в качестве биосенсера на различные D-аминокислоты [10].

Ввиду перспективности использования DAAO в биотехнологии, как селективного инструмента детекции D-аминокислот и способа локальной генерации  $H_2O_2$ , становятся актуальными исследования различных этапов реакции DAAO с D-аминокислотами. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) позволяет зафиксировать изменения в конформациях молекулярных структур, особенно обладающих сопряженными связями, каковыми являются флавиновые кофакторы. Сигнал КР можно усилить за счет эффекта плазмонного резонанса при использовании наноструктур благородных металлов [11].

В связи с этим мы поставили целью исследовать изменение конформации FAD при взаимодействии DAAO с D-аминокислотами при помощи спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с использованием серебряных плазмонных наноструктур.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью метода ГКР мы исследовали конформацию кофактора-FAD очищенного препарата оксидазы D-аминокислот, выделенной из почки свиньи, (Shanghai Yuanye Bio-Technology Co Ltd, Китай) в окисленной форме и при внесе-

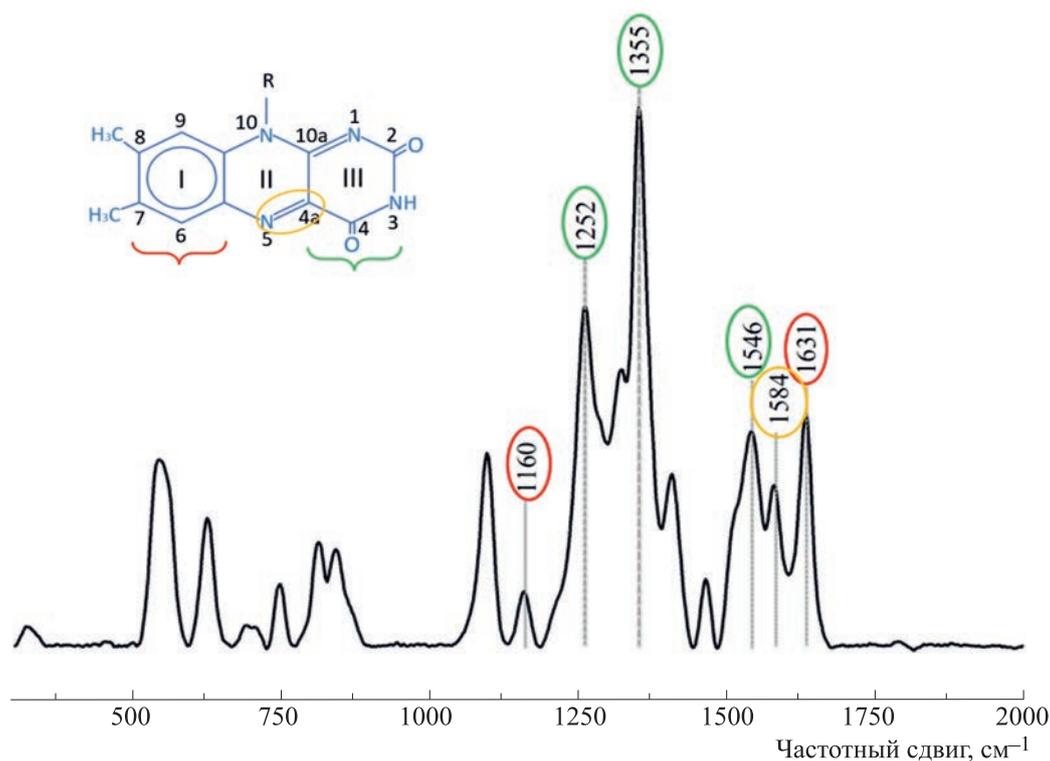
нии избытка аминокислот D-аланина или D-серина.

Спектры ГКР регистрировали на конфокальном КР-микроспектрометре NTEGRA Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия), соединенном с инвертированным микроскопом IX-71 (Olympus, Япония) в диапазоне  $300-2000\text{ см}^{-1}$ , с шагом измерения  $0.8\text{ см}^{-1}$ , регистратор – CCD-детектор с Пельтье-охлаждением ( $-50^\circ\text{C}$ ).

Кристаллический препарат DAAO (получен из почки свиньи, Shanghai Yuanye Bio-Technology Co Ltd, Китай) растворяли в натрий-фосфатном буфере (конечная концентрация белка  $1\text{ мг/мл}$ ). Раствор объемом  $20\text{ мкл}$  помещали на дно чашки Петри со стеклянным основанием (Metex), затем в каплю опускали фрагмент стекла с серебряными наноструктурами так, чтобы сторона с напыленными серебряными наноструктурами была повернута ко дну чашки Петри – навстречу лазерному лучу. Фокусировали лазер на слое жидкости около наноструктурированной поверхности, при этом использовали объектив  $20\times$  с числовой апертурой  $0.45$ ; диаметр области регистрации  $\sim 800\text{ нм}$ . Использовали лазерное возбуждение с длиной волны  $532\text{ нм}$  и мощностью лазера не более  $1\text{ мВт}$ , время накопления сигнала варьировало в разных сериях экспериментах и составляло  $1$  или  $60\text{ с}$ .

Реакцию DAAO с субстратом инициировали, примешивая к капле раствора ( $1\text{ мг/мл}$ ) эквивалентную по объему каплю раствора D-аланина ( $100\text{ мМ}$ ) или D-серина ( $100\text{ мМ}$ ) в натрий-фосфатном буфере. Для регистрации динамики сигнала КР от FAD-группы DAAO из почки свиньи в присутствии субстратов спектр снимали каждую секунду на протяжении первой минуты с момента внесения D-аминокислоты, а затем с интервалом в минуту.

Синтез серебряных наноструктур осуществляли по методике, разработанной ранее [12]. Для начала  $2.93\text{ г}$  нитрата серебра растворяли в  $40\text{ мл}$  воды Milli-Q. Параллельно растворяли  $7\text{ г}$  NaOH в  $30\text{ мл}$  воды и затем приливали тонкой струей при перемешивании к раствору нитрата серебра. Выпавший в ходе реакции осадок оксида серебра трижды промывали водой Milli-Q (по  $100\text{ мл}$ ), затем к нему при постоянном перемешивании добавляли  $25\text{ мл}$  воды Milli-Q и  $5\text{ мл}$  концентрированного раствора аммиака. В результате получали прозрачный раствор – аммиачный комплекс серебра. Покровные стекла, отмытые в детергенте и выдержанные в течение  $5\text{ мин}$  в ультразвуковой ванне, высушивали на воздухе и помещали в тер-



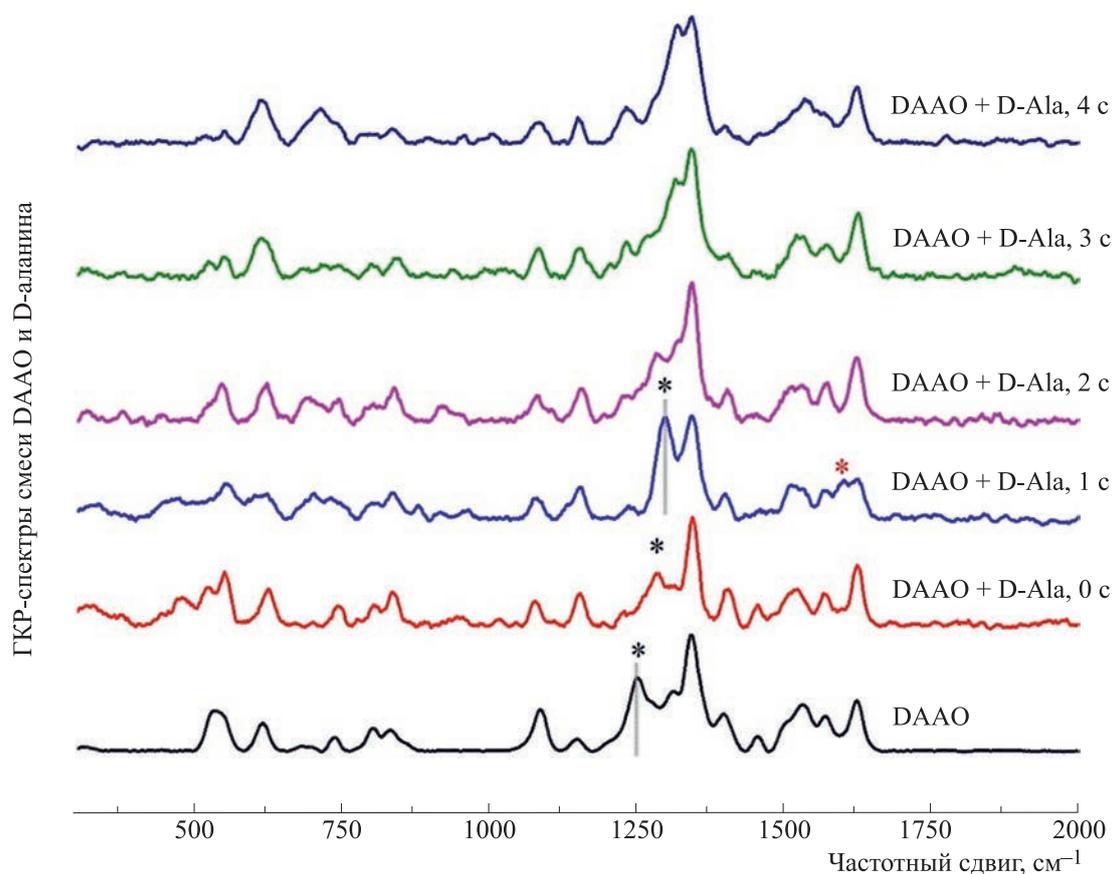
**Рис. 1.** Спектр ГКР фермента DAAO (раствор фермента в концентрации 1 мг/мл) в окисленном состоянии. Спектр соответствует спектру окисленного кофактора-FAD. Длина волны возбуждения – 532 нм, мощность лазера – не более 1 мВт на область регистрации с диаметром 800 нм, время накопления спектра 60 с. Разными цветами обведены положения максимумов характерных пиков на спектре и соответствующие им группы атомов на структурной формуле FAD.

мически устойчивый стеклянный стакан на 1 л, который устанавливали на поверхность, предварительно разогретую до 380°C. Раствор аммиачного комплекса серебра переливали в емкость ультразвукового распылителя (Альбедро ПМП, ТУ 9444-001-49917419-2010, Россия) (30 мл) и распыляли на поверхность покровных стекол медленными круговыми движениями при нагревании до 380°C, делая перерывы по 5 мин через каждые 3 мин. Расстояние сопла распылителя до покровных стекол составляло 1.5–2.0 см. Далее стекла выдерживали в течение 15 мин при 400°C, после чего охлаждали и упаковывали в светонепроницаемые капсулы. В результате на стеклах формировались сложные иерархические наноструктуры из металлического серебра в виде пересекающихся колец максимальным диаметром в районе 50 мкм, покрытых сферическими частицами с диаметром от нескольких единиц до десятков нм. Полученные наноструктуры сохраняли плазмонные свойства в течение нескольких месяцев.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен спектр ГКР FAD-группы DAAO в окисленной форме. Отметим, что регистрация КР-спектров без использования серебряных наноструктур при тех же параметрах измерения и концентрации фермента не позволяла определить положение отдельных пиков в одной группе (данные не представлены). В результате анализа ГКР-спектров показано, что среди полос наиболее выражены пики с положениями максимумов 1630, 1584, 1546, 1355, 1252, 1160  $\text{см}^{-1}$ , связанные с колебанием связей в одном из трех ароматических колец кофермента FAD (табл. 1).

Известно, что у восстановленной формы флавина меньше характерных пиков на КР-спектрах по сравнению с окисленной формой, что обусловлено изменениями в делокализации  $\pi$ -электронных орбиталей в N(5)- и N(10)-атомах [16]. При добавлении к DAAO субстрата D-аланина уже в течение 10 с были выявлены изменения полос спектра ГКР, которые через 60 с стабилизировались.



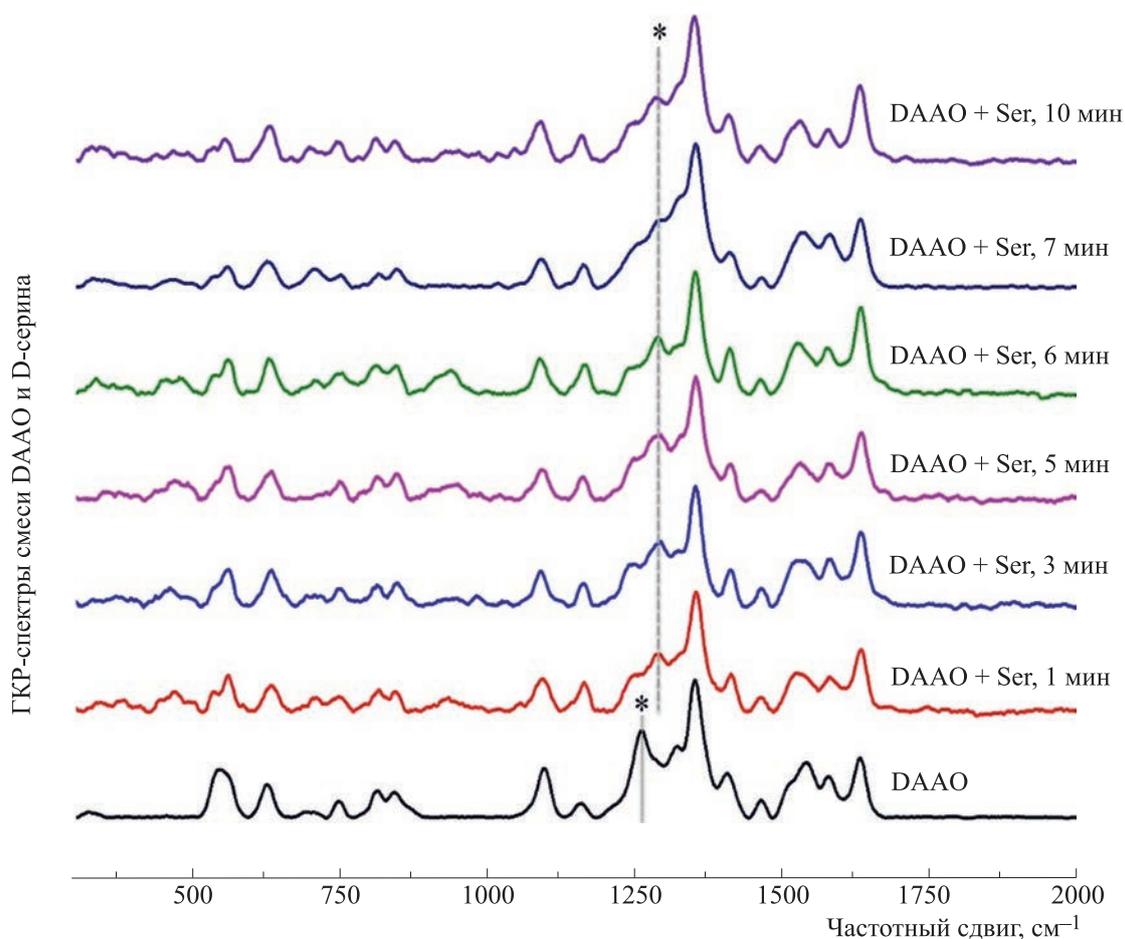
**Рис. 2.** ГКР-спектр DAAO при внесении избытка субстрата D-аланина (концентрация DAAO – 1 мг/мл, конечная концентрация D-аланина в растворе с ферментом – 50 мМ). Длительность регистрации спектров составляла 1 с. На спектре, зарегистрированном через 1 с после внесения D-аланина (спектр с пометкой «1 с»), звездочкой отмечен пик  $1612\text{ см}^{-1}$ , соответствующий восстановленной молекуле FAD. Символом # на спектрах «0 с» и «1 с» отмечен сдвиг пика  $1252\text{ см}^{-1}$  к положению около  $1300\text{ см}^{-1}$ , что, вероятно, обусловлено изменением вклада колебаний водородной связи в положении кольца III молекулы FAD-группы при стабилизации комплекса с D-аланином.

На рис. 2 представлена серия спектров ГКР, полученных через одну секунду после внесения D-аланина к раствору DAAO. Установлено, что

спустя 1 с появляется пик  $1612\text{ см}^{-1}$  (помечен звездочкой на спектре «1 с»), который исчезает на 3-й и последующих секундах и обусловлен либо

**Таблица 1.** Соотнесение пиков спектра ГКР фермента DAAO с колебаниями связей FAD-группы

Полосы спектра ГКР окисленного FAD из DAAO из почки свиньи, $\text{см}^{-1}$	Предполагаемые колебания связей кофермента FAD	Ссылка
1160	Связи кольца I	[13]
1252	[C(2)-N(3)H-C(4)] кольца III	[13–15]
1355	[C(4a)-C(10a)-N(1)-C(2)] кольца III	[13, 14, 16]
1546	[C(4a)-C(4)], [C(4a)-(10a)] связи кольца III	[15, 16]
1584	[C(4a)-N(5)] кольца II	[13–16]
1631	Связи кольца I	[14, 15]



**Рис. 3.** ГКР-спектры DAAO в присутствии D-серина (концентрация фермента – 1 мг/мл, конечная концентрация D-серина – 50 мМ). Звездочками обозначены изменение положения пика  $1252\text{ см}^{-1}$ .

семихинонной формой FAD [17], либо полностью восстановленной формой флавина [18]. Также на КР-спектре полученном через одну секунду после добавления D-аланина, пик  $1252\text{ см}^{-1}$  исчезает, но появляется пик в районе  $1300\text{ см}^{-1}$ , который также исчезает ко второй и третьей секундам. Подобный сдвиг полос ГКР-спектра флавина был обнаружен при замене водорода в позиции N(3)-H на дейтерий, а также при формировании водородной связи N(3)-H $\cdots$ R [14]. В связи с этим полоса  $1252\text{ см}^{-1}$  может служить индикатором состояния взаимодействия N(3)-H $\cdots$ белок.

В ходе ферментативной реакции DAAO с аминокислотой происходит ее дегидрирование и перенос водорода на N(5) флавина. При этом стабилизацию субстрата относительно фермента обеспечивают несколько водородных связей, а после дегидрирования этот процесс осуществляется за

счет также электростатических взаимодействия атомов в молекуле [5].

Вероятно, N(3)-H-группа флавина непосредственно не участвует в ходе ферментативной реакции, но стабилизация молекулы кофактора относительно лиганда может влиять на изменение водородной связи N(3)-H $\cdots$ R, что мы наблюдаем при внесении D-аланина к DAAO. Затем осуществляется повторное окисление восстановленного комплекса «фермент-аминокислота», и на второй секунде мы видим исчезновение пика  $1612\text{ см}^{-1}$ , в то время как пик в области  $1600\text{ см}^{-1}$  снова смещается в низкочастотную область ГКР-спектра.

На рис. 3 представлены спектры DAAO (1 мг/мл), характеризующие динамику изменения конформации FAD в присутствии D-серина (100 мМ). Известно, что константа Михаэлиса ( $K_M$ ) реакции человеческого фермента DAAO и

D-серина в четыре раза выше  $K_M$  реакции DAAO и D-аланина [19]. Также известно, что относительная активность фермента DAAO, выделенного из почки свиньи, в отношении D-аланина более чем вдвое превышает активность в отношении D-серина [20]. Сказанное согласуется с наблюдаемым эффектом: изменения на спектре FAD-группы DAAO при внесении D-серина происходят в течение более длительного времени. При внесении же D-аланина изменения были выявлены уже на первых секундах ферментативной реакции. Установлено, что при активации DAAO D-серином за 60 с меняется положение пика  $1252\text{ см}^{-1}$  и появляется пик в районе  $1300\text{ см}^{-1}$ , но в течение 7–10 мин область  $1200\text{–}1355\text{ см}^{-1}$  ГКР-спектра FAD перестает изменяться.

Итак, с помощью серебряных наночастиц были зарегистрированы ГКР-спектры и исследованы изменения конформации кофактора-FAD при активации DAAO субстратами с различной специфичностью. Выявлены характерные спектральные полосы с положениями максимумов:  $1630, 1584, 1546, 1355, 1252, 1160\text{ см}^{-1}$ , связанные с колебаниями групп атомов отдельных колец FAD-группы в окисленном состоянии. Показано, что в ходе окислительно-восстановительной реакции с субстратом происходит смещение пика  $1252\text{ см}^{-1}$  в длинноволновую область, что, предположительно, связано с процессами координации активного центра DAAO относительно аминокислоты. Также в случае с взаимодействием фермента с D-аланином удалось зарегистрировать появление пика  $1612\text{ см}^{-1}$ , связанного с восстановлением флавиновой части FAD. Мы также обнаружили разницу во времени, необходимом для регистрации изменений в ГКР-спектре FAD-группы фермента DAAO в присутствии D-аланина и D-серина. Так, во взаимодействии DAAO с D-аланином изменения ГКР-спектров происходили в течение нескольких секунд, а при добавлении D-серина для аналогичных результатов требовались минуты, что подтверждает литературные данные о разной активности фермента DAAO при взаимодействиях с указанными аминокислотами.

Предложенный подход на основе спектроскопии ГКР с серебряными плазмонными наноструктурами может быть использован в дальнейших исследованиях механизмов реакции DAAO с D-аминокислотами и определения эффективности генерации  $\text{H}_2\text{O}_2$  различными формами DAAO.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00006 для Ж.В. Бочковой и Н.А. Браже), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Pollegioni and G. Molla. *Cell Press*, **29** (6), 276 (2011).
2. K. Yagi, K. Okamura, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 77 (1967).
3. R. Upadhyaya, H. Nagajyothi, and S. G. Bhat. *Process Biochem.*, **35**, 7 (1999).
4. L. Pollegioni, B. Langkau, and W. Tischer, *J. Biol. Chem.*, **268** (19), 1385 (1993).
5. L. Pollegioni, S. Sacchi, and G. Murtas, *Front. Mol. Biosci.*, **5**, 107 (2018).
6. R. Konno, et al. *Arch. Toxicol.*, **74**, 473 (2000).
7. H. Wei, N. Gong, et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **111**, 30 (2013).
8. J. Sasabe, Y. Miyoshi, et al., *Nat. Microbiol.*, **1** (10), 16125 (2016).
9. A. L. Kalinichenko, et al., *Redox Biol.*, **60**, 2213 (2023).
10. S. Moussa, G. Murtas, et al., *ACS Appl. BioMater.*, **4**, 5598 (2021).
11. L. Rodriguez-Lorenzo, L. Fabris, and R. A. Alvarez-Puebla. *Anal. Chim. Acta*, **745**, 10 (2012).
12. A. A. Semenova, E. A. Goodilin, N. A. Brazhe, et al. *J. Mater. Chem.*, **22**, 24530 (2012).
13. Y. Nishina, T. Kitagawa, K. Shiga., *J. Biochem.*, **84**, 925 (1978).
14. T. Kitagawa, Y. Nishina, et al., *Biochemistry*, **18**, 1804 (1979).
15. Y. Nishina, H. Tojo, and K. Shiga, *J. Biochem.*, **104**, 227 (1988).
16. Y. Nishina, R. Miura, and H. Tojo. *J. Biochem.*, **99**, 329 (1986).
17. Y. Nishina, K. Shiga, et al., *J. Biochem.*, **88**, 411 (1980).
18. Y. Nishina, K. Shiga, and R. Miura, *J. Biochem.*, **94**, 1979 (1983).
19. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P14920/entry>.

20. M. Gabler, M. Hensel, and L. Fischer, *Enzyme Microb. Technol.*, **27** (8), 605 (2000).

## **A Raman Spectroscopic Investigation of Conformation of Flavin Adenine Dinucleotide, a CoEnzyme of D-Amino Acid Oxidase**

**J. Bochkova\***, **W. Liu\*\***, **N.A. Brazhe\***, **A.A. Zhgun\*\*\***, and **G.V. Maksimov\***

*\*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 2/12, Moscow, 119234 Russia*

*\*\*Department of Biology, MSU-BIT University,  
International University Park Road 1, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen,  
Guangdong Province, 518172 China*

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

Based on silver nanoparticles application, surface-enhanced Raman scattering spectra of D-amino acid oxidase from pig kidney were recorded and analyzed. Spectral parameters characteristic of conformational changes in cofactor flavin adenine dinucleotide during activation of the enzyme by D-amino acids were revealed. It was found that enzyme substrate specificity determines the amount of time from the start of the conformational changes of flavin adenine dinucleotide until they no longer occur: in the presence of D-alanine, registration of the said conformational changes takes up just a few seconds, while it takes 10 min in the presence of D-serine .

*Keywords: Raman spectroscopy, silver nanostructures, FAD, D-amino acid oxidase*

## АНАЛИЗ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ЛИНКЕРНЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА НМGB1, Н1 И ИХ КОМПЛЕКСОВ

© 2023 г. Е.В. Чихиржина\*, А.М. Поляничко\*, \*\*, #

\*Институт цитологии РАН, Тихорецкий просп., 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия

\*\*Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

#E-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Негистоновый хромосомный белок НМGB1 и гистон Н1 представляют собой линкерные белки хроматина. Функции линкерных белков тесно связаны с их конформационным состоянием. В настоящее время активно изучается строение белков, играющих ключевую роль в формировании высших уровней структурной организации хроматина. В данной работе проведен сравнительный анализ вторичной структуры линкерного гистона Н1 и негистонового белка НМGB1. Методами кругового дихроизма в УФ-области и ИК-Фурье-спектроскопии показано, что положительно заряженный гистон Н1 связывается с С-концевым фрагментом НМGB1, стабилизируя образующийся комплекс и индуцируя формирование дополнительных  $\alpha$ -спиральных участков в обоих белках.

*Ключевые слова:* линкерный гистон Н1, негистоновый хромосомный белок НМGB1, ИК-Фурье-спектроскопия, круговой дихроизм.

DOI: 10.31857/S0006302923050071, EDN: PHSQYC

ДНК в ядре эукариотической клетки входит в состав сложного ДНК-белкового комплекса, способного обеспечивать не только его функционирование, но и при необходимости высокую степень компактизации [1–6]. ДНК-связывающие белки в ядре клетки можно условно разделить на две большие группы – гистоновые и негистоновые белки хроматина. К первым относятся коровые гистоны (Н2А, Н2В, Н3 и Н4), составляющие белковую частицу, вокруг которой закручена двойная спираль ДНК, и линкерный гистон Н1, взаимодействующий с ДНК на межнуклеосомных (линкерных) участках [3, 4, 6]. Среди остальных (т. е. негистоновых) белков хроматина наиболее многочисленны представители обширной группы белков с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group, или НМG), некоторые из которых, так называемые белки НМGB, также функционируют в межнуклеосомных областях хроматина [5, 7–9]. Эти белки активно участвуют не только в регуляции структуры хроматина, но и принимают непосредственное участие во многих клеточных процессах, таких

как транскрипция, репарация, рекомбинация и др. [5, 7, 10].

Гистон Н1 состоит из центрального глобулярного домена и двух неупорядоченных участков на обоих концах полипептидной цепи [4, 11, 12]. Связывание гистона Н1 с ДНК происходит по большой бороздке за счет глобулярного домена белка [4, 6]. Основными структурными элементами белка НМGB1 являются два структурно консервативных НМGB-домена, соединенных коротким линкером, и неупорядоченный отрицательно заряженный С-концевой участок, состоящий из непрерывной последовательности остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот [5, 7, 9]. Белок НМGB1 взаимодействует с ДНК по малой бороздке посредством двух НМGB-доменов, индуцируя заметный (до 130°) изгиб двойной спирали в направлении большой бороздки [7]. При этом неупорядоченный С-концевой участок НМGB1 выступает в качестве модулятора межмолекулярных взаимодействий [5, 9]. Связываясь с ДНК по разным бороздкам, Н1 и НМGB1 не только изменяют структуру ДНК сходным образом, но и способны узнавать и предпочтительно взаимодействовать с участками

*Сокращения:* КД – круговой дихроизм, ИК – инфракрасный.

ДНК, обладающими различными структурными нарушениями [3, 13, 14].

Функции линкерных белков тесно связаны с их конформационным состоянием [9, 15–17]. В настоящее время активно изучается строение белков, играющих ключевую роль в формировании высших (наднуклеосомных) уровней структурной организации хроматина. Наиболее распространенным методом первичного исследования структуры биополимеров является метод кругового дихроизма (КД) в ультрафиолетовом диапазоне [18–26]. Этот метод позволяет оценивать основные параметры вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот, однако имеет ограниченную применимость для изучения вторичной структуры белков в составе надмолекулярных комплексов. По этой причине за последнее время вырос интерес к анализу колебательных спектров биомолекул. В частности, анализ спектров инфракрасного (ИК) поглощения позволяет получить более точную и обширную информацию о вторичной структуре белковой молекулы [27–29] по сравнению с традиционными методами кругового дихроизма в ультрафиолетовом диапазоне.

В данной работе проведен сравнительный анализ вторичной структуры линкерного гистона Н1 и негистонового белка НМGB1 с помощью КД-спектроскопии в ультрафиолетовой области спектра и ИК-Фурье-спектроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ядерные белки НМGB1 (мол. масса 26500 Да) и Н1 (мол. масса 21000 Да) выделяли из тимуса теллят экстракцией 5%-й хлорной кислотой с последующим осаждением 5.5 объемами подкисленного ацетона при  $-20^{\circ}\text{C}$  в соответствии с ранее описанной методикой [30]. Чистоту белков проверяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [31]. КД-спектры белков регистрировали на дихрографе Mark V (Jobin Yvon, Франция) в цилиндрических кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0.5 см в диапазоне длин волн 200–260 нм. Степень  $\alpha$ -спиральности оценивали с использованием сервера K2D3 [32], а также по величине молярной эллиптичности при 222 нм  $[\theta_{222}]$  [33], используя соотношение:

$$\alpha(\%) = \frac{[\theta_{222}] + 3000}{39000}.$$

Для измерения ИК-спектров готовили водные растворы белков и их комплексов в присутствии 15 мМ NaCl, которые затем подвергали лиофилизации. Таблетированные образцы готовили при помощи ручного пресса согласно описанной ра-

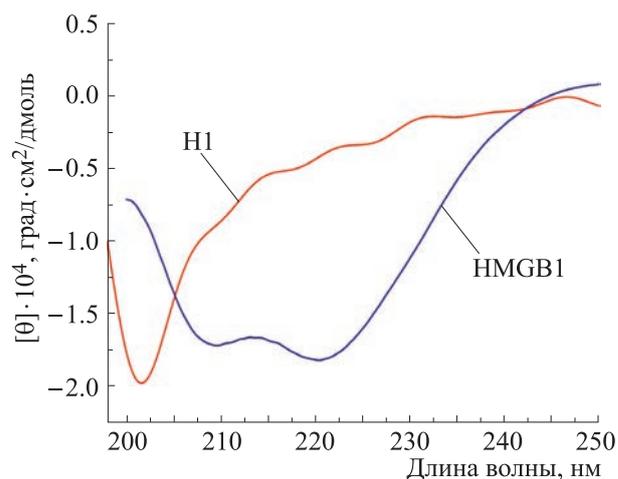


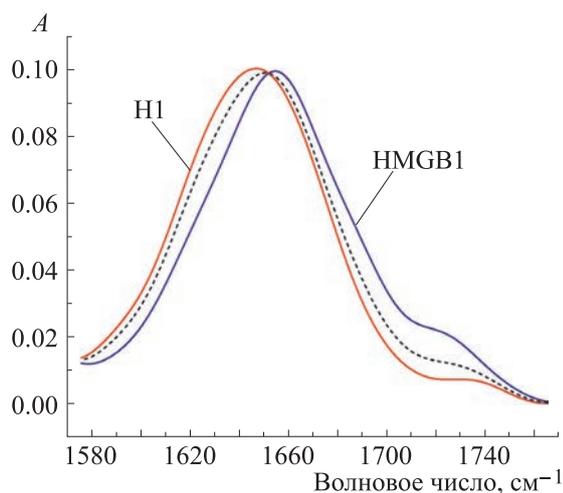
Рис. 1. КД-спектры негистонового белка НМGB1 и линкерного гистона Н1.

нее методике [34]. Полученные образцы исследовали в таблетках KBr на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Scientific, США), снабженном низкошумящим МСТ (HgCdTe) детектором. Регистрацию спектров проводили с разрешением  $2\text{ см}^{-1}$  и усредняли по 128 накоплениям. Первичную обработку и анализ спектров проводили с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа вторичной структуры линкерного гистона Н1 и негистонового белка НМGB1 мы использовали метод кругового дихроизма в ультрафиолетовом диапазоне. Характерные КД-спектры белков представлены на рис. 1. В спектре гистона Н1 доминирует отрицательная полоса с минимумом в окрестности 200 нм. Такая форма спектра характерна для полипептидных цепей с преимущественно неупорядоченной структурой. Количественная оценка степени  $\alpha$ -спиральности дает для гистона Н1 величину порядка 15%. КД-спектр белка НМGB1 имеет характерный для  $\alpha$ -спиральной структуры профиль с двумя минимумами при 209 и 222 нм. Количественный анализ этого спектра позволяет получить оценку доли  $\alpha$ -спиральных участков в белковой молекуле около 55%.

Несмотря на то, что линкерный гистон Н1 и негистоновый белок НМGB1 изучаются на протяжении многих лет, до сих пор нет исчерпывающих данных об их пространственной структуре, полученных прямыми методами, такими как рентгеноструктурный анализ или метод ядерного магнитного резонанса. На сегодняшний день ре-



**Рис. 2.** Спектры ИК-поглощения негистонового белка HMGB1 и линкерного гистона H1 в области полосы «Амид I», полученные в таблетках KBr. Прерывистой линией представлен спектр эквимольной «смеси» H1/HMGB1, полученный как сумма экспериментальных спектров отдельных белков, приведенных к соответствующей концентрации.

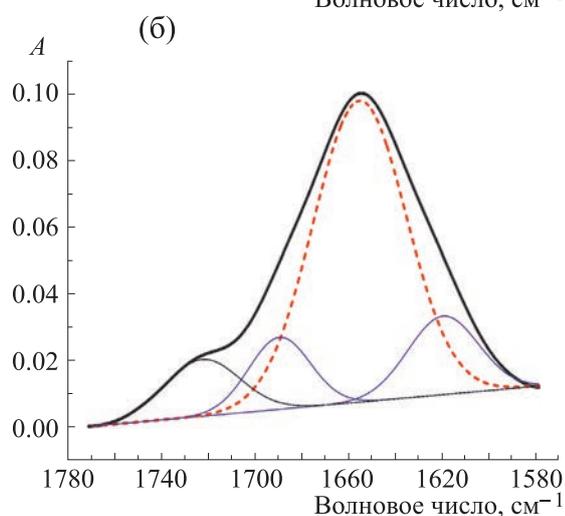
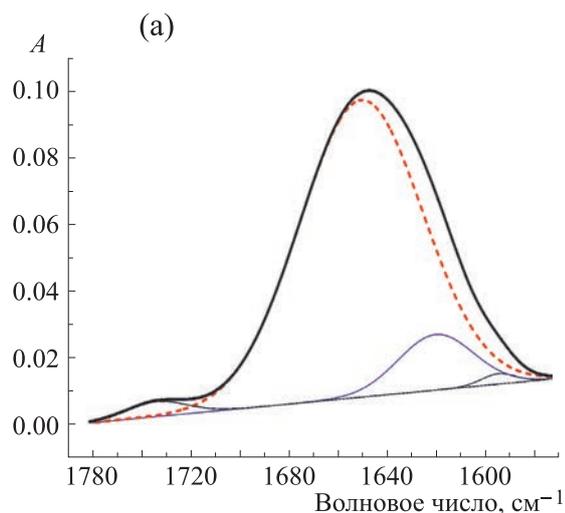
шены лишь структуры отдельных изолированных HMGB-доменов некоторых белков семейства HMGB [11, 12, 35] и глобулярного домена гистона H1. Не так давно для этих белков были получены предсказания пространственной структуры на основе численного эксперимента при помощи алгоритма AlphaFold [36–39].

Полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными ранее экспериментальными данными. Анализ предсказанной структуры дает следующие оценки для основных параметров вторичной структуры белков. Полипептидная цепь линкерного гистона H1 содержит около 20%  $\alpha$ -спиральных участков и порядка 80% участков в неупорядоченной конформации. У негистонового белка HMGB1 в состав  $\alpha$ -спиралей входят от 55% до 65% аминокислотных остатков. Разброс в 10% связан с тем, что  $\alpha$ -спиральность на уровне 55% обусловлена консервативной структурой HMGB-доменов в составе белка и подтверждена экспериментально. Кроме того, численный эксперимент предсказал возможность формирования ещё 10%  $\alpha$ -спиралей в отрицательно заряженном C-концевом фрагменте белка. Несмотря на то, что прямые структурные данные, подтверждающие такую возможность, в настоящее время отсутствуют, этот результат согласуется с анализом ранее проведенных спектроскопических исследований [40].

Особенностью белков HMGB1 и H1 является наличие большого числа заряженных аминокислотных остатков. Однако в физиологических условиях заряды этих белков противоположны по знаку. В составе HMGB1 преобладают отрицательно заряженные группы, преимущественно за счет дикарбоновых аминокислот C-концевого фрагмента, тогда как гистон H1, богатый остатками лизина и аргинина, заряжен положительно. Обладая противоположными зарядами, эти белки способны образовывать достаточно устойчивый комплекс, и в физиологических условиях проявляют склонность к агрегации, что приводит к значительному рассеянию света в образце [28, 30, 41, 42]. Последнее обстоятельство не позволяет получить КД-спектры, пригодные для анализа вторичной структуры таких систем [27, 41]. По этой причине для изучения структуры этих белков в составе комплекса мы использовали метод ИК-спектроскопии.

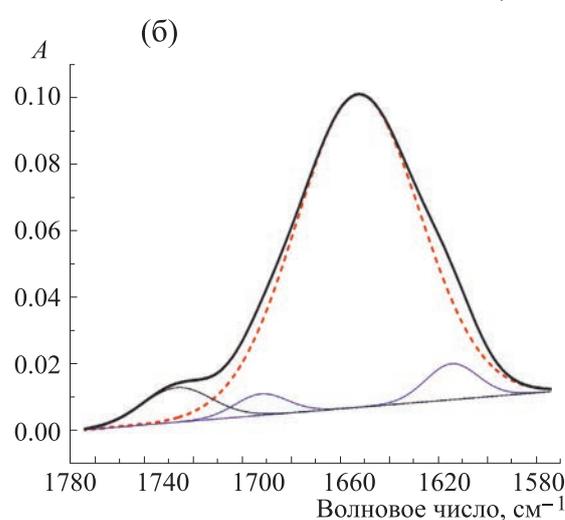
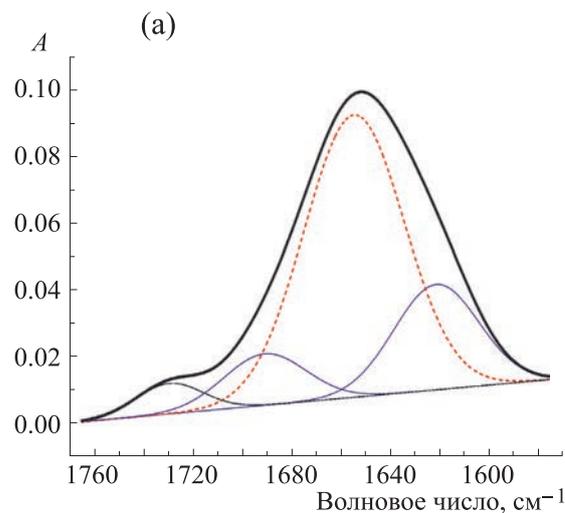
Пептиды и белки содержат в своей структуре многочисленные амидные группы, колебания которых отчетливо проявляются в их ИК спектрах. Характерные частоты этих колебаний находятся вблизи 1650, 1540 и 1240  $\text{cm}^{-1}$ , а соответствующие им полосы в ИК-спектре обычно называются полосами «Амид I», «Амид II» и «Амид III» соответственно. Данные спектральные полосы обусловлены преимущественно валентными колебаниями связей C=O, N-H, C-N и деформационными колебаниями группы CNH в составе пептидной группы [43]. Для определения параметров вторичной структуры белков по спектрам ИК поглощения мы анализировали полосу «Амид I» (1700–1600  $\text{cm}^{-1}$ ), представляющую собой суперпозицию колебаний, соответствующих разным конформациям полипептидных цепей (рис. 2). Эти колебания дают информацию об  $\alpha$ -спиралях,  $\beta$ -структурах различного типа и неупорядоченных участках белка. Отнесение полос поглощения в ИК спектре белков различным типам вторичной структуры было описано ранее (см обзор [44] и ссылки в нем).

Для разложения полосы «Амид I» на составляющие анализировали спектр второй производной, согласно описанной ранее методике [45,46]. Долю каждого типа вторичной структуры оценивали как площадь под соответствующим контуром, отнесенную к общей площади полосы «Амид I». Этот подход успешно применялся ранее для определения вторичной структуры различных белков [44–48]. В данной работе мы провели анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 и негистонового белка HMGB1.



**Рис. 3.** Разложение полосы «Амид I» линкерного гистона H1 (а) и негистонного хромосомного белка HMGB1 (б) методом второй производной. Прерывистой линией представлены доминирующие в разложениях полосы с максимумом: (а) при  $1650\text{ см}^{-1}$ , соответствует неупорядоченной структуре полипептидной цепи; (б) при  $1654\text{ см}^{-1}$ , соответствует  $\alpha$ -спиральной структуре полипептидной цепи.

Результаты разложения полосы «Амид I» в спектрах белков представлены на рис. 3. Анализ полученных результатов показывает, что в составе полосы «Амид I» спектра гистона H1 можно выделить несколько составляющих, причем основной вклад (около 85%) приходится на полосу с максимумом в окрестности  $1650\text{ см}^{-1}$ , соответствующую неупорядоченной структуре полипептидной цепи. Аналогичное разложение полосы «Амид I» в спектре HMGB1 демонстрирует, что основной вклад (около 65%) приходится на составляющую с максимумом в окрестности  $1655\text{ см}^{-1}$ , соответствующую  $\alpha$ -спиральным участкам. Полученные результаты находятся в разумном согласии как с ре-



**Рис. 4.** Разложение полосы «Амид I» методом второй производной для спектра эквимолярной «смеси» H1/HMGB1, полученного как сумма экспериментальных спектров отдельных белков, приведенных к соответствующей концентрации (а); спектра комплекса линкерного гистона H1 и негистонного хромосомного белка HMGB1 (б). Прерывистой линией представлена доминирующая в разложениях полоса с максимумом при  $1654\text{ см}^{-1}$ , соответствующая  $\alpha$ -спиральной структуре полипептидной цепи.

зультатами анализа КД-спектров, так и с теоретически предсказанными структурами.

Анализ вторичной структуры белков в составе комплекса H1-HMGB1 даст ответ на вопрос, сопровождается ли формирование белкового комплекса изменением структуры белков. Опираясь на полученные выше данные КД- и ИК-спектроскопии, можно ожидать, что если формирование комплекса H1-HMGB1 не приводит к изменениям вторичной структуры белков, то общее содержание  $\alpha$ -спиральных участков в комплексе составит порядка 60%. На рис. 2 представлен спектр

«смеси» Н1/НМGB1, полученный как сумма экспериментальных спектров отдельных белков, приведенных к соответствующей концентрации. Анализ полосы «Амид I» этого спектра (рис. 4а) показал, что в разложении доминирует полоса с максимумом в окрестности  $1654 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая  $\alpha$ -спиральным элементам. Количественная оценка  $\alpha$ -спиральности «смеси» белков дает величину 62%, близкую к ожидаемой. Для анализа изменений вторичной структуры белков, вызванных их взаимодействием, мы проанализировали ИК спектр их комплекса (рис. 4б). Количественный анализ разложения полосы «Амид I» дает оценку степени  $\alpha$ -спиральности в комплексе на уровне 85%. Данный результат показывает, что взаимодействие белков НМGB1 и Н1 сопровождается изменением вторичной структуры, как минимум одного из белков.

Опираясь на результаты предсказания структуры НМGB1 [38], можно предположить, что увеличение доли  $\alpha$ -спиральных участков в составе этого белка возможно за счет структуризации С-концевой последовательности дикарбоновых аминокислот. Обладая отрицательным зарядом, данная последовательность принимает активное участие в межмолекулярных взаимодействиях, в том числе с другими белками, за счет взаимодействия с их положительно заряженными группами [5, 7, 9, 35]. Такой механизм, вероятнее всего, реализуется и при взаимодействии с линкерным гистоном Н1, богатым остатками лизина и аргинина, несущими положительный заряд [4, 49, 50]. Однако увеличение доли  $\alpha$ -спиральных участков в эквимольном комплексе более чем на 20% по сравнению с исходным уровнем не может объясняться только лишь изменениями в структуре НМGB1, так как соответствует увеличению  $\alpha$ -спиральности белка НМGB1 до уровня, превышающего 100%. Вместе с тем, согласно ранее опубликованным данным, для гистона Н1 при некоторых межмолекулярных взаимодействиях также характерно формирование новых  $\alpha$ -спиральных участков [4, 19]. Поэтому при взаимодействии между гистоном Н1 и негистоновым белком НМGB1, скорее всего, наблюдается изменение в структуре обоих белков.

Таким образом, опираясь на полученные результаты, мы предполагаем, что положительно заряженный гистон Н1 связывается с С-концевым фрагментом НМGB1, стабилизируя образующийся комплекс и индуцируя формирование дополнительных  $\alpha$ -спиральных участков в обоих белках. Следует отметить, что, хотя реальный процент состава вторичной структуры в растворе, скорее всего, отличается от цифр, определенных в сухом состоянии, тем не менее наблюдаемое

увеличение  $\alpha$ -спиральности отражает изменения вторичной структуры белков происходящих при формировании комплексов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ вторичной структуры ядерных белков линкерного гистона Н1 и негистонового белка НМGB1 с использованием двух различных подходов (КД- и ИК-спектроскопии) дает хорошо согласующиеся между собой результаты. Взаимодействие белков НМGB1 и Н1 очень быстро приводит к образованию в растворе достаточно крупных рассеивающих комплексов, что затрудняет анализ КД-спектров в ультрафиолетовой области. Вместе, даже такие относительно крупные белковые комплексы не рассеивают свет в инфракрасной области спектра, что позволяет анализировать вторичную структуру белков в комплексе по их спектрам ИК поглощения.

На основании анализа данных ИК-спектроскопии мы предположили, что первичное образование комплекса происходит за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженным С-концевым участком НМGB1 и положительно заряженными группами гистона Н1. Последующее изменение вторичной структуры белков в комплексе приводит к образованию дополнительных  $\alpha$ -спиральных участков в обоих белках. Мы полагаем, что полученные данные будут полезны при изучении структурных перестроек в хроматине на наднуклеосомном уровне. В частности, механизмы взаимодействия белков на межнуклеосомном участке хроматина, подобные тем, что были описаны в данной работе, могут оказаться существенными также в процессах эпигенетического регулирования степени компактизации хроматина. На сегодняшний день остается открытым вопрос и о взаимодействии определенных вариантов гистона Н1 с белком НМGB1, и о том, какое влияние эти взаимодействия могут оказывать на структуру и конкретные функции генома. Кроме того, знание механизма взаимодействия гистона Н1 и белка НМGB1 необходимо для понимания механизмов их взаимодействия с другими молекулами-партнерами при формировании сложных функционально-значимых комплексов в хроматине.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ (ресурсные центры «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и наноэлектроники», «Криогенный отдел»).

### 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

- C. L. Woodcock and R. P. Ghosh, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000296 (2010).
- K. Luger, M. L. Dechassa, and D. J. Tremethick, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 436 (2012).
- A. E. White, A. R. Hieb, and K. Luger, *Sci. Rep.*, **6**, 19122 (2016).
- Е. В. Чихиржина, Т. Ю. Старкова и А. М. Поляничко, *Биофизика*, **63**, 1070 (2018).
- E. V. Chikhirzhina, T. Y. Starkova, A. Beljajev, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7948 (2020).
- Е. В. Чихиржина, Т. Ю. Старкова и А. М. Поляничко, *Биофизика*, **65**, 237 (2020).
- R. Reeves, *DNA Repair*, **36**, 122 (2015).
- Е. В. Чихиржина, А. М. Поляничко и Т. Ю. Старкова, *Цитология*, **62**, 716 (2020).
- E. V. Chikhirzhina, T. Yu. Starkova, and A. M. Polyanichko, *Biophysics*, **66**, 373 (2021).
- A. Raucci, S. Di Maggio, F. Scavello, et al., *Cell Mol. Life Sci.*, **76**, 211 (2019).
- V. Ramakrishnan, J. T. Fich, V. Graziano, et al., *Nature*, **362**, 219 (1993).
- C. Cerf, G. Lippens, V. Ramakrishnan, et al., *Biochemistry*, **33**, 11079 (1994).
- Y. V. Postnikov and M. Bustin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 462 (2016).
- F. Totsingan and A. J. Jr. Bell, *Prot. Sci.*, **22**, 1552 (2013).
- Е. В. Чихиржина, Е. И. Костылева, А. М. Поляничко и В. И. Воробьев, *Цитология*, **40**, 883 (1998).
- M. Watson, K. Stott, and J. O. Thomas, *Mol. Biol.*, **374**, 1286 (2007).
- K. Stott, M. Watson, F. S. Howe, et al., *J. Mol. Biol.*, **403**, 706 (2010).
- J. Zlatanova and J. Yaneva, *DNA Cell Biol.*, **10**, 239 (1991).
- Е. И. Рамм, Е. В. Чихиржина, Е. И. Костылева и В. И. Воробьев, *Биохимия*, **59**, 150 (1995).
- N. J. Greenfield, *Nature Protocols*, **1**, 2876 (2006).
- Е. В. Чихиржина, А. М. Поляничко, Е. И. Костылева и В. И. Воробьев, *Молекуляр. биология*, **45**, 356 (2011).
- A. M. Polyanichko, V. V. Andrushchenko, P. Bour, et al., In *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy*, ed. by D. S. Rodgers (Nova Science Publishers, N.-Y., 2012), pp. 67–126.
- A. Micsonai, F. Wien, L. Kerna, and J. Kardos, *Biophys. Comput. Biol.*, **112**, E3095 (2015).
- Е. В. Чихиржина, Е. И. Костылева, В. И. Воробьев и А. М. Поляничко, *Цитология*, **60**, 923 (2018).
- Y. Izumi, K. Matsuo, K. Fujii, et al., *J. Radiat. Res.*, **59**, 108 (2018).
- A. J. Miles, R. W. Janes, and B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.*, **50**, 8400 (2021).
- A. Polyanichko and H. Wieser, *Biopolymers*, **78**, 329 (2005).
- A. Polyanichko and E. Chikhirzhina, *J. Mol. Struct.*, **1044**, 167 (2013).
- А. М. Поляничко, В. И. Воробьев и Е. В. Чихиржина, *Молекуляр. биология*, **47**, 338 (2013).
- Е. В. Чихиржина, А. М. Поляничко, А. Н. Скворцов и др., *Молекуляр. биология*, **36**, 525 (2002).
- U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
- A. Louis-Jeune, M. A. Andrade-Navarro, and C. Perez-Iratxeta, *Proteins*, **80**, 374 (2012).
- J. A. Morrow, M. L. Segall, S. Lund-Katz et al., *Biochemistry*, **39** (38), 11657 (2000).
- Е. Е. Тымченко, А. А. Солдатова, Е. В. Чихиржина и А. М. Поляничко, *Биофизика*, **67**, 22 (2022).
- A. M. Read, P. D. Cary, C. Crane-Robinson, et al., *Nucl. Acids Res.*, **21**, 3427 (1993).
- J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, et al., *Nature*, **596**, 583 (2021).
- M. Varadi, S. Anyango, M. Deshpande, et al., *Nucl. Acids Res.*, **50** (D1), D439 (2022).
- <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P10103>.
- <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q0I1J2>.
- Т. Ю. Родионова, Е. В. Чихиржина, В. И. Воробьев и А. М. Поляничко, *Журн. структур. химии*, **50**, 1009 (2009).
- M. Polyanichko, E. V. Chikhirzhina, A. N. Skvortsov, et al., *J. Biomolec. Struct. Dyn.*, **19**, 1053 (2002).
- L. A. Kohlstaedt and R. D. Cole, *Biochemistry*, **3**, 570 (1994).
- S. Kint and Y. A. Tomimatsu, *Biopolymers*, **18**, 1073 (1979).
- A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1073 (2007).
- А. М. Поляничко, Н. М. Романов, Т. Ю. Старкова и др., *Цитология*, **56**, 316 (2014).
- Е. А. Тельная, Л. В. Плотникова, А. Д. Гарифуллин и др., *Биофизика*, **65**, 1154 (2020).
- Л. В. Плотникова, А. М. Поляничко, М. В. Успенская и др., *Вестн. Санкт-Петербургского ун-та*, **4**, 34 (2017).
- Л. В. Плотникова, М. О. Кобелева, Е. В. Борисов и др., *Цитология*, **60**, 1037 (2018).
- J. Allan, T. Mitchell, and N. Harborne, *J. Mol. Biol.*, **187**, 591 (1986).
- R. Vila, I. Ponte, M. Collado, et al., *J. Biol. Chem.*, **276**, 46429 (2001).
- Е. И. Рамм, Е. В. Чихиржина, Е. И. Костылева и В. И. Воробьев, *Биохимия*, **59**, 150 (1995).

## **Analysis of the Secondary Structure of Chromatin Linker Proteins HMGB1, H1 and Their Complexes**

**E.V. Chikhirzhina\* and A.M. Polyanichko\*, \*\***

*\*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, Saint-Petersburg, 194064 Russia*

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

The nonhistone chromosomal protein HMGB1 and histone H1 are chromatin linker proteins. The functions of linker proteins are closely related to their conformational state. Currently, the structure of proteins that play a key role in the formation of higher levels of chromatin structural organization is being actively studied. In this work, a comparative analysis of the secondary structure of the linker histone H1 and the nonhistone protein HMGB1 was carried out. By using UV-circular dichroism and FTIR spectroscopy it was shown that the positively charged histone H1 binds to the C-terminal fragment of HMGB1, stabilizing the resulting complex and inducing the formation of additional  $\alpha$ -helical regions in both proteins.

*Keywords: linker histone H1, nonhistone chromosomal protein HMGB1, FTIR spectroscopy, circular dichroism*

УДК 577.325

## ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОИНУЛИНАЗЫ ИЗ *Aspergillus ficuum* С МОНО-, ДИ- И ПОЛИСАХАРИДАМИ

© 2023 г. С.М. Макин\*, А.Н. Дубовицкая\*, Д.Ю. Богомолов\*, М.С. Кондратьев\* \*\*, М.Г. Холявка\*, \*\*\*, #, В.Г. Артюхов\*

\*Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

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

\*\*\*Севастопольский государственный университет, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

#E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 16.08.2023 г.

Целью работы был анализ особенностей пространственной организации молекулы эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* после связывания с моно-, ди- и полисахаридами. Изучены изменения объема и количества внутренних полостей при связывании инулиназы с моно- (глюкоза, фруктоза), ди- (сахароза, манноза) и полисахаридами (инулин), описаны преобразования в количестве и длине туннелей и пор, проанализирована реорганизация состава и локализации скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы фермента. Показано, что в моделях инулиназы в комплексе с сахарозой (вторым субстратом) и маннозой (активатором) наблюдаются одинаковые типы внутренних структур. Аналогичная закономерность выявлена и при образовании комплексов с продуктом реакции – фруктозой и ингибитором – глюкозой. Кроме того, установлено, что состав как заряженных, так и гидрофобных скоплений не претерпевает значительных изменений после связывания инулиназы с моно-, ди- и полисахаридами, т.е. взаимодействие с рядом названных углеводов отражается преимущественно на внутренних структурах фермента. Изученные особенности связывания инулиназ с различными лигандами необходимо учитывать при разработке на их основе современных промышленных биокатализаторов.

*Ключевые слова:* инулиназа, катализ, полости, туннели, компьютерное моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302923050083, EDN: PGZZTE

Благодаря своей способности гидролизовать инулин фермент инулиназа играет важную роль в пищевой промышленности в области производства фруктозы и фруктоолигосахаридов из экстрактов инулиносодержащих растений [1]. Различают экзо- и эндоинулиназы. Экзоинулиназы в качестве продуктов образуют в основном моносахариды, эндоинулиназы – преимущественно олигосахариды [2, 3], т.е. эндоинулиназа действует на внутренние  $\beta$ -2,1-гликозидные связи инулина с образованием фруктоолигосахаридов различной длины цепи [4, 5].

Известно, что растительное сырье, богатое инулином, представляет собой смесь сахаров [4] и может включать, помимо инулина, такие углеводы как сахароза и манноза. При этом фруктоза и глюкоза, являясь продуктами гидролиза инулина, оказывают на фермент ингибирующее воздействие [6–8]. Основным субстратом фермента является инулин, однако сахароза также способна выступать в качестве минорного субстрата [9, 10]. В работе [11] было показано, что отношение активности к сахарозе и инулину обычно значи-

тельно выше для инвертаз ( $\geq 1500$ ) и ниже для инулиназ ( $\leq 10$ ). Установлено, что соотношение этих типов активностей зависит от pH, температуры и метода определения ферментативной активности [12]. Существуют данные об активаторном действии маннозы на инулиназу [13, 14]. Таким образом, сахара, содержащиеся в растительном сырье, способны оказывать различное влияние на инулиназную активность. Именно поэтому важно изучать механизмы взаимодействия различных сахаров с молекулами ферментов методами молекулярного докинга и 3D-моделирования [15, 16].

Известно, что свойства и функции различных ферментов определяются их пространственной структурой, обусловленной аминокислотной последовательностью и ее пространственной укладкой, выражающейся в определенной третичной структуре [17]. Даже небольшое изменение размеров той или иной макромолекулы в пределах нескольких ангстрем, может повлечь за собой существенное изменение ее свойств, вплоть до полной потери каталитической активности [18, 19]. Со-

временные методы компьютерного моделирования пространственных структур белков позволяют прогнозировать влияние различных факторов на их свойства и функции [20, 21].

Внутренние полости, туннели и поры являются важными элементами пространственной организации белка. Они участвуют в таких процессах, как распознавание и связывание лигандов, перенос малых молекул, а также меж- и внутримолекулярный перенос энергии [22–24]. Данные элементы пространственной структуры ферментов принимают участие в образовании специфического микроокружения, необходимого для осуществления биохимических реакций, и обеспечивают транспорт различных соединений к активному и субстратсвязывающему центрам белка.

Белок-субстратные взаимодействия возникают только в непосредственной близости субстрата и активного центра. Большинство ферментов (>60%) имеют каталитические центры, расположенные в глубоких внутренних полостях [17, 25]. Отсюда следует, что структура молекулы фермента нуждается в особых путях, идущих через молекулу белка для обеспечения каталитического взаимодействия. Такими путями выступают туннели, через которые осуществляется транспорт субстратов, кофакторов, растворителей и продуктов к активному центру и от него [26].

Туннели тяжело поддаются анализу из-за большого количества их промежуточных форм, но именно благодаря разнообразию вариаций структур и размеров туннелей, состава выстилающих их аминокислотных остатков, а также обусловленной туннелями конформационной динамичности в белковых молекулах данные структурные элементы принимают участие в обеспечении доступа предпочтительного субстрата к активному центру фермента и в то же время ограничении такового для нежелательных молекул путем соединения внутреннего пространства биомакромолекул с внешним пространством, позволяя стерически комплементарным субстратам перемещаться внутрь и/или выходить из активных центров ферментов; обеспечении доступа лигандов с различными физико-химическими свойствами к регуляторным центрам; поддержании стабильности белков; обеспечении термодинамической и кинетической составляющих реакций, требующих отсутствия водного окружения [19, 27, 28].

Полости белковых молекул считаются энергетически невыгодными элементами пространственной структуры, так как в некоторых случаях они могут быть заполнены водой, из-за чего конформация всей молекулы оказывается менее стабильной [29]. Тем не менее, данные структуры часто являются эволюционно консервативными, так как играют важную роль в формировании пространственной организации ферментов. Так, полости зачастую обеспечивают необходимую

конформационную подвижность биомакромолекул и участвуют в различных механизмах их денатурации [21, 24]. Помимо постоянно существующих, есть полости, которые формируются на весьма краткий период. Примером такой структуры могут служить полости, образующиеся в результате флип-флоп перехода ароматического кольца фенилаланина. Это в очередной раз напоминает о том, что молекулы ферментов являются динамичными, а не статичными системами, и что для функционирования им необходима определенная конформационная подвижность.

В связи с вышесказанным целью работы было выявить особенности взаимодействий эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* с моно-, ди- и полисахаридами, учитывая параметры туннелей, полостей и пор, которые образуются в ходе этих взаимодействий, а именно их объемы (в нм<sup>3</sup>) и протяженность (в Å).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования была выбрана пространственная структура эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7). Отрисовка молекул углеводов была произведена в HyperChem.

Докинг белковых структур с лигандами осуществляли в программном обеспечении AutoDock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodockvina-1-1-2-64-bit>). Вычисление параметров туннелей и внутренних полостей осуществляли при помощи программы MOLE (<http://mole.chemimuni.cz>). Анализ скоплений аминокислот на поверхностях белковых молекул проводили на основе программного обеспечения Maestro 10.3 (<https://www.schrodinger.com/products/maestro>).

Расстояния между аминокислотными остатками на поверхности ферментов были рассчитаны на основе координат атомов в их составе по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2},$$

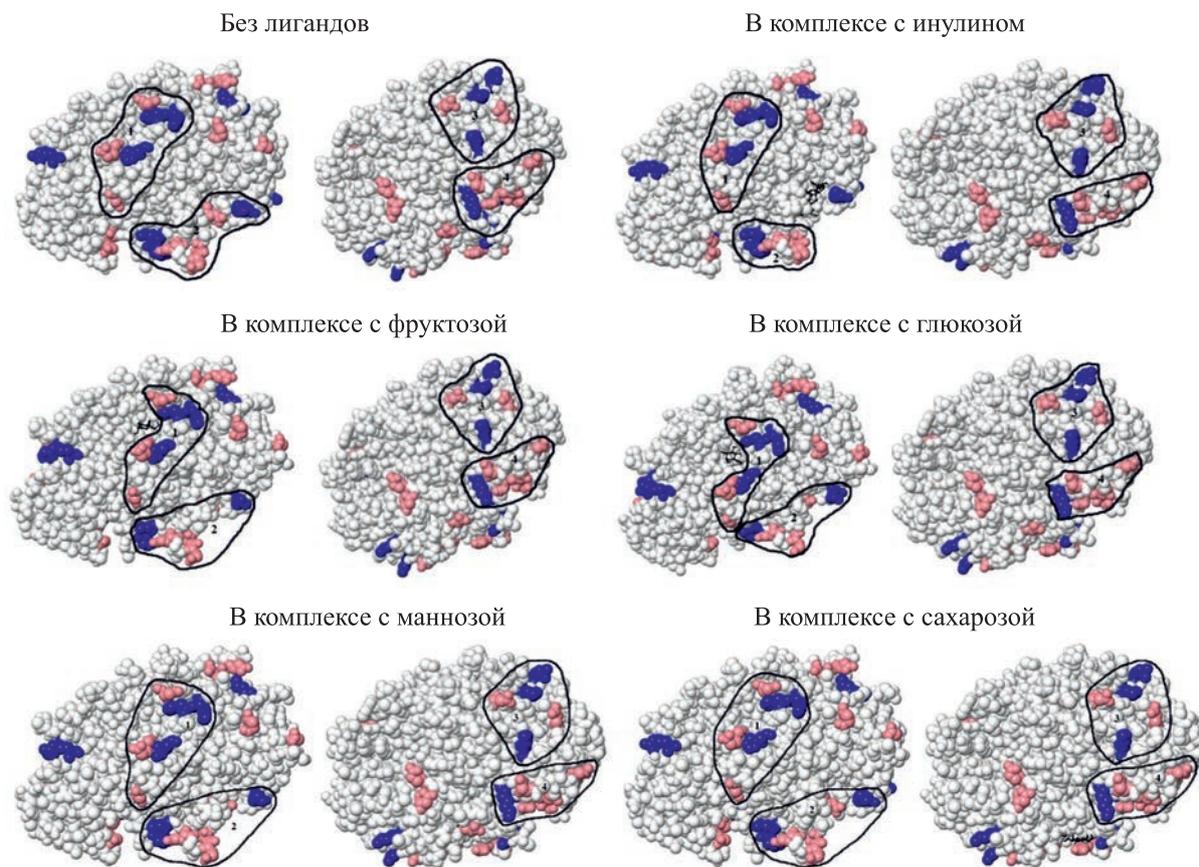
где  $x_1$  и  $x_2$  – координаты атомов двух аминокислот по оси абсцисс,  $y_1$  и  $y_2$  – координаты атомов аминокислот по оси ординат,  $z_1$  и  $z_2$  – координаты по оси аппликата. За скопление принимали аминокислотные остатки, расстояние между которыми не превышало 10 Å [30].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В пространственной структуре эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) обнаружено четыре скопления заряженных и восемь скоплений гидрофобных аминокислотных остатков. После одноточечного взаимодействия с используемыми в данной работе носителями количество, аминокислотный состав (табл. 1) и локализация (рис. 1) заряженных аминокислотных

**Таблица 1.** Аминокислотный состав заряженных скоплений на поверхности молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum*

Лиганд	Скопление 1	Скопление 2	Скопление 3	Скопление 4
Без лигандов	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с фруктозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с глюкозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с инулином	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu243, Glu247, Lys344, Glu246, Lys345	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с маннозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с сахарозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454

**Рис. 1.** Локализация скоплений заряженных аминокислотных остатков в составе моделей эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* при одноточечном связывании с углеводами.

**Таблица 2.** Аминокислотный состав гидрофобных скоплений на поверхности молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum*

Лиганд	Скопление 1	Скопление 2	Скопление 3	Скопление 4	Скопление 5	Скопление 6	Скопление 7	Скопление 8
Без лигандов	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с фруктозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с глюкозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с инулином	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Gly112, Val143, Ala206, Pro107, Ala117, Gly186	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	—	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с маннозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с сахарозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446

остатков изменяются только при связывании с инулином, что выражается в изменении состава аминокислот во втором скоплении. Одноточеч-

ный докинг подразумевает взаимодействие одной молекулы лиганда с выбранной моделью белка.

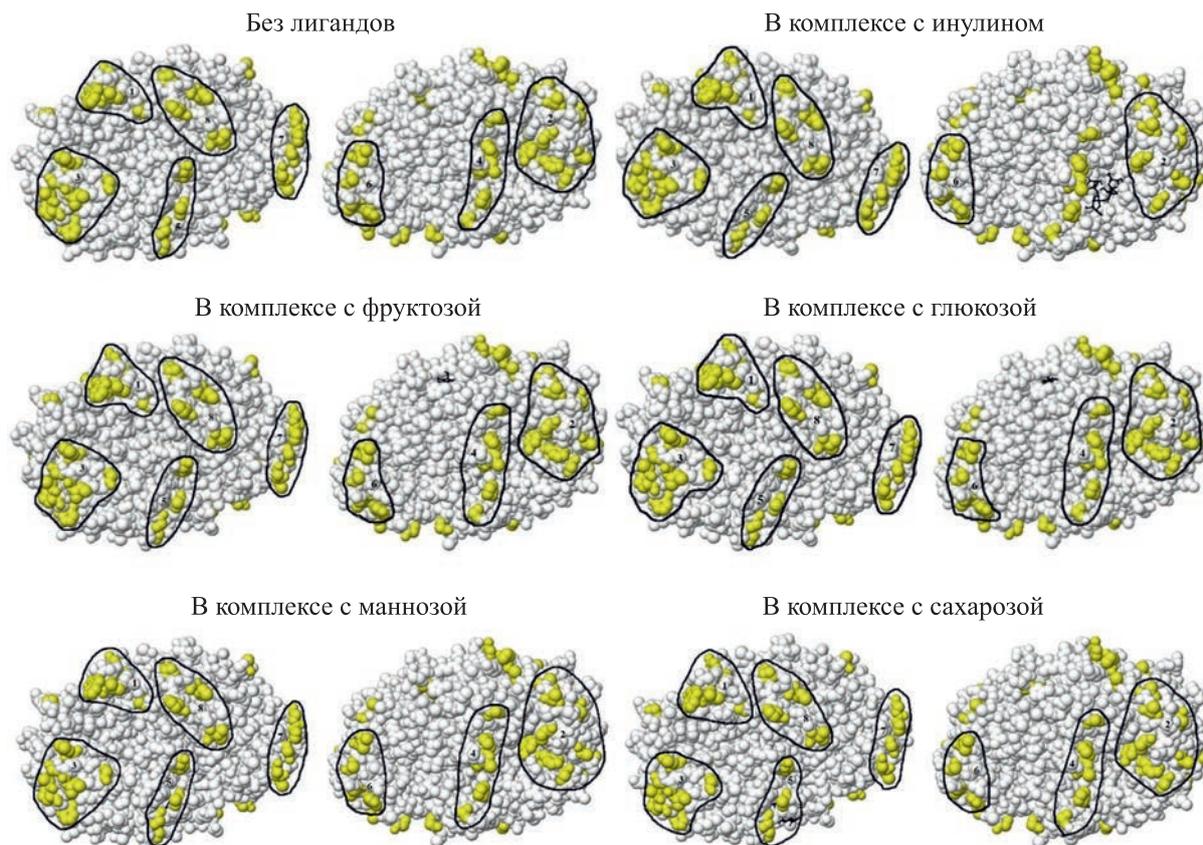


Рис. 2. Локализация скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в составе моделей эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* при одноточечном связывании с углеводами.

Для гидрофобных скоплений также наблюдаются изменения состава (табл. 2), количества и локализации (рис. 2) аминокислотных остатков только при взаимодействии с инулином: исчезает четвертое гидрофобное скопление, изменяется состав второго скопления.

В ходе исследования был проведен анализ внутренних структур моделей инулиназ (табл. 3). Типичными представителями внутренних структур являются туннели, внутренние полости и поры. Внутренние полости представляют собой пространство, не заполненное аминокислотами и не соединенное с внешним растворителем. Термин «пора» означает путь, идущий через молекулу белка, без каких-либо прерываний внутренней полостью, с одной стороны соединенный с внешней поверхностью молекулы. «Туннель» — путь, соединяющий поверхность белка с внутренней полостью, или две или несколько внутренних полостей [26].

Во всех представленных моделях присутствуют внутренние полости, большая из них имеет объем  $0.308 \text{ нм}^3$ . При взаимодействии с маннозой и сахарозой образуется новая внутренняя полость

объемом  $0.205 \text{ нм}^3$ . В модели, полученной путем одноточечного докинга инулиназы с инулином, полость объемом  $0.152 \text{ нм}^3$  прилегает к лиганду, что может оказывать значительное влияние на сродство лиганда к ферменту, тогда как в других моделях данная полость отсутствует (рис. 3). Поры в представленных моделях отсутствуют.

Разные полости (у инулиназы без лигандов их шесть) имеют отличный объем вследствие различного их расположения в пространстве молекулы и аминокислотного состава их стенок. Во всех представленных моделях наблюдается присутствие двух полостей равного объема  $0.171 \text{ нм}^3$ . В большинстве моделей присутствует туннель длиной  $15.09 \text{ \AA}$ , кроме комплексов с маннозой и сахарозой, в которых длина туннеля составляет  $11.78 \text{ \AA}$ . В модели «инулиназа—инулин» также присутствует второй туннель длиной  $6.39 \text{ \AA}$ .

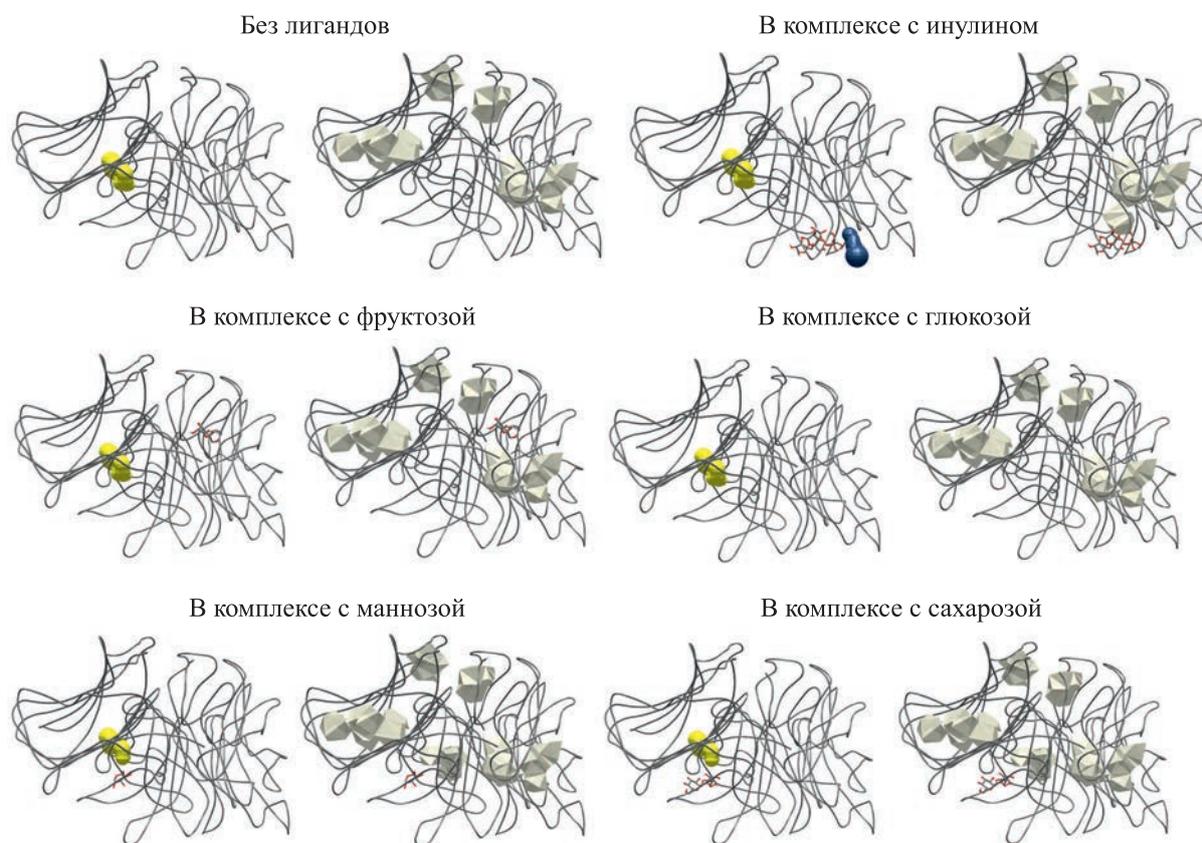
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных расчетов было выявлено, что в моделях комплексов молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с сахарозой и манно-

**Таблица 3.** Профили внутренних структур моделей молекул, полученных путем одноточечного молекулярного докинга инулиназы из *Aspergillus ficuum* с различными углеводами

Нативный фермент	Глюкоза	Инулин	Манноза	Сахароза	Фруктоза
Объем внутренних полостей, нм <sup>3</sup>					
0.308	0.308	0.308	0.308	0.308	0.308
0.251	0.251	0.251	0.251	0.251	0.251
–	–	–	<b>0.205</b>	<b>0.205</b>	–
0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171
0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171
–	–	<b>0.152</b>	–	–	–
0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137
0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115
Длина туннелей, Å					
15.09	15.09	15.09	11.78	11.78	15.09
		<b>6.39</b>			

Примечание. Полужирным курсивом выделены структуры, отличающиеся от таковых у нативного фермента.

**Рис. 3.** Локализация внутренних структур в составе моделей эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* при одноточечном связывании с углеводами (слева – туннели, справа – внутренние полости).

зой наблюдаются одинаковые типы внутренних структур, что может служить подтверждением того, что данные сахара оказывают схожий эффект на активность фермента. Манноза является активатором инулиназы, тогда как сахароза представляет собой субстрат для данного фермента, наряду с инулином [31]. В случае взаимодействия с фруктозой (продуктом реакции гидролиза инулина) происходит ингибирование фермента. Модели комплексов энзима с глюкозой и фруктозой обладают схожими профилями внутренних структур, что позволяет сделать вывод об ингибиторных свойствах глюкозы в отношении инулиназы [15]. Кроме того, было показано, что состав как заряженных, так и гидрофобных скоплений на поверхности молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* не претерпевает значительных изменений после ее взаимодействия с изучаемыми нами лигандами. Соответственно, можно сделать вывод о том, что взаимодействие с рядом представленных сахаров происходит с изменением конфигурации и состава внутренних структур фермента – туннелей и внутренних полостей.

Производство инулина из инулинсодержащего сырья – необходимый этап в технологии создания низкокалорийных подсластителей. Данное исследование позволяет углубить понимание механизмов взаимодействия инулиназы с различными углеводами, что открывает возможность применять полученные результаты в пищевой промышленности, благодаря пониманию того, какие поли-, ди- и олигосахариды являются ингибиторами инулиназ (фруктоза, глюкоза), а какие – их активаторами (сахароза, манноза).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. G. Holyavka, A. R. Kayumov, D. R. Baydamshina, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **115**, 829 (2018).

2. B. A. Абелян и Л. С. Манукян, *Биохимия*, **61** (6), 1028 (1996).
3. T. A. Kovaleva, M. G. Kholyavka, and V. G. Artyukhov, *Biotechnology in Russia*, **1**, 43 (2012).
4. R. S. Singh, T. Singh, and C. Larroche, *Bioresour. Technol.* **273**, 641 (2019).
5. A. Mathur and D. Sadana, *World J. Pharmacy Pharmaceut. Sci.*, **10** (4), 360 (2021).
6. Q. Meng, C. Lu, H. Gao, et al., *Bioresour. Technol.*, **320**, 124346 (2021).
7. L. Zhang, C. Zhao, W. Y. Ohta, and Y. Wang, *Process Biochemistry*, **40** (5), 1541 (2005).
8. R. I. Corona, A. Morales-Burgos, C. Pelayo, et al., *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **42**, 1779 (2019).
9. M. Germec and I. Turhan, *Biomass Convers. Biorefin.*, **13** (6), 4727 (2021).
10. D. Das, R. Selvaraj, and M. Ramananda Bhat, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **22**, 101363 (2019).
11. E. J. Vandamme and D. G. Derycke, *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139 (1983).
12. M. G. Holyavka, V. G. Artyukhov, and T. A. Kovaleva, *Biocatal. Biotransformation*, **34** (1), 1 (2016).
13. Q. Sun, M. Arif, Z. Chi, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **169**, 206 (2021).
14. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, М. И. Калашникова и Д. А. Сливкин, *Технологии живых систем*, **1**, 60 (2011).
15. М. Г. Холявка и В. Г. Артюхов, *Инулиназы в условиях различного микроокружения: биофизические, кинетические и структурно-функциональные свойства* (Изд. дом ВГУ, Воронеж, 2018).
16. M. G. Holyavka, M. S. Kondratyev, A. A. Samchenko, et al., *Comput. Biol. Med.*, **71**, 198 (2016).
17. L. Pravda, K. Berka, R. Svobodová-Vařeková, et al., *BMC Bioinformatics*, **15** (1), 379 (2014).
18. G. P. Barletta and S. Fernandez-Alberti, *J. Chem. Theory Comput.*, **14** (2), 998 (2018).
19. J. Brezovsky, V. Kozlikova, and J. Damborsky, In *Protein Engineering. Methods in Molecular Biology*, Vol. 1685, Ed. by U. Bornscheuer, and M. Höhne (Humana Press, New York, 2018), pp. 25–42. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8\_3
20. M. Petřek, P. Košíňová, J. Koča, and M. Otyepka, *Structure*, **15** (11), 1357 (2007).
21. A. Stank, D. B. Kokh, M. Horn, et al., *Nucl. Acids Res.*, **45** (W1), W325 (2017).
22. S. E. D. Dias, A. M. Martins, Q. T. Nguyen, and A. J. P. Gomes, *BMC Bioinformatics*, **18** (1), 1 (2017).
23. H. Li and Y. O. Kamatari, In *High Pressure Bioscience – Basic Concepts, Applications and Frontiers*, Ed. by K. Akasaka and H. Matsuki (Springer, 2015), pp. 237–257.
24. M. S. Mason, B.Y. Chen, and F. Jagodzinski, *Molecules*, **23** (2), 351 (2018).
25. S. Marques, J. Brezovsky, and J. Damborsky, *Understanding Enzymes: Function, Design, Engineering, and Analysis* (Jenny Stanford Publishing, New York, 2016).
26. P. Kokkonen, D. Bednar, G. Pinto, et al., *Biotechnol. Adv.*, **37** (6), 107386 (2019).

27. T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, and U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17** (2), 215 (2013).
28. A. Stank, D. B. Kokh, J. C. Fuller, and R. C. Wade, *Acc. Chem. Res.*, **49** (5), 809 (2016).
29. U. Sreenivasan and P. H. Axelsen, *Biochemistry*, **51**, 12785 (1992).
30. Д. Ю. Богомолов, Ф. А. Сакибаев, М. Г. Холявка и др., *Сорбционные и хроматографические процессы*, **21** (4), 555 (2021).
31. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и В. Г. Артюхов, *Биотехнология*, **1**, 43 (2012).

## The Specificity of Interactions between Endoinulinase from *Aspergillus ficuum* and Mono-, Di- and Polysaccharides

S.M. Makin\*, A.N. Dubovitskaya\*, D.Yu. Bogomolov\*, M.S. Kondratyev\*, \*\*, M.G. Holyavka\*, \*\*\*, and V.G. Artyukhov\*

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

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

\*\*\*Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

The aim of this study was to analyze the peculiarities of spatial organization of an endoinulinase molecule from *Aspergillus ficuum* after its binding to mono-, di-, and polysaccharides. This study examined changes in volume and number of internal cavities upon binding of inulinase to mono- (glucose, fructose), di- (sucrose, mannose), and polysaccharides (inulin). Transformations in the quantity and length of tunnels and pores were described, and the reorganization of the composition and localization of charged and hydrophobic amino acid residues clusters on the surface of the enzyme molecule was analyzed. It was shown that the models of inulinase in the complex with sucrose (an alternative substrate) and mannose (an activator) exhibit the same types of internal structures. The similar pattern was found in the formation of complexes with fructose (a reaction product) and glucose (an inhibitor). In addition, it was established that both charged and hydrophobic clusters do not undergo significant changes in chemical composition after the binding of inulinase to mono-, di-, and polysaccharides, i.e., the interaction between inulinase and carbohydrates mentioned above primarily affects the internal structures of the enzyme. The specificity of the binding of inulinases to various ligands should be taken into account while developing modern industrial biocatalysts based on inulinase.

*Keywords: inulinase, catalysis, cavities, tunnels, computer modeling*

УДК 577.3

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ВОДНЫЕ РАСТВОРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

© 2023 г. Е.Е. Текуцкая\*,#, Г.П. Ильченко\*, М.Г. Барышев\*\*

\*Кубанский государственный университет, Ставропольская ул., 149, Краснодар, 350040, Россия

\*\*Кубанский государственный технологический университет, Московская ул., 2, Краснодар, 350000, Россия

#E-mail: tekytska@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 24.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

Предложен механизм преобразования сигнала магнитной составляющей низкочастотного электромагнитного поля, имеющего крайне низкую энергию, в химический и биохимический отклик в водных растворах биополимеров на основе нуклеиновых кислот и белков. Из разработанной теоретической модели следует, что в основе окислительных повреждений ДНК и конформационных переходов белков лежит универсальный механизм, связанный с изменением количества наиболее долгоживущей формы – перекиси водорода в химическом осцилляторе взаимопревращений активных форм кислорода под действием низкоинтенсивного электромагнитного поля. Экспериментально определено, что количественное содержание перекиси водорода в растворах биополимеров резонансоподобно зависит от частоты воздействующего поля. Конформационные изменения белков сопровождаются увеличением доступности и активности нуклеофильных центров, являющихся потенциальными мишенями для активных форм кислорода. Полное разворачивание и денатурация аминокислотной цепи белка под действием низкочастотного электромагнитного поля не происходит. Показано, что повышенное образование перекиси водорода при частотах 3 и 50 Гц приводит к окислительной модификации азотистых оснований ДНК.

*Ключевые слова:* низкочастотное электромагнитное поле, активные формы кислорода, перекись водорода, биополимеры, ДНК, альбумин, флуоресцентная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302923030095, EDN: PIZWON

Значительное количество магнитобиологических эффектов приходится на крайне низкочастотный (3–30 Гц) и сверхнизкочастотный (30–300 Гц) диапазоны электромагнитного поля (ЭМП), но первичные механизмы этого действия, несмотря на многочисленные исследования и предлагаемые модели, до сегодняшнего дня остаются до конца не ясными [1–4]. Между тем, воздействие ЭМП крайне низкочастотного и сверхнизкочастотного диапазонов на живые системы может носить двоякий характер. С одной стороны, негативное влияние ЭМП связано с необходимостью защиты организма человека, поскольку действие ЭМП на живые системы может приводить к повреждению ДНК, инициировать окислительную модификацию азотистых оснований и появлению одно- и двунитевых разрывов, а также к сбою в системе репарации ДНК, как показали исследования [5–7]. С другой стороны,

сверхнизкочастотное ЭМП в последние десятилетия занимает особое место в медицинских исследованиях, особенно в области лечения рака в сочетании с химиотерапевтическими препаратами и обезболиваниями [8, 9]. Предполагается, что под действием ЭМП может изменяться скорость диффузии через биологические мембраны, ориентация и конформация биологических макромолекул, а также состояние свободных радикалов.

Одним из важных источников мутаций выступает эндогенный и экзогенный окислительный стресс, которому подвергается ДНК всех живых организмов. Повышенный уровень образования активных форм кислорода (АФК), опосредованный физическими, химическими или биологическими факторами среды является наиболее генотоксическим процессом, воздействующим на ДНК [10–11].

Цель работы заключалась в разработке физико-химического механизма генерации АФК в водных растворах под действием низкочастотно-

*Сокращения:* ЭМП – электромагнитное поле, АФК – активные формы кислорода, ЧСА – человеческий сывороточный альбумин.

го электромагнитного поля и инициации повреждений биополимеров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований были водные растворы ДНК, получаемого химической и ультразвуковой обработкой водного экстракта молотосеменных и осетровых рыб (ICN, США), и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Водные растворы ЧСА получали путем разведения белка до концентрации 5 мкМ в буферной системе с различными значениями pH. Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции, равный  $E_{260\text{ нм}} = 200$ .

**Обработка проб электромагнитным полем.** В ходе экспериментов использовали разработанное нами устройство для автоматизированного исследования биологических жидкостей в ЭМП, подробное описание и структурная схема которого приведены в работе [12]. Обработку растворов ДНК и ЧСА низкочастотным ЭМП, в котором преобладает магнитная составляющая, проводили в химически чистой стерильной пластиковой посуде при толщине слоя 2 мм согласно методике, изложенной в работе [6]. Образец помещали в центр соленоида, где ЭМП с достаточной точностью можно считать однородным, поскольку размеры соленоида много больше размеров образца. Эффективное значение напряженности поля, измерение которой производили прибором «Экофизика-110А» с цифровым измерительным преобразователем ПЗ-80-ЕН50, в месте нахождения образца составляло  $550 \pm 30$  А/м. Частоту ЭМП варьировали от 0 до 50 Гц с шагом 0,5, 1 или 5 Гц. Задавали начальную частоту ЭМП и соответствующую напряженность и проводили обработку образца в течение 15 или 30 мин. Затем регистрировали спектр флуоресценции образца при соответствующей длине волны возбуждения. В растворе ДНК измеряли количественное содержание перекиси водорода.

Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре F-2700 (Hitachi, Япония).

**Определение содержания перекиси водорода** в водных растворах ДНК проводили с помощью спектрофотометрического метода, используя набор «PerOx Метод определения перекисей в образцах ЭДТА плазмы» (Immun Diagnostic AG, Германия) на микропланшетном ридере Multiskan (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Калибровочный график линейен в диапазоне  $1 \cdot 10^{-5}$  –  $5 \cdot 10^{-2}$  М.

**Статистическая обработка.** Полученные данные анализировали в пакете статистического анализа Statistica 6.0. Проверка гипотезы о нормальном (гауссовом) типе распределения результатов

проводилась по Шапиро–Уилксу, а также с помощью определения ординат нормированной гауссовой функции распределения согласно рекомендациям, изложенным в монографии [13]. Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

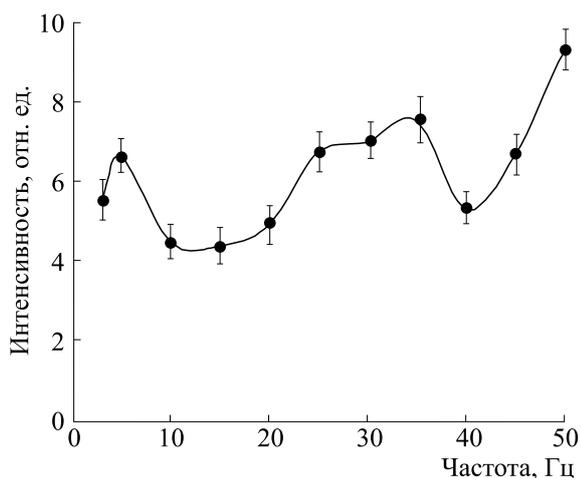
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Процесс образования АФК в водных растворах нуклеиновых кислот изучали с использованием растворов ДНК с известным нуклеотидным составом. Длины волн возбуждения флуоресценции  $\lambda_{\text{возб}}$  в растворах ДНК подбирали таким образом, чтобы возбуждались пиримидиновые основания ДНК. Учитывали, что полоса поглощения УФ-излучения молекулами ДНК составляет от 160 до 320 нм и наибольшее разрушающее действие на ДНК оказывает излучение с длиной волны  $\lambda_{\text{max}}$  253.7 нм. Оптимальной длиной волны возбуждения выбрана  $\lambda_{\text{возб}} = 320$  нм, поскольку резонансный пограничный УФ-диапазон (3.94 эВ) не разрушает, а лишь возбуждает молекулу ДНК.

На спектрах флуоресценции растворов ДНК с концентрациями 2.5, 0.25, 0.025 мкг/мл в диапазоне от 320 до 720 нм отмечали два характерных максимума интенсивности флуоресценции в области длин волн  $410 \pm 3$  нм и  $645 \pm 5$  нм. Первый максимум связан с наличием в составе молекул ДНК хромофоров, поглощающих УФ-излучение, – сопряженные  $\pi$ -связи азотистых оснований. Появление второго максимума, по-видимому, связано с изменением содержания АФК в растворе и косвенно свидетельствует о наличии в водном растворе ДНК синглетного кислорода. Известно, что молекулы синглетного кислорода могут образовывать возбужденные эксимеры ( $^1\text{O}_2$ )<sub>2</sub>, которые переходят в основное состояние с испусканием фотона в видимом диапазоне в районе 640–645 нм [14].

Получены зависимости интенсивности флуоресценции разбавленных водных растворов ДНК с концентрацией 0.025 мкг/мл от частоты ЭМП с шагом 5 Гц в области второго максимума  $645 \pm 5$  нм (рис. 1). Наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции области  $645 \pm 5$  нм по сравнению с контролем (раствором ДНК соответствующей концентрации без обработки ЭМП) всех исследуемых растворов ДНК при обработке низкоинтенсивным ЭМП с частотами 3–5, 25–35 и 50 Гц, что косвенно свидетельствует об изменении количества АФК, в частности, синглетного кислорода, в водном растворе (рис. 1).

Время жизни радикалов АФК, как правило, очень мало, поэтому об их появлении удобно судить по накоплению наиболее долгоживущей



**Рис. 1.** Усредненная зависимость интенсивности флуоресценции при  $\lambda_{\text{max}} = 645 \pm 5$  нм растворов ДНК с концентрацией 0.025 мкг/мл от частоты ЭМП. Время обработки образцов 30 мин,  $t = 21^\circ\text{C}$ .

формы — перекиси водорода. В водных растворах ДНК после обработки низкоинтенсивным ЭМП с соответствующими частотами определили содержание перекиси водорода. Из рис. 2 видно, что содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растворах ДНК увеличивается после обработки ЭМП с частотами 3–8, 25 и 50 Гц.

Мы изучали действие низкочастотного ЭМП на растворы ЧСА при значениях рН от 3.0 до 7.0 после обработки ЭМП с частотами от 3 до 32 Гц в течение 15 мин с шагом 0.5 Гц. Величина интенсивности триптофановой флуоресценции изменялась от 230 до 500 отн. ед. в зависимости от используемой частоты ЭМП, максимумы спектров

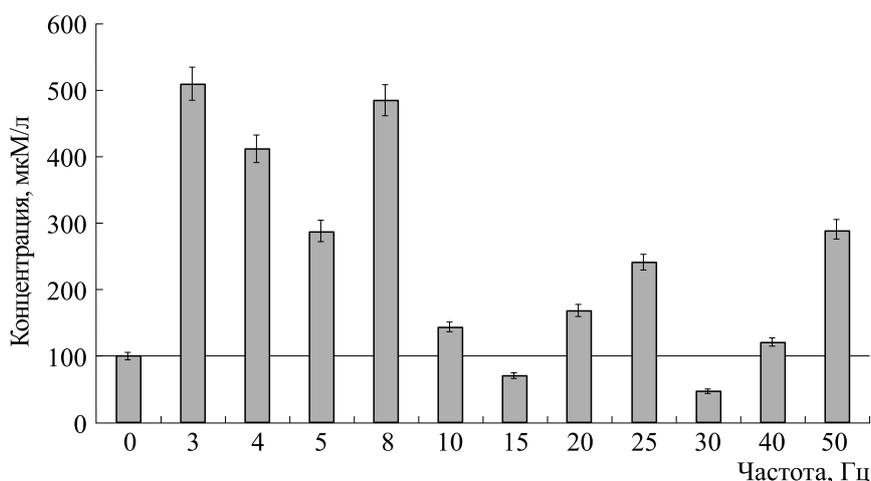
флуоресценции значительно смешались. Характер изменения спектров триптофановой флуоресценции ЧСА также различался при разных значениях рН.

На рис. 3 в качестве примера приведено семейство спектров триптофановой флуоресценции ЧСА с концентрацией  $1 \cdot 10^{-6}$  М при рН 3.0 после обработки ЭМП с разными частотами. В белковом растворе после обработки ЭМП наблюдали, кроме полосы флуоресценции триптофана, дополнительные полосы флуоресценции при всех изученных рН. Возможно, что данные полосы появляются в растворе ЧСА вследствие образования новых флуорофоров при окислении АФК аминокислотных остатков белка. Как видно из рис. 3, при рН 3.0 интенсивность флуоресценции  $I_{\text{фл макс}}$  после обработки раствора ЧСА ЭМП уменьшается с 440 (без обработки ЭМП) до 230 отн. ед., при этом максимум флуоресценции  $I_{\text{фл макс}}$  батохромно смещается в коротковолновую область на 15–20 нм.

Это свидетельствует о наличии хорошо известного эффекта — сдвига стационарного спектра испускания белков в коротковолновую область в присутствии тушителя [15].

Из спектров триптофановой флуоресценции ЧСА в диапазоне длин волн от 270 до 440 нм рассчитана интегральная интенсивность флуоресценции растворов ЧСА при разных значениях рН по формуле:

$$I_{\text{от.}} = \frac{I_{\text{сум.ф}}}{I_{\text{сум.К}}},$$



**Рис. 2.** Содержание перекиси водорода до (0 Гц) и после воздействия ЭМП с различными частотами в водных растворах ДНК с концентрацией 0.025 мкг/мл, время обработки образцов 30 мин,  $t = 21^\circ\text{C}$ .

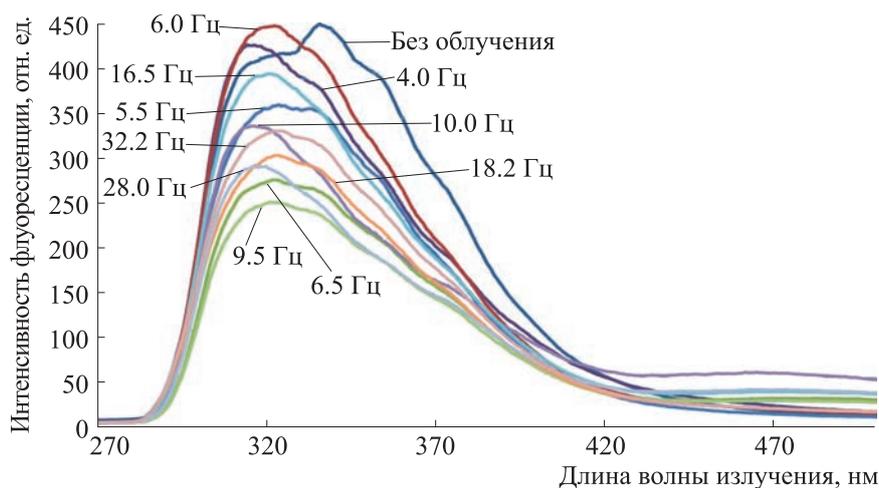


Рис. 3. Спектры триптофановой флуоресценции растворов ЧСА ( $1 \cdot 10^{-6}$  М) после обработки ЭМП разной частоты при pH 3.0. Время обработки образцов 15 мин,  $t = 23^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм.

где  $I_{\text{сум.Г}}$  — интегральная флуоресценция раствора ЧСА в диапазоне от 270 до 440 нм после обработки ЭМП с соответствующей частотой,  $I_{\text{сум.К}}$  — интегральная флуоресценция раствора ЧСА в от 270 до 440 нм без обработки ЭМП.

На рис. 4. приведены зависимости интегральных значений флуоресценции  $I_{\text{от}}$  водных растворов ЧСА от частоты ЭМП при значениях pH от 3.0 до 6.5.

Видно, что воздействие ЭМП приводит к увеличению  $I_{\text{от}}$  растворов ЧСА, имеющих pH 4.5, что близко к значению изоэлектрической точки. Положение максимума флуоресценции при этом оставалось практически неизменным. Это свидетельствует об уменьшении доступности аминокислотных остатков альбумина в центре, содержащем триптофан, для молекул воды и АФК и об уплотнении гидрофобного окружения Тгр-214.

При других значениях pH величина  $I_{\text{от}}$  ниже интегральной флуоресценции раствора ЧСА без обработки ЭМП (на рис. 4 показана пунктиром).

Значения квантовых выходов триптофановой флуоресценции растворов ЧСА изменяются при pH 4.5–5.5 с 0.041 до 0.070 и при pH 7.0 — с 0.040 до 0.048 после обработки ЭМП частотой 8 Гц (табл. 1). Это также является доказательством изменений окружения флуорофоров в молекуле альбумина, происходящих под действием низкоинтенсивного электромагнитного поля.

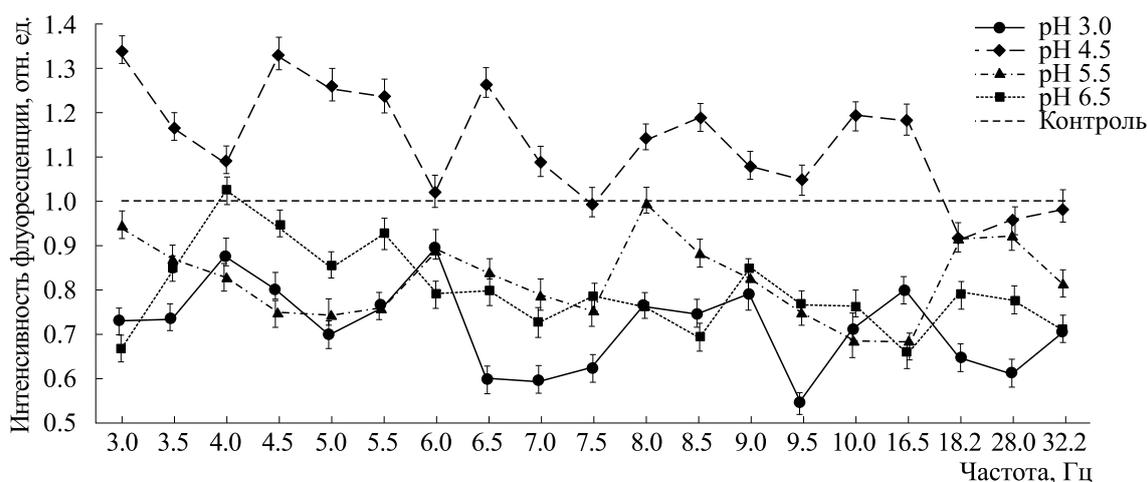


Рис. 4. Усредненные зависимости интегральной интенсивности флуоресценции растворов ЧСА ( $1 \cdot 10^{-6}$  М) от частоты ЭМП при разных значениях pH. Время обработки образцов 15 мин,  $t = 23^\circ\text{C}$ .

**Таблица 1.** Квантовый выход триптофановой флуоресценции водных растворов сывороточного альбумина ( $1 \cdot 10^{-6}$  М) с различными значениями pH после обработки ЭМП частотой 8 Гц

pH	Квантовый выход до обработки ЭМП	Квантовый выход после обработки ЭМП
3.0	$0.069 \pm 0.001$	$0.072 \pm 0.002$
3.5	$0.065 \pm 0.002$	$0.068 \pm 0.001$
4.5	$0.041 \pm 0.001$	$0.057 \pm 0.002$
5.5	$0.058 \pm 0.001$	$0.071 \pm 0.001$
6.5	$0.035 \pm 0.002$	$0.035 \pm 0.001$
7.0	$0.040 \pm 0.002$	$0.048 \pm 0.002$

### МОДЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ВОДНЫЕ РАСТВОРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

В разбавленных растворах биополимеров процессы образования АФК протекают по типу химического осциллятора [17]. Начальной стадией является инициация процесса – присоединение электрона  $e^-$  с ридберговски возбужденных уровней макромолекул (например, ДНК) [18] к свободным протонам воды с образованием радикала водорода:



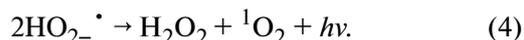
При нейтральном pH радикал водорода взаимодействует с молекулами растворенного кислорода, концентрация которых на 3 порядка выше, чем концентрация протонов и гидроксид-ионов ( $10^{17}$  против  $10^{14}$  молекул/см<sup>3</sup>) [19], образуя гидроперекисный радикал:



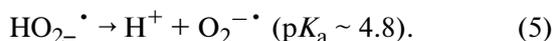
Дальнейшее образование перекиси происходит двумя способами:



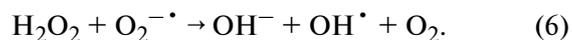
или



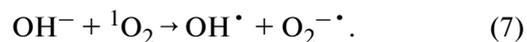
По мере увеличения концентрации перекиси водорода по реакциям (3) и (4) pH раствора растет. При нейтральных и щелочных pH водного окружения гидроперекисный радикал распадается с образованием супероксид-иона:



Освободившийся в результате протекания реакции (5) протон снова может взаимодействовать с ридберговским  $e^-_{Rg}$  макромолекулы. Таким образом, протекание реакций (1)–(4) приводит к накоплению в водном растворе биополимера перекиси водорода, синглетного кислорода и супероксид-иона. С ростом содержания перекиси водорода супероксид-ион способствует ее разложению с образованием гидроксильного радикала [20]:



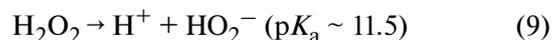
Присутствие синглетного кислорода в нейтральной и слабощелочной среде приводит к дальнейшему образованию супероксид-иона:



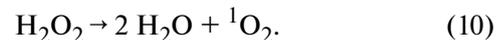
Дисмутация гидроксильного радикала приводит к образованию перекиси водорода:



С ростом pH перекись способна самопроизвольно распадаться с подкислением среды:



или с образованием синглетного кислорода:



Самораспад перекиси по реакции (10) имеет порядок от 1 до 2 и приводит к образованию синглетного кислорода  ${}^1O_2$ , который вновь участвует в цикле взаимопревращений АФК. Введя обозначение  $k_i$  для констант скоростей реакций (1)–(10), запишем соответствующие кинетические уравнения для скорости образования в разбавленных водных растворах биополимеров разных АФК в общем виде:

$$\frac{d}{dt} [\text{H}^\cdot] = k_1[\text{H}^+][e^-_{\text{Rg}}] - k_2[\text{H}^\cdot][\text{O}_2] - k_3[\text{H}^\cdot][\text{HO}_2^\cdot], \quad (11)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{HO}_2^\cdot] = k_2[\text{H}^\cdot][\text{HO}_2^\cdot] - k_4[\text{HO}_2^\cdot]^2 - k_3[\text{HO}_2^\cdot][\text{H}^\cdot] - k_5[\text{HO}_2^\cdot], \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt} [^1\text{O}_2] = k_4[\text{HO}_2^\cdot]^2 - k_7[^1\text{O}_2][\text{OH}^-] + k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2], \quad (13)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{O}_2^\cdot] = k_5[\text{HO}_2^\cdot] - k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^\cdot] + k_7[\text{OH}^-], \quad (14)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{OH}^\cdot] = k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^\cdot] + k_7[\text{OH}^-][^1\text{O}_2] - k_8[\text{OH}^\cdot], \quad (15)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{H}_2\text{O}_2] = k_3[\text{H}^\cdot][\text{HO}_2^\cdot] + k_4[\text{HO}_2^\cdot]^2 + k_8[\text{OH}^\cdot]^2 - k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^\cdot] - k_9[\text{H}_2\text{O}_2] - k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2]. \quad (16)$$

Используем условие постоянства промежуточных продуктов в системе (1)–(10) и упрощение кинетической модели производства и убыли перекиси водорода. В результате решения системы

уравнений (11)–(16) получаем выражение для скорости образования наиболее устойчивой и долгоживущей АФК — перекиси водорода:

$$\frac{d}{dt} [\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{k_1}{2} [\text{OH}^-][e^-_{\text{Rg}}] + \frac{k_4}{2} \left( \frac{k_2}{k_3} \right)^2 [\text{O}_2]^2 - k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2]. \quad (17)$$

Из уравнения (17) следует, что в разбавленных растворах биополимеров скорость накопления перекиси водорода зависит от pH раствора, концентрации электронов  $e^-_{\text{Rg}}$  с ридберговски возбужденных уровней макромолекул и концентрации растворенного кислорода, что частично совпадает с выводами, приведенными в работе [21]. Периодическое накопление и разложение перекиси водорода и определяют периодичность всего цикла взаимопревращений в химическом осцилляторе АФК.

Рассмотрим образование химического осциллятора взаимопревращений АФК в водных растворах биополимеров. На рис. 5 приведена упрощенная схема превращений  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ходе протекания химических реакций в водных растворах

биополимеров. Реакции образования перекиси водорода, протекающие согласно уравнениям (1)–(8), разделим на три группы: первая группа — инициация цикла и первоначальное образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  описывается уравнениями (1)–(3), на рис. 5 обозначена как I; вторая группа — реакции с участием синглетного кислорода, описываются уравнениями (4)–(8), на рис. 5 обозначена как II; третья группа — уравнение (8), обозначена как III. Отдельным блоком IV выделены процессы распада перекиси водорода согласно реакциям (9)–(10), они протекают эффективно при накоплении достаточного количества  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растворе,  $k_0$  — степень распада перекиси водорода.

Введем величину  $\tau$  — время увеличения концентрации  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  в каждом цикле реакций в  $e$

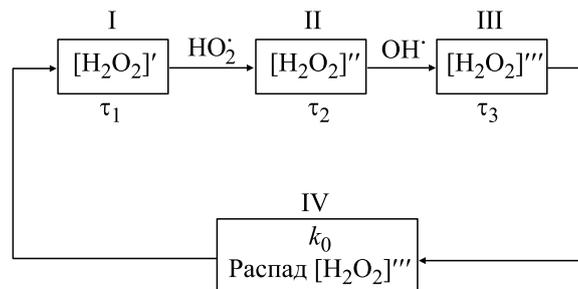


Рис. 5. Схема взаимопревращений перекиси водорода в водном растворе биополимера в ходе протекания реакций (1)–(10).

раз. Величина  $\tau$  учитывает не только время накопления перекиси водорода, но и время жизни и диффузии соответствующих ионов и радикалов в каждой группе реакций.

Для процесса взаимопревращения перекиси водорода в химическом осцилляторе АФК можно записать:

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]''}{dt} + \frac{1}{\tau_1}[\text{H}_2\text{O}_2]'' = \frac{1}{\tau_1}[\text{H}_2\text{O}_2]', \quad (18)$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]'''}{dt} + \frac{1}{\tau_2}[\text{H}_2\text{O}_2]''' = \frac{1}{\tau_2}[\text{H}_2\text{O}_2]'', \quad (19)$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]^{IV}}{dt} + \frac{1}{\tau_3}[\text{H}_2\text{O}_2]^{IV} = \frac{1}{\tau_3}[\text{H}_2\text{O}_2]''', \quad (20)$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]^I = -k_0[\text{H}_2\text{O}_2]^{IV}. \quad (21)$$

С учетом протекания реакций распада перекиси водорода и уменьшения ее концентрации показатель  $k_0$  в уравнении (21) имеет знак «-». Преобразовав систему уравнений (18)–(21) и отбросив член, содержащий третью производную, ввиду его малости, получим окончательное уравнение для изменения концентрации перекиси водорода в водном растворе биополимера:

$$\frac{d^2[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt^2} + \frac{\tau_1 + \tau_2 + \tau_3}{\tau_1\tau_2 + \tau_1\tau_3 + \tau_2\tau_3} \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} + \frac{k_0 + 1}{\tau_1\tau_2 + \tau_1\tau_3 + \tau_2\tau_3} [\text{H}_2\text{O}_2] = 0. \quad (22)$$

Уравнение (22) является дифференциальным уравнением свободных колебаний, возникающих в гармоническом осцилляторе [22]. В этом уравнении выражение перед  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  есть квадрат частоты собственных колебаний в химическом осцилляторе:

$$\omega_0^2 = \frac{k_0 + 1}{\tau_1\tau_2 + \tau_1\tau_3 + \tau_2\tau_3},$$

а выражение перед  $\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt}$  — показатель затухания колебаний концентраций перекиси водорода в химическом осцилляторе:

$$\delta = \frac{\tau_1 + \tau_2 + \tau_3}{\tau_1\tau_2 + \tau_1\tau_3 + \tau_2\tau_3}.$$

С учетом этого уравнение (22) примет вид:

$$\frac{d^2[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt^2} + \delta \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} + \omega_0^2[\text{H}_2\text{O}_2] = 0. \quad (23)$$

Рассмотрим влияние низкочастотного ЭМП, в котором преобладает магнитная составляющая, на выход перекиси водорода в водном растворе биополимера. Магнитная составляющая ЭМП, изменяющаяся синусоидально, описывается уравнением  $H = H_m \sin \omega t$ .

Как отмечалось выше, согласно уравнению (17) в растворах биополимеров скорость накопления перекиси водорода зависит от рН, концентрации электронов с ридберговски возбужденных уровней макромолекул и концентрации растворенного  $\text{O}_2$ . Магнитная составляющая ЭМП мо-

жет воздействовать на магнитные моменты электронов с ридберговски возбужденных уровней макромолекул [17]. Кроме того, в водных растворах биополимеров имеются радикальные пары с различными g-факторами партнеров (например,  $\text{H}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ). Магнитная составляющая ЭМП, по-видимому, ориентирует спины бирадикальных пар (например,  $\text{H}^\bullet$  и  $\text{O}_2$ ), меняя их подвижность, что возвращает нас к теории взаимодействия триплет-синглетных пар, разработанной А.Л. Бучаченко [23]. При действии магнитной составляющей ЭМП на растворенный в воде  $\text{O}_2$  (триплетный, парамагнитный) возможно изменение скорости реакции (2) с образованием гидроперекисного радикала — лимитирующей стадии и ключевой реакции цикла образования АФК, ответственной за суммарный выход перекиси водорода и синглетного кислорода. Таким образом, возможно преобразование сигнала магнитной составляющей вначале в химический, а затем и в биохимический отклик.

Все вышесказанное позволяет предположить, что под влиянием ЭМП приращение концентрации перекиси водорода изменяется пропорционально напряженности магнитной составляющей:

$$\Delta[\text{H}_2\text{O}_2] = \alpha H_m \sin \omega t,$$

где  $\alpha$  — коэффициент пропорциональности.

В результате колебания, возникающие в химическом осцилляторе, станут вынужденными и для них будет справедливо уравнение

$$\frac{d^2[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt^2} + \delta \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} + \omega_0^2[\text{H}_2\text{O}_2] = \alpha H_m \sin t. \quad (24)$$

Решение такого неоднородного уравнения равно сумме общего решения однородного уравнения (22), характеризующего затухающий процесс образования перекиси водорода, возникающий после скачкообразного приложения внешнего воздействия, и частного решения, которое описывает установившийся колебательный процесс под действием приложенной вынуждающей силы.

Общее решение записывается в виде:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}0} e^{-\delta t} \sin(\omega_0 t + \varphi_0), \quad (25)$$

где  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}0}$  – амплитуда свободных колебаний концентрации перекиси водорода,  $\omega = (\omega_0^2 - \delta^2)^{1/2}$ .

Частное решение имеет вид:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}} \sin(\omega t + \varphi), \quad (26)$$

где  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}}$  – амплитуда вынужденных колебаний концентрации перекиси водорода под воздействием ЭМП.

Для определения амплитуды вынужденных колебаний  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}}$  в уравнение (24) подставим значения первой и второй производной уравнения

$$\frac{d}{dt}[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}} \cos(\omega t + \varphi), \quad (27)$$

$$\frac{d^2}{dt^2}[\text{H}_2\text{O}_2] = -\omega^2 [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}} \sin(\omega t + \varphi). \quad (28)$$

Подставляя выражение (28) в уравнение (25), получим значение амплитуды вынужденного колебания концентрации перекиси водорода под воздействием ЭМП:

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}} = \alpha H_m \left( (\omega_0^2 - \delta^2)^2 + 4\delta^2 \omega^2 \right)^{-1/2}. \quad (29)$$

Если потери в химическом осцилляторе невелики, а частота вынуждающей силы незначительно отличается от собственной частоты взаимопревращений перекиси водорода в химическом осцилляторе, то получим решение исходного уравнения (24) в следующем виде:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}0} e^{-\delta t} \sin(\omega_0 t + \varphi) + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}} \sin(\omega t + \varphi), \quad (30)$$

где  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{M}} = \alpha H_m \left( (\omega_0^2 - \delta^2)^2 + 4\delta^2 \omega^2 \right)^{-1/2}$ ,  $\varphi$  – начальная фаза, которая при сделанных допущениях одинакова как для затухающих, так и для незатухающих колебаний.

Из анализа выражения (30) следует, что результирующее колебание содержания перекиси водорода является суммой двух колебаний, имеющих разные частоты. Численное соотношение между частотами колебаний в системе химического осциллятора и внешнего поля в целом определяет характер переходного процесса.

Таким образом, поведение химического осциллятора АФК, находящегося под действием внешнего низкоинтенсивного ЭМП, существенно зависит от амплитуды и частоты  $\omega$  этого поля. При этом различаются отдельные случаи:

1. Если частота  $\omega_0$  химического осциллятора взаимопревращений перекиси водорода значительно больше частоты  $\omega$  внешнего ЭМП, то действие поля сводится к эффекту модуляции автоколебаний осциллятора колебаниями поля, который проявляется в изменении амплитуды колебаний концентрации перекиси водорода. Это приводит к увеличению/уменьшению выхода перекиси водорода в растворе биополимера.

2. С приближением частоты химического осциллятора перекиси водорода  $\omega_0$  к частоте ЭМП

$\omega$  картина меняется. Частота генерации  $\omega_0$  «подтягивается» к частоте внешнего ЭМП и при некотором значении  $\Delta\omega = \omega_0 - \omega$ , зависящем от соотношения амплитуд, химический осциллятор начинает работать точно на частоте  $\omega_0 = \omega$  без каких-либо признаков модуляции. Частота химического осциллятора перекиси водорода оказывается синхронизирована частотой вынуждающего воздействия – ЭМП. При увеличении внешней частоты  $\omega$  период автоколебаний концентрации перекиси водорода может перестраиваться таким образом, чтобы быть кратным периоду внешних колебаний. Таким образом, может происходить резонансное взаимодействие внешнего воздействующего ЭМП и химического осциллятора.

Предложенная модель не касается биофизической природы мишени и учитывает лишь характер ее взаимодействия с окружением.

Рассмотренный нами цикл автоколебаний в водных растворах биополимеров перекиси водорода является, возможно, доминирующим. Хотя одновременно могут существовать и несколько параллельно действующих химических осцилляторов превращений отдельных форм АФК, каждый из которых будет иметь собственную частоту колебаний.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предложенная модель преобразования сигнала магнитной составляющей низкочастотного электромагнитного поля в химический и биохимический отклик в водных растворах биополимеров на основе нуклеиновых кислот и белков находится в качественном соответствии с полученными экспериментально частотными зависимостями. Так, значительное резонансоподобное увеличение содержания перекиси водорода в растворах ДНК при воздействии электромагнитным полем частотами 3–8 и 50 Гц (рис. 2), а также появление синглетного кислорода (рис. 1), приводят к увеличению уровня окисленных модификаций азотистых оснований в ДНК. Как было экспериментально показано в работе [6], обработка образцов крови магнитным полем данными частотами (3 и 50 Гц) приводит к достоверному (в 1.5 раза) повышению уровня содержания 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) в геномной ДНК – одного из ключевых биомаркеров окислительных повреждений нуклеиновых кислот, опосредованных с генерацией АФК. При нарушении процессов репарации ДНК накопление окислительных повреждений может привести к дальнейшим структурным изменениям ДНК, в частности, к появлению одно- и двунитевых разрывов.

Образующиеся в ходе резонансного взаимодействия низкочастотного электромагнитного поля и химического осциллятора повышенные количества АФК атакуют нуклеофильные центры белков, повреждая их. Кислотные ( $N \rightarrow F^{\cdot} \rightarrow F \rightarrow E$ ) и основные ( $N \rightarrow B$ ) переходы альбумина сопровождаются увеличением доступности и активности этих нуклеофильных центров при изменении pH.

В ЧСА многие аминокислоты подвержены модификациям, обусловленным действием АФК, в частности, гидроксильными радикалами и супероксид-анион-радикалами. Так, аминокислоты, входящие в состав ЧСА, активно снижают выход перекиси водорода, являясь эффективными перехватчиками гидроксильных радикалов: Trp – на 70%, Tug – на 80% и His – на 36%. Как известно, из всех аминокислот наиболее эффективным тушителем синглетного кислорода является Trp, константа скорости тушения синглетного кислорода триптофаном, полученная с помощью уравнения Штерна–Фольмера, составляет  $(4.6 \pm \pm 0.6) \cdot 10^7$  1/М·с [16]. Наблюдаемые батохромные сдвиги соответствующих спектров флуоресценции ЧСА (рис. 3) связаны, вероятно, с увеличением подвижности микроокружения аминокислотных остатков Trp и Tug в альбумине и усилением

процессов тушения вследствие разрушения третичной структуры белка. При действии ЭМП происходят изменения в центре связывания молекулы альбумина, содержащий Trp, а именно увеличение (разрыхление) F-формы ЧСА и открытие гидрофобной зоны ( $F^{\cdot} \rightarrow F$ -переход). Это приводит к проникновению молекул воды в данный центр, взаимодействию образующихся в воде АФК с ароматическим кольцом Trp и тушению его флуоресценции. Среди других мест окисления ЧСА возможны гистидин и метионин.

Тушение триптофановой флуоресценции ЧСА при обработке ЭМП указывает на одностадийный характер денатурации альбумина при  $pH > pI$  ЧСА – разрыхлении белковых глобул и изменение конформационных состояний с разными временами жизни возбужденного состояния. В таких состояниях флуоресцентные характеристики Trp в ЧСА определяются не только положением индольного кольца как таковым, но и характером взаимодействия флуорофора с аминокислотным окружением, которое также может влиять на степень завершенности релаксационных процессов за время жизни возбужденного состояния [15]. Полученные эффекты согласуются с выводами авторов статьи [24], в которой показано, что обработка ЭМП водных растворов альбуминов приводит к существенным изменениям белковых макромолекул и обусловлены, хотя бы частично, изменением свойств водной фазы. О возможностях оценки параметров изменения гидратной оболочки белков при различных внешних воздействиях указывают и авторы работы [25].

Иными словами, деформация молекулярной структуры альбумина при не очень больших воздействиях низкочастотным ЭМП может быть связана с окислением аминокислотных остатков и локализоваться именно в неплотно упакованных участках, не приводя к полному разрушению структуры молекулы. При этом могут происходить окислительно-восстановительные модификации сульфгидрильных и гидроксильных групп белков. Это предотвращает дальнейшую денатурацию белка.

Таким образом, основываясь на теоретических выкладках и экспериментальных результатах, можно сделать вывод о возможности увеличения/уменьшения выхода перекиси водорода в водных растворах биополимеров в процессе воздействия на них низкоинтенсивным низкочастотным электромагнитным полем. Если воздействие низкочастотного электромагнитного поля, опосредованное генерацией АФК в водной среде, на ДНК носит в основном повреждающий характер (либо окислительный, либо структурный), то

белки претерпевают в основном конформационные переходы. Изменения состояния биополимеров вызывают дальнейшие изменения на уровне систем, клеток [26] и поведения целого организма [27].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен механизм преобразования сигнала магнитной составляющей низкочастотного электромагнитного поля в химический и биохимический отклик в водных растворах биополимеров на основе нуклеиновых кислот и белков. Результатом описанного механизма является изменение концентрации перекиси водорода, определяемое выражением (30), под действием электромагнитного поля в химическом осцилляторе АФК. Этот процесс имеет резонансный характер. Резонанс наступает, когда частота внешнего поля совпадает (или кратна) собственной частоте химического осциллятора. Изменение концентрации АФК в водном растворе позволяет объяснить экспериментально наблюдаемые эффекты влияния низкочастотного электромагнитного поля на биохимические процессы.

Следует учесть, что предложенная модель не рассматривает биофизическую природу мишени и учитывает лишь характер ее взаимодействия с окружением. Магнитная составляющая низкочастотного электромагнитного поля может воздействовать на бирадикальные магнитохимические реакции химического осциллятора АФК, изменяя константы скорости их образования. Исходя из этого, рассматриваемая проблема требует более детального изучения с учетом биофизической природы мишени, что авторы предполагают сделать в дальнейшем.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Бинги, *Биофизика*, **61** (1), 201 (2016).
2. J. L. Phillips, N. P. Singh, and H. Lay, *Pathophysiology*, **16**, 79 (2009).
3. Л. Н. Галль, *Физические принципы функционирования материи живого организма* (Изд-во политех. ун-та, СПб., 2014).
4. В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., *Биофизика*, **55** (4), 631 (2010).
5. D. Lingvay, A. G. Bors, and A. M. Bors, *Electrotehnica, Electronica, Automatica*, **66** (2), 5 (2018).
6. Е. Е. Текуцкая, М. Г. Барышев, Л. Р. Гусарук и Г. П. Ильченко, *Биофизика*, **65** (4), 664 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040055
7. Y. Wang, X. Liu, Y. Zhang, et al., *Biol. Open*, **8**, bio041293 (2019). DOI: 10.1242/bio.041293
8. C. A. Buckner, A. L. Buckner, S. A. Koren, et al., *PloS One*, **10** (4), e0124136 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0124136
9. F. Sanie-Jahromi and M. Saadat, *Mol. Biol. Reports*, **45**, 807 (2018). DOI: 10.1007/s11033-018-4223-7
10. С. В. Смирнова, С. В. Гудков и В. И. Брусков, *8-Оксогуанин и продукты его окисления. Образование в ДНК под действием тепла, ионов уранила и гамма-излучения* (Lambert Acad. Publ., Saarbrücken, 2011).
11. Е. Б. Менщикова, В. З. Ланкин, Н. Л. Зенков и др., *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты* (Слово, М., 2006).
12. Е. Е. Текуцкая, М. Г. Барышев, Е. Е. Тумаев и Г. П. Ильченко, *Биофизика*, **65** (3), 479 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920030060
13. А. Н. Герасимов, *Медицинская статистика* (ООО «Медицинское информационное агентство», М., 2007).
14. С. В. Гудков, О. Э. Карп, С. А. Гармаш и др., *Биофизика*, **57** (1), 5 (2012).
15. Е. В. Немцева, О. О. Лащук и М. А. Герасимова, *Биофизика*, **61** (2), 231 (2016).
16. Д. Н. Буторина, А. А. Красновский мл. и А. В. Приезжев, *Биофизика*, **48** (2), 201 (2003).
17. С. В. Гудков, О. Э. Карп, С. А. Гармаш и др., *Биофизика*, **57** (1), 5 (2012).
18. С. В. Авакян и Л. А. Баранова, *Биофизика*, **64** (1), 12 (2019).
19. Л. В. Беловолова, *Оптика и спектроскопия*, **128** (7), 923 (2020).
20. Н. Л. Лаврик и Н. М. Бажин, *Биофизика*, **56** (3), 574 (2011).
21. В. О. Пономарев и В. В. Новиков, *Биофизика*, **54** (2), 235 (2009).
22. Т. И. Трофимова, *Курс физики. Учебное пособие для вузов* (Издательский центр «Академия», М., 2006).
23. А. Л. Бучаченко, *Успехи химии*, **83** (1), 1 (2014).
24. Ю. В. Цейслер, В. С. Мартынюк, А. Ю. Артеменко и Н. С. Мирошниченко, *Физика живого*, **17** (1), 94 (2009).
25. Е. В. Рубцова, А. Б. Соловей и В. И. Лобышев, *Биофизика*, **59** (6), 1071 (2014).
26. Е. Е. Текуцкая, Л. Р. Гусарук и Г. П. Ильченко, *Биофизика*, **67** (1), 113 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010112
27. Е. Е. Текуцкая, И. С. Рябова, С. В. Козин и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **172** (11), 602 (2021). DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-11-602-606

## Mechanism of Action of the Low-Frequency Electromagnetic Field on Aqueous Solutions of Biopolymers

E.E. Tekutskaya\*, G.P. Ilchenko\*, and M.G. Baryshev\*\*

\*Kuban State University, Stavropol'skaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

\*\*Kuban State Technological University, Moskovskaya ul. 2, Krasnodar, 350000 Russia

This paper presents the mechanism of signal transformation by which a signal from the magnetic component of the low-frequency electromagnetic field with extremely low energy is changed into chemical and biochemical signals which elicit a biological response in aqueous solutions of biopolymers based on nucleic acids and proteins. A theoretical model developed shows that the basis of oxidative DNA damage and conformational transitions of proteins is a universal mechanism associated with a change in the amount of the most long-lived form – hydrogen peroxide in a chemical oscillator of mutual transformations of reactive oxygen species under the influence of low-intensity electromagnetic field exposure. It has been experimentally established that the quantitative content of hydrogen peroxide in solutions of biopolymers resonantly depends on the frequency of applied field. Conformational changes in proteins are accompanied by an increase in the availability and activity of the nucleophilic centers that are potential targets for reactive oxygen species. Complete unfolding and denaturation of the amino acid chain of the protein under the influence of low-frequency electromagnetic field exposure do not occur. It has been shown that enhanced hydrogen peroxide formation at 3 Hz and 50 Hz leads to oxidative modification of nitrogenous bases in DNA.

*Keywords: low-frequency electromagnetic field, reactive oxygen species, hydrogen peroxide, biopolymers, DNA, albumin, fluorescent spectroscopy*

УДК 577.22

## УТОЧНЕНИЕ ПОЗИЦИЙ НУКЛЕОСОМ ВНУТРИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ДАННЫХ MNASE-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2023 г. В.А. Васильев\*, Д.М. Рябов\*, А.К. Шайтан\*, Г.А. Армеев\*, #

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

\*E-mail: armeev@intbio.org

Поступила в редакцию 06.05.2023 г.

После доработки 06.05.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Организация хроматина играет важную роль в регуляции работы генетического аппарата клетки. Основной единицей упаковки хроматина является нуклеосома, хранящая на себе ДНК длиной около 145 пар нуклеотидов. Упаковка генетического материала и его доступность для ферментов транскрипции и других регуляторных хроматиновых белков зависят от позиции нуклеосом. Для исследования позиций нуклеосом в геноме применяют MNase-секвенирование. Данные MNase-секвенирования позволяют детектировать факт наличия нуклеосом на последовательности, однако их точное позиционирование сложно установить по этим данным. Для уточнения положений нуклеосом необходимо дополнительно фильтровать и обрабатывать данные. В данной работе предлагается комбинированный метод отбора возможных позиций нуклеосом по данным MNase-секвенирования, основанный на геометрическом анализе молекулярных моделей нуклеосомных цепочек. Разработанный алгоритм позволяет эффективно отсеивать недоступные комбинации нуклеосомных цепочек и конформационно запрещенные позиции нуклеосом.

*Ключевые слова:* хроматин, нуклеосома, позиционирование нуклеосом, молекулярное моделирование.

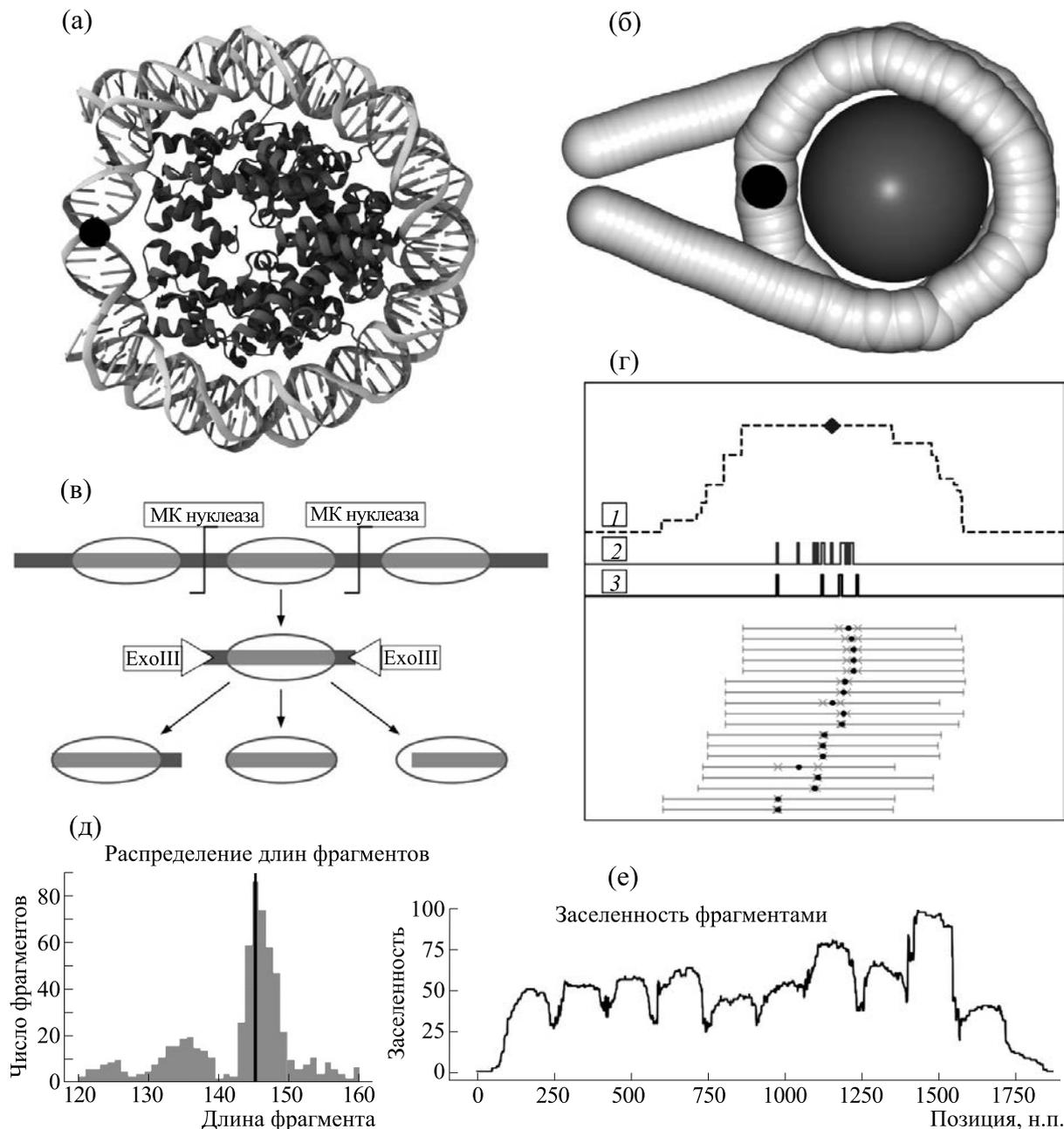
DOI: 10.31857/S0006302923050101, EDN: PHUCE:

Геномы большинства эукариот содержат больше ДНК, чем геномы прокариот. Такое различие можно ожидать, так как для работы более сложно устроенных организмов требуется большее число генов. Однако размер генома не связан напрямую со сложностью организма. Так, многие растения обладают значительно большим по длине геномом, чем человек. Причина различий в размерах геномов между эукариотами и прокариотами кроется в ряде причин. Эукариотические геномы содержат некодирующие участки ДНК, расположенные между и внутри генов. В отличие от прокариот, некоторые эукариотические гены многократно повторяются. Наличие множественных копий генов позволяет значительно повысить уровни экспрессии кодируемых белков. Так, например, кодируются белки-гистоны — одни из самых распространенных белков в клеточном ядре.

В геномах бактерий большая часть ДНК кодирует белки. Например, геном *E. coli* состоит примерно из 5 миллионов н.п. и содержит около 4 тысяч генов, при этом почти 90% ДНК кодирует белковые последовательности. Геном пекарских дрожжей, состоящий из 12 миллионов н.п., примерно в 2.5 раза больше генома *E. coli*. В среднем

у пекарских дрожжей на один ген приходится около 2000 н.п. и примерно 70% генома дрожжей занято кодирующими последовательностями белков, которых у дрожжей около 6000. Геномы высших животных (например, человека) устроены еще сложнее и содержат продолжительные области некодирующей ДНК. По современным оценкам только 1.5% из примерно 3 миллиардов н.п. генома человека кодирует последовательности белков [1]. Остальные участки заняты некодирующими последовательностями, которые тем не менее выполняют регуляторные функции. Несмотря на линейный размер, эукариотический геном помещается в клеточном ядре, при этом сохраняя свои функции.

Базовым элементом компактизации хроматина является нуклеосома. Нуклеосомы состоят из восьми гистонов (четыре типа гистонов, формирующих гетеродимеры) и ДНК длиной порядка 145 пар нуклеотидов. Нуклеосомы — симметричные структуры (рис. 1а), при этом ось симметрии (диадная ось нуклеосомы) в них проходит вблизи центра одной из нуклеотидных пар (далее по тексту диадная н.п., на рис. 1а показана черной точкой). Упаковка генетического материала и его до-



**Рис. 1.** (а) – Внешний вид структуры нуклеосомы. Визуализация построена на основе модели 3LZ0 из PDB. Белковая часть показана в виде вторичной структуры темно серым цветом, ДНК показана светло-серым. Черной точкой отмечено положение диадной н.п. (б) – Внешний вид огрубленной модели нуклеосомной частицы с линкерными областями. Черной точкой отмечено положение диадной н.п. Цветовая схема соответствует рисунку (а). (в) – Схема появления фрагментов разной длины в экспериментах по MNase-секвенированию. (г) – Схема формирования пиков на профилях заселенности нуклеосомами. Отрезки в нижней половине схемы отображают фрагменты нуклеосомной ДНК из MNase-секвенирования, черные точки – положения центров фрагментов, серые крестики – возможные положения диадных н.п. Линия 1 – сумма всех фрагментов, ромбом показано положение центра пика (данное положение часто используют как статистическое среднее расположение нуклеосом); линия 2 – центров сигналов; линия 3 – отфильтрованный профиль положения диадных н.п. (д) – Распределение длин выровненных участков. (е) – Профили заселенности участков генома нуклеосомами.

ступность для ферментов транскрипции и других регуляторных белков хроматина зависят от расположения нуклеосом. Известно, что на стабиль-

ность нуклеосом влияет последовательность ДНК. Существуют такие последовательности, на которых нуклеосомы не только стабильны, но и

строго позиционированы [2]. Однако фундаментальные механизмы влияния последовательности ДНК на стабильность и позиционирование нуклеосом неясны. Позиционирование нуклеосом в хроматине обеспечивается не только сродством к последовательности, но и работой транскрипционных факторов, которые активно передвигают нуклеосомы по ДНК (ремоделлеров хроматина). Например, гены, на которых активен ISW1, в среднем содержат нуклеосомы каждые 175 н.п., а гены, регулируемые CHD1, – 160 н.п. [3]

Нуклеосомы в геноме распределены не случайно. Существуют как области с высокой упорядоченностью нуклеосом, так и участки генома, лишенные четко определенной нуклеосомной организации. В работе [4] впервые было показано, что в областях вблизи промоторов *S. cerevisiae* нуклеосомы точно позиционированы. Такое позиционирование связано с высокой транскрипционной активностью и работой транскрипционных факторов [5]. Значимость позиционирования нуклеосом проявляется во многих биологических исследованиях и напрямую влияет на локальную структуру хроматина [6]. Позиционирование нуклеосом может оказывать влияние на процессы регуляции работы ДНК, например, связывание нуклеосом с ДНК может приводить к блокированию сайтов связывания других белков. Интересно, что с течением жизни структура хроматина меняется: снижается уровень экспрессии гистоновых белков, уменьшается заселенность генов нуклеосомами, что в результате приводит к нарушению процессов транскрипции [7].

Как уже было отмечено выше, позиционирование нуклеосом зависит от последовательности ДНК и активности хроматиновых ремоделлеров. Известно, что *in vitro* нуклеосомы способны к спонтанному тепловому передвижению. Однако механизм такого передвижения не до конца ясен, в ряде работ по молекулярному моделированию были показаны начальные этапы перемещения нуклеосом по ДНК [8]. Один из основных методов изучения позиций нуклеосом *in vivo* – MNase seq (от аббревиатуры MNКаза – микрококковая нуклеаза). В этом методе исследуют препарат хроматина, выделенный из клеточной культуры. Такой хроматин далее обрабатывают микрококковой нуклеазой – ферментом, разрезающим фрагменты цепи ДНК, не связанные с белками. Однако данный фермент предпочтительно разрезает АТ-богатые регионы [9]. В результате после обработки получают фрагменты ДНК, связанные с белками (рис. 1в). В силу селективности эндонуклеазной активности и низкой экзонуклеазной активности, получившиеся фрагменты ДНК могут быть больше по размеру, чем связанные с белками участки. Чтобы уточнить области связывания, образец дополнительно обрабатывают эк-

зонуклеазой III (EcoIII), которая расщепляет не защищенные белками концы ДНК. Полученные фрагменты ДНК очищают от белков и определяют методами высокопроизводительного секвенирования. Получившиеся чтения картируют на геном и фильтруют по длине. Участки длиной порядка 150 н.п. обычно ассоциируют с областями расположения нуклеосом [10]. В ходе дальнейшего анализа рассчитывают распределения длин выравненных участков (рис. 1д) и определяют профили заселенности участков генома нуклеосомами – для каждого нуклеотида определяется число сигналов от участков нуклеосомной ДНК (рис. 1е).

Важно отметить, что полученные сигналы (выравненные на геном участки нуклеосомной ДНК) не позволяют однозначно судить о позиции нуклеосомы. Обработка смесью нуклеаз может приводить к формированию участков ДНК, отличающихся по длине от ожидаемых для нуклеосомы (рис. 1в,д): часть нуклеосом будет обработана недостаточно, а часть – чрезмерно. Таким образом, сигналы в совокупности позволяют уверенно детектировать факт наличия нуклеосом на последовательности, однако их начальное позиционирование неоднозначно. Если считать центры сигналов за диадные н.п. нуклеосом, то для каждого пика заселенности ожидается достаточно большее число возможных положений нуклеосомы (рис. 1г, линия 2, центры сигналов показаны черными точками). Таким образом, для точного определения положений нуклеосом необходимо дополнительно фильтровать и обрабатывать данные, как например в работах [11, 12].

Эксперименты по определению позиций нуклеосом по большей части получены для культур клеток и содержат сигналы позиционирования для большой совокупности геномов. На итоговых профилях заселенности мы видим результат суперпозиции множества альтернативных вариантов позиционирования, который дополнительно смазан неоднородностью длин сигналов. Определение возможных расположений нуклеосом по таким данным – сложная вычислительная задача. В данной работе мы предлагаем метод отбора возможных позиций нуклеосом по данным MNase-секвенирования. Данный метод основан на отборе наиболее вероятных положений нуклеосом по изначальным сигналам с последующей фильтрацией допустимых комбинаций. Созданный нами фильтр основан на геометрическом анализе доступного конформационного пространства для молекулярных моделей нуклеосомных фибрилл. Мы применяем данный метод для поиска доступных положений нуклеосом на ряде генов *S. cerevisiae* по данным эксперимента MNase-секвенирования.

**Таблица 1.** Характеристики исследуемых участков генома *S. cerevisiae*

Открытая рамка считывания (ОРС)	Координата начала ОРС	Координата конца ОРС	Число возможных цепочек нуклеосом	Число возможных позиций нуклеосом	Число стерически возможных позиций нуклеосом	Коэффициент корреляции модельного профиля с экспериментом
YJR046W	522048	523912	154688	101	92	0.76
YOR066W	449436	451375	60843	101	93	0.49
YLR177W	511054	512990	84870	92	65	0.48
YFL041W	49139	51007	51543	89	80	0.51
YHL019C	67731	69548	22664	85	72	0.65
YPR155C	835563	837413	42262	94	82	0.46

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Обработка геномных данных и выбор областей для моделирования.** Для разработки и апробирования метода использовали набор данных из работы [13]. Из базы архива секвенирований SRA [14] был загружен набор чтений для эксперимента по MNase-секвенированию хроматина *S. cerevisiae*, идентификатор эксперимента SRR1802189. Чтения были обработаны и картированы на геном дрожжей (версия сборки генома GCF\_000146045.2) с помощью программы Bowtie2 [15]. Полученные сигналы были отфильтрованы по стандартному протоколу программы. Для дальнейшего анализа были выбраны отображения сигналов на (+) цепи ДНК. Для исследования были выбраны шесть случайных генов длиной менее 2000 н.п. При выборе участков для моделирования использовали следующие критерии: сигнал MNase-секвенирования определен от более чем 400 нуклеосом, распределение длин сигналов имеет максимум в 145 н.п., для данных генов имеется аннотация уровнем экспрессии. Аннотация уровнем экспрессии была взята из эксперимента [16]. Список исследуемых генов и их геномные координаты приведены в табл. 1. В результате данной обработки были получены сигналы позиционирования нуклеосом внутри исследуемых генов.

**Моделирование цепочек нуклеосом.** Для моделирования цепочек нуклеосом использовали огрубленный геометрический подход. В таком подходе каждая пара нуклеотидов и каждое белковое ядро нуклеосомы задается сферическими частицами разных диаметров (рис. 1б). В данном подходе описание геометрии фибриллы проводили во внутренних параметрах ДНК: взаимные ориентации н.п. относительно друга задавались при помощи шести параметров (shift, slide, rise, tilt, roll, twist). Позиции нуклеосом записывали

как отступ от диадной н.п. В качестве шаблона для создания нуклеосомных цепочек использовали структуру 3LZ0 [17] (рис. 1а) из банка данных PDB. Для этой структуры были рассчитаны параметры ДНК и относительное положение белкового ядра нуклеосомы при помощи программного пакета PyNAMod. Создание модели цепочки нуклеосом происходило в несколько этапов: создавался набор параметров для ДНК требуемой длины в В-форме; в местах положений нуклеосом параметры ДНК заменялись параметрами для нуклеосомы; проводилась конвертация параметров ДНК в реальное пространство; рассчитывались координаты центров нуклеосом.

Таким образом, данный подход позволяет соединять нуклеосомы прямыми участками двухцепочечной ДНК для дальнейшего расчета их характеристик. В частности, для цепочек нуклеосом рассчитывали количество внутренних стерических перекрытий. Для пар нуклеотидов был взят радиус 3.5 Å, а для белковых ядер нуклеосом – 32 Å. Для каждой пары частиц рассчитывали перекрытие: если расстояние между частицами меньше суммы их заданных радиусов, то принимается, что частицы перекрываются, а соответствующая цепочка нуклеосом отвергается. Для доступных конформаций нуклеосомных цепочек рассчитывали радиус инерции по центрам нуклеосом.

Для проведения всех расчетов применяли программный пакет PyNAMod, для ускорения численной математики использовали библиотеки NumPy и транслятор Numba.

Для поиска доступных цепочек нуклеосом были созданы модели всех возможных комбинаций цепочек из пяти нуклеосом и длиной соединяющей ДНК от 0 до 100 н.п. Всего было создано  $10^8$  комбинаций. Расчеты проводили в парал-

тельном режиме с использованием 80 процессорных ядер. Длина свободного участка ДНК на концах цепочек нуклеосом составляла 50 н.п. Цепочки, в которых наблюдались стерические перекрывания, отбрасывались. Затем было рассчитано отношение числа доступных конформаций к общему числу комбинационно возможных цепочек нуклеосом. Для анализа цепочек с шестью и семью нуклеосомами были рассчитаны конфигурации с максимальной длиной линкерных областей 40, так как полный расчет на доступных мощностях занял бы более трех лет.

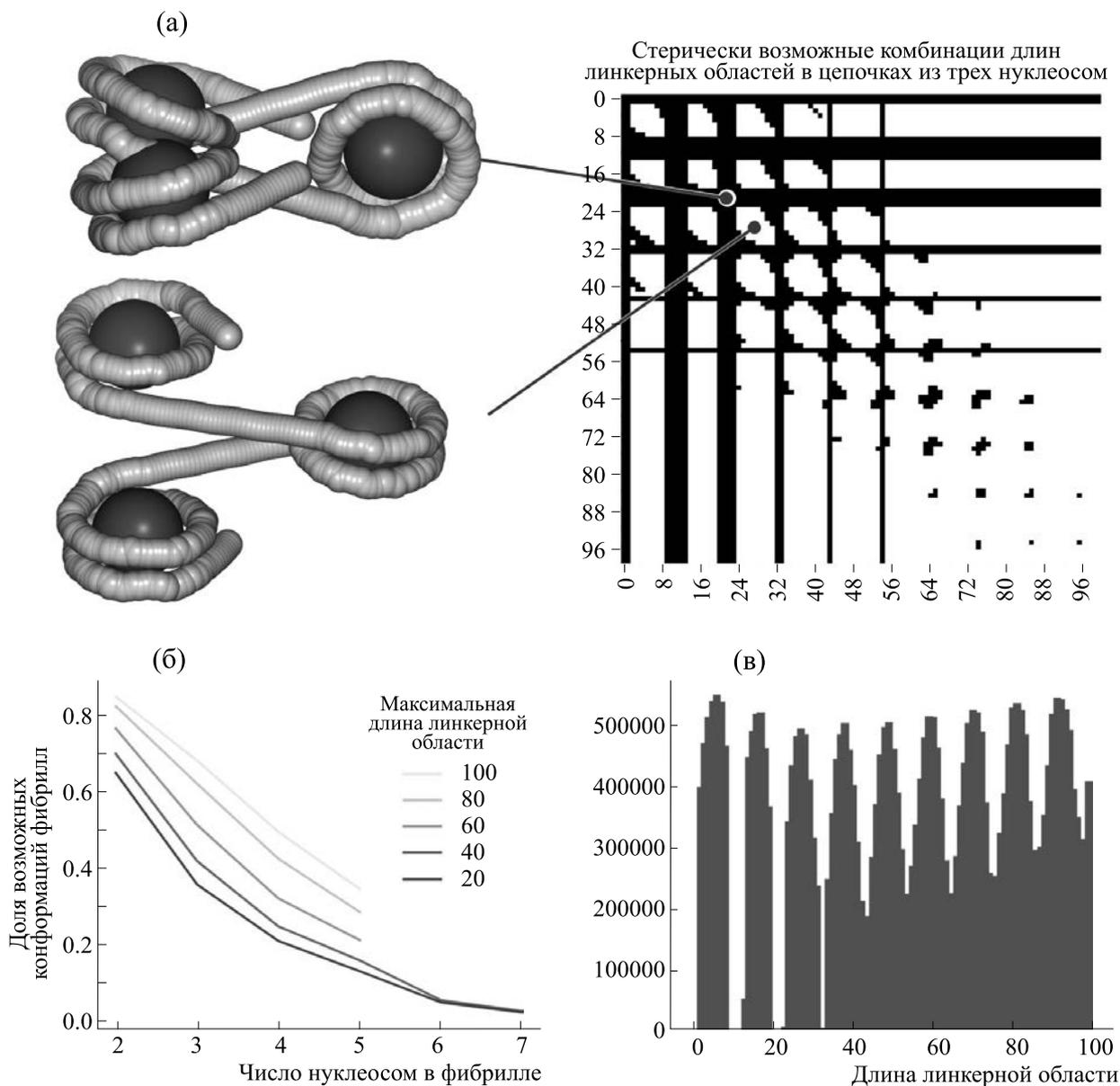
**Моделирование позиций нуклеосом в гене.** Для предсказания возможных позиций нуклеосом в гене из всех сигналов MNase секвенирования учитывали длину сигнала. В случае если длина фрагмента соответствовала длине нуклеосомной ДНК (145 пар нуклеотидов), предполагалось однозначное определение диадной н.п. Если фрагмент отличался по длине от нуклеосомной ДНК, предполагалось наличие двух возможных диадных н.п. (рис. 1г). Более короткие сигналы могут получаться по причине того, что фермент расщепил часть нуклеосомной ДНК с одного из концов. Аналогично два возможных положения диадной н.п. возникает в том случае, когда фрагмент длиннее 145 н.п. Из полученных возможных позиций диадных н.п. рассчитывали профиль вероятности обнаружения диадной н.п. по последовательности гена. Согласно этому профилю, для каждого сигнала выбиралась только одна позиция диадной н.п. В случае равной вероятности для центров диад такой сигнал отбрасывался. Для последующего анализа были выбраны позиции диадных н.п., которые были обнаружены в двух и более сигналах.

По отобранным позициям диадных н.п. был построен направленный граф, в вершинах которого находятся кандидаты в позиции нуклеосом, а связи присваиваются для нуклеосом, находящихся не ближе 145 н.п. и не дальше 215 н.п. (среднее расстояние между нуклеосомами для *S. cerevisiae* 165 н.п. [18]). Все возможные конформации фибрилл гена можно представить, как путь в этом графе. В качестве начальных вершин путей выбирались вершины, в которые не приходят связи и они находятся на расстоянии не более 250 н.п. от начала гена. Аналогично, конечные вершины — это такие вершины, из которых не начинается связь, а нуклеосомы находятся на расстоянии не более 250 н.п. от конца гена. Из всех начальных вершин находятся все возможные пути до каждой конечной вершины. При построении пути применяли фильтр по допустимым комбинациям длин линкерных областей: при добавлении каждой вершины в путь, если длина пути с новой вершиной больше или равна пяти, проверяется, что комбинация четырех последних длин линкерных областей в пути стерически возможна

(см. пункт «Моделирование цепочек нуклеосом»).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Точное позиционирование важно с геометрической точки зрения, так как сдвиг нуклеосомы на 1 н.п. приводит к небольшому смещению (3.3 Å), но значительному повороту (34.3°). Выровненные участки из секвенирования — сигналы позиционирования нуклеосом — не позволяют однозначно определить позицию диадных н.п. нуклеосом. Обработка смесью нуклеаз приводит к формированию участков ДНК, отличающихся по длине от нуклеосомной (рис. 1в,д): часть нуклеосом будет обработана недостаточно, а часть — чрезмерно. Число коротких и длинных сигналов значительно меньше числа нормальных сигналов (рис. 1д). Для того чтобы участок ДНК был атакован нуклеазой и стал короче, ДНК должна «открутиться» от нуклеосомы. Вероятность одновременного откручивания нуклеосомы с двух концов ниже, чем вероятность одностороннего откручивания, по этой причине для всех коротких сигналов мы предполагали две возможные позиции диадной н.п., соответствующие откручиванию ДНК либо с одной, либо с другой стороны. Аналогично, мы предположили, что более длинные участки ДНК содержат две возможные позиции. Из профилей встречаемости диадных н.п. для каждого сигнала отбирали наиболее распространенную. Из рис. 1г видно, что если считать за позиции диадных н.п. центры сигналов (черные точки), возникает большое количество дополнительных вариантов позиционирования (линия 2), однако при использовании предположения, описанного выше, число возможных позиций значительно сокращается (линия 3). Такая процедура отбора позиций нуклеосом позволяет сократить число возможных кандидатов в два-три раза (в зависимости от гена). В других работах для уточнения позиций нуклеосом анализируют не изначальные сигналы, а профили заселенности нуклеосом. Такие профили обычно обрабатывают оконными фильтрами для локальной нормировки и сглаживания. На обработанном профиле заселенности находят все пики, каждый из которых рассматривают как предположительный центр нуклеосомной ДНК. Затем определяют кластеры возможных пиков — группы таких пиков на расстоянии менее 147 н.п. Далее при анализе выбирают возможные комбинации позиций таким образом, чтобы комбинации нуклеосом формировали максимально схожие с изначальными профили заселенности [11]. Однако такой подход основан на усреднении сигналов по множеству клеток и позволяет определять лишь средние позиции нуклеосом в гене.



**Рис. 2.** (а) — Иллюстрация сканирования пространства доступных цепочек из трех нуклеосом. На тепловой карте черным показаны заслоненные конфигурации, белым — разрешенные комбинации линкерных областей ДНК. Слева от карты показаны примеры заслоненных и разрешенных цепочек. (б) — График зависимости доли доступного конфигурационного пространства от числа нуклеосом в цепочке. (в) — Распределение длин линкерных областей ДНК во всех допустимых цепочках из пяти нуклеосом.

Геном *S. cerevisiae* отличается сравнительно небольшим размером и высокой долей содержания кодирующих последовательностей. В среднем на один ген у дрожжей приходится порядка 2000 н.п. Для генов со строгим позиционированием нуклеосом средняя длина линкерных областей ДНК составляет порядка 20 н.п. [18] Таким образом, на один ген приходится порядка 10–11 нуклеосом. Если позиция каждой нуклеосомы определена неточно, возможное число комбинаций таких нуклеосом невероятно велико. Однако не любая

комбинация позиций нуклеосом возможна геометрически, нуклеосомы могут перекрываться (рис. 2а). Для того чтобы создать фильтр для отбора цепочек нуклеосом, мы рассчитали стерические перекрытия для цепочек длиной от двух до пяти нуклеосом с длиной линкерных областей ДНК от 0 до 100 н.п. и для цепочек длиной 7 и 8 для линкерных областей до 40 н.п. На рис. 2а видно, что ряд комбинаций линкерных областей приводит к появлению заслоненных структур, а на тепловой карте видна периодичность. Такая

периодичность хорошо согласуется с литературными данными. Для регулярных нуклеосомных фибрилл доступен ряд конфигураций, образующий две группы спиральных структур с характерными длинами линкерных областей  $10N$  и  $10N+5$  [19–21]. Для всех комбинаций фибрилл из 5 нуклеосом чаще всего встречаются ликеры длиной  $10N+5$  (рис. 2в). Интересно, что с ростом длины нуклеосомных цепочек доля допустимых комбинаций длин линкерных областей значительно падает, причем для малых длин линкерных областей она приближается к единицам процентов (рис. 2б). Таким образом, для плотных цепочек нуклеосом доступно значительно меньшее конфигурационное пространство чем для цепочек с большим межнуклеосомным расстоянием. Опираясь на данное наблюдение, мы создали алгоритм отбора конфигураций нуклеосомных цепочек произвольной длины по экспериментальным данным.

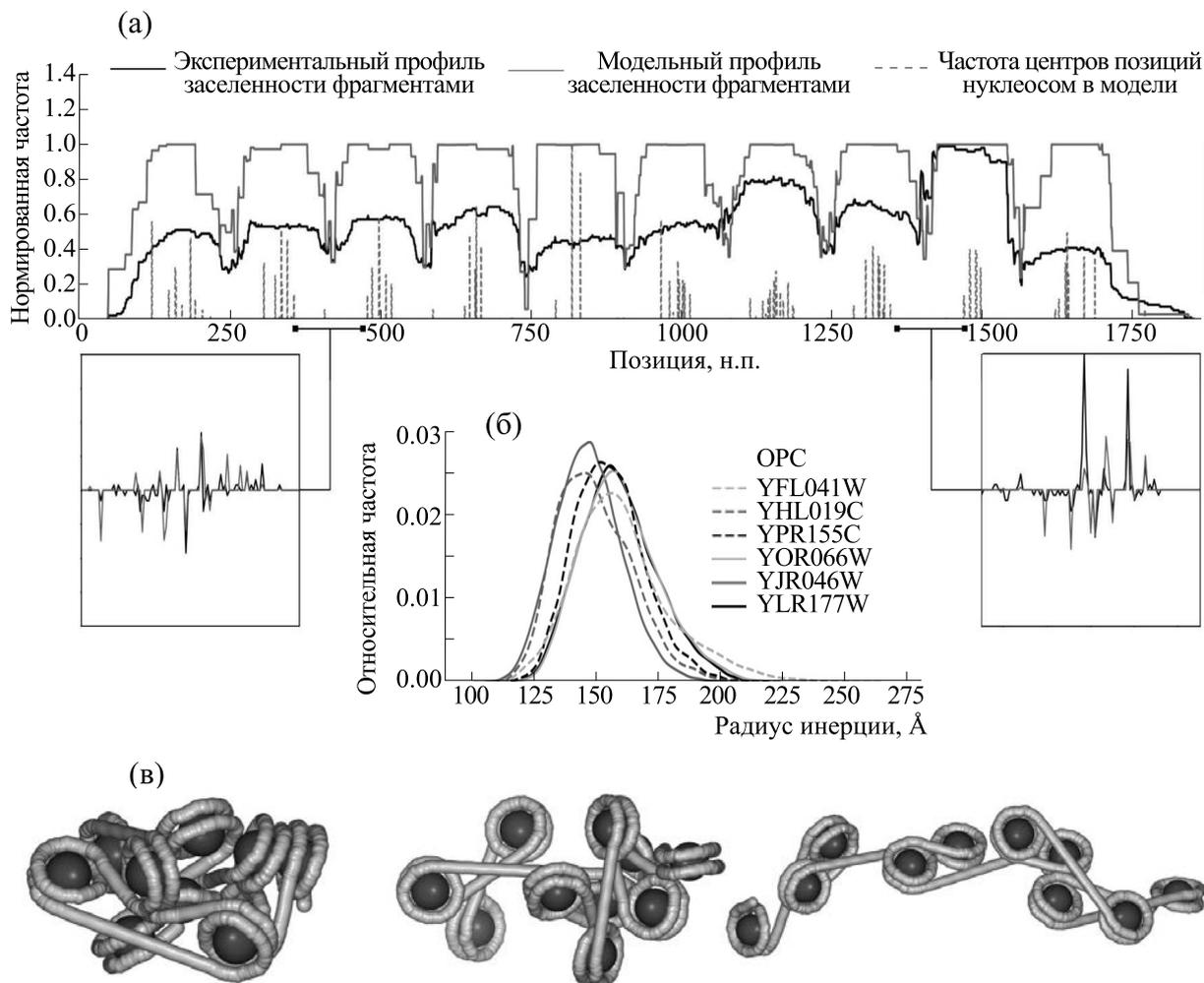
Мы провели поиск доступных конфигураций цепочек нуклеосом для сигналов позиционирования нуклеосом для шести генов *S. cerevisiae*. Разработанный нами подход основан на последовательном переборе возможных комбинаций сигналов нуклеосом на ДНК. Однако доступное пространство комбинаций нуклеосом на гене длиной 2000 н.п. слишком велико для прямого перебора. Так, после обработки сигналов MNase-секвенирования для гена TАН11 (открытая рамка считывания YJR046W) мы отфильтровали 101 возможную позицию нуклеосомных н.п. Исходя из карты заселенности сигналов (рис. 1е), на данном гене находится 10 нуклеосом. Для такого числа сигналов, число сочетаний из 10 нуклеосом составляет порядка  $10^{16}$  комбинаций, однако нуклеосомные сигналы не могут перекрываться. Исходя из числа сигналов, для каждого пика заселенности нуклеосомами ожидается порядка 10 вариантов расположения нуклеосом, что эквивалентно  $10^{10}$  возможных конфигураций цепочек. Такое число позиций весьма затруднительно исследовать прямым перебором. Для того чтобы не рассчитывать заведомо недоступные конфигурации нуклеосомных цепочек мы отбрасывали конфигурацию, как только в ней встречалась запрещенная комбинация позиций для пяти нуклеосом. В итоге для гена TАН11 было обнаружено 154688 возможных комбинаций позиций, что на три порядка меньше изначальной оценки. Интересно, что в результате работы данного алгоритма девять возможных позиций нуклеосом не вошли ни в одну цепочку. Для остальных обработанных генов также была отфильтрована большая часть нуклеосомных цепочек (табл. 1) и отсеяно от 8 до 27 возможных позиций нуклеосом. Все отсеянные позиции встречались не более чем в двух сигналах MNase-секвенирования и, вероятно, отно-

сятся к соседним с ними позициям нуклеосом. Для всех доступных моделей был рассчитан радиус инерции от нуклеосомных частиц, который изменялся в пределах от 100 до 250 Å, а полученные модели значительно отличались геометрически (рис. 3б,в). Мы не обнаружили зависимости между определенными параметрами для нуклеосомных цепочек (число доступных конформаций, радиус инерции) и уровнем экспрессии гена. Однако, так как эксперимент по определению уровня экспрессии и эксперимент по картированию нуклеосом были проведены в разных условиях и на разных клеточных культурах, для них могут быть характерны разные состояния хроматина.

Интересно, что полученный модельный профиль заселенности нуклеосом не только качественно совпадает с экспериментальным, но и схож с ним в деталях, о чем свидетельствует высокий коэффициент корреляции Пирсона (рис. 3а, коэффициенты корреляции представлены в табл. 1). Таким образом, тонкая структура профилей в эксперименте является не шумом, а следствием наложения сигналов от нуклеосом из разных клеток. Следовательно, подходы, основанные на сглаживании профилей заселенности нуклеосом с последующим поиском пиков, приводят к потере сигнала точного позиционирования. Для профилей с ярко выраженными десятками пиками заселенности нуклеосом были обнаружены возможные цепочки из 9 и 11 нуклеосом. Доля таких цепочек сравнительно невелика (порядка 5%), однако данные цепочки содержат сигналы с высокой интенсивностью из экспериментальных данных. Интересно, что в модельных профилях заселенности нуклеосомами для всех генов (в отличие от экспериментальных) высоты пиков были равны между собой. Высота пика в эксперименте не связана прямо с представленностью нуклеосомы в геноме, а зависит от времени обработки ферментами и сродства нуклеаз к последовательности линкерных областей ДНК между нуклеосомами [22].

Разработанный нами подход содержит ряд ограничений. В данной модели мы не учитываем гибкость ДНК. Такой подход может приводить к чрезмерной фильтрации конфигураций. Однако, учитывая длину персистентности ДНК порядка 160 н.п. [23] и малую длину линкерных областей ДНК в генах дрожжей, для реализации заслоненных конфигураций потребуется значительно изогнуть ДНК. Также при поиске возможных конфигураций нуклеосомных цепочек, мы ограничивали максимальную длину линкерной области 70 н.п., что позволяет применять подход только для плотно заселенных нуклеосомами участков хроматина.

Разработанный нами алгоритм позволяет эффективно отсеивать недоступные комбинации



**Рис. 3.** (а) – Сравнение экспериментального и модельного профилей заселенности фрагментами нуклеосом. Показан ген *TAN11* (открытая рамка считывания *YJR046W*). На врезках показаны дифференциальные профили заселенности. (б) – Распределение радиусов инерции модельных цепочек нуклеосом от разных генов пекарских дрожжей. (в) – Визуализация фибрилл с минимальным, медианным и максимальным радиусами инерции.

нуклеосомных цепочек и конформационно запрещенные экспериментальные сигналы. Однако после такой обработки в результате остаются десятки и сотни тысяч доступных комбинаций нуклеосом. Большое число возможных вариантов может быть объяснено тем, что в экспериментах по MNase-секвенированию наблюдается суперпозиция нуклеосом из клеточной культуры. Конкретное количество геномов, подверженных анализу можно оценить исходя из оптической плотности культуры клеток и объема образца, в эксперименте [13] анализу подвергалось порядка  $10^8$  клеток. Очевидно, что при таком количестве клеток и случайном расположении нуклеосом в каждой из них профили заселенности были бы равномерными. Учитывая, что на каждый ген приходится порядка 500 сигналов, состояния хроматина, характерные для небольших популя-

ций клеток, будут подавлены доминантными состояниями.

В данной работе предложен и апробирован комбинированный метод отбора возможных нуклеосом по данным MNase-секвенирования и молекулярного моделирования. Разработанный алгоритм позволяет отфильтровывать недоступные комбинации нуклеосом и их позиции. Предложенный алгоритм позволяет уточнять позиции нуклеосом на отдельных генах, однако его можно адаптировать для обработки сигнала от кластеров нуклеосом на полном геноме.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

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

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-00033).

## 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. G. S. Omenn, *Mol. Cell. Proteomics*, **20**, 100062 (2021).
2. P. T. Lowary and J. Widom, *J. Mol. Biol.*, **276** (1), 19 (1998).
3. J. Осампо, et al., *Nucl/ Acids Res.*, **44** (10), 4625 (2016).
4. G.-C. Yuan, et al., *Science*, **309** (5734), 626 (2005).
5. W. Lee, et al., *Nature Genet.*, **39** (10), 1235 (2007).
6. D. S. Saxton and J. Rine, *Proc. Natl. Acad. USA*, **117** (44), 27493 (2020).
7. J. Feser and J. Tyler, *FEBS Lett.*, **585** (13), 2041 (2011).
8. G. A. Armeev, et al., *Nature Commun.*, **12** (1), 2387 (2021).
9. C. Dingwall, G. P. Lomonosoff, and R. A. Laskey, *Nucl. Acids Res.*, **9** (12), 2659 (1981).
10. T.-H. S. Hsieh, et al., *Cell*, **162** (1), 108 (2015).
11. R. Schöpflin, et al., *Bioinformatics*, **29** (19), 2380 (2013).
12. X. Zhou, et al., *eLife*, **5**, e16970 (2016).
13. H. A. Cole, et al., *Nucl. Acids Res.*, **44** (2), 573 (2016).
14. R. Leinonen, H. Sugawara, and M. Shumway, *Nucl. Acids Res.*, **39** (Database issue), D19 (2011).
15. B. Langmead and S. L. Salzberg, *Nature Methods*, **9** (4), 357 (2012).
16. K. Waern and M. Snyder, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **3** (2), 343 (2013).
17. D. Vasudevan, E. Y. D. Chua, and C. A. Davey, *J. Mol. Biol.*, **403** (1), 1 (2010).
18. T. Tsukiyama, et al., *Genes Dev.*, **13** (6), 686 (1999).
19. N. Kepper, et al., *Biophys. J.*, **95** (8), 3692 (2008).
20. D. Norouzi, et al., *AIMS Biophys.*, **2** (4), 613 (2015).
21. V. B. Zhurkin and D. Norouzi, *Biophys. J.*, **120** (4), 577 (2021).
22. R. V. Chereji, T. D. Bryson, and S. Henikoff, *Genome Biol.*, **20** (1), 198 (2019).
23. J. S. Mitchell, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **13** (4), 1539 (2017).

## Updating Nucleosome Positions within Individual Genes Using Molecular Modeling Methods and MNase Sequencing Data

V.A. Vasilev\*, D.M. Ryabov\*, A.K. Shaytan\*, and G.A. Armeev\*

*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

Organization of chromatin plays an important role in regulating the genetic machinery of the cell. The basic unit of chromatin packaging is a nucleosome, which harbors DNA of about 145 base pairs in length. The packaging of genetic material and its accessibility to transcription enzymes and other regulatory chromatin proteins depends on the positions of nucleosomes. MNase sequencing is used to examine nucleosome positions in a genome. MNase sequencing data are sufficient for detecting the presence of nucleosomes on the sequence, but a determination of the precise locations of nucleosomes can be problematic. Accurate determination of nucleosome positions requires additional data filtering and processing. In this study, using MNase sequencing data, a combined method based on geometric analysis of nucleosome chain molecular models is proposed for selecting possible nucleosome positions. The developed algorithm efficiently eliminates inaccessible nucleosome chain combinations and conformationally prohibited nucleosome positions.

*Keywords: chromatin, nucleosome, nucleosome positioning, molecular modeling*

## ПОИСК АНОМАЛИЙ СИГНАЛА ПОКРЫТИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТРУКТУРНЫМИ ВАРИАЦИЯМИ ГЕНОМА

© 2023 г. И.В. Бездворных\*, Н.А. Черкасов\*, А.А. Канапин\*, А.А. Самсонова\*.\*#

\*Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская набережная, 7–9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

#E-mail: a.samsonova@spbu.ru

Поступила в редакцию 04.10.2022 г.

После доработки 04.10.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Структурные вариации генома являются одним из основных источников генетического разнообразия. Как мутагены структурные варианты могут оказывать значительное влияние на здоровье человека, являясь причинами наследственных и онкологических заболеваний. Существующие методы поиска структурных вариантов основываются на анализе данных высокопроизводительного секвенирования, и, несмотря на значительный прогресс в их развитии, не позволяют определять структурные вариации с точностью, достаточной для применения в диагностике. Новые возможности для разработки методов поиска структурных вариаций представляет анализ сигнала покрытия секвенирования (т.е. количества фрагментов секвенирования, выравненных в каждой точке генома), который может рассматриваться как временной ряд. В работе представлен метод для поиска повторяющихся паттернов в сигнале покрытия, разработанный с использованием алгоритмов, применяемых для анализа временных рядов, а именно: KNN- (K-nearest neighbour) и SAX-преобразования (Symbolic Aggregation Approximation) сигнала. С использованием данных проекта Human Genome Diversity Project, включающих полногеномное секвенирование 911 человек разного этнического происхождения, нами были построены обобщающие паттерны сигнала покрытия в окрестностях точек разрыва, соответствующих структурным вариациям. В дополнение был разработан программный пакет для быстрого поиска аномалий в сигнале покрытия с применением полученных паттернов.

*Ключевые слова:* геномика, секвенирование, структурные вариации, анализ сигналов, SAX-трансформация.

DOI: 10.31857/S0006302923050113, EDN: PHCXST

Структурные вариации включают в себя такие масштабные перестройки генома, как протяженные делеции, инсерции, транслокации, инверсии, а также изменения уровня копийности (copy number variation, CNV) [1]. В отличие от однонуклеотидных замен и коротких (менее 30 п.о.) инсерций и делеций, структурные вариации, в силу своего размера, могут оказывать значительное влияние на фенотип организма хозяина и, в некоторых случаях, провоцировать возникновение заболеваний и наследственных патологий [2, 3]. Современные алгоритмы поиска структурных вариаций базируются на использовании данных высокопроизводительного секвенирования (полногеномного или полноэкзомного) и используют две основных методологии: анализ уровня сигнала покрытия (depth

of coverage) и анализ расщепленных фрагментов секвенирования (split reads) [4].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области разработки способов обнаружения структурных вариантов, задача точной их локализации до сих пор не имеет удовлетворительного решения, что выражается в значительном уровне разногласий в результатах поиска [5, 6]. Иначе говоря, цель, заключающаяся в нахождении точки разрыва с точностью в плюс/минус одно основание, необходимая для применения результатов в клинической практике не достигнута. Одним из способов решения проблемы неточности обнаружения координат структурных вариаций в геноме, является разработка алгоритмов, анализирующих и интегрирующих результаты предсказания различных программ (так называемых meta-callers), таких, как svclassify и подобных [7].

*Сокращение:* SAX – аппроксимация с помощью символьной агрегации (Symbolic Aggregation Approximation).

В то же время анализ уровня сигнала покрытия с точки зрения поиска аномалий и aberrаций изучен относительно мало, и лишь немногие программные пакеты используют этот источник информации о форме, протяженности, амплитуде, тренде и пр. сигнала для поиска структурных вариантов [8, 9]. Под сигналом покрытия генома понимается вектор целочисленных значений, значение которого в каждой точке соответствует числу выровненных на референсный геном фрагментов секвенирования, покрывающих данную позицию. Такой сигнал может рассматриваться как временной ряд и, следовательно, к нему могут быть применены разнообразие алгоритмы и методы, изначально разработанные для анализа временных рядов и, например, поиска разладок и характеристических паттернов (так называемых мотивов) в них.

В данной работе мы представляем новый метод поиска устойчивых паттернов, ассоциированных с точками разрыва, соответствующих различным типам структурных вариаций, разработанный с использованием алгоритма KNN\_Search (K-nearest neighbours) [10] и аппроксимации с помощью символьной агрегации (Symbolic Aggregation Approximation, SAX) [11]. На основе анализа данных, содержащихся в ранее разработанной нами базе данных SWaveform [12], были построены устойчивые повторяющиеся паттерны (мотивы) для имеющихся типов структурных вариаций. Также нами был разработан инструмент быстрого измерения SAX-расстояния между профилем покрытия генома и найденными нашим алгоритмом (или любыми другими) мотивами, позволяющий обнаруживать aberrантные регионы в сигнале покрытия, потенциально связанные со структурными вариациями.

## МЕТОДЫ

**Источники данных.** База данных SWaveform [12] содержит профили сигнала покрытия секвенирования, полученные на основании анализа данных полногеномного секвенирования 911 образцов консорциума Human Genome Diversity Project [13, 14] со средним значением уровня покрытия 30x, общее число профилей составляет 13106216. Для всех имеющихся в базе данных типов структурных вариаций (делеции, дубликации, инверсии, инсерции и варианты копийности) нами были отобраны группы профилей сигнала покрытия в окне  $\pm 256$  п.о. от точки разрыва (breakpoint). Для анализа были использованы только варианты с длиной, большей размера окна, т.е. превышающих 512 п.о. В случае протяженных вариаций, а именно делеций, дубликаций, инверсий и вариантов копийности, использовались профили, соответствующие их левой и правой границам. Также профили были сгруппиро-

ваны в соответствии с генотипом (гомо- или гетерозигота) структурных вариантов, что позволило в конечном итоге получить 22 группы для поиска устойчивых паттернов.

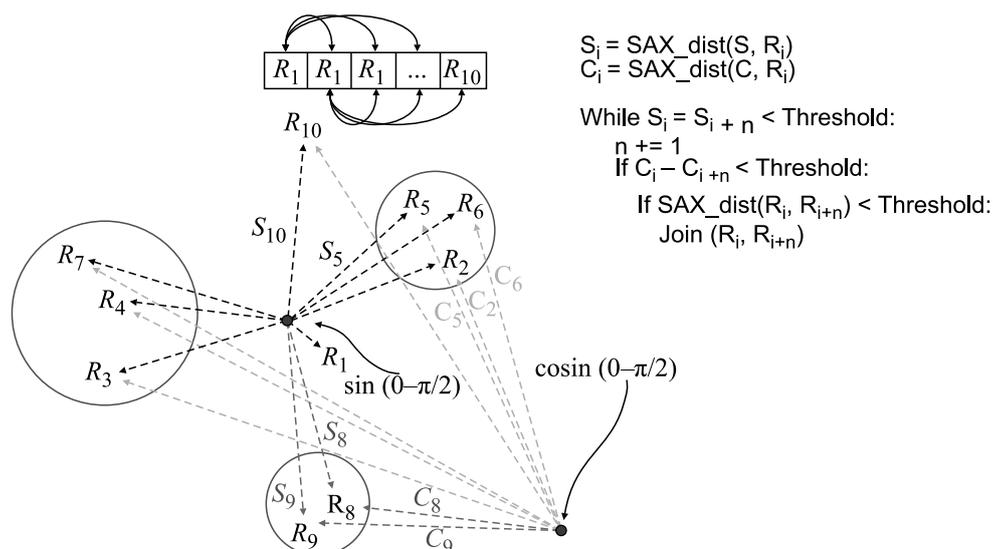
**SAX-преобразование и модифицированный алгоритм KNN.** Аппроксимация с помощью символьной агрегации позволяет осуществить преобразование временного ряда, существенно снижающее размерность входных данных. Классификаторы, построенные на преобразованных данных, обладают обобщающей способностью без ущерба для качества классификации [10]. Для данного преобразования требуется определить два параметра — ширину окна  $W$  и размер алфавита  $A$ . Преобразование включает в себя следующие этапы:

1. Нормализация исходного сигнала на среднее и дисперсию.
2. Для заданной длины алфавита  $A$  генерируется интервальная сетка, где значения распределены по нормальному закону. Каждое  $i$ -е значение сетки является  $i/A$ -квантилем функции плотности нормального распределения.
3. Сигнал разбивается на  $W$  непересекающихся одинаковых сегментов и значения в каждом сегменте усредняются.
4. Каждое усредненное значение сегмента округляется до ближайшего значения из сетки из шага 2. Этому сегменту присваивается соответствующий номер сетки (от 0 до  $A-1$ ).

Метод поиска  $K$ -ближайших соседей (K-Nearest Neighbour, KNN\_Search) для заданного вектора  $v$ , заданного максимального расстояния  $T$  и известной функции расстояния  $\rho$ , возвращает список векторов, которые находятся на расстоянии от  $v$  не далее, чем на  $T$ . При анализе сигнала покрытия, последний рассматривается как одномерный временной ряд и разбивается скользящим окном на векторы, каждый из которых преобразуется в свое SAX-представление  $\{v_0, \dots, v_l\}$ . Между этими векторами рассчитываются попарные расстояния. Из них 1.5% самых малых расстояний между векторами считаются максимальным значением  $T$  для алгоритма KNN\_Search.

Все векторы, которые оказались ближе друг к другу, чем  $T$ , объединяются в группы, которые сортируются по убыванию числа элементов в них. Таким образом, группа, содержащая максимальное число объединенных векторов, соответствует преобладающему мотиву.

Поскольку входящий временной ряд может оказаться достаточно длинным, возникает достаточно ресурсоемкая задача измерения попарных SAX-расстояний между всеми векторами  $\{v_0, \dots, v_l\}$ . Чтобы существенно снизить число операций по измерению расстояния, нами была произведена следующая модификация исходного алгорит-



**Рис. 1.** Схематическое представление модифицированного алгоритма KNN. Расстояния от базисных векторов  $S$  и  $C$  до всех остальных векторов —  $S_i$  и  $C_i$ . Расстояние между любыми двумя векторами  $R$  может быть меньше порогового тогда и только тогда, когда разница их расстояний до каждого из референсных векторов меньше порогового.

ма KNN\_Search. На первом этапе производится предварительный подсчет расстояний от произвольно выбранных нетождественных референсных векторов  $\{b_0, \dots, b_B\}$  до всех векторов списка  $\{v_0, \dots, v_I\}$ . Затем, для каждой пары векторов  $v_i$  и  $v_j$  проверяются расстояния до референсных векторов: если существует хотя бы один референсный вектор  $b_k$ , такой, что  $|\rho(v_i, b_k) - \rho(v_j, b_k)| > T$ , то, согласно положениям, представленным в работе [10],  $\rho(v_i, v_j) > T$ , т.е. расстояние между данной парой векторов  $v_i$  и  $v_j$  также больше порогового. Схематически данный метод показан на рис. 1. Такая модификация исходного алгоритма позволяет существенно сократить количество операций вычисления попарных расстояний. Вопрос выбора референсных векторов  $\{b_0, \dots, b_B\}$  остается открытым, однако с математической точки зрения их выбор может быть произвольным, поэтому в нашей модификации алгоритма используются два референсных вектора — SAX-трансформации функций  $\sin$  и  $\cos$  в диапазоне от 0 до  $\pi/2$ .

**Построение повторяющихся паттернов (мотивов) на основе профилей сигнала покрытия.** Поиск паттернов для каждой из 22 групп профилей сигнала покрытия, описанных выше, проводили следующим образом. Исходные профили группировались с применением алгоритма кластеризации K-means с числом кластеров равным 2. Число  $k$ , определяющее количество кластеров, оптимальное применительно к данной задаче, было определено в ходе серии вычислительных экспериментов с выборкой профилей, соответствующих структурным вариантам одного класса и генотипа. В ходе кластеризации с различным числом ис-

комых групп рассчитывали силуэтный индекс, который послужил критерием выбора итогового разбиения. Для оценки расстояния между профилями сигнала был использован метод расчета, основанный на принципе динамической трансформации временной шкалы (Dynamic Time Warping, DTW) [15–17]. Существенной его особенностью является устойчивость к сдвигу расстояния между сравниваемыми сигналами, что позволяет сравнивать профили, в которых общий паттерн сигнала сохраняется, но существуют локальные искажения формы (т.е. растяжения или сжатия). Применение этого метода абсолютно оправдано в случае оценки расстояния между интервалами, содержащими точки разрыва, порожденные структурными вариантами, так как дают возможность компенсировать эффекты, вызванные неточностями в работе алгоритмов предсказания структурных вариаций. В зависимости от класса структурного варианта алгоритм выделяет, как правило, либо один преобладающий кластер (т.е. содержащий более 2/3 профилей сигнала) или же два примерно равных по размерам кластера. В случае наличия преобладающего кластера наименьший исключается из дальнейшего анализа.

На следующем этапе все профили подвергаются SAX-преобразованию, где размер алфавита составляет 24 символа, а число сегментов выбрано равным 64. На завершающем этапе внутри полученного кластера или кластеров производится поиск мотива, преобладающего в полученных SAX-трансформированных профилях с использованием описанного выше модифицированного алгоритма KNN. Итоговый мотив сохраняется в виде вектора усредненных значений для каждой

позиции. Также для каждого мотива сохраняются параметры SAX-преобразования.

**Использование SAX-мотивов для поиска аномалий в сигнале покрытия.** Для поиска участков генома, в которых сигнал покрытия обладает максимальным сходством с полученными SAX-мотивами нами был разработан программный комплекс saxmf (<https://github.com/latur/saxmf>), реализованный на языках C и Python и способный работать в многопоточном режиме. Входными данными для работы программы является сигнал покрытия в специальном формате BCOV [12], получаемый путем преобразования стандартных файлов выравнивания фрагментов секвенирования в форматах SAM/BAM/CRAM. Преобразование осуществляется с помощью программ mosdepth [18] и bed2cov (см. репозиторий (<https://github.com/latur/saxmf>)). Поисковая программа saxmf включает в себя SAX-мотивы, рассчитанные из данных Human Genome Diversity Project, однако имеется возможность поиска любых других мотивов, закодированных в формате JSON.

В ходе работы программы сигнал покрытия подвергается SAX-трансформации в скользящем окне, после чего вычисляется SAX-расстояние между ним и искомым мотивом. Полученные в ходе первичного поиска геномные интервалы, потенциально содержащие мотив, соответствующий точке разрыва, порожденной каким-нибудь структурным вариантом, на следующем этапе, объединяются в кластеры для идентификации региона, имеющего максимальную близость с искомым мотивом. Положение центральной точки данного региона ищется как взвешенное среднее по SAX-расстоянию по формуле:

$$BND = \frac{\sum_i Pos_i * SAX_i}{\sum_i (S - SAX_i)},$$

где  $S$  — максимальное SAX-расстояние внутри кластера,  $Pos_i$  — центр  $i$ -го региона,  $SAX_i$  — SAX-расстояние  $i$ -го региона до мотива. Результаты поиска выводятся в формате BED-файла, включающего координаты региона и SAX-расстояние до искомого мотива.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка предложенного метода поиска паттернов, ассоциированных со структурными вариантами, была проведена на двух независимых наборах данных. В первом случае были использованы результаты полногеномного секвенирования проекта «Геномы России» [19]. Для 360 образцов были определены структурные варианты (делеции и дупликации) с использованием программы DELLY2 [20]. Затем нами был проведен поиск мо-

тивов, ассоциированных с вышеуказанными типами структурных вариаций, предсказанных с использованием данных ресурса SWaveform. Мы исходили из того, что мотив может встречаться в геноме не только в позициях, идентифицированных DELLY2, но и в других, поэтому для нас было критически важным увеличить чувствительность, но не так существенно снизить специфичность нахождения точек разрыва. Регионы, обнаруженные в ходе анализа с помощью описанного пакета saxmf, были отфильтрованы по пороговому значению SAX-расстояния, изменявшегося от 0 до 10 с шагом 0.2. Для каждого случая рассчитывали расстояние Жаккарда между регионами, найденными saxmf и DELLY2, а также процент локусов, найденных только с помощью DELLY2. Результаты анализа демонстрируют высокий уровень совпадения результатов поиска saxmf с данными, полученными одной из самых распространенных программ для поиска структурных вариаций (см. рис. 2).

Таким образом, можно предварительно оценить пороговое значение SAX-расстояния для фильтрации результатов последующего анализа данных с помощью описанного метода.

В дополнение был проведен поиск регионов, содержащих паттерн, ассоциированный с левой границей делеций в эталонном образце генома HG002 [21, 22] (проект Genome In a Bottle [23] (GIAB), NIST). Под эгидой консорциума GIAB в этом геноме был проведен всесторонний анализ структурных вариаций с использованием различных технологий секвенирования, включающих использование длинных и коротких фрагментов, а также программ для предсказания структурных вариаций. Полученные результаты были проанализированы кураторами, что позволило охарактеризовать наиболее достоверные вариации [24]. В частности, для выбранного нами мотива (левая граница делеций) в данном геноме описано 5372 региона, из которых нами был успешно обнаружен 4651 регион (~86%). Этот результат показывает, что разработанная методика поиска паттернов сигнала покрытия может быть успешно применена для первичного поиска структурных вариантов в данных полногеномного секвенирования.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант No 20-14-00072).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

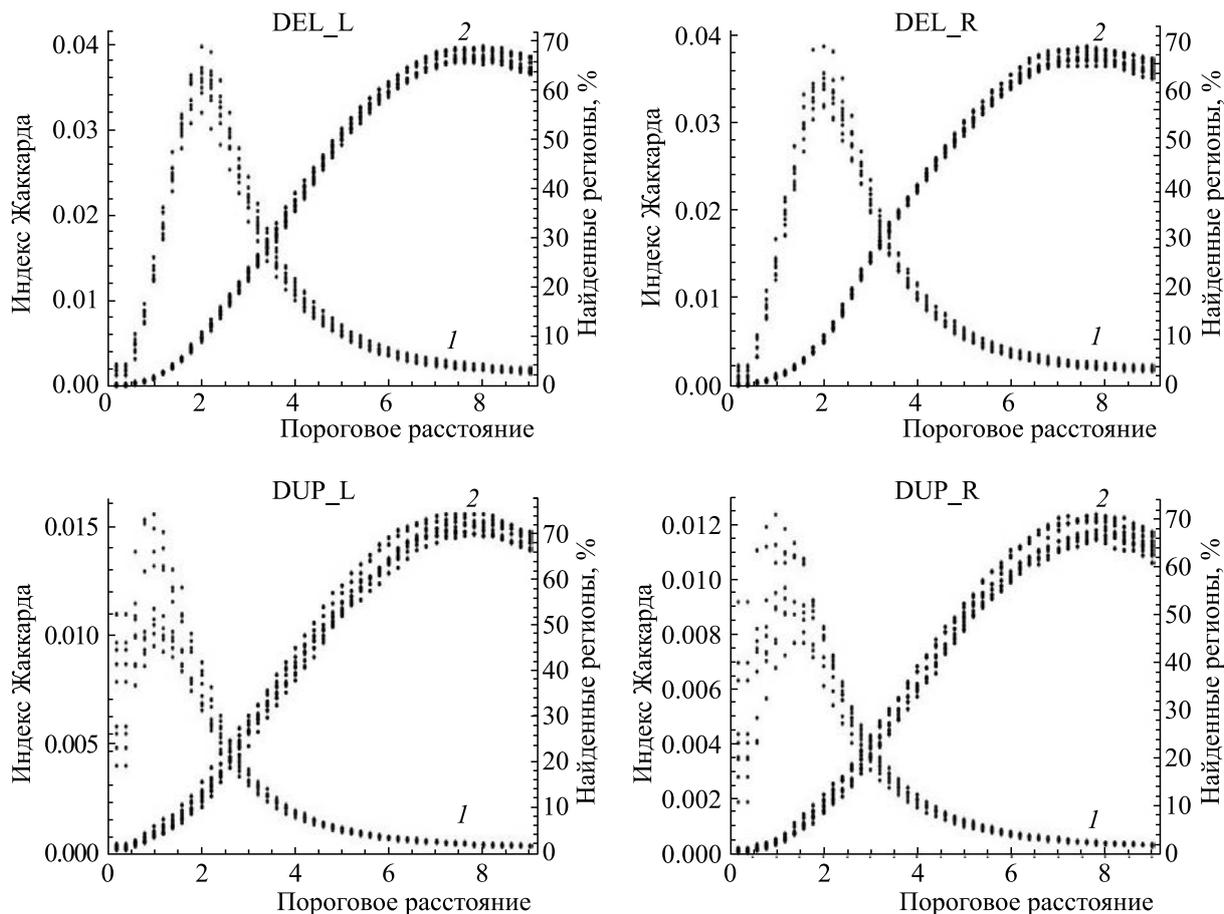


Рис. 2. Графики зависимости индекса Жаккарда (1) и процента найденных регионов (2) от порогового расстояния (ось абсцисс).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. L. Collins, et al., *Nature*, **581** (7809), 444 (2020).
2. Y. R. Li, et al., *Nature Commun.*, **11** (1), 255 (2020).
3. S. Girirajan, et al., *Am. J. Human Genetics*, **92** (2), 221 (2013).
4. M. Mahmoud, et al., *Genome Biol.*, **20** (1), 1 (2019).
5. S. Kosugi, et al., *Genome Biol.*, **20** (1), 117 (2019).
6. Z. Liu, et al., *Genome Biol.*, **23** (1), 68 (2022).
7. H. Parikh, et al., *BMC Genomics*, **17** (1), 64 (2016).
8. A. Abyzov, et al., *Genome Res.*, **21** (6), 974 (2011).
9. M. Rapti, et al., *Brief Bioinform.*, **23** (2), bbac049 (2022).
10. Z. A. Aghbari, *Data Knowl. Eng.*, **52** (3), 333 (2005).
11. S. Malinowski, et al., *Lect. Notes Comput. Sci.*, 273 (2013).
12. 762 *BGRS/SB-2022 Swaveform: a genome-wide survey of structural variation profiles*, Thirteen Int. Multiconference (2022).
13. A. Bergström, et al., *Science*, **367** (6484), eaay5012 (2020).
14. M. A. Almarri, et al., *Cell*, **182** (1), 189 (2020).
15. H. Sakoe and S. Chiba, *IEEE Trans. Acoust. Speech Signal Process.*, **26** (1), 43 (1978).
16. F. Petitjean, A. Ketterlin, and P. Gançarski, *Pattern Recogn.*, **44** (3), 678 (2011).
17. R. Tavenard, et al., *J. Mach. Learn. Res.*, **21** (118), 1 (2020).
18. B. S. Pedersen and A. R. Quinlan, *Bioinformatics*, **34** (5), 867 (2018).
19. D. V. Zhernakova, et al., *Genomics*, 1 (2019).
20. T. Rausch, et al., *Bioinformatics*, **28** (18), i333 (2012).
21. J. M. Zook, et al., *Nat. Biotechnol.*, 1 (2020).
22. A. Shumate, et al., *Genome Biol.*, 1 (2020).
23. J. M. Zook, et al., *Sci. Data*, **3**, 160025 (2016).
24. L. M. Chapman, et al., *PLoS Comput. Biol.* **16** (6), e1007933-20 (2020).

## Searching for Sequencing Signal Anomalies Associated with Genome Structural Variations

I.V. Bezdvornyyk\*, N.A. Cherkasov\*, A.A. Kanapin\*, and A.A. Samsonova\*

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

Genomic structural variations (SVs) are one of the main sources of genetic diversity. Structural variants as mutagens may have a significant impact on human health and lead to hereditary diseases and cancers. Existing methods of finding structural variants are based on analysis of high-throughput sequencing data and despite significant progress in the development of the detection methods, there is still a need for improving the identification of structural variations with accuracy appropriate for use in a diagnostic procedure. Analysis of the signal of sequencing coverage (i.e., the number of sequencing fragments that aligned to every point of a genome) holds new potential for the design of approaches for structural variations discovery, and can be used as time-series analysis. Here, we present an approach for identification of patterns in the coverage signal. The method has been developed based on algorithms used for analysis of time series data, namely KNN (K-nearest neighbour) search algorithm and the SAX (Symbolic Aggregation Approximation) method. Using the rich dataset encompassing full genomes of 911 individuals with different ethnic backgrounds generated by the Human Genome Diversity Project initiative, we constructed generalized patterns of signal coverage in the vicinity of breakpoints corresponding to various structural variant types. Also, with the benefit of the SAX models of the motifs we developed a software package for fast detection of anomalies in the coverage signal.

*Keywords: genomics, sequencing, structural variations, signal analysis, SAX transformation*

УДК 591.111.1

## ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ ЯКУТСКИХ СУСЛИКОВ В ПРЕДГИБЕРНАЦИОННЫЙ ОСЕННИЙ ПЕРИОД

© 2023 г. П.О. Теплова\*, #, Н.П. Комелина\*, К.И. Лизоркина\*, Н.М. Захарова\*

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

#E-mail: p.o.teplova@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 16.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Ранее было показано, что ряд физиологических и биохимических изменений у якутских длиннохвостых сусликов происходит уже в осенний (предгибернационный) период: в головном мозге, сердце, скелетных мышцах и др. В данной работе проанализирован состав клеток периферической крови осенью и впервые обнаружено увеличение общего числа лейкоцитов, в частности, гранулоцитов и уменьшение количества лимфоцитов у якутских сусликов по сравнению с летом; выявлен сдвиг лейкограммы с лимфоцитарной фракции в сторону гранулоцитарной. Показан значительный рост тромбоцитов и тромбокрита с сохранением процентного соотношения зрелых и молодых форм клеток. К сожалению, литературных данных о клеточном составе крови в осенний период подготовки гибернаторов к зимней спячке чрезвычайно мало. Между тем, полученные нами результаты указывают на наличие крайне важных адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов у сусликов в этот период. В статье обсуждены возможные причины этих изменений.

*Ключевые слова:* лейкоциты, тромбоциты, гематология, адаптация, гибернация, суслик.

DOI: 10.31857/S0006302923050125, EDN: PHDDWJ

Гибернация зимоспящих сусликов является уникальной природной моделью для изучения адаптивных механизмов функционирования организма в условиях критически низких температур для выживаемости человека и других теплокровных животных [1]. Естественная спячка гибернаторов представляет собой прерывистый процесс, состоящий из повторяющихся баутов спячки и межбаутовых пробуждений. Баут спячки у якутских сусликов длится в среднем 7–14 дней и состоит из входа в торпидное состояние (оцепенение), пребывания в глубоком торпоре и выхода из него. Межбаутная активность (эутермия) после пробуждения составляет от нескольких до 24 часов [2, 3]. При изучении гибернации, как правило, наибольшее внимание уделяется сравнению летнего и зимнего периодов, соответствующих периодам максимальной и минимальной активности зимоспящих, в то время как этологические, морфологические и физиологические перестройки при подготовке к спячке происходят уже в осеннее время. К сожалению, данных, каса-

ющихся предгибернационного (осеннего) периода жизнедеятельности гетеротермных животных в литературе чрезвычайно мало. Между тем, получены убедительные результаты, касающиеся изменений, происходящих у якутских сусликов на органном и организменном уровнях в осенний период: в поведенческой активности, в моноаминергической и опиоидной системах головного мозга, в сердце и скелетных мышцах [4–8]. Данная работа продолжает цикл исследований, касающихся осеннего периода подготовки к зимней спячке.

Известно, что у зимоспящих животных в течение годового цикла происходит ряд физиолого-биохимических изменений, направленных на адекватное обеспечение всех систем организма, как в условиях активной жизнедеятельности, так и в торпоре. Несомненно, важнейшую роль в поддержании гомеостаза организма играет кровь. Целью данного исследования является выявление особенностей адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов крови якутских сус-

ликов в осенний период, что расширит не только наше представление об уникальном явлении зимней спячки, но и понимание значимости рассматриваемых форменных элементов в подготовке организма к экстремальным физиологическим изменениям (гипотермии).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Объектом исследования являлись якутские длиннохвостые суслики *Urocitellus undulatus* обоего пола ( $N = 50$ ), взятые в эксперимент во время их летней (июнь-июль, температура в области сердца  $38^{\circ}\text{C}$ , масса  $607.0 \pm 18.6$  гр.,  $N = 25$ ) и осенней активности (октябрь, температура в области сердца  $37-38^{\circ}\text{C}$ , масса  $682.0 \pm 15.4$  гр.,  $N = 25$ ). Диких животных отлавливали в Якутии в августе с дальнейшей транспортировкой в лабораторию. В летний и осенний периоды (до ноября) сусликов содержали в одинаковых условиях: в индивидуальных клетках в специально приспособленных неотопливаемых помещениях с соблюдением естественного фотопериода, при достаточном количестве пищи (зерно, семена подсолнечника, овощи) (*ad libitum*). Забор сусликов осеннего периода проводили в первые две недели октября при ежедневном мониторинге животных, с учетом того, что начало входа в спячку у данного вида приходится на третью декаду октября [9].

**Гематологический анализ.** Гематологическое исследование цельной крови проводили на многопараметровом ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе BC-2800Vet (Mindray, Китай). Калибровку прибора осуществляли при помощи заводского набора BC-3D (Mindray, Китай). Забор крови всегда осуществляли в утренние часы (10:00–11:00) незамедлительно после декапитации животных. Животных декапитировали после анестезии золетилом (Zoletil, Virbac, Франция, 4 мг/кг внутримышечно). Кровь в объеме 200 мкл отбирали в пробирку с антикоагулянтом  $\text{K}_2\text{-EDTA}$ , 0,2 мл. Определяли следующие гематологические показатели:

– лейкоцитарные индексы: WBC (общее количество лейкоцитов),  $\times 10^9/\text{л}$ ; LYMPH (лимфоциты),  $\times 10^9/\text{л}$ ; MON (моноциты),  $\times 10^9/\text{л}$ ; GRAN (гранулоциты, суммарно нейтрофилы, базофилы и эозинофилы),  $\times 10^9/\text{л}$ ; LYMPH (лимфоциты), %; MON (моноциты), %; GRAN (гранулоциты), %;

– тромбоцитарные индексы: PLT (тромбоциты),  $\times 10^9/\text{л}$ ; MPV (средний объем тромбоцитов), фл; PDW (ширина распределения тромбоцитов по объему); PCT (тромбокрит), %.

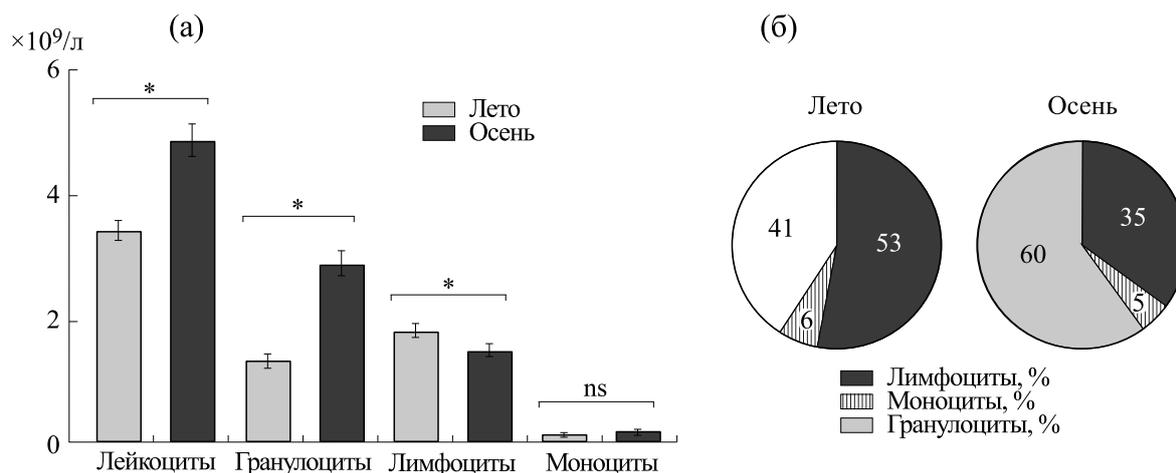
**Статистический анализ.** Данные представлены в виде среднего значения  $\pm m$ , где  $m$  – стандартная ошибка среднего (SEM, Standard Error of the

Mean). Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.4.1.681 (GraphPad Software Inc., США) и Statistica 10.0.1011 (StatSoft Inc., США). Анализ вида распределения данных проводили с использованием критериев нормальности Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса, а также  $W$ -критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения независимых измерений использовали двусторонний непараметрический непарный  $U$ -критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

**Содержание лейкоцитов.** Полученные абсолютные и относительные показатели лейкоцитарной фракции крови подробно представлены на рис. 1. Было обнаружено, что осенью общее число лейкоцитов увеличивается почти в полтора раза по сравнению с летним периодом:  $(4.90 \pm 0.26) \times 10^9/\text{л}$  и  $(3.50 \pm 0.14) \times 10^9/\text{л}$  соответственно. При этом со сменой сезона количественный показатель фракции гранулоцитов возрастает в два раза: с  $(1.40 \pm 0.07) \times 10^9/\text{л}$  летом до  $(2.90 \pm 0.21) \times 10^9/\text{л}$  осенью, количество лимфоцитов уменьшается в 1.2 раза (с  $(1.80 \pm 0.11) \times 10^9/\text{л}$  летом до  $(1.50 \pm 0.09) \times 10^9/\text{л}$  осенью), а количество моноцитов достоверно не изменяется (рис. 1а). Также наблюдается изменение соотношения некоторых субпопуляций лейкоцитов (рис. 1б): снижается процентное содержание лимфоцитов – с 53% летом до 35% осенью (на 18%), увеличивается процентное содержание гранулоцитов – с 41% летом до 60% осенью (на 19%).

Данный феномен может говорить о высвобождении нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга в кровь. Согласно литературным данным, в активном состоянии костный мозг сусликов содержит больше нейтрофилов ранней стадии (миелобласты и нейтрофильные промиелоциты) и меньше нейтрофилов поздней стадии (нейтрофильные метамиелоциты) [10, 11]. Нейтрофилы отвечают за неспецифическую форму лейкоцитарной защиты. Известно, что в костном мозге млекопитающих содержится запас гранулоцитов, кратно превышающий уровень, циркулирующий в кровяном русле, который задействуется, например, при стрессе [12]. Повышение уровня гранулоцитов может быть связано и с процессом, обратным лейкоцитарной экстравазации – проникновением лейкоцитов за пределы сосудов и временное «хранение» во вторичных лимфоидных (селезенке и лимфоузлах) и прочих (кишечник, легкие) органах [1, 13–17]. Схожие механиз-



**Рис. 1.** Лейкоцитарный профиль крови якутских сусликов *Urocitellus undulatus* в период летней и осенней активности. (а) – Абсолютные значения общего количества лейкоцитов и их отдельных фракций, представленные как среднее и стандартная ошибка среднего. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия между выборками ( $p < 0.05$ ), ns – по результатам статистической проверки статистически значимые отличия не обнаружены ( $p \geq 0.05$ ). (б) – Относительное содержание различных видов лейкоцитов (лейкограмма);  $n = 25$  для каждого времени года.

мы, вероятно, актуальны и для физиологического увеличения лейкоцитов у гибернарующих животных во время и после пробуждения [1, 18, 19]. Как показано на суслике золотистом (*Callospermophilus lateralis*), временных и энергетических резервов организма для быстрого созревания нейтрофилов в период пробуждения недостаточно вследствие подавления синтеза белка во время гипотермии [11]. Таким образом, можно объяснить потребность организма в данной адаптации в виде увеличенного пула нейтрофилов уже в осенний период.

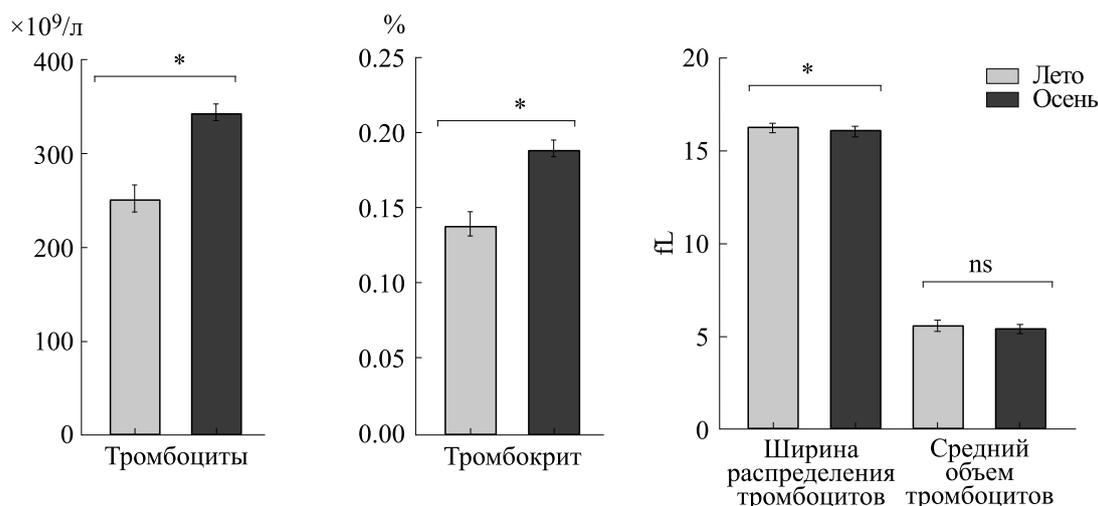
В отличие от относительно короткоживущих гранулоцитов, время жизни лимфоцитов составляет несколько месяцев [20, 21]. Развивающаяся лимфоцитопения у якутских сусликов может объясняться постепенным снижением активности костного мозга в отношении синтеза этого типа клеток, экстравазацией (например, в кишечник) [22, 23], а также инволюцией тимуса [24]. Лимфоцитопения в осенний период может быть обусловлена и снижением пролиферативной способности Т-лимфоцитов селезенки в это время [25].

Увеличение общего числа лейкоцитов в 1.6 раза осенью недавно обнаружено и у гетеротермных летучих мышей *Myotis dasycneme*, при этом у самок параметр WBC в 2.5 раза выше, чем у самцов [26]. Сезонный лейкоцитоз осенью перед спячкой показан и для других гибернаторов, таких как тарбаган (*Marmota sibirica*) [27] и краснощекий суслик (*Spermophilus erythrognys*) [28].

Общеизвестными распространенными причинами повышения уровня лейкоцитов являются

стрессовые состояния, травмы, инфекционный и воспалительный ответ организма [29]. Однако, по всей видимости, здесь имеет место именно адаптивная реакция, эволюционно выработанная гибернаторами для подготовки к сезону гипотермии. По нашим данным (в печати), во время торпора у якутского суслика происходит аномальное снижение количества лейкоцитов до критических значений. При пробуждении, наоборот, количество данных кровяных телец стремительно увеличивается; подобное описано и для европейского суслика [1]. Мы полагаем, что осень является важным периодом для обеспечения необходимого клеточного пула лейкоцитов для межбурных пробуждений. Существенное увеличение гранулоцитарной фракции лейкоцитов можно объяснить активацией врожденной иммунной системы с целью клиренса крови от различных патогенов перед зимней спячкой, которая сопровождается затем глубокой иммунодепрессией [11].

**Тромбоцитарные показатели.** Осенью изменяется также количество тромбоцитов в крови якутских сусликов, подробные результаты представлены на рис. 2. У активных осенних животных выявлено значительное увеличение тромбоцитов по сравнению с летними –  $(344.50 \pm 9.90) \times 10^9/\text{л}$  и  $(252.20 \pm 13.96) \times 10^9/\text{л}$  соответственно. Аналогичная тенденция сохраняется для тромбоцита: с лета на осень происходит увеличение в 1.4 раза  $(0.140 \pm 0.007\%$  и  $0.19 \pm 0.005\%$  соответственно). При этом ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW) остается практически неизменной



**Рис. 2.** Количество тромбоцитов в крови якутских сусликов *Urocitellus undulatus* в период летней и осенней активности. Значения представлены как среднее и стандартная ошибка среднего. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия между выборками ( $p < 0.05$ ), ns – по результатам статистической проверки значимые отличия не обнаружены ( $p \geq 0.05$ );  $n = 25$  для каждого времени года.

( $16.40 \pm 0.09$  fL летом и  $16.20 \pm 0.04$  fL осенью), что свидетельствует об общем сохранении процентного соотношения зрелых и молодых фракций тромбоцитов, и дополнительно подтверждается отсутствием достоверных различий показателя MPV (среднего объема тромбоцитов) летом и осенью.

Схожий тромбоцитарный профиль был показан для гетеротермных летучих мышей осенью: наблюдали увеличение общего числа тромбоцитов и тромбокрита в два раза при отсутствии изменений показателя MPV [26].

Возможным механизмом высвобождения тромбоцитов в кровяное русло является их способность к обратимой адгезии, миграции и аккумуляции на стенках кровеносных сосудов, а также в различных органах, как и в случае с лейкоцитарным пулом периферической крови.

Имеются данные о том, что в период торпора тромбоциты не накапливаются в селезенке [19, 30]. Выявлено, что основным местом для хранения тромбоцитов в период зимней спячки являются синусоиды печени [19, 31]. Вероятно, зрелая часть тромбоцитов мигрирует из органов, а фракция молодых образуется путем отшнуровывания тромбоцитов от мегакариоцитов костного мозга таким образом, что соотношение зрелых и молодых форм остается неизменным [32, 33]. Любопытно, что срок жизни меченых тромбоцитов примерно на 50% продолжительнее у спящих сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) по сравнению с не впавшими в спячку [19].

Аналогично ситуации с лейкоцитарными показателями, в период спячки у якутского, а также европейского и тринадцатиполосного суслика [1, 19] происходит аномальное снижение количества тромбоцитов с последующим реактивным увеличением данного параметра до нормальных значений в период межбуждений (материал в печати). Наблюдаемый тромбоцитоз, по-видимому, также связан с подготовкой к периоду гипотермии. Показано, что тромбоциты играют важную роль не только в процессе гемостаза, но и в процессах репарации и адаптации организма к действию на него различных экстремальных факторов (гипоксии, ионизирующей радиации, инфекции, стресса и др.), к которым относится и гипотермия в торпидный период [34].

Из-за подобной адаптивной лабильности гематологических показателей длиннохвостые суслики способны адекватно реагировать на сезонные изменения и благоприятно переживать длительный период зимней спячки (5–8 мес).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами результаты указывают на наличие крайне важных адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов у сусликов в осенний период подготовки к зимней спячке. Впервые у якутских сусликов обнаружено увеличение общего числа лейкоцитов, в частности, гранулоцитов и уменьшение количества лимфоцитов осенью по сравнению с летом; выявлен сдвиг лейкограммы с лимфоцитарной фрак-

ции в сторону гранулоцитарной. Показан значительный рост тромбоцитов и тромбокрита с сохранением процентного соотношения зрелых и молодых фракций клеток. Возможный смысл описанных гематологических изменений заключается в заблаговременном клиренсе крови от патогенов, репарации имеющихся внешних и внутренних повреждений, а также накоплению увеличенного пула клеток для последующего распределения в органах во время зимней спячки. Данное исследование еще раз подтверждает важность изучения осеннего периода жизни гетеротермных животных.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме Государственного задания «Механизмы природного и искусственного гипобиоза» (НИОКТР: 122041100276-0).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с руководящими принципами, установленными Директивой Европейского Совета 2010/63/EU и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12 августа 1977 г. N 755 “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”. Протокол был одобрен этическим комитетом Института биофизики клетки РАН (№ 2 от 08.09.2021 г).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. R. Bouma, A. M. Strijkstra, A. S. Voerema, et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **136**, 319 (2010).
2. N. K. Klichkhanov, E. R. Nikitina, Z. M. Shihamirova, et al., *Front. Physiol.*, **12**, 730657 (2021).
3. S. Popova, A. Ulanova, Y. Gritsyna, et al., *Sci. Reports*, **10**, 15185 (2020).
4. Е. В. Карадулева, И. М. Санталова и Н. М. Захарова, *Биофизика*, **57**, 926 (2014).
5. М. В. Лазарева, К. О. Трапезникова, И. М. Вихлянцева и др., *Биофизика*, **57**, 982 (2012).
6. М. В. Онуфриев, Т. П. Семенова, Е. П. Волкова и др., *Нейрохимия*, **33**, 103 (2016).
7. Т. П. Семенова и Н. М. Захарова, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **99**, 1265 (2002).
8. Т. П. Семенова, Л. А. Спиридонова и Н. М. Захарова, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **100**, 1068 (2014).
9. А. И. Ануфриев и И. М. Охлопков, *Экология*, **2**, 125 (2015)
10. J. E. Szilagy and J. B. Senturia, *Cryobiology*, **9**, 257 (1972).
11. H. R. Bouma, H. V. Carey, and F. G. M. Kroese, *J. Leukoc. Biol.*, **88**, 619 (2010).
12. A. Hidalgo, E. R. Chilvers, C. Summers, et al., *Trends Immunol.*, **40**, 584 (2019).
13. M. Franco, C. Contreras, and R. F. Nespolo, *Comp. Biochem. Physiol. A*, **166**, 338 (2013).
14. Y. Yasuma, R. M. McCarron, M. Spatz, et al., *Am. J. Physiol.*, **273**, 1861 (1997).
15. Г. В. Алексеева и В. М. Юнкер, *Изв. СО АН СССР*, **5** (1), 124 (1974).
16. Г. В. Алексеева, В. М. Юнкер и О.П. Федорова, *Известия СО АН СССР*, **92** (1974).
17. А. И. Ануфриев, *Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии* (СО РАН, Новосибирск., 2008).
18. P. Suomalainen and V. Rosokivi, *Suomalainen Tiedeakatemia toimituksia. Sar. A.4: Biologica*, **198**, 1 (1973).
19. E. L. d.Vrij, Thesis of Doctor of Philosophy (University of Groningen, Groningen, 2019).
20. E. Parretta, G. Cassese, A. Santoni, et al., *J. Immunol.*, **180**, 7230 (2008).
21. J. Sprent and D. F. Tough, *Science (New York)*, **265**, 1395 (1994).
22. P. Inkovaara and P. Suomalainen, *Ann. Acad. Sci. Fenn. Biol.*, **200**, 1 (1973).
23. C. C. Kurtz and H. V. Carey, *Develop. Comp. Immunol.*, **31**, 415 (2007).
24. С. Г. Колаева, Е. Г. Новоселова, З. Г. Амерханов и др., *Цитология*, **45**, 628 (2003).
25. E. G. Novoselova, A. V. Kulikov, O. V. Glushkova, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **397**, 272 (2004).
26. L. Kovalchuk, V. Mishchenko, and L. Chernaya, *Zoology and Ecology*, **27**, 168 (2017).
27. Л. И. Лешкович, *Изв. Гос. противочумн. ин-та Сибири и Дальнего Востока*, **8**, 70 (1950).
28. В. М. Юнкер, Г. В. Алексеева и Е. В. Фомина, *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **10**, 193 (1974).
29. N. Abramson and B. Melton, *Am. Fam. Physician*, **62**, 2053 (2000).
30. E. L. dVrij, P. C. Vogelaar, M. Goris, et al., *PloS One*, **9**, 603 (2014).
31. E. L. dVrij, H. R. Bouma, M. Goris, et al., *J. Comp. Physiol. B*, **191**, 603 (2021).
32. S. Cooper, S. Lloyd, A. Koch, et al., *J. Comp. Physiol. B*, **187**, 815 (2017).
33. L. Corash, H. Y. Chen, J. Levin, et al., *Blood*, **70**, 177 (1987).
34. B. G. Yushkov, *Bull. Sib. Med.*, **20**, 216 (2021).

## **Peculiarities of Adaptational Changes in Leukocytes and Platelets of Yakutian Ground Squirrels during the Pre-Hibernation Period in Autumn**

**P.O. Teplova\*, N.P. Komelina\*, K.I. Lizorkina\*, and N.M. Zakharova\***

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

Earlier, it was shown that a series of physiological and biochemical changes in Yakutian long-tailed ground squirrels start to happen during autumn (the pre-hibernation period): in the brain, heart, skeletal muscles, etc. This study was conducted to analyze the composition of peripheral blood cells obtained from Yakutian ground squirrels in autumn, and for the first time an increase in the total number of leukocytes, particularly granulocytes, and a decrease in the number of lymphocytes were observed when compared with those obtained in summer; a shift of the leukogram from the lymphocytic fraction to the granulocytic fraction was revealed. Significant increase in a platelet count and thrombocrit with preservation of the percentage ratio of mature and young cell fractions was shown. Still, information on the cellular components of blood during the autumn season when hibernators prepare for winter months of hibernation remains scarce. Nonetheless, the results of our study indicate that there are very significant adaptive changes that occur in leukocytes and platelets of ground squirrels in this period. Possible causes of these changes are discussed.

*Keywords: leukocytes, platelets, hematology, adaptation, hibernation, ground squirrel*

УДК 577.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ИНДУКЦИИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ВТОРИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

© 2023 г. О.М. Розанова<sup>\*,#</sup>, Е.Н. Смирнова<sup>\*</sup>, Т.А. Белякова<sup>\*\*</sup>, Н.С. Стрельникова<sup>\*\*,#</sup>

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

<sup>#</sup>E-mail: rozanova.iteb@gmail.com

<sup>\*\*</sup>Филиал «Физико-технический центр» Физического института им. П.Н. Лебедева РАН,  
ул. Мира, 1Н, Протвино Московской области, 142281, Россия

<sup>##</sup>E-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

Поступила в редакцию 03.07.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Исследованы радиочувствительность к низким и высоким дозам рентгеновского излучения и способность к индукции радиационного адаптивного ответа лимфоцитов при облучении *in vitro* периферической крови пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита и здоровых доноров разного возраста. Критерием цитогенетического повреждения служила частота микроядер в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах в культуре. Было обнаружено, что спонтанный уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита в 2,5 раза выше, чем у здоровых молодых и возрастных волонтеров, а также наблюдалась значительная межиндивидуальная вариабельность значений по сравнению с контрольными когортами. Не было выявлено различий в средних значениях по радиочувствительности к низким и высоким дозам рентгеновского излучения между исследуемыми группами. Показано отсутствие корреляции между спонтанным уровнем микроядер в лимфоцитах и радиочувствительностью индивидумов во всех группах. Радиационный адаптивный ответ индуцировался с той же частотой и в той же степени в лимфоцитах как у пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита, так и у здоровых доноров разного возраста.

*Ключевые слова:* радиационный адаптивный ответ, лимфоциты человека, микроядра, ионизирующее излучение

DOI: 10.31857/S0006302923050137, EDN: PHESWE

В последние годы активно исследуется клиническое применение ряда специфических немешенных эффектов, обнаруженных в 1980–90 гг. при изучении действия малых доз радиации на живые объекты [1, 2]. Наибольший интерес из них представляют феномены индуцированной гиперчувствительности в области низких доз (до 40 сГр) и радиационный адаптивный ответ (РАО), который проявляется в том, что предварительное облучение биологических объектов в малых дозах ионизирующего излучения приводит к повышению устойчивости организма к последующему воздействию в больших повреждающих

дозах радиации или других генотоксических агентов [3]. Способность к индукции РАО показана в настоящее время на организменном уровне *in vivo* на представителях практически всех таксономических уровней животного и растительного мира [4]. Поскольку индукция РАО приводит к снижению повреждения на 40–75%, и эта величина сравнима или превосходит эффективность известных современных химических радиопротекторов [5], то многими исследователями РАО рассматривается как способ повышения общей устойчивости организмов к различным неблагоприятным факторам окружающей среды, метод защиты здоровых тканей и органов при радиотерапии рака, сахарном диабете и модуляции воспалительных иммунных реакций при острых и хронических заболеваниях опорно-двигательного аппарата, иммунодефицитных состояниях, ле-

*Сокращения:* РАО – радиационный адаптивный ответ, ЦБДЛ – цитохалазин-блокированные двуядерные лимфоциты, СВИД – синдром вторичного иммунного дефицита, БПНЦ РАН – больница Пущинского научного центра РАН.

чения коронавируса [6]. Ранее нами при облучении двухмесячных мышей линии SHK в дозе 10 сГр была показана индукция РАО, который сохранялся не только на протяжении всей жизни животных, но и приводил к снижению спонтанного уровня цитогенетических повреждений, связанных со старением, что обусловлено эпигенетическими изменениями генома, которые приводили к повышению стабильности генома [7, 8]. В связи с этим активно продолжаются исследования механизмов и закономерностей индукции РАО у человека в условиях *in vivo* и *in vitro*. В ряде работ, проведенных в основном на здоровых донорах, была выявлена большая индивидуальная вариабельность регистрируемых показателей и зависимость от генетических и эпигенетических факторов [3, 9]. Совсем немного публикаций существует о возможности индукции РАО в зависимости от возраста и диагноза пациентов, поскольку как правило исследуют только уровень спонтанного уровня генетических повреждений и радиочувствительность клеток пациентов с разными заболеваниями. К настоящему моменту показано, что повышенный уровень этих показателей наблюдается у онкологических пациентов, жителей областей с повышенным радиационным фоном и сотрудников предприятий, работающих с радиоактивными материалами [10, 11]. В качестве биомаркера геномной нестабильности в работах по изучению индивидуальной радиочувствительности человека чаще всего используется метод определения количества микроядер в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах (ЦБДЛ) человека, который является чувствительным, воспроизводимым и унифицированным методом, позволяет быстро оценивать уровень хромосомных повреждений, накапливать индивидуальные данные в течение нескольких лет, объединять и сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях [12–14].

В последние годы в мире растет количество людей с синдромом вторичной иммунной недостаточности, в основе которого лежит расстройство функционирования иммунной системы, развивающееся в постнатальном периоде или у взрослых, которое отличается нарушением процессов дифференцировки, пролиферации и адаптации клеток иммунной системы и не является результатом генетических нарушений [15]. Хотя синдром вторичного иммунодефицита (СВИД) не является болезнью, это состояние представляет собой существенный фактор риска преждевременного старения, рака, атеросклероза, аутоиммунных, аллергических и хронических инфекционных заболеваний. Исследование населения, проживающего в экологически неблагоприятных регионах, показало, что в большинстве случаев недостаточность иммунной системы клинически проявляется часто рецидивирующими бактери-

альными, грибковыми, вирусными инфекциями (обычно сочетанными герпетическими инфекциями), плохо поддающимися традиционным методам лечения [16]. Важное участие различных сигнальных путей иммунной системы в реакциях организма при действии низких доз радиации показано во многих исследованиях [17].

Целью данной работы являлось исследование радиочувствительности и способности к индукции РАО в лимфоцитах периферической крови пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

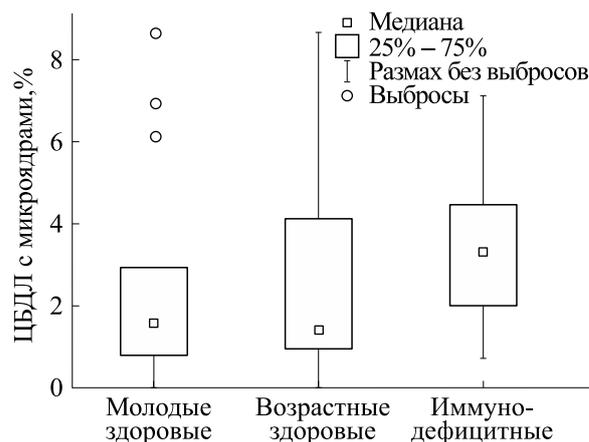
В исследовании участвовали 12 пациентов (все женщины, средний возраст 59 лет) с СВИД, которые были клинически обследованы в отделении иммунологии Больницы Пущинского научного центра РАН (БПНЦ РАН) и находились в стадии ремиссии. Две контрольные группы включали 15 молодых волонтеров (женщины и мужчины, средний возраст 24 года) и 12 возрастных волонтеров (женщины и мужчины, средний возраст 55 лет). Все участники не имели вредных привычек (курение, алкоголь), придерживались традиционной диеты и образа жизни, а также не подвергались в течение месяца рентгеновским обследованиям или компьютерной томографии.

Образцы крови (5 мл) отбирали у волонтеров утром натощак из локтевой вены в стерильные флаконы с гепарином (10 ед/мл) на базе отделения иммунологии БПНЦ РАН, а также процедурных кабинетов БПНЦ РАН и Протвинской городской больницы (Протвино Московской области).

Изучение радиочувствительности и индукции РАО проводили при облучении рентгеновскими лучами *in vitro* гепаринизированной цельной периферической крови человека. Полученный объем венозной крови делился на аликвоты объемом 0.5 мл для следующих вариантов в двух повторениях: 1) необлученный контроль; 2) облучение рентгеновским излучением в дозе 10 сГр; 3) облучение в дозе 2 Гр; 4) облучение по схеме РАО — сначала в адаптирующей дозе 10 сГр, а затем через 5 ч — в выявляющей дозе 2 Гр. Величины доз и время между облучением было подобрано на основе предыдущих исследований по определению условий, необходимых для индукции АО на мышах и дозовых зависимостей индукции хромосомных повреждений, полученных при облучении лимфоцитов здоровых доноров [19, 20]. Облучение образцов крови проводили при комнатной температуре рентгеновским излучением (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин) на установке



**Рис. 1.** Спонтанная частота ЦБДЛ с микроядрами (в %) у здоровых и иммунодефицитных индивидуумов. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона. Различия между группами статистически достоверны (\* –  $p \leq 0.0001$ , \*\* –  $p \leq 0.001$ ).



**Рис. 2.** Количество микроядер в ЦБДЛ здоровых и иммунодефицитных доноров после рентгеновского облучения в дозе 10 сГр. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

РУТ в ЦКП «Источники излучения» (ИБК РАН, Пушкино Московской области).

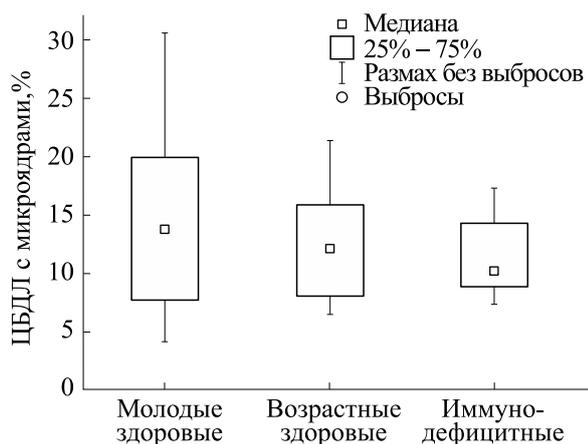
Для определения цитогенетического повреждения в лимфоцитах использовали методику Фенеша [21] с небольшими модификациями. После облучения аликвоты цельной крови культивировали при 37°C в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 20% термоинактивированной эмбриональной сыворотки («ПанЭко», Россия), 1% антибиотической смеси и 7 мкг/мл фитогемагглютина («ПанЭко», Россия), который необходим для стимуляции лимфоцитов к делению. Через 44 ч после начала культивирования в среду добавляли блокатор цитоплазматического деления в концентрации 7 мкг/мл цитохалазин В (Sigma Aldrich, США) для накопления двуядерных лимфоцитов. После 72 ч инкубации готовили цитогенетические препараты по стандартному протоколу для подсчета двуядерных лимфоцитов с микроядрами, которые окрашивались 4%-м красителем азур-эозином по Романовскому. Критерием повреждения служила частота микроядер в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах. При анализе микроядер в ЦБДЛ использовали критерии, описанные в работе [12]. На каждую экспериментальную точку отдельного донора подсчитывали не менее 1000 ЦБДЛ.

Статистические различия между группами оценивались с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Степень разброса значений внутри группы определяли с помощью коэффициента вариации. Парный корреляционный анализ проводили с помощью корреляции Пирсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показаны спонтанная частота микроядер ЦБДЛ у пациентов с СВИД и здоровых доноров разного возраста. Индивидуальные значения частоты микроядер в контрольной молодой группе находились в диапазоне 0.80–2.28%, в контрольной возрастной группе – 0.60–3.50%, а в группе с СВИД – 1.50–10.90%. Средние значения спонтанного уровня хромосомных повреждений в лимфоцитах контрольных групп не зависели от возраста индивидуумов. Среднее значение спонтанного уровня цитогенетических повреждений в группе с СВИД в 2.6 раза превышало таковое в группе молодых и в 2.4 раза в группе возрастных волонтеров. Кроме повышенного среднего спонтанного уровня микроядер у пациентов с СВИД наблюдалась значительная вариабельность значений по сравнению с когортой здоровых доноров обоих возрастов.

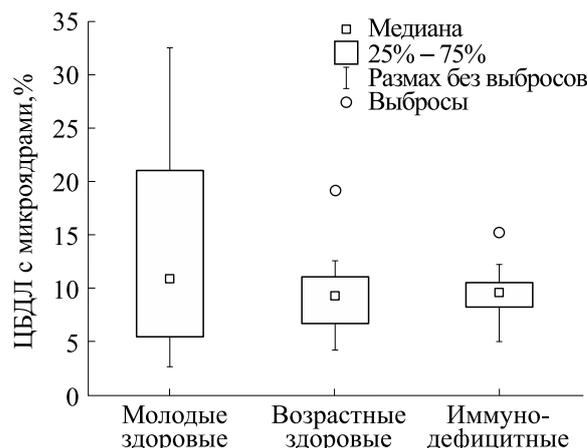
Далее мы исследовали чувствительность лимфоцитов цельной крови индивидуумов к облучению рентгеновским излучением в дозе 10 сГр. На рис. 2 показаны средние значения количества микроядер в лимфоцитах после облучения низкой дозой всех трех когорт. Индивидуальные значения количества микроядер в лимфоцитах контрольной молодой группы находились в диапазоне 0.0–8.63%, в контрольной возрастной группе – 0.0–8.63%, а в группе с СВИД – 0.7–7.10%. Высокая внутригрупповая вариабельность значений наблюдалась у молодых волонтеров, а низкая – в группе с СВИД. Средняя радиочувствительность к дозе 10 сГр у пациентов с СВИД не отличалась от здоровых доноров обоих возрастов. Медианные значения в контрольных группах были близки (1.6 и 1.4), а в группе иммунодефицитных это значение было выше (3.3).



**Рис. 3.** Значения количества ЦБДЛ с микроядрами у здоровых и иммунодефицитных доноров после рентгеновского облучения в дозе 2 Гр. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

На рис. 3 представлено количество микроядер в лимфоцитах, облученных в дозе 2 Гр, у пациентов с СВИД и здоровых индивидуумов. Индивидуальные значения количества микроядер в лимфоцитах контрольной молодой группы находились в диапазоне 4.10–30.69%, в контрольной возрастной группе – 6.50–21.4%, а в группе пациентов с СВИД – 7.40–17.3%. Достоверных отличий в радиочувствительности лимфоцитов к дозе 2 Гр между группами выявлено не было. В группе здоровых молодых волонтеров наблюдалась наиболее выраженная межиндивидуальная вариабельность по сравнению с другими группами. Анализ полученных данных показал также, что отсутствует корреляция между спонтанным уровнем микроядер в ЦХБЛ и радиочувствительностью индивидуумов во всех группах.

Следующим этапом было исследование способности к индукции РАО при облучении лимфоцитов пациентов с СВИД и здоровых доноров по схеме РАО. На рис. 4 показаны средние значения выхода микроядер в лимфоцитах здоровых волонтеров и пациентов с СВИД при последовательном облучении в дозе 10 с Гр, а через 5 ч (минимальное время, необходимое для развития РАО) в дозе 2 Гр. Как и при облучении в малых и терапевтических дозах, при комбинированном лучевом воздействии в группах наблюдали значительный индивидуальный разброс значений: в контрольной молодой группе значения находились в диапазоне 2.60–32.51%, в контрольной возрастной группе 4.20–19.20%, а в группе с СВИД 5.00–15.20%. Наибольшая внутригрупповая вариабельность значений наблюдалась в группе молодых доноров. Достоверных отличий в



**Рис. 4.** Количество микроядер в ЦБДЛ здоровых и иммунодефицитных доноров после облучения по схеме РАО (10 сГр + 2 Гр). Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

радиочувствительности при облучении по схеме РАО между группами выявлено не было.

Во многих работах индукцию РАО в лимфоцитах крови людей определяют по статистически достоверным различиям между группой, облученной только выявляющей дозой и группой комбинированного облучения [22]. Мы величину РАО определяли по формуле:

$$РАО = ((D_1 - D_0) + (D_2 - D_0)) / (D_{1+2} - D_0),$$

где  $D_1$  – количество микроядер в лимфоцитах при облучении в дозе 10 сГр;  $D_2$  – количество микроядер в лимфоцитах при облучении в дозе 2 Гр;  $D_0$  – количество микроядер в необлученных лимфоцитах;  $D_{1+2}$  – количество микроядер в лимфоцитах при облучении в дозе 10 сГр+2 Гр. Поскольку индукция РАО рассматривается как механизм, который приводит к значительному радиопротекторному эффекту, то мы рассматривали наличие РАО только у тех волонтеров, у которых его величина была больше 1.2. При соетанном облучении лимфоцитов наблюдались три вида ответа: снижение радиочувствительности (наличие РАО), повышение радиочувствительности и отсутствие реакции на адаптирующее воздействие.

Как видно из табл. 1, во всех группах у индивидуумов выявлена высокая способность к индукции РАО. В группе молодых волонтеров у 80% индуцировался РАО (максимальное значение равнялось 3.51), в группе возрастных – 75% (максимальное значение – 3.50), в группе с СВИД – 83.4% (максимальное значение 3.12). Средняя величина РАО была одинакова во всех

**Таблица 1.** Частота микроядер в двуядерных лимфоцитах человека, облученных разными дозами рентгеновского излучения

Молодые здоровые волонтеры			Возрастные здоровые волонтеры			Иммунодефицитные волонтеры					
№	Микроядра в ЦБДЛ, %		Тип ответа	№	Микроядра в ЦБДЛ, %		Тип ответа	№	Микроядра в ЦБДЛ, %		Тип ответа
	2 Гр	0.1 + 2 Гр			2 Гр	0.1 + 2 Гр			2 Гр	0.1 + 2 Гр	
1	9.70	7.10	+	1	6.50	4.20	+	1	14.50	8.50	+
2	7.70	3.80	+	2	12.94	6.14	+	2	9.50	9.80	+
3	4.10	2.60	+	3	16.70	10.50	+	3	8.90	10.50	+
4	6.50	4.20	+	4	15.10	12.50	+	4	10.30	10.20	+
5	6.58	5.43	+	5	21.40	11.30	+	5	14.70	8.60	+
6	26.44	28.04	+	6	11.70	10.70	+	6	10.30	5.00	+
7	30.69	25.19	+	7	6.80	7.00	–	7	14.00	10.60	+
8	14.93	10.93	+	8	6.50	5.70	–	8	17.30	15.20	–
9	23.75	21.08	+	9	9.60	7.90	+	9	10.28	7.83	+
10	13.93	13.83	–	10	12.80	9.60	+	10	7.37	12.23	ПР
11	14.60	13.10	–	11	10.85	9.20	+	11	8.92	9.61	+
12	16.62	17.52	+	12	17.10	19.20	–	12	7.90	6.20	+
13	19.95	32.51	ПР								
14	12.94	6.14	+								
15	12.25	7.65	+								

Примечание. «+» – РАО, «–» – нет РАО, «ПР» – повышение радиочувствительности.

когортах (1.61 у молодых, 1.65 у возрастных и 1.64 в группе с СВИД), то есть по этому критерию не было выявлено зависимости от возраста и наличия иммунодефицитного состояния.

В группах волонтеров с СВИД и молодых здоровых наблюдали по одному человеку с проявлением повышенной радиочувствительности, в группе возрастных такой эффект не наблюдался. Следует отметить, что в каждой группе были индивидуумы, у которых не было изменений в реакции клеток при облучении по схеме РАО. Доля таких людей была наиболее выражена в группе возрастных здоровых доноров и составляла 25%, в группе молодых – 13.4%, в группе с СВИД – 8.3%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании спонтанного уровня цитогенетических повреждений в культивируемых лимфоцитах человека в нашей работе было показано, что среднее значение спонтанного уровня цитогенетических повреждений в группе больных с СВИД в 2.6 раза превышало таковое в группе молодых и в 2.4 раза – в группе возрастных волонтеров. Кроме повышенного спонтанного уровня микроядер между пациентами с СВИД наблюдалась значительная вариабельность значений по сравнению с когортой здоровых доноров, что свидетельствует о накоплении спонтанных генетических нарушений, которые могут быть

обусловлены хроническим заболеванием или наличием воспалительных процессов, что характерно для людей с СВИД. Выявленный уровень спонтанных повреждений у этих пациентов сравним с повышенным уровнем микроядер в ЦБДЛ сотрудников атомной промышленности, получивших в результате хронического облучения дозу порядка 20 сГр и у медицинских сотрудников, работающих в рентгеновских кабинетах и с диагностическими радионуклидами [23, 24]. Повышенные спонтанные уровни микроядер в ЦБДЛ были выявлены также у больных сахарным диабетом, заболеванием щитовидной железы и раком [25, 26]. В большом многолетнем межлабораторном исследовании 7000 индивидуальных значений спонтанного уровня микроядер в ЦБДЛ было показано, что для условно здоровых людей разного возраста значения находятся в диапазоне 1–6% [13]. В этом и других исследованиях с использованием метода подсчета хромосомных aberrаций не удалось доказать связь роста спонтанного уровня повреждений в лимфоцитах с возрастом человека, курением [27] или проживанием в неблагоприятных экологических условиях [11], но отмечается четкая связь повышенного спонтанного уровня микроядер в ЦБДЛ у пациентов с риском индукции онкологических заболеваний [13, 28, 29]. В настоящее время по мере накопления индивидуальных данных по спонтанному уровню микроядер в лимфоцитах человека происходит переоценка представлений о причинах роста генетических повреждений в различных тканях организма с возрастом, и многие исследователи связывают эти изменения не с естественным старением, а с развитием воспалительных или других заболеваний.

Облучение низкими дозами рентгеновского излучения моделирует чувствительность индивидуумов при уровнях радиационных нагрузок, связанных с загрязнением окружающей среды, профессиональной деятельностью, а также при КТ-сканировании, маммографии [30] и других рентгеновских обследованиях, применение которых в диагностике выросло многократно в течение последнего десятилетия [31]. В нашем исследовании показано, что если средняя радиочувствительность лимфоцитов к дозе 10 сГр у пациентов с СВИД не отличалась от таковой у здоровых доноров обоих возрастов, то медианные значения в контрольных группах были близки и составляли 1.6 и 1.4, а в группе иммунодефицитных доноров это значение было выше в два раза. Ранее нами [20, 32] и другими исследователями [33] при изучении дозовых зависимостей при действии острого и хронического гамма-излучения было показано, что при облучении лимфоцитов здоровых доноров в диапазоне доз 0–40 сГр, наблюдается индуцированная гиперчувствительность по сравнению с ожидаемой при экстраполяции эффек-

тов, полученных при высоких дозах. Можно предположить, что у пациентов с СВИД в этом диапазоне доз также наблюдается индуцированная гиперчувствительность.

В связи с развитием подходов к разработке персонализированной медицины, поисков адекватных и чувствительных биомаркеров, принципов отбора персонала для работы в условиях повышенного радиационного риска в последние десятилетия проблема определения индивидуальной радиочувствительности становится все более актуальной. В большинстве работ, посвященных этой теме, используются дозы 1–2 Гр, которые соответствуют третьему участку нелинейных дозовых зависимостей, полученных для этого объекта с помощью различных маркеров повреждения хромосом и характеризуют клеточный ответ, который определяется в основном участием стресс-индуцированных систем репарации ДНК. Нами было выявлено, что в радиочувствительности лимфоцитов при облучении в дозе 2 Гр достоверных отличий между исследуемыми группами нет. Следует только отметить, что в группе здоровых молодых волонтеров наблюдалась наиболее выраженная межиндивидуальная вариабельность по сравнению с возрастными группами. Анализ полученных данных показал также, что отсутствует корреляция между спонтанным уровнем микроядер в ЦБДЛ и радиочувствительностью индивидуумов во всех группах. Уровень цитогенетических повреждений, вызванный окислительным стрессом при облучении рентгеновским излучением в дозе 2 Гр, примерно в 10 раз превышает спонтанный уровень цитогенетических повреждений, и поскольку периферические лимфоциты распределены по всему телу и находятся в постоянной циркуляции, то исследуемый биомаркер демонстрирует степень повреждения наиболее чувствительных клеток нормальной ткани при дозе, равной однократной фракции облучения при радиотерапии опухолей. Полученные нами показатели также сопоставимы с уровнями хромосомных повреждений, которые наблюдаются в крови больных такими заболеваниями как сахарный диабет и щитовидной железы, являющиеся индукторами постоянного окислительного стресса [34].

В работе [35] было показано, что радиочувствительность лимфоцитов человека, определенная с помощью микроядерного теста в ЦБДЛ, при облучении *in vivo* и *in vitro* до 3 Гр совпадает, что позволяет рассматривать облучение цельной крови *in vitro* в дозе 2 Гр как адекватную тест-систему для определения индивидуальной радиочувствительности. Полученные при облучении в дозе 2 Гр данные индивидуальной и средней радиочувствительности отражают генетическую нестабильность клеток иммунной системы на острый окислительный стресс, что является результатом

активации и взаимодействия антиоксидантных и репарационных систем организма, что в конечном счете определяет защиту организма от неблагоприятных факторов. В исследованиях радиочувствительности людей, работающих или живущих в условиях повышенного радиационного фона, пациентов, страдающих различными патологиями, было показано снижение, повышение радиочувствительности или отсутствие изменений по сравнению с контролем, а также высокая вариабельность индивидуальных значений [36, 37]. Авторы отмечают, что данные о корреляции спонтанного уровня цитогенетических повреждений с радиочувствительностью лимфоцитов *in vitro* также противоречивы и связывают выявленные реакции с индивидуальной вариабельностью и сложностью подбора адекватных когорт для сравнения.

За 40 лет со времени введения термина РАО установилось мнение, что этот феномен эволюционно существует у всех организмов, а при исследовании закономерностей его реализации было выявлено участие специфических механизмов репарации, пролиферации и клеточной гибели [4]. Установлено, что условия, необходимые для индукции РАО, зависят от величины адаптирующего и выявляющего воздействий, качества этих агентов, интервала между облучениями, чувствительности объекта к облучению низкими и высокими дозами, метода регистрации повреждений, происходило ли облучение *in vivo* или *in vitro* [3]. В данной работе при облучении цельной крови при сочетанном облучении по схеме РАО нами не было выявлено различий в чувствительности лимфоцитов между группами. При анализе частоты индукции РАО и величины его значения, обнаружено, что средняя величина РАО была также одинакова во всех когортах и равнялась 1.61 у молодых, 1.65 у возрастных и 1.64 в группе с СВИД; таким образом, по этому критерию не было выявлено зависимости от возраста и наличия иммунодефицитного состояния. При этом, в каждой группе были индивидуумы, у которых не было изменений в реакции клеток при облучении по схеме РАО по сравнению с облучением только в дозе 2 Гр. Доля таких людей была наиболее выражена в группе возрастных здоровых доноров и составляла 25%, в группе молодых — 13.4%, в группе с СВИД — 8.3%. При анализе анкет возрастных доноров, у которых не было выявлено изменений радиочувствительности, было установлено, что они более 30 лет работали в области ядерной физики и дозиметрии на ускорителях. Возможно, в результате профессиональной деятельности некоторые из этих волонтеров получили достаточную дозу хронического облучения, что привело к адаптации, и при дополнительном облучении в нашем эксперименте уже не происходило снижения уровня повреждения. Аналогичные наблюде-

ния об отсутствии РАО были показаны при исследовании жителей, проживающих на загрязненных в результате техногенных аварий районах, сотрудиках предприятий атомной промышленности [10, 11, 23]. Известно также, что на индукцию РАО, влияют такие факторы внешней среды, как кратковременная диета, прием антиоксидантных добавок и витаминов [38]. Мы предполагаем, что выявленная разнонаправленная реакция клеток при облучении по схеме РАО может свидетельствовать также об индукции генетической нестабильности, которая может выявиться только в экспериментальных условиях путем дооблучения лимфоцитов в стрессовой нелетальной дозе или по схеме РАО.

Полученные в нашей работе результаты показали, что спонтанный уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах пациентов с СВИД в 2.5 раза выше, чем у здоровых доноров того же возраста. При этом не было выявлено различий в радиочувствительности к низким и средним дозам рентгеновского излучения между исследуемыми группами, а РАО индуцировался с той же частотой в лимфоцитах пациентов с СВИД и в той же степени, как и у здоровых доноров разного возраста. Эти данные могут свидетельствовать о том, что процессы, обуславливающие возникновение и развитие вторичного иммунодефицитного состояния, не затрагивают механизмы, участвующие в формировании РАО, в частности, связанные с индукцией безошибочной репарации повреждений ДНК, которая индуцируется в узком диапазоне низких доз радиации, специфическом для каждого биологического объекта, а также регуляцией апоптоза, который приводит к гибели наиболее поврежденных клеток при облучении более высокими дозами. Использование в нашей работе показателей, которые характеризуют индивидуальную генетическую нестабильность лимфоцитов человека в условиях окислительного уровня стресса разного уровня, на наш взгляд, является полезным для оценки отдаленных последствий иммунодефицитных состояний, а также их вклада в формирование РАО. Таким образом, определение частоты микроядер в ЦБДЛ при облучении цельной крови человека *in vitro* может служить как прогностическим биомаркером состояния пациентов при заболеваниях иммунной системы, так и критерием индивидуальной радиочувствительности, что может быть полезным для персонализации лечения пациентов при радиотерапии.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующей отделением иммунологии БПНЦ РАН д.м.н. Н.И. Косяковой за подбор когорты пациентов, медицинский персонал процедурных

кабинетов БПНЦ РАН и Протвинской городской больницы за взятие образцов, а также сотрудников ИТЭБ РАН и ФИАН РАН, которые участвовали в исследовании в качестве доноров.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01027-22-00.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами медицинской этики, изложенными в Этических принципах медицинских исследований с участием человека Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация 2013) и было одобрено Комиссией по биоэтике и биобезопасности ИТЭБ РАН (№ 36/22). У всех волонтеров было получено информированное согласие на участие в исследовании.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. Olivieri, J. Bodycote, and S. Wolff, *Science*, **223** (4636), 594 (1984).
- И. Н. Когарко, А. В. Аклеев, В. В. Петушкова и др., *Радиация и риск*, **31** (1), 93 (2022).
- И. И. Пелевина, В. В. Петушкова, В. А. Бирюков и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **59** (3), 261 (2019).
- Y. Guéguen, A. Bontemps, and T.G. Ebrahimian, *Cell Mol Life Sci.*, **76** (7), 1255 (2019).
- F. Cortese, D. Klokov, A. Osipov, et al., *Oncotarget*, **9** (18), 14692 (2018).
- F. Rödel, B. Frey, U. Gaipf, et al., *Curr. Med. Chem.*, **19** (12), 1741 (2012).
- V. E. Balakin, S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **374**, 488 (2000).
- S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, G. F. Aptikaeva, et al., *Int. J. Low Radiat.*, **2** (1–2), 1 (2006).
- S. M. J. Mortazavi, T. Ikushima, and H. Mozdarani, *Iran. J. Radiat. Res.*, **1** (1), 55 (2003).
- J. F. Barquinero, L. Barrios, M. R. Caballín, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **67** (2), 187 (1995).
- M. Ghiassi-nejad, S. M. Mortazavi, J. R. Cameron, et al., *Health Phys.*, **82** (1), 87 (2002).
- M. Fenech, W. P. Chang, M. Kirsch-Volders, et al., *Mutat. Res.*, **534** (1–2), 65 (2003).
- S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi, et al., *Carcinogenesis*, **28** (3), 625 (2006).
- J. Hall, P. A. Jeggo, C. West, et al., *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **771**, 59 (2017).
- R. S. Tuano, N. Seth, and J. Chinen, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **127** (6), 617 (2021).
- P. М. Хаитов, *Иммунология* (ГЭОТАР-Медиа, М., 2016).
- K. Lumniczky, N. Impens, G. Armengol, et al., *Environ. Int.*, **149**, 106212 (2021).
- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, *J. Am. Med. Association*, **310** (20), 2191 (2013).
- V. E. Balakin, S. I. Zaichkina, D. Y. Klokov, et al., *Докл. РАН*, **363** (6), 843 (1998).
- S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, G. F. Aptikaeva, et al., *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.*, **2** (3), 213 (2004).
- M. Fenech, *Mutation Res.*, **455** (1–2), 81 (2000).
- А. М. Серебрянный, А. В. Алещенко, В. Я. Готлиб и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **47** (1), 93 (2007).
- M. Gerić, J. Popić, G. Gajski, et al., *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **843**, 46 (2019).
- Z. Siama, M. Zosang-Zuali, A. Vanlalruati, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **95** (6), 697 (2019).
- S. Ban, C. Konomi, M. Iwakawa, et al., *J. Radiat. Res.*, **45** (4), 535 (2004).
- M. G. Andreassi, R. Barale, P. Iozzo, et al., *Mutagenesis*, **26** (1), 77 (2011).
- S. Bonassi, M. Neri, C. Lando, et al., *Mutat. Res.*, **543** (2), 155 (2003).
- S. Bonassi, R. El-Zein, C. Bolognesi, et al., *Mutagenesis*, **26** (1), 93 (2011).
- R. El-Zein, A. Vral, and C. J. Etzel, *Mutagenesis*, **26** (1), 101 (2011).
- J. Depuydt, A. Baert, V. Vandersickel, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **89** (7), 532 (2013).
- M. Khatib, D. M. Walker, R. J. Albertini, et al., *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **820**, 8 (2017).
- S. I. Zaichkina, G. F. Aptikaeva, O. M. Rozanova, et al., *Environ. Health Perspect.*, **105** (Suppl 6), 1441 (1997).
- I. Seth, M. C. Joiner, and J. D. Tucker, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **91** (1), 82 (2015).
- M. Gerić, A. M. Domijan, V. Gluščić, et al., *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **810**, 22 (2016).
- H. W. Gantenberg, K. Wuttke, C. Streffer, et al., *Radiat. Res.*, **128** (3), 276 (1991).
- И. И. Пелевина, А. А. Алещенко, М. М. Антошина и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **47** (6), 658 (2007).
- T. I. Ivanova, V. A. Khorokhorina, N. I. Sychenkova, et al., in *Proc. 3rd Rus. Conf. with international participation "Radiobiological Foundations of Radiation Therapy"* (2019), pp. 66–68.
- S. S. Sorokina, S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, et al., *Biophysics*, **61** (1), 144 (2016).

## **A Study on the Radiosensitivity and Induction of Adaptive Response in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Secondary Immunodeficiency Syndrome**

**O.M. Rozanova\*, E.N. Smirnova\*, T.A. Belyakova\*\*, and N.S. Strelnikova\*\***

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

*\*\*Branch "Physical-Technical Center" of P.N. Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,  
ul. Mira 1H, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

This study examined radiosensitivity at low and high dose exposure to X-rays in human lymphocytes and the ability of low and high dose radiation to induce radioadaptive response when the peripheral blood cells from patients with secondary immune deficiency syndrome and healthy donors of different ages were irradiated *in vitro*. The frequency of micronuclei in cytochalasin-blocked binuclear lymphocytes in culture served as an indication of cytogenetic damage. It was found that the spontaneous level of cytogenetic damage in blood lymphocytes of patients with secondary immune deficiency syndrome was 2.5 times greater than that of healthy young and older volunteers and there was also a substantial interindividual variability in outcome parameters as compared to the data of control groups. There were no differences in mean values for radiosensitivity at low and high dose exposure of X-rays between the groups. In all groups, no correlation was shown between the spontaneous level of micronuclei in lymphocytes and the radiosensitivity of individuals. The adaptive response was induced with the same frequency and to the same extent in lymphocytes in patients with secondary immune deficiency syndrome and in healthy donors of different ages.

*Keywords: radioadaptive response, human lymphocytes, micronuclei, ionizing radiation*

## ВЛИЯНИЕ ТАКСИФОЛИНА, КОНЪЮГАТА ТАКСИФОЛИНА С ГЛИОКСАЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ И НАРИНГЕНИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

© 2023 г. В.С. Шубина\*, #, М. И. Кобякова\*, Ю.В. Шаталин\*

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

#E-mail: shubinavictoria@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.08.2023 г.

После доработки 28.08.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Целью работы являлось изучение влияния таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксалево́й кислотой и нарингенина на фагоцитоз латексных частиц нейтрофилами и адгезивные свойства данных клеток. Было показано, что таксифолин не влияет на фагоцитарную активность и адгезивные свойства нейтрофилов. Конъюгат таксифолина с глиоксалево́й кислотой значительно ингибирует фагоцитарную активность нейтрофилов. В то же время, конъюгат значительно усиливает адгезию данных клеток. Нарингенин снижает фагоцитарную активность нейтрофилов, однако, в меньшей степени, чем конъюгат. Нарингенин также ингибирует адгезию нейтрофилов. Полученные данные свидетельствуют о том, что полифенолы могут влиять на функциональную активность нейтрофилов, что может играть важную роль в модуляции воспалительного процесса, в частности когда пролонгированная активация нейтрофилов приводит к повреждению клеток и тканей собственного организма.

*Ключевые слова:* фагоцитоз, адгезия, нейтрофилы, полифенолы.

DOI: 10.31857/S0006302923050149, EDN: PNNMYB

Нейтрофилы являются наиболее многочисленной фракцией лейкоцитов, циркулирующих в кровеносном русле. Данные клетки одними из первых направляются к очагам инфекции и воспаления, где ликвидируют внедрившиеся патогены и иницируют и поддерживают воспалительный процесс. Для этих целей нейтрофилы используют различные эффекторные функции. В частности, нейтрофилы фагоцитируют патогены и клеточный дебрис, продуцируют активные формы кислорода (АФК), как снаружи клетки, так и внутри фагосом, высвобождают, так называемые внеклеточные ловушки, или NET (neutrophil extracellular traps) [1,2]. Хотя данные функции нейтрофилов важны для эффективной защиты организма от патогенов, пролонгированная активация данных клеток играет важную роль в патогенезе ряда воспалительных и аутоиммунных заболеваний [3, 4]. Например, известно, что избы-

точная продукция АФК нейтрофилами может приводить к повреждению клеток и тканей собственного организма, способствовать хронизации воспаления [2–4]. Избыточное образование NET также является фактором, провоцирующим развитие ряда заболеваний [1, 5].

Полифенолы относят к эффективным антиоксидантам, способным ингибировать образование АФК нейтрофилами как снаружи, так и внутри клетки [6, 7]. Тем не менее, мало что известно об их способности влиять на другие функции нейтрофилов, такие как фагоцитоз и NETоз. Ранее высказывалось предположение, согласно которому соединения, способные ингибировать АФК, способны ингибировать и образование NET, зависимое от АФК [8]. В пользу данного предположения свидетельствуют некоторые данные, представленные в литературе [8–10]. В частности, было показано, что эпикатехин, катехин, рутин, ресвератрол и кверцетин, проявляющие высокую антиоксидантную активность, способны ингибировать АФК-зависимое образование NET, индуцированное форбол-12-миристан-13-ацетатом [8–10]. С другой стороны, образование NET, вызванное отдельными стимулами, может быть не-

*Сокращения:* АФК – активные формы кислорода, NET – внеклеточные ловушки нейтрофилов (neutrophil extracellular traps), DfTf – конъюгат таксифолина с глиоксалево́й кислотой, кальцеин-АМ – кальцеин-ацетоксиметилловый эфир.

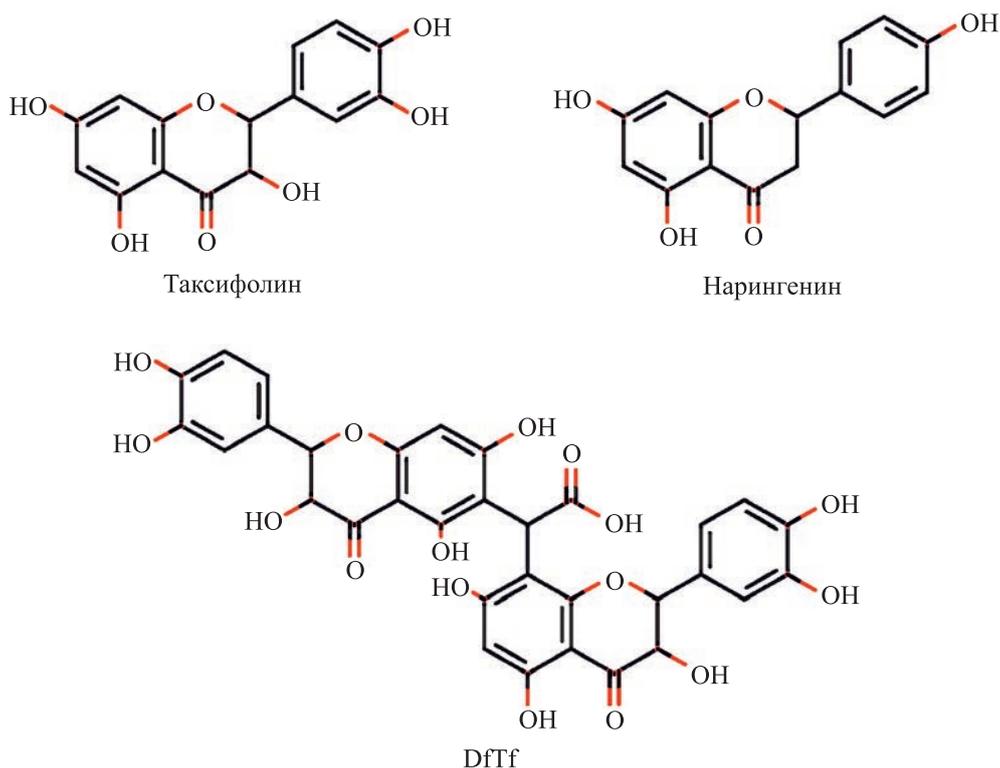


Рис. 1. Структуры исследуемых полифенолов. Конъюгат таксифолина с глиоксальной кислотой обозначен как DfTf.

зависимым от АФК [11]. Так, образование NET, индуцированное латексными шариками, опсонизированными IgG, происходило в присутствии дифенилениодоний хлорида, сильного ингибитора NADPH-оксидазы, полностью останавливающего HEToz, индуцированный форбол-12-мири-стат-13-ацетатом [11]. Таким образом, вопрос о том каково влияние полифенолов на АФК-независимый HEToz, остается открытым. Еще меньше известно о влиянии полифенолов на фагоцитарную активность нейтрофилов. Отдельные данные, встречающиеся в литературе, получены на клеточных линиях и, в целом, свидетельствуют в пользу того, что полифенолы могут оказывать как усиливающее, так и ингибирующее действие на фагоцитарную активность клеток, которое, по всей видимости, зависит от структуры данных соединений [12, 13]. Другим открытым вопросом остается влияние полифенолов на адгезивные свойства нейтрофилов. Как известно, благодаря адгезивным свойствам возможна миграция нейтрофилов из кровеносного русла к очагу воспаления и их надлежащее функционирование [14]. С другой стороны, чрезмерная адгезия нейтрофилов может приводить к повреждению собственных клеток и тканей [15].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксальной кислотой (DfTf) и нарингенина на

фагоцитарную активность и адгезивные свойства нейтрофилов (рис. 1). Таксифолин и нарингенин представляют собой природные полифенолы, присутствующие в продуктах питания и напитках, среди которых цитрусовые и их соки, ликеры, вино и др. [16–18]. Данные соединения проявляют разнообразные биологические свойства, включая антиоксидантные, противовоспалительные и противомикробные свойства [19–22]. DfTf является продуктом конденсации таксифолина и глиоксальной кислоты и, предположительно, формируется в процессе хранения, обработки и переваривания продуктов питания и напитков, содержащих данные соединения. О формировании продуктов конденсации флавоноидов с реактивными карбонильными соединениями в продуктах питания и *in vivo* уже сообщалось в литературе [23, 24]. Глиоксальная кислота формируется в вине, где, как известно, она реагирует с катехинами, приводя к образованию пигментов катиона ксантилиа (xanthylum cation pigments). Довольно вероятно, что DfTf наряду с другими продуктами конденсации таксифолина также формируется в процессе выдержки и хранения вина. Снижение уровня таксифолина в вине со временем [18] также свидетельствует в пользу данного предположения.

Хотя реакции полифенолов с реактивными карбонильными соединениями протекают в про-

цессе хранения, старения, обработки и переваривания продуктов питания и напитков, богатых полифенолами, свойства таких продуктов и влияние данных реакций на свойства полифенольной фракции остаются мало изученными. Действие образующихся продуктов на клетки также остается в значительной степени неизвестными. В связи с вышесказанным исследование влияния DfTf на функциональную активность нейтрофилов представляет собой отдельный интерес.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Синтез конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой.** Синтез осуществляли по методике, описанной ранее [25]. Кратко: 148 мг глиоксалевой кислоты и 20 мкл концентрированной соляной кислоты были добавлены к 608 мг таксифолина, растворенного в 5 мл тетрагидрофурана. Смесь нагревали при постоянном перемешивании с обратным холодильником в течение 2 ч. Продукт конденсации выделяли в виде натриевой соли добавлением к смеси раствора гидроксида натрия в этаноле. Продукт отмывали холодным спиртом и высушивали под вакуумом.

**Выделение нейтрофилов.** Нейтрофилы выделяли из цельной крови крыс-самцов линии Wistar методом лизиса эритроцитов с последующим центрифугированием на градиенте плотности фикал–верографин (1.077/1.119) [26, 27]. Кратко: к гепаринизированной крови добавляли двукратный объем холодной (4°C) дистиллированной воды и перемешивали в течении 20 с. После этого быстро восстанавливали осмотическую среду добавлением двукратного раствора фосфатно-солевого буфера. Далее суспензию клеток центрифугировали при 180 g в течение 5 мин при 4°C. Осадок отмывали раствором фосфатно-солевого буфера. Полученную фракцию, обогащенную лейкоцитами, наслаивали на градиент фикал–верографин (1.077/1.119) и центрифугировали в течение 15 мин при 180 g при 4°C. Фракцию, расположенную на границе раздела фикал–верографин (1.077/1.119), собирали и дважды отмывали раствором фосфатно-солевого буфера. Далее клетки ресуспендировали в растворе Хенкса (pH 7.2) ( $10^6$  клеток/мл). Содержание нейтрофилов во фракции составляло не менее 96%.

**Оценка фагоцитарной активности.** Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали методом флуоресцентной микроскопии. Для этих целей использовали латексные частицы, обладающие желто-зеленой флуоресценцией (L4530, Sigma, США), и латексные частицы, обладающие красной флуоресценцией (L3030, Sigma, США). Средний размер частиц – 2 мкм. Частицы предварительно опсонизировали иммуноглобулином IgG (I8015, Sigma, США) в течение одного часа, после

чего трижды отмывали раствором Хенкса. Исследование проводили в 96-луночных планшетах (SPL 30096, Южная Корея) следующим образом. В лунки, содержащие 100 мкл суспензии нейтрофилов в растворе Хенкса (500 тыс. кл./мл) и эмбриональную бычью сыворотку (10%), добавляли полифенолы, конечная концентрация которых составляла 100 мкМ. Затем планшеты помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 30 мин. После этого к нейтрофилам добавляли латексные частицы и инкубировали при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение двух часов. За 30 мин до окончания инкубации клеток с латексными шариками в среду добавляли ядерный краситель Hoechst 33342 (14533, Sigma, США) в концентрации 5 мкг/мл. В отдельных экспериментах, цитоплазму клеток окрашивали кальцеин-ацетоксиметиоловым эфиром (кальцеин-AM) (206700, Sigma, США). После этого клетки однократно отмывали раствором Хенкса и фотографировали с помощью флуоресцентной многопараметрической флуоресцентной станции ImageXpress MicroXL (Molecular Devices, США). Полученные снимки обрабатывали с использованием встроенного программного обеспечения. Долю клеток, вступивших в фагоцитоз, определяли как отношение числа клеток, вступивших в фагоцитоз, к общему числу клеток. Среднее число частиц, поглощенных клеткой, определяли как отношение общего числа поглощенных частиц к числу клеток, вступивших в фагоцитоз.

**Оценка адгезивных свойств нейтрофилов.** После съемки клеток с помощью флуоресцентной многопараметрической флуоресцентной станции ImageXpress MicroXL клетки инкубировали с 0.25%-м раствором трипсин-ЭДТА в течение 20 мин. Затем клетки двукратно отмывали раствором Хенкса и оценивали общее число клеток, присутствующих в лунках, с помощью 96-луночного микропланшетного ридера Infinite F200 (Tecan, Австрия). Измерения проводили при  $\lambda_{ex} = 360$  нм,  $\lambda_{em} = 465$  нм, что позволяет регистрировать флуоресценцию, соответствующую ядерному красителю Hoechst 33342. За 100% принимали флуоресценцию нейтрофилов, не подвергавшихся каким-либо воздействиям. Количество адгезированных нейтрофилов выражали в процентах от исходного числа клеток.

**Статистический анализ.** Все эксперименты были выполнены трижды, в трех повторностях. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Сравнение средних значений проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением с помощью Тьюки теста. Для расчетов применяли статистический программный пакет GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., США). Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки фагоцитарной активности нейтрофилы инкубировали с латексными частицами L4530 (желто-зеленая флуоресценция), опсонизированными IgG, в отсутствие (контроль) и в присутствии полифенолов (100 мкМ) в течение двух часов. Было показано, что таксифолин достоверно не влияет на фагоцитарную активность нейтрофилов, тогда как конъюгат DfTf значительно снижает ее (рис. 2). В присутствии DfTf снижается доля клеток, вступивших в фагоцитоз, и среднее число частиц, поглощенных клеткой, на 64% и 39% соответственно (рис. 2д,е). Установлено, что другой исследуемый флавоноид, нарингенин, также снижает фагоцитарную активность нейтрофилов, однако в меньшей степени, чем DfTf. В присутствии нарингенина доля клеток, вступивших в фагоцитоз, снижалась приблизительно на 25%, как и среднее число частиц, поглощенных клеткой (рис. 2д,е).

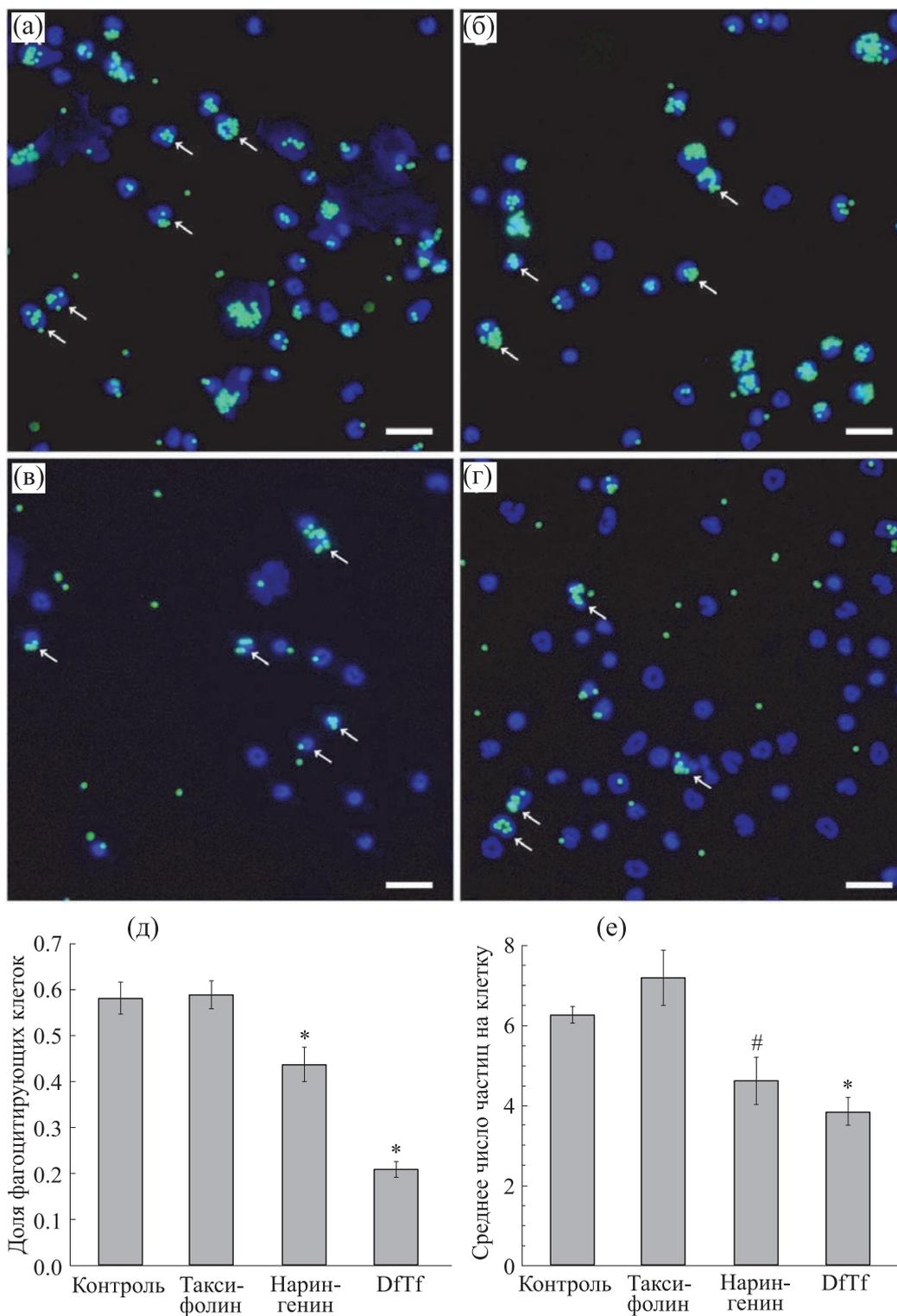
Важно отметить, что в процессе инкубации клеток с латексными шариками, опсонизированными IgG, наблюдалось формирование структур, напоминающих сеть. Данные структуры окрашивались ядерным красителем Hoechst 33342 и, предположительно, представляли собой NET (рис. 3). Как уже упоминалось, о формировании NET нейтрофилами человека в присутствии латексных шариков, опсонизированных IgG и компонентом, ранее сообщалось в литературе [11]. Интересно, что добавление в среду кальцеина-АМ приводило к дополнительному окрашиванию данных структур, что также хорошо согласуется с литературными данными, согласно которым NET окрашиваются таким красителем как Fluo-3 АМ [28]. Как известно, оба эти красителя проявляют флуоресценцию в присутствии ионов кальция после отщепления эфирной группы внутриклеточными эстеразами. Окрашивание формирующейся сети данными красителями, вероятно, говорит о том, что кальций-содержащие структуры входят в ее состав или солокализуются с ней. Примечательно, что митохондрии, являющиеся внутриклеточным кальциевым депо, также вовлечены в НЕТОз. Митохондриальная ДНК была обнаружена ассоциированной с ядерной ДНК в составе NET [29, 30]. Однако механизмы, лежащие в основе такой ассоциации, остаются невыясненными [29, 30]. Можно предположить, что митохондрии могут быть вовлечены в формирование структур, окрашиваемых вышеупомянутыми красителями. С другой стороны, нельзя исключать вклад в образование данных структур других органелл или компонентов клетки. Например, обширная вакуолизация эндоплазматического ретикулума, другого депо кальция в клетке, наблюдалась на ранних стадиях НЕТОза, вызванного иономицином и липополисахаридом

[30], предполагая вовлечение эндоплазматического ретикулума в данный процесс. Таким образом, природа окрашиваемых кальцеином-АМ структур, а также механизмы формирования NET остаются неясными на сегодняшний день и требуют дальнейшего изучения.

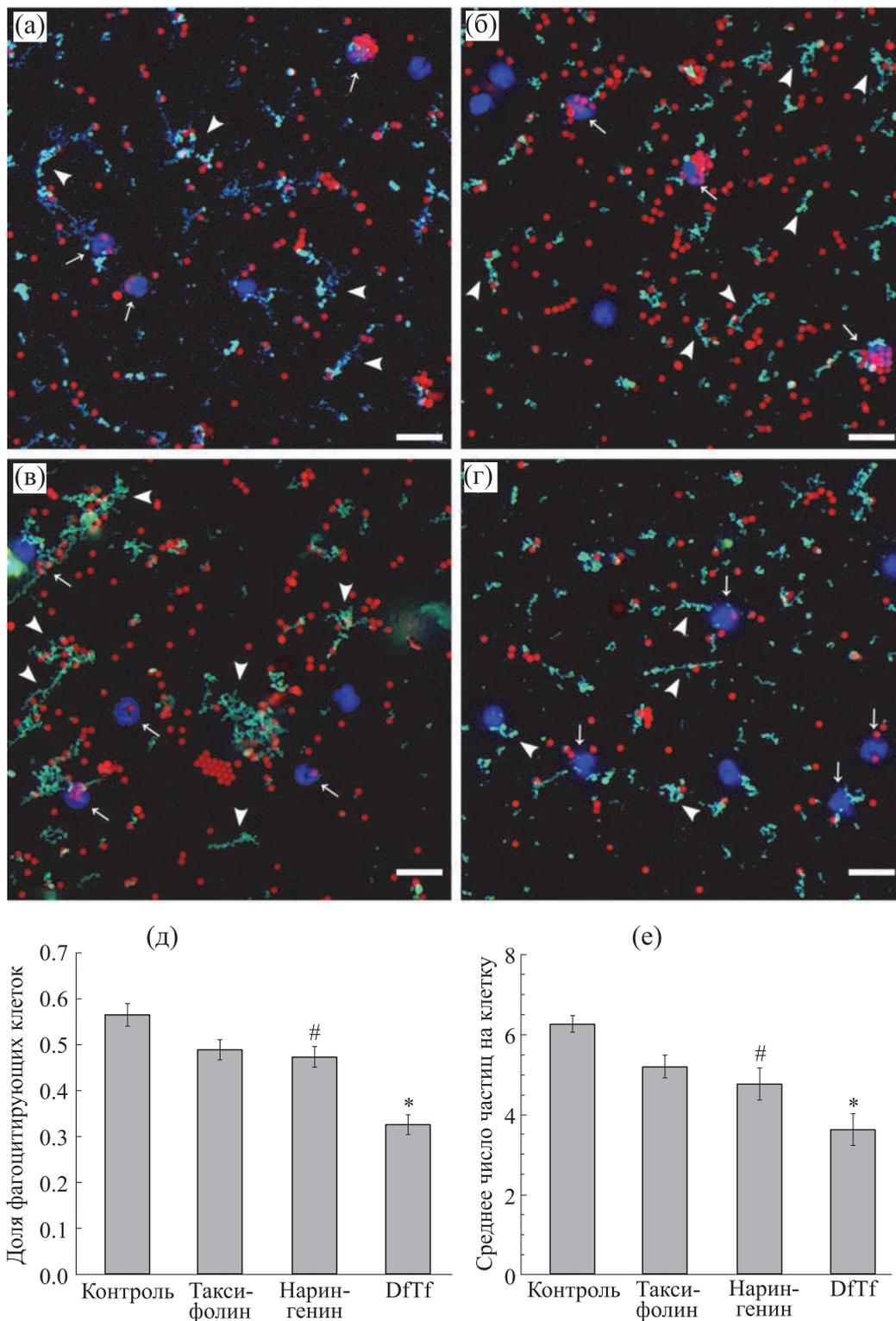
На рис. 3 приведены флуоресцентные микрофотографии нейтрофилов спустя два часа инкубации с латексными частицами L3030 (красная флуоресценция), опсонизированными IgG, в отсутствие (контроль) и в присутствии полифенолов (100 мкМ). Видно, что во всех образцах наблюдается формирование структур, напоминающих сеть. Наиболее выраженное образование данных структур наблюдается в контроле и в присутствии нарингенина. Для сравнения на рис. 3 также приведены данные о влиянии исследуемых полифенолов на фагоцитоз латексных частиц L3030 (красная флуоресценция) нейтрофилами.

В рамках данной работы также было установлено, что исследуемые полифенолы по разному влияют на адгезивные свойства нейтрофилов (рис. 4). Так, DfTf, несмотря на его ингибирующее влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов, усиливал адгезию данных клеток к поверхности пластика, тогда как нарингенин ингибировал ее. Влияния таксифолина на адгезивные свойства нейтрофилов в условиях эксперимента выявлено не было (рис. 4).

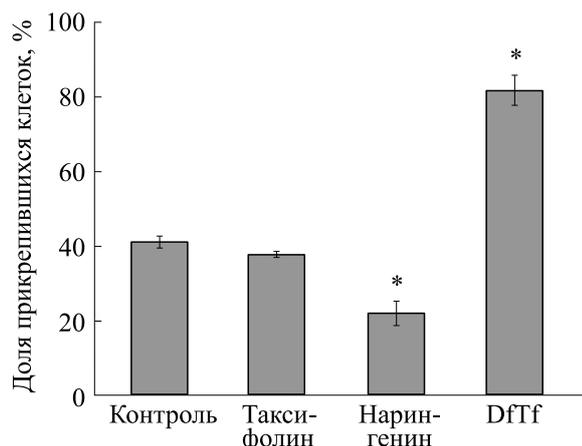
Таким образом, полученные данные указывают на то, что таксифолин, способный эффективно ингибировать продукцию АФК нейтрофилами в ответ на различные стимулы [6, 7], не оказывает достоверного влияния на фагоцитарную активность и адгезию данных клеток. В то же время его структурный аналог нарингенин, проявляющий меньшую антиоксидантную активность [6, 7], оказывает ингибирующее действие на фагоцитоз и адгезию нейтрофилов. Это позволяет говорить о том, что влияние данных структурно близких соединений на различные функции нейтрофилов существенно отличается. При этом наблюдаемые ингибиторные эффекты указывают на противовоспалительный потенциал обоих соединений. DfTf ингибирует фагоцитоз, но усиливает адгезию нейтрофилов к пластику в присутствии латексных частиц, опсонизированных IgG, что свидетельствует о модуляции функционального ответа нейтрофилов на внедрившийся патоген. Как известно, адгезивные свойства нейтрофилов играют ключевую роль в функционировании данных клеток [14]. В частности, адгезия нейтрофилов сопряжена с секрецией различных цитокинов, способствующих инфильтрации ткани макрофагами, поддержанию воспалительного процесса [31, 32], а также активации фибробластоподобных клеток, участвующих в процессе регенерации ткани [33]. С другой



**Рис. 2.** Влияние исследуемых полифенолов на фагоцитоз латексных частиц L4530 (желто-зеленая флуоресценция) нейтрофилами. (а–г) Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии нейтрофилов в контроле (а), а также в присутствии таксифолина (б), конъюгата таксифолина с гликоксалевой кислотой (в) и нарингенина (г). Стрелками указаны отдельные клетки, вступившие в фагоцитоз. Масштабный отрезок 25 мкм. (д–е) Показатели фагоцитоза в контроле и в присутствии исследуемых полифенолов: доля клеток, вступивших в фагоцитоз (д), среднее число частиц, поглощенных клеткой (е). \* Достоверные различия по сравнению с контролем,  $p < 0.001$ ; # Достоверные различия по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Влияние исследуемых полифенолов на фагоцитоз латексных частиц L3030 (красная флуоресценция) нейтрофилами. (а–г) Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии нейтрофилов в контроле (а), а также в присутствии таксифолина (б), конъюгата таксифолина с гликозальной кислотой (в), и нарингенина (г). Стрелками указаны отдельные клетки, вступившие в фагоцитоз. Головками стрелок указаны структуры, окрашиваемые Hoechst 33342 и кальцеином-АМ. Масштабный отрезок 25 мкм. (д–е) Показатели фагоцитоза в контроле и в присутствии исследуемых полифенолов: доля клеток, вступивших в фагоцитоз (д), среднее число частиц, поглощенных клеткой (е). \* Достоверные различия по сравнению с контролем,  $p < 0.001$ ; # Достоверные различия по сравнению с контролем,  $p < 0.005$ .



**Рис. 4.** Влияние исследуемых полифенолов на адгезивные свойства нейтрофилов. \* Достоверные различия по сравнению с контролем,  $p < 0.001$ .

стороны, нейтрофилы, вносят свой вклад и в завершение воспаления, при этом их способность к адгезии также играет важную роль [32]. Принимая во внимание вышесказанное, мы полагаем, что DfTf может представлять интерес в качестве компонента новых ранозаживляющих материалов.

Важно также отметить следующее. В рамках данной работы мы впервые показали, что конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой и исходный флавоноид, таксифолин, по разному влияют на фагоцитоз и адгезию нейтрофилов. Ранее мы обнаружили, что DfTf проявляет большую улавливающую активность по отношению к пероксиду водорода, чем таксифолин [25, 34]. В то же время DfTf и таксифолин оказывали сопоставимое антиоксидантное действие в бифазной системе [34]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что свойства и биологическая активность полифенольной фракции могут существенно меняться, когда протекают реакции конденсации полифенолов с реактивными карбонильными соединениями.

В целом полученные данные указывают на то, что полифенолы способны модулировать функциональную активность нейтрофилов, что может играть важную роль в разрешении воспалительного процесса, в частности когда пролонгированная активация нейтрофилов приводит к повреждению клеток и тканей собственного организма.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН. Авторы благодарны В.Г. Заикину (ЗАО «НПФ «Флавит») за любезно предоставленный таксифолин.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00149).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с подопытными животными проводились в соответствии с международными правилами обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU) и были одобрены Комитетом по этике ИТЭБ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. В. Воробьева, Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология, **75** (4), 210 (2020).
2. М. А. Челомбитько, Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология, **73** (4), 242 (2018).
3. M. Laforge, C. Elbim, C. Frère, et al., Nat. Rev. Immunol. **20** (9), 515 (2020).
4. A. Herrero-Cervera, O. Soehnlein, E. Kenne, Cell. Mol. Immunol., **19** (2), 177 (2022).
5. V. Papayannopoulos, Nat. Rev. Immunol., **18** (2), 134 (2018).
6. D. Ribeiro, M. Freitas, S. M. Tomé, et al., Eur. J. Med. Chem., **67**, 280 (2013).
7. D. Ribeiro, E. Fernandes, and M. Freitas, In *Flavonoids as Modulators of Neutrophils' Oxidative Burst: Structure-Activity Relationship. Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (Acad. Press, 2018), Chapter 20.
8. T. Kirchner, E. Hermann, S. Möller, et al., Mediators Inflamm., **2013**, 710239 (2013).
9. M. M. de Souza Andrade, V. N. C. Leal, I. G. Fernandes, et al., Antioxidants (Basel), **11** (9), 1690 (2022).
10. G. S. Pereira, I. Percebom, S. Mendes, et al., Braz. J. Biol., **84**, e252936 (2022).
11. M. Saffarzadeh, H. A. Cabrera-Fuentes, F. Veit, et al., Discoveries (Craiova), **2** (2), e19 (2014).
12. M. Monobe, K. Ema, Y. Tokuda, et al., Cytotechnology, **62** (3), 201 (2010).
13. S. Cui, J. Qian, P. Bo, J. Tradit. Chin. Med., **33** (6), 804 (2013).
14. G. Berton, S. R. Yan, L. Fumagalli, et al., Int. J. Clin. Lab. Res., **26** (3), 160 (1996).
15. А.А. Галкин и В.С. Демидова, Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б.М. Костюченка, **2** (2), 25 (2015).
16. R. Cannataro, A. Fazio, C. La Torre, et al., Antioxidants (Basel), **10** (2), 328 (2021).
17. A. Rødtjer, L. Skibsted, and M. L. Andersen. Eur. Food Res. Technol., **223**, 663 (2006).
18. B.F. de Simón, M. Sanz, E. Cadahía, et al., Food Chem., **143**, 66 (2014).
19. J. Cai, H. Wen, H. Zhou, et al., Biomed. Pharmacother., **164**, 114990 (2023).
20. Y. Liu, X. Shi, Y. Tian, et al., Front. Pharmacol., **14**, 1173855 (2023).
21. A. Duda-Madej, J. Stecko, J. Sobieraj, et al., Antibiotics (Basel), **11** (11), 1628 (2022).

22. D. Yang, R. Zhu, H.-X. Xu, et al., *Food Bioscience*, **53**, 102811 (2023).
23. M. Chen, H. Zhou, C. Huang, et al., *Food Chem.*, **377**, 132008 (2022).
24. M. Chen, P. Liu, H. Zhou, et al., *Front. Nutr.*, **9**, 973048 (2022).
25. V. S. Shubina and Yu. V. Shatalin, *J. Food Sci. Technol.*, **54** (6), 1467 (2017).
26. M.T. Quinn and F.R. DeLeo, *Neutrophil: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, 2087* (Springer, 2020).
27. N. Beloborodova, I. Bairamov, A. Olenin, et al., *J. Biomed. Sci.*, **19** (1), 89 (2012).
28. A. K. Gupta, S. Giaglis, P. Hasler, et al., *PLoS One*, **9** (5), e97088 (2014).
29. S. Yousefi, D. Stojkov, N. Germic, et al., *Eur. J. Immunol.*, **49** (2), 221 (2019).
30. H. R. Thiam, S. L. Wong, D. D. Wagner, et al., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **36**, 191 (2020).
31. A. Herrero-Cervera, O. Soehnlein, and E. Kenne, *Cell. Mol. Immunol.*, **19** (2), 177 (2022).
32. Baiula, R. Greco, L. Ferrazzano, et al., *PLoS One*, **15** (8), e0237746 (2020).
33. S. de Oliveira, E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Nat. Rev. Immunol.*, **16** (6), 378 (2016).
34. V. S. Shubina, V. I. Kozina, and Yu. V. Shatalin, *Antioxidants (Basel)*, **10** (8), 1262 (2021).

## **Effect of Taxifolin, a Conjugate of Taxifolin with Glyoxylic Acid, and Naringenin on the Functional Activity of Neutrophils**

**V.S. Shubina, M.I. Kobyakova, and Yu.V. Shatalin**

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

The aim of the present work was to study the effects of taxifolin, a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid, and naringenin on phagocytosis of latex beads by neutrophils and adhesive properties of these cells. It was shown that taxifolin had no effect on the phagocytic activity and adhesive properties of neutrophils. A conjugate of taxifolin with glyoxylic acid strongly inhibited the phagocytic activity of neutrophils. At the same time, the conjugate significantly enhanced adhesion of these cells. Naringenin decreased phagocytic activity of neutrophils, though to a lesser extent than the conjugate did. Naringenin also inhibited adhesion of neutrophils. Thus, the data collected during our study indicate that polyphenols may influence the functional activity of neutrophils that can play an important role in the modulation of inflammation, especially when prolonged activation of neutrophils leads to tissue damage.

*Keywords: phagocytosis, adhesion, neutrophils, polyphenols*

УДК 576.32/.36

## ВЛИЯНИЕ ДИСУЛЬФИДСОДЕРЖАЩЕГО ИММУНОМОДУЛЯТОРА МОЛИКСАНА НА ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

© 2023 г. А.В. Мельницкая\*., З.И. Крутецкая\*, В.Г. Антонов\*\*, Н.И. Крутецкая\*

\*Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

\*\*Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,  
Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, 194100, Россия

#E-mail: a.melnitskaya@spbu.ru

Поступила в редакцию 29.12.2022 г.

После доработки 29.12.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Рассматривается влияние фармакологического аналога окисленного глутатиона — дисульфидсодержащего иммуномодулятора моликсана на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. С использованием метода фиксации потенциала впервые показано, что моликсан модулирует транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. Обнаружено, что приложение моликсана со стороны апикальной поверхности кожи подавляет транспорт  $\text{Na}^+$ , тогда как при добавлении со стороны базолатеральной поверхности моликсан имитирует действие инсулина и стимулирует транспорт  $\text{Na}^+$ . Результаты свидетельствуют о том, что окисленный глутатион и его фармакологические аналоги моликсан и глутоксим однонаправленно модулируют транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

*Ключевые слова:* моликсан, GSSG, транспорт  $\text{Na}^+$ , эпителий кожи лягушки.

DOI: 10.31857/S0006302923050150, EDN: PHJODD

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Для практической медицины большой интерес имеет изучение транспорта ионов в почке, являющейся уникальным органом по разнообразию, интенсивности и избирательности транспортных процессов, а также по многообразию механизмов их селективного регулирования. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевого пузыря амфибий. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов трансэпителиального транспорта воды и ионов в клетках почки [1].

Транспорт  $\text{Na}^+$  в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпо-

нентную систему, в работе которой принимают участие различные  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса. В реабсорбирующих эпителиях ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  играют амилоридчувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы (ENaC). Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах ENaC, определяют его редокс-чувствительность и являются мишенью для внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов [2, 3]. Внеклеточные фрагменты ENaC содержат CRD1 и CRD2 домены, богатые остатками цистеина, которые являются высококонсервативными среди членов семейства дегнерины/ENaC. Эти внеклеточные остатки цистеина, вероятно, участвуют в образовании дисульфидных связей, важных для правильного фолдинга белка [3] и транслокации каналов к плазмалемме [2, 3]. Трансмембранные сегменты и N- и C-терминальные фрагменты  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц ENaC также содержат остатки цистеина, которые доступны для окисляющих и восстанавливающих агентов со стороны цитозоля [4]. Согласно двухмембранной модели активного

*Сокращения:* ENaC — амилоридчувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы, GSH — восстановленная форма глутатиона, GSSG — окисленная форма глутатиона.

транспорта  $\text{Na}^+$  эпителиальными клетками, предложенной Кефед-Джонсеном и Уссингом,  $\text{Na}^+$  удаляется из клетки при помощи  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, локализованной во внутренней (базолатеральной или серозной) мембране эпителиальных клеток [5].  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, как и другие ион-транспортные системы, чувствительна к действию окисляющих и восстанавливающих агентов [6]. Однако, большая часть данных о редокс-регуляции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы получена для очищенного фермента или ферментного комплекса, экспрессированного в гетерологических системах. В то же время влияние окислителей и восстановителей на транспорт  $\text{Na}^+$  в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки, практически не изучено.

Важнейшую роль в редокс-регулируемых внутриклеточных сигнальных путях играют эндогенные системы глутатиона. Глутатион ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин) существует в клетке в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах и является универсальным тиолсодержащим трипептидом, обнаруженным в большинстве клеток растений, микроорганизмов и млекопитающих. Глутатион предотвращает окисление SH-групп или восстанавливает S-S-связи, индуцирует свободные радикалы, участвует в детоксикации токсических ксенобиотиков (лекарственных веществ, канцерогенов) [7], участвует в активации транскрипции генов, в том числе некоторых антиоксидантных ферментов, а также ингибировании редоксзависимых путей активации апоптоза; входит в систему детоксикации и антиоксидантной защиты, предупреждения и ограничения окислительного стресса [8, 9].

На основе дисульфидсодержащих окисляющих агентов синтезирован и успешно применен в клинической практике целый ряд фармакологических препаратов, которые были объединены в группу тиопозтинов, характеризующихся системным цитопротекторным эффектом [10, 11]. Фармакологические аналоги GSSG глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний. Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания.

Ранее нами было впервые обнаружено, что GSSG и глутоксим модулируют транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки [12]. Обнаружено, что

приложение этих агентов со стороны апикальной поверхности кожи подавляет транспорт  $\text{Na}^+$ , тогда как при добавлении со стороны базолатеральной поверхности кожи GSSG и глутоксим имитируют действие инсулина и стимулируют транспорт  $\text{Na}^+$ . В связи с этим, целью настоящей работы было исследование влияния другого дисульфидсодержащего препарата – моликсана – на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

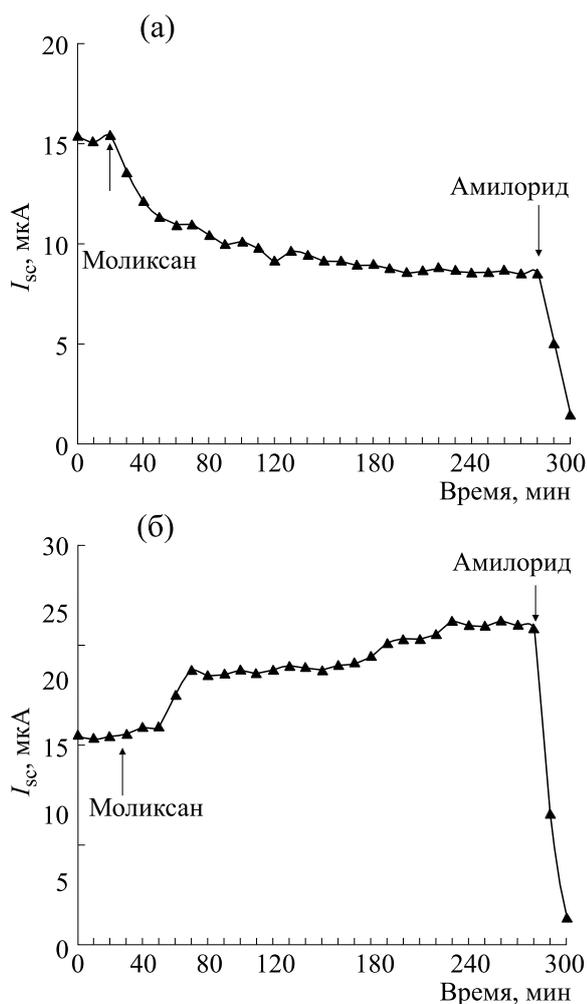
Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга (World Precision Instruments, Inc., Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в mM): 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 *Rana temporaria* использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик. Для измерения вольт-амперных характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал ( $V_T$ ) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи  $V_{OC}$  ( $V_{OC} = V_T$  при трансэпителиальном токе  $I_T = 0$ ). Из вольт-амперных характеристик определяли электрические параметры кожи – ток короткого замыкания  $I_{SC}$  ( $I_{SC} = I_T$  при  $V_T = 0$ ),  $V_{OC}$  и трансэпителиальную проводимость  $g_T$ .

Транспорт  $\text{Na}^+$  оценивали как амилоридчувствительный ток  $I_{SC}$ . В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилоридчувствительных эпителиальных  $\text{Na}^+$ -каналов амилорид (20 мкМ).

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточный раствор амилорида (10 мМ) готовили на воде. Моликсан был предоставлен фирмой «ФАРМА-ВАМ» (Санкт-Петербург). Маточный раствор моликсана (50 мг/мл) 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  $x \pm s_x$ . Достоверными считали различия



**Рис. 1.** Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{SC}$  через кожу лягушки в ответ на приложение фармакологического аналога окисленного глутатиона (GSSG) – дисульфидсодержащего иммуномодулятора моликсана (200 мкг/мл), добавленного со стороны апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи лягушки. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид чувствительных эпителиальных  $Na^+$ -каналов (ENaC) – амилорид (20 мкМ).

при  $p \leq 0.05$ . На рисунках представлены результаты типичных экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (здесь и далее по тексту число опытов  $n = 10$ ) составляют:  $I_{SC} = 14.51 \pm 2.35$  мкА;  $V_{OC} = -27.03 \pm 4.16$  мВ;  $g_T = 0.53 \pm 0.25$  мСм.

Обнаружено, что моликсан модулирует транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. В среднем изменение электрических характеристик кожи лягушки по-

сле добавления 200 мкг/мл моликсана к апикальной поверхности кожи было следующим:  $I_{SC}$  уменьшился на  $30.34 \pm 4.82\%$ ,  $V_{OC}$  уменьшился на  $26.35 \pm 12.24\%$ , а  $g_T$  уменьшилась на  $9.32 \pm 2.74\%$ . В случае обработки моликсаном базолатеральной поверхности кожи лягушки изменение электрических характеристик в среднем было следующим:  $I_{SC}$  увеличился на  $36.46 \pm 5.2\%$ ,  $V_{OC}$  увеличился на  $40.08 \pm 8.34\%$ , а  $g_T$  – на  $8.15 \pm 3.01\%$ . Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние моликсана на транспорт  $Na^+$  различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1а,б) аналогично эффекту GSSG и глутоксима, показанному нами ранее [12].

Обработка апикальной поверхности кожи лягушки моликсаном подавляет транспорт  $Na^+$  (рис. 1а). Наиболее вероятно предположить, что ингибирующее влияние моликсана может быть связано с его способностью взаимодействовать с функционально значимыми остатками цистеина  $Na^+$ -транспортирующих белков, что приводит к ингибированию их активности и подавлению транспорта  $Na^+$ . Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым ENaC и другие  $Na^+$ -транспортирующие белки быстро и обратимо ингибируются агентами, окисляющими SH-группы остатков цистеина [2, 3, 6]. Кроме того, с использованием метода локальной фиксации потенциала на альвеолярных клетках I крысы было показано, что GSSG в микромолярных концентрациях снижает вероятность открытого состояния ENaC, экспрессируемых в апикальных мембранах пневмоцитов, а также приводит к снижению клиренса альвеолярной жидкости в экспериментах *in vivo*. В данном исследовании продемонстрировано также, что сдвиг окислительно-восстановительного потенциала к более окисленному состоянию при добавлении GSSG вызывает обратимое снижение активности ENaC, которое можно устранить с помощью добавление GSH. Более того, за это изменение активности ENaC ответственна прямая обратимая модификация ENaC с помощью GSSG (S-глутатионилирование субъединиц ENaC). В целом эти результаты показывают, что обратимое S-глутатионилирование субъединиц ENaC может играть важную роль в регуляции баланса жидкости в легких [13].

В то же время, моликсан, приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулирует транспорт  $Na^+$  (рис. 1б). Полученные результаты согласуются с данными литературы о способности GSSG и его фармакологических аналогов оказывать рецептор-опосредованное влияние на клеточные процессы. Так, в

клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию (лиганд-независимую активацию) рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [14, 15]. Также нами ранее было показано, что в случае приложения к базолатеральной поверхности кожи лягушки, GSSG и глутоксим действуют как инсулиномиметики и стимулируют трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$  [12]. Можно предположить, что GSSG и его фармакологические аналоги моликсан и глутоксим могут взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами  $\alpha$ -субъединиц инсулинового рецептора, вызывать трансактивацию рецептора и запускать сигнальный каскад, приводящий к активации  $\text{Na}^+$ -транспортирующих белков и стимуляции транспорта  $\text{Na}^+$ .

Известно, что ключевые  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки (ENaC,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ -обменники) содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для действия внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [2–4, 6]. Однако добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта  $\text{Na}^+$ . Можно предположить, что влияние моликсана на транспорт  $\text{Na}^+$  обусловлено в основном модуляцией активности ENaC.

Таким образом, в настоящей работе показано модулирующее влияние моликсана на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что моликсан, GSSG и глутоксим однонаправленно модулируют транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Можно предположить, что влияние этих дисульфидсодержащих окислителей на транспорт  $\text{Na}^+$  опосредовано сходными регуляторными механизмами.

Полученные нами данные о влиянии моликсана, GSSG и глутоксима на трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$  способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов действия этих дисульфидсодержащих окисляющих агентов, широко применяемых в клинической практике в качестве препаратов, обладающих иммуномодулирующим, гемопоэтическим и гепатопротекторным действием, а также для смягчения окислительного стресса и купирования процессов воспаления. Кроме того, обнаружение новых соединений, влияющих на активность ENaC и других  $\text{Na}^+$ -транспортирующих белков, актуально для биомедицинских исследований многих патологических процессов и является предпосылкой для разработки новых фармакологических средств в терапии подобных состояний.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Договоров СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 01/18-НИОКР от 05.03.2018 и № 05/03-20 от 12.03.2020.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных и все манипуляции с ними выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. В. Наточин, *Основы физиологии почки* (Наука, Л., 1982).
2. D. J. Benos and B. A. Stanton, *J. Physiol.*, **520**, 631 (1999).
3. D. Firsov, M. Robert-Nicoud, S. Gruender, et al., *J. Biol. Chem.*, **274**, 2743 (1999).
4. S. Kellenberger, I. Gautschi, Y. Pfister, et al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 7739 (2005).
5. V. Koefoed-Johnsen and H. H. Ussing, *Acta. Physiol. Scand.*, **42**, 298 (1958).
6. A. A. Boldyrev and E. R. Bulygina, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **834**, 666 (1997).
7. J. D. Hayes and L. I. McLellan, *Free Rad. Res.*, **31**, 273 (1999).
8. В. И. Кулинский и Л. С. Колесниченко, *Биомед. химия*, **55** (4), 365 (2009).
9. J. D. Uys, P. J. Mulholland, and D. M. Townsend, *Biomed. Pharmacother.*, **68**, 799 (2014).
10. А. Е. Борисов, Л. А. Козхемьякин, А. Е. Антусевич, et al., *Vestn. Hirurgii im. I. I. Grekova*, **4** (2), 32 (2001).
11. О. Б. Жуков, А. Р. Зубарев, М. В. Мезенцева и др., *Врачебное сословие*, **5** (6), 51 (2004).
12. Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev, A. V. Melnitskaya, et al., *Dokl. RAN*, **421** (5), 709 (2008).
13. C. A. Downs, L. Kreiner, X. M. Zhao, et al., *Am. J. Physiol.*, **308**, L943 (2015).
14. Е. Б. Бурова, К. П. Василенко, В. Г. Антонов и др., *Докл. РАН*, **404**, 1 (2005).
15. К. П. Василенко, Е. Б. Бурова, В. Г. Антонов и др., *Цитология*, **48** (6), 500 (2006).

## **The Effect of Molixan, a Disulfide-Containing Immunomodulator, on Na<sup>+</sup> Transport across Frog Skin Epithelium**

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

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

*\*\* Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Litovskaya ul. 2, Saint Petersburg, 194100 Russia*

The effect of molixan, a disulfide-containing immunomodulator which is an analogue of oxidized glutathione, on Na<sup>+</sup> transport across frog skin epithelium has been studied. Using the voltage-clamp technique, the capacity of molixan to modulate Na<sup>+</sup> transport across frog skin epithelium has been revealed for the first time. It was also found that when molixan is applied to the apical surface of frog skin, it suppresses Na<sup>+</sup> transport, while molixan added on the basolateral surface may mimic the effect of insulin and stimulate Na<sup>+</sup> transport. The results obtained indicate that oxidized glutathione and its analogs molixan and glutoxim unidirectionally modulate Na<sup>+</sup> transport across frog skin.

*Keywords: molixan, GSSG, Na<sup>+</sup> transport, frog skin epithelium*

УДК 577.3

## КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И СВЕТА В ПРИСУТСТВИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА

© 2023 г. С.В. Акулиничев\*, \*\*, #, С.И. Глухов\*, \*\*\*, ##, А.В. Ефременко\*\*\*\*, Д.А. Коконцев\*, \*\*, Е.А. Кузнецова\*\*\*, В.В. Мартынова\*, А.В. Феофанов\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, И.А. Яковлев\*, \*\*

\*Институт ядерных исследований РАН, Физическая ул., 27, Москва, Троицк, 108840, Россия

\*\*Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Абрикосовский пер., 2, Москва, 119991, Россия

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

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

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

#E-mail: akulinic@inr.ru

##E-mail: serglukhovmb@gmail.com

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Исследовано совместное использование рентгеновского облучения и фотодинамической терапии на модели клеток аденокарциномы легкого человека A549. Установлено, что синхронное воздействие двух видов облучения способствует более сильному снижению уровня выживаемости опухолевых клеток, чем их последовательное применение или каждый вид облучения по отдельности. Для различных комбинаций двух указанных видов облучения в клетках определены уровни РНК и экспрессии ряда генов, вовлеченных в контроль клеточного цикла (*p21*, *DINOL*), апоптоз (*BAX*, *PUMA*) и репарацию ДНК (*PARP1*, *OGG1*, *Rad51*, *Lig4*). Наибольший уровень экспрессии при всех воздействиях наблюдался для гена длинной некодирующей РНК *DINOL*. Обнаруженное повышение экспрессии генов *BAX* и *PUMA* свидетельствует о развитии апоптоза. Полученные результаты подтверждают синергизм лучевой и фотодинамической терапии при их синхронном применении.

*Ключевые слова:* рентгеновское излучение, производные хлорина, фотодинамическая терапия, клетки A549.

DOI: 10.31857/S0006302923050162, EDN: PHMLHS

Лучевая терапия (ЛТ) опухолей является стандартным методом лечения многих видов онкологических заболеваний. Однако часто ее эффективность ограничена из-за радиорезистентности раковых клеток и разной оксигенации участков солидных опухолей, а также из-за ее неизбирательного воздействия на опухолевые и нормальные клетки. В качестве альтернативы или дополнения к местной радиотерапии большое значение приобрела фотодинамическая терапия (ФДТ) [1].

*Сокращения:* ЛТ – лучевая терапия, ФДТ – фотодинамическая терапия, ФС – фотосенсибилизатор, ПЦР – полимеразная цепная реакция, РТА – рентгеновский терапевтический аппарат.

Действие ФДТ основано на образовании в опухолевых клетках, содержащих фотосенсибилизатор (ФС) и облучаемых светом заданной длины волны, активных форм кислорода с высокой цитотоксичностью (синглетный кислород и др.) и малой диффузией, что снижает поражение прилегающих здоровых тканей. В дополнение к высокой конформности, обеспечиваемой концентрацией ФС только в опухолевых клетках, ФДТ характеризуется минимальной приобретенной резистентностью [2]. Более широкому клиническому применению ФДТ, особенно для терапии глуболежащих опухолей, препятствуют проблемы с доставкой света через оптически непрозрачные биологические ткани. Кроме того, эффектив-

ность самостоятельной ФДТ ограничивается аллергическими и другими нежелательными реакциями организма пациента на введенный ФС, а слишком мощное световое воздействие может приводить к перегреву нормальных тканей. Предлагаемые методы доставки света в ткани, например, с помощью использования миниатюрных имплантируемых излучателей [3], пока являются экспериментальными и находятся в стадии разработки. Поэтому в последние годы делались попытки объединить преимущества ФДТ и ЛТ для повышения эффективности лечения новообразований [4]. В ряде работ обнаружено, что комбинация ФДТ и ЛТ позволяет снизить дозу ионизирующего излучения или световой поток и/или концентрацию ФС для достижения того же клинического эффекта, что и при самостоятельной ЛТ или ФДТ [5].

В настоящее время в качестве ФС используются соединения различных классов, например, производные бензопорфирина, цианиновые красители, хлорины и другие [5, 7–9]. Особый интерес представляют ФС на основе производных хлорофилла – хлорины [10]. В клинической практике используются такие препараты на основе хлорина е6, как радахлорин, фотолон и фотодитазин. Синтез новых производных хлорина е6 и их биологическое исследование продолжают до сих пор. Одним из подобных соединений является 3<sup>2</sup>-(4-метоксифенил)-15<sup>2</sup>-аспартилхлорин е6 (производное хлорина, названное DYSP-C34), который обладает такими полезными биологическими свойствами как улучшенная растворимость в воде и клеточная проницаемость, таргетное накопление в опухолях и повышенная фототоксичность при облучении низкой световой дозой. Кроме того, было показано, что DYSP-C34 может эффективно накапливаться в подкожной ксенотрансплантатной опухоли мыши и демонстрировать существенную регрессию опухоли после облучения крайне низкой плотностью света [11].

Настоящая работа посвящена исследованию возможной синергии ФДТ и ЛТ на примере монослойной клеточной культуры рака легкого A549, недорогой и доступной модели новообразований человека, и ФС на основе аминоалкиламидного производного хлорина е6.

В работе оценивали клеточный ответ на совместное использование рентгеновского излучения и фотодинамического воздействия по следующим критериям: выживаемость клеток A549 и уровень экспрессии генов, вовлеченных в ответ на генотоксический стресс, начиная от распознавания и ликвидации повреждений ДНК до клеточной гибели. Среди генов репарации ДНК были выбраны для анализа гены *Lig4*, *Rad51*, *Parp1*, *Ogg1*. С учетом уникальности и незаменимости

генов репарации ДНК в разных механизмах репарации такой выбор позволяет оценить вклад каждого механизма репарации ДНК в ликвидацию радиационных повреждений при оценке влияния сочетания ЛТ и ФДТ. Увеличение экспрессии генов репарации происходит, как правило, на третий-шестой час после облучения [12], что может быть обнаружено методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукт гена *Lig4* является эксклюзивным для репарации двухцепочечных разрывов ДНК по каноническому механизму негомологичного соединения концов (с-NHEJ) – главному механизму репарации ДНК в соматических клетках высших эукариот, находящихся в фазах G1/G0 [13]. Продукт гена *Rad51* является уникальным для репарации двухцепочечных разрывов ДНК, направляемой по механизму гомологичной рекомбинации (HRR) – наиболее точному механизму репарации ДНК, более часто реализуемому в фазах S-G2-M [14] и активно транскрибирующихся участках эухроматина [15]. Продукт гена *Ogg1* отвечает за удаление из ДНК 8-оксогуанина, одного из самых распространенных типов окисления оснований ДНК. Продукт гена *Parp1*, хроматиновый белок, является участником координации множества репарационных процессов одноцепочечных разрывов ДНК, эксцизионной репарации нуклеотидов, а также низкоспецифической репарации ДНК по механизмам альтернативного или опосредованного микрогомологией соединения концов (alt-NHEJ и MHEJ соответственно), с-NHEJ и HRR [16].

Анализ активации клеточной гибели в ответ на повреждение ДНК был сосредоточен вокруг сигнального каскада, опосредованного участием гена *p53*. Была проведена оценка активации следующих подконтрольных *p53*-генов: *p21/CDKN1A*, *DINOL*, *PUMA* и *BAX*. Ген *p21/CDKN1A* кодирует ингибитор циклинзависимых киназ, рост его концентрации приводит к остановке клеточного цикла в ответ на многие виды стресса, в том числе и на повреждение ДНК. Продукт гена *DINOL*, длинная некодирующая РНК, является важнейшим компонентом положительной обратной связи в *p53*-зависимой активации процессов поддержания целостности генома. Это реализуется, во-первых, в препятствии транскриптом *DINOL* протеолитической дегградации *p53* при участии MDM-2 (убиквитинлигазы), во-вторых, в усилении связывания *p53* с подконтрольными ему промоторами генов *p21/CDKN1A*, *GADD45A* и многих других генов [17]. Для выявления опосредованной повреждением ДНК апоптотической гибели клеток была оценена экспрессия проапоптотических генов, активируемых генотоксическим стрессом, генов *PUMA* (*p53*-upregulated modulator of apoptosis) и *BAX*. Белковым продуктом гена *PUMA* является ингибитор антиапоптотического

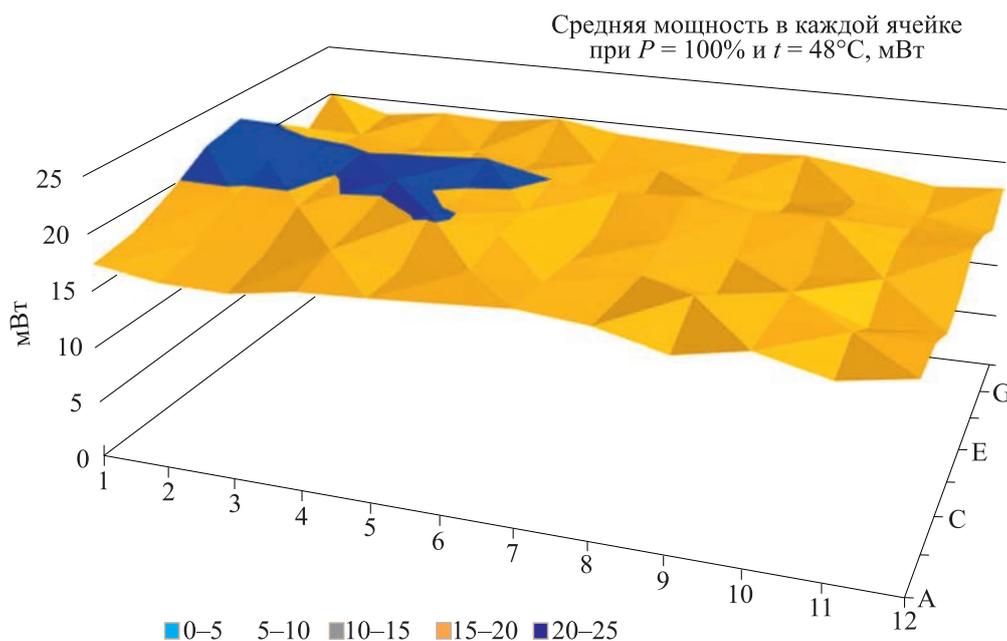


Рис. 1. Распределение мощности света по 96 лункам планшета на длине волны 663 нм.

белка BCL-2. Белковым продуктом гена *BAX* является эффекторный белок апоптоза, активация которого реализуется в образовании пор во внешней мембране митохондрий, сопровождаемым выходом в цитоплазму цитохрома C, а также в активации каспаз и собственно запуске апоптотической гибели [18]. Для генов *p21/CDKN1A*, *DINOL*, *PUMA*, *BAX* увеличение экспрессии происходит прямо пропорционально уровню генотоксического воздействия, что не всегда наблюдается для генов контроля клеточного цикла и апоптоза [19].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Источник ионизирующего излучения.** В качестве источника ионизирующего излучения использован клинический близкофокусный рентгенотерапевтический аппарат РЕНТГЕН-ТА-02 (РТА) производства ООО «Севкаврентген-Д» (Россия). Максимальное напряжение на трубке этого аппарата составляет 100 кВ, однако в работе использовали рентгеновское излучение при напряжении 60 кВ, которое ближе к видимому свету по глубине прохождения в тканях. Дозу облучения подбирали путем изменения тока аппарата и длительности облучения так, чтобы время набора дозы рентгеновским излучением и время облучения светом совпадали. Это дает возможность реализовать полностью синхронное воздействие рентгена и света. Дозиметрию ионизирующего излучения проводили двумя независимыми методами: с использованием миниатюрной ионизационной камеры 34013 (PTW, Германия) с электрометром

MULTIDOS (PTW, Германия) и радиохромной пленки EBТ2 и EBТ-XD (Gafchromic, США). Дозу в выбранном режиме сначала измеряли с ионизационной камерой в твердотельном фантоме, симулирующем планшет с клетками, а затем — с помощью пленок при их размещении непосредственно над и под планшетом или чашкой Петри с клетками. При этом значение поглощенной клетками дозы определяли как среднее между показаниями пленок, расположенных над и под планшетом или чашкой Петри.

**Источник излучения света и фотосенсибилизатор.** Для исследования фотодинамических эффектов в клеточной культуре, а в дальнейшем и в живых организмах, разработан и изготовлен световой облучатель, позволяющий подводить свет строго заданной длины волны к биологическим образцам одновременно с рентгеновским или другим ионизирующим излучением. Источник излучения света выполнен на основе 24-х светодиодов (мощность каждого — 2 Вт) с регулируемой длиной волны в диапазоне 658–665 нм. Для лабораторного 96-луночного планшета плотность мощности света составляла  $80 \text{ мВт/см}^2$ . Измерения спектра света проводили с использованием спектрометра ASP-150 («Авеста-Проект», Россия), а плотность светового потока измеряли с использованием сенсорного прибора на основе термoeлементa S425C (Thorlabs, США). Пример измеренного распределения мощности света по лункам 96-луночного планшета показан на рис. 1. При обработке результатов использовали лунки с отклонением мощности света не более 15%. Дли-

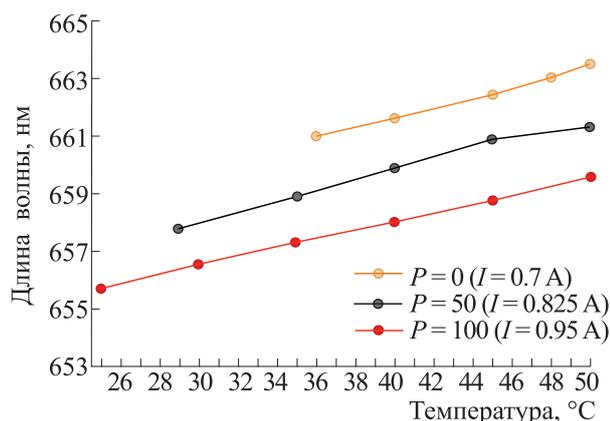


Рис. 2. Зависимость длины волны света от температуры диодов и тока, задаваемого параметром мощности излучателя  $P$ .

на волны светового излучения определяется температурой диодов и подаваемым на них током, задаваемым параметром мощности ( $P$ ) излучателя (рис. 2).

В качестве ФС был использован раствор аминоалкиламида хлорина е6 (AAE6) в 5%-й эмульсии кремофора EL [20–22]. Спектр поглощения в 1%-й эмульсии раствора кремофора EL (CrEL) представлен на рис. 3. Максимум Q-полосы поглощения находится на длине волны 663 нм, что соответствует длине волны использованного излучателя при температуре диодов 47–48°C при максимальной мощности излучателя (рис. 2). Близкий по свойствам ФС был использован в предыдущих исследованиях сочетанной терапии ФДТ и ЛТ [8] и показал свою высокую эффектив-

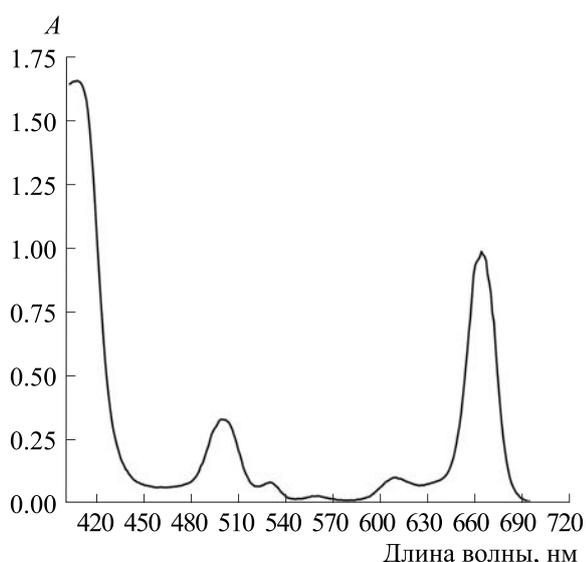


Рис. 3. Спектр поглощения AAE6 в 1%-м CrEL.

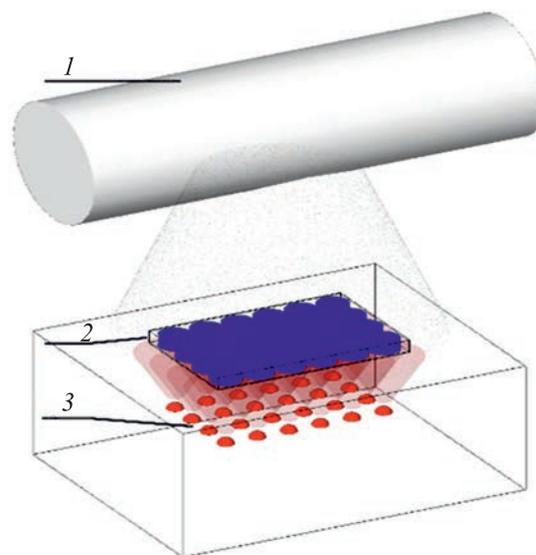


Рис. 4. Принципиальная схема установки для сочетания воздействия ФДТ и РТА на примере облучения 24-луночного планшета с клетками: 1 – трубка РТА, 2 – планшет с клетками, 3 – излучатель света.

ность. Аналогичные виды ФС исследовались и в других работах [10, 23, 24].

Общая схема эксперимента показана на рис. 4. Воздействие на клетки осуществлялось либо самостоятельно (РТА или ФДТ), либо последовательно (РТА → ФДТ или ФДТ → РТА), либо одновременно (РТА+ФДТ). Преимуществом использованного оборудования является возможность синхронного воздействия света и ионизирующего излучения на клетки или на другой биологический материал. Эксперимент проводили в каньоне для рентгеновской терапии, поэтому все управление излучателями проводилось дистанционно с использованием кабелей длиной около 10 м.

**Клеточная линия и условия выращивания клеток.** В экспериментах использовали клетки аденокарциномы легкого человека A549 (получены из ИБХ РАН, Москва). Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 35 мм в концентрации  $1.5 \times 10^5$  клеток в чашке в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 4 мМ глутамина («ПанЭко», Россия), антибиотика (пенициллин-стрептомицин, 250 ЕД, «ПанЭко», Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Аргентина). Перед посевом культуру клеток проверяли на количество живых/мертвых клеток с красителем трипановым синим [25]. Как правило, количество мертвых клеток в экспериментах не превышало 3%.

**Облучение клеток.** Клетки A549 облучали в полной среде (2 мл) в закрытых чашках Петри. Воздействие рентгеновскими лучами проводили

в дозе 6 Гр. Воздействие светом в присутствии ФС на клетки осуществляли в течение 200 с в дозе 5 Дж/см<sup>2</sup>. Предварительно раствор ФС в концентрации 0.1 мкМ был приготовлен в полной среде из 1.6 мМ стокового раствора (в 5%-й эмульсии кремофора EL). В чашке Петри с клетками 1 мл среды заменяли на свежеприготовленный раствор ФС, при этом конечная концентрация ФС составила 0.05 мкМ. После облучения клетки инкубировали 1–24 ч в стандартных условиях.

**Клоногенный тест.** После облучения клетки культивировали в инкубаторе 1 ч в стандартных условиях, затем каждую чашку промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера, буфер полностью удаляли и добавляли 0.5 мл 0.25%-го трипсина. Далее чашки инкубировали 15 мин. Каждую чашку проверяли под микроскопом на факт полного открепления клеток. Клетки ресуспендировали в 4 мл среды и переносили в пятимиллилитровые пробирки типа Эппендорф, далее центрифугировали при 1400 g в течение 5 мин. При подсчете клеточной суспензии в камере Горяева и проверке на наличие поврежденных клеток с трипановым синим мертвые клетки не были обнаружены. Клетки высевали в чашки Петри диаметром 35 мм (SPL Lifesciences, Южная Корея) в концентрации 300 клеток/чашку, в такой же концентрации высевали контрольные клетки. Все колонии выращивали в течение одной недели после воздействия, затем проводили их подсчет. Окрашивание и фиксацию колоний проводили с помощью 57%-го этанола и 0.5%-го бриллиантового зеленого в течение получаса.

**Консервация клеток и анализ уровня РНК.** Клетки в чашках Петри после облучения подвергали консервации в растворе IntactRNA (Евроген, Россия). Для этого полная клеточная среда (DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки) заменялась на DMEM без эмбриональной телячьей сыворотки (согласно рекомендациям производителя IntactRNA), далее среда удалялась и заменялась на 1 мл раствора IntactRNA на чашку Петри. Дальнейшие инкубации проводились по методике производителя (1 ч при комнатной температуре, 24 ч при +4°C, далее до момента анализа при –20°C). Облученные и необлученные (контрольные) клетки в реагенте IntactRNA хранили при –20°C менее 2 месяцев. Перед выделением РНК консервант IntactRNA удалялся, клетки промывались от избытка консерванта в фосфатно-солевом буфере. Лизис клеток производили с использованием реагента на основе кислого фенола и гуанидина тиоцианата ExtractRNA (Евроген, Россия). Очистку РНК из фенольного раствора производили с помощью набора Direct-zol RNA Microprep (Zymo Research, США), включая удаление примесей геномной ДНК в реакции с ДНКазой I. Концентрацию РНК определяли в ре-

акции с интеркалирующим красителем с использованием набора RNA BR на флуориметре Qubit (Thermo Scientific, США).

**Обратная транскрипция и количественная полимеразная цепная реакция.** Синтез кДНК проводили с помощью случайного гексамерного праймера в реакции обратной транскрипции с ферментом M-MLV -RH («Biolabmix», Россия) в присутствии ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Scientific, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием Hot Start Taq DNA polymerase («Biolabmix», Россия) с детекцией продуктов по накоплению флуоресценции SybrGreen I. Программа ПЦР: 1×(94°C – 4'45"); 42×(92°C – 15", 60°C – 15", 72°C – 10" – детекция флуоресценции в канале SybrGreen/FAM). Качество реакций контролировали по кривым плавления. Праймеры к целевым генам, подобранные в процессе работы, приведены в табл. 1. Относительное усиление экспрессии на уровне мРНК определяли по методу 2<sup>–ΔΔC<sub>t</sub></sup> [26]. В качестве нормировочного гена был взят ген *GAPDH*.

**Статистический анализ.** Анализ статистической достоверности отличий проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), расчет *p*-value достоверности уровня значимости проводили методом последующего теста Туки [27].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Определяли выживаемость клеток (клоногенный тест) при отдельном или синхронном воздействии ЛТ и ФДТ, эти результаты представлены на рис. 5. Как видно из рис. 5, выживаемость клеток существенно снижалась при самостоятельном воздействии рентгеновского или фотодинамического облучения, в то время как при их синхронном воздействии образование колоний совсем не выявлялось, что говорит о полной гибели клеток в данных условиях эксперимента.

Определение концентрации РНК было проведено в образцах, полученных в двух разделенных по времени на несколько месяцев сеансах облучения. Во время каждого сеанса были облучены по два обособленных биологических образца для каждого режима. Концентрация РНК была определена в равных по объему образцах, взятых из однотипно засеянных чашек Петри в рамках каждого из сеансов облучения. Результаты показали, что в течение 6–24 ч после фотоиндуцированного и лучевого воздействия в клетках A549 происходит значительное снижение концентрации РНК как при последовательном, так и при синхронном применении ЛТ и ФДТ (рис. 6). При этом концентрация РНК в клетках при последовательном воздействии ЛТ и ФДТ выше, чем при синхронном облучении в каждом соответствующем вре-

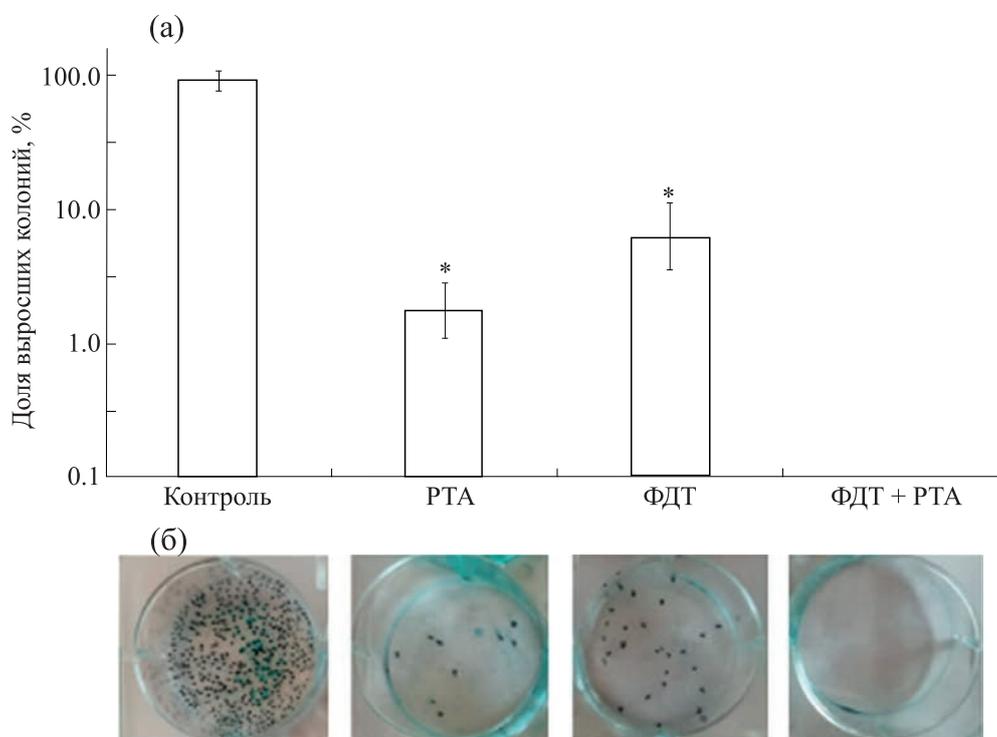
**Таблица 1.** Праймеры, подобранные к целевым генам

№	Ген	Прямой праймер 5' → 3'	Обратный праймер 5' → 3'
1	<i>BAX</i>	TTCTGACGGCAACTTCAACTG	AATGTCCAGCCCATGATGGTTC
2	<i>DINOL</i>	TGGGAGAGGTGACCTAGTGAG	ACTCTGGCAGGCAAGGATTTAC
3	<i>GAPDH</i>	TTCAACAGCGACACCCACTC	TGGTCCAGGGGTCTTACTCC
4	<i>HPRT1</i>	ATTGTAGCCCTCTGTGTGCTC	TACTTTTATGTCCCCTGTTGACTG
5	<i>LIG4</i>	ACTCCCTGGAAGTGTATTGCC	TGTGAGGCAGCCATCAAAGC
6	<i>OGG1</i>	ACTGTATCACCCTGGGGTTC	CAGTGATGCGGGCGATGTTG
7	<i>p21</i>	AGGGGACAGCAGAGGAAGAC	AGAAGATCAGCCGGCGTTTG
8	<i>p53</i>	GTGAGCGCTTCGAGATGTTC	ATGGCGGGAGGTAGACTGAC
9	<i>PARP1</i>	TGTCCCAGGGTCTTCGGATAG	AGACGTATGGCAGTAGTTGGC

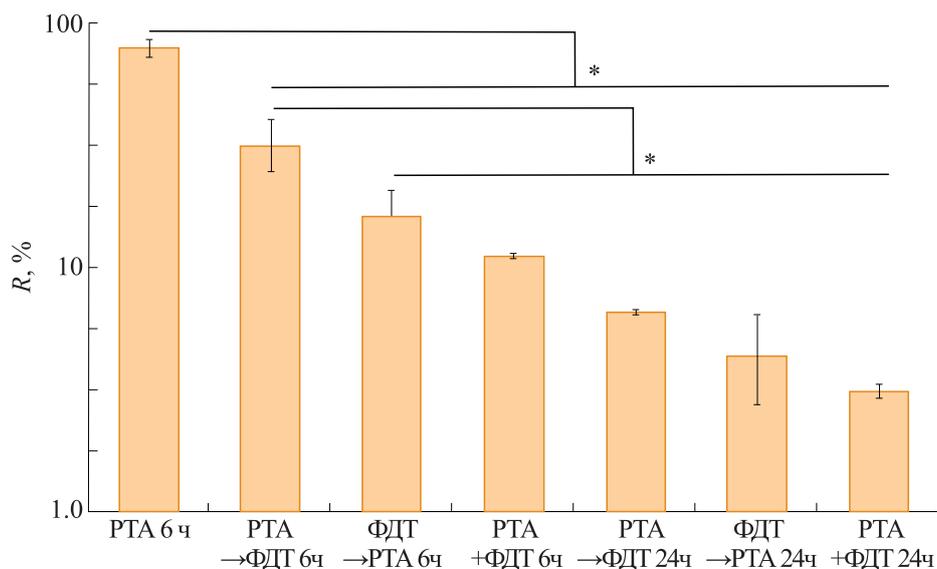
менном периоде. Облучение клеток A549 только с помощью РТА приводит к снижению РНК на ~20%, в то время как синхронное облучение снижает уровень РНК приблизительно в 9 раз. Значительное падение определяемой концентрации РНК говорит о наибольшем поражении РНК

именно при синхронном воздействии ФДТ и РТА.

Анализ генов контроля клеточного цикла и апоптоза показал, что после последовательного и синхронного воздействий ФДТ и ЛТ на клетки A549 в них наблюдается существенный рост экс-



**Рис. 5.** Выживаемость (а) и фото чашек Петри с колониями (б) клеток A549 после самостоятельного и синхронного воздействия рентгеновского излучения и света в присутствии ФС (значения и погрешности на графике представлены как  $M \pm SD$ ); \* – выделены достоверные отличия от контроля,  $p < 0.05$ .



**Рис. 6.** Уровни РНК при самостоятельном (РТА или ФДТ), последовательном (РТА → ФДТ и ФДТ → РТА) и синхронном (РТА+ФДТ) воздействии рентгеновского излучения и света в присутствии ФС на клетки А549.  $R$  – отношение в % количества РНК для облученных образцов к аналогичным уровням в необлученных образцах (показаны значения и погрешности в виде  $M \pm SD$ ); \* – отмечены достоверные отличия от контроля,  $p < 0,05$ .

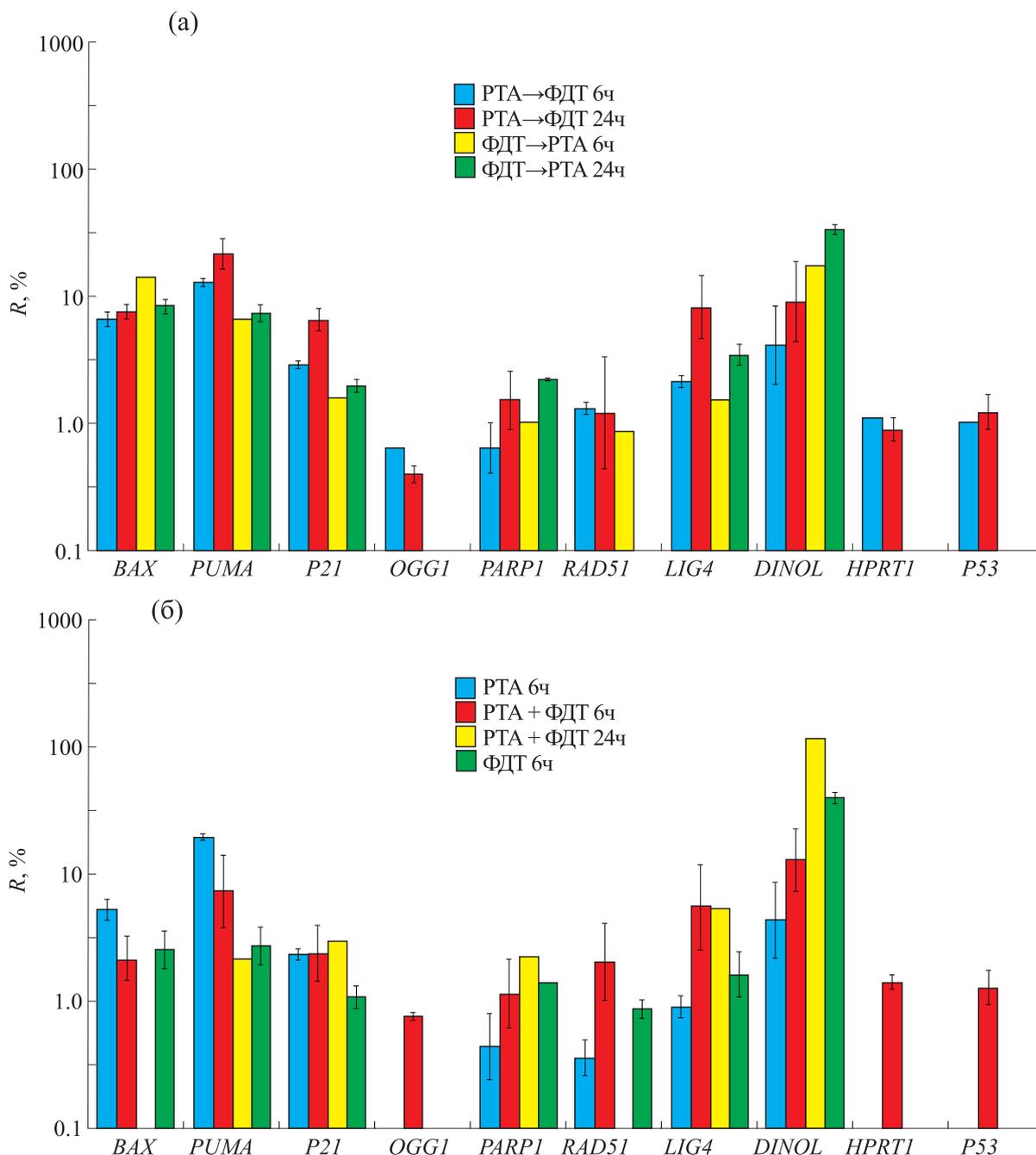
прессии генов *p21*, *DINOL*, *PUMA*, *BAX* уже к шестому часу после воздействия, этот рост продолжается до 24 часов (рис. 7). Обнаружено, что для гена *p53*, а также для большинства генов репарации ДНК *PARP1*, *RAD51* и *Ogg1* уровень экспрессии при разных режимах облучения практически не менялся. Наблюдалась некоторая тенденция к увеличению экспрессии гена *RAD51* к 6 ч и *PARP1* к 24 часам при всех вариантах синхронного воздействия. Для гена *Ogg1*, наоборот, наблюдалось некоторое снижение уровня экспрессии со временем. Экспрессия гена *HPRT1* приведена для сравнения экспрессии второго нормировочного гена, используемого наряду с *GAPDH* в исследованиях. Из сопоставления всех результатов экспрессии генов репарации следует, что наибольшая активация наблюдалась для гена *Lig4*. Это вполне соответствует тому, что данный ген вовлечен в наибольшее число процессов репарации по механизму с-ННЕJ в соматических клетках эукариот, находящихся преимущественно в фазах G1/G0 клеточного цикла, когда этот механизм репарации ДНК имеет доминирующее значение.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследована возможность получения синергического эффекта при воздействии двух видов облучения, используемых в терапии злокачественных новообразований, – воздействия света в присутствии ФС и ионизирующего (рентгеновского) излучения. Облучение проводили в разных режимах – самостоятельно или последовательно ФДТ и РТА и синхронно ФДТ +РТА.

При последовательном воздействии концентрация РНК заметно снижалась по сравнению с самостоятельным воздействием, однако ее уровень был все равно заметно выше, чем при синхронном воздействии (рис. 6). Значительная деградация РНК не позволила провести даже фрагментарный ПЦР-анализ для трех из четырех образцов, полученных через 24 ч после синхронного воздействия ФДТ и РТА. Избранная схема количественной ПЦР требовала наличия целостных фрагментов целевой РНК длиной хотя бы в 300 нуклеотидов (так как был использован случайный гексамерный праймер вместо олиго-дТ в реакции синтеза кДНК). Дизайн праймеров был подобран для получения продуктов ПЦР длиной не более 250 нуклеотидов. Это еще раз свидетельствует об особенно сильном воздействии синхронного облучения.

Как правило, ген *p53* не меняет своей экспрессии на уровне мРНК, так как в основном его активность регулируется за счет протеолиза, посттрансляционных модификаций, тетрамеризации и связывания с промоторами подконтрольных генов [28]. Однако для мишеней белка *p53*, для которых свойственна активация экспрессии в ответ на генотоксический стресс (*CDKN1A*, *DINOL*, *BAX*, *PUMA*), показана существенная активация в ответ на комбинированное воздействие ФДТ и РТА. Уменьшение уровня РНК в совокупности с ростом экспрессии генов *Lig4* и *DINOL* свидетельствуют о мощном генотоксическом эффекте примененных воздействий. Известно, что *DINOL* усиливает экспрессию примерно в 100 раз в пер-



**Рис. 7.** Уровни экспрессии генов *BAX*, *PUMA*, *p21*, *Lig4*, *DINOL*, *PARP1*, *Rad51*, *OGG1*, *p53* и *HPRT1* в клетках A549 при самостоятельном, последовательном и синхронном воздействии рентгеновского излучения и света в присутствии ФС. *R* – отношение в % уровней экспрессии генов для облученных образцов к аналогичным уровням в необлученных образцах.

вичных фибробластах человека в ответ на повреждение ДНК, вызванное доксорубицином (генотоксическим химиотерапевтическим агентом), достигая пика через 10–24 ч после воздействия [17]. Тем не менее, известный ген-мишень *p53* *CDKN1A* (*p21*) в тех же условиях активируется только в 5–10 раз. В наших экспериментах наблюдалась похожая тенденция опережения уров-

ня экспрессии *DINOL* над *CDKN1A*. Обнаруженное значительное повышение экспрессии *p21*, *DINOL* и вовлеченных в апоптоз генов *BAX* и *PUMA* может также свидетельствовать о существенном повреждении ДНК облученных клеток и развитии апоптоза под контролем механизма, опосредованного работой *p53*. Экспрессия *DINOL*, *BAX*

и *PUMA* также была высокой при воздействии только самостоятельной РТА или ФДТ.

Выживаемость клеток существенно снижалась при воздействии обоих видов облучения в отдельности, а при их синхронном воздействии образование колоний практически не выявлялось. Это свидетельствует о существенном повреждающем воздействии именно синхронного режима ФДТ+РТА. Существенно худшее состояние РНК после синхронного воздействия РТА и ФДТ, что следует из невозможности провести даже фрагментарный ПЦР анализ кДНК, вероятнее всего обусловлено пролонгированным окислительным стрессом, возникающим под действием ионизирующего излучения и поддерживающимся на протяжении нескольких суток после облучения по причине, очевидно, дисфункции митохондрий, генерации и диффузии из митохондриального пространства во внутриклеточное большое количества непогашенных активных форм кислорода [29]. Исходя из полученных результатов для выживаемости, экспрессии генов и обнаруженной деградации РНК, можно сделать вывод, что наибольшее поражающее клетки воздействие оказывает синхронное облучение, что подтверждает синергизм ФДТ и ЛТ именно при их совместном воздействии.

Таким образом, полученные результаты по активации генов репарации ДНК и запуску апоптоза под контролем *p53* соответствуют динамике развития постлучевой гибели клеток при разных комбинациях воздействия ФДТ и ЛТ. В совокупности с фактором деградации РНК данные по экспрессии генов и клеточной гибели свидетельствуют о большем поражающем эффекте синхронной комбинации ФДТ и ЛТ по сравнению с их последовательным применением.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннюю благодарность д.б.н. М.Г. Шарипову, С.И. Державину, А.А. Игнатовой, Д.Н. Мамонову и Г.В. Мерзликину за помощь в проведении экспериментов, а также М.А. Грину за предоставление фотосенсибилизатора для исследований.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-02-00102 «Исследование эффективности синхронной фотодинамической и лучевой терапии»).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. He, X. Yu, and W. Li, *ACS Nano*, **16** (12), 19691 (2022). DOI: 10.1021/acsnano.2c07286
2. A. Bansal, F. Yang, T. Xi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115** (7), 1469 (2018). DOI: 10.1073/pnas.1717552115
3. Y. Fatma and T. Ayça, *Nov. Appro. in Can. Study*, **1** (2), 000506 (2018). DOI: 10.31031/NACS.2018.01.000506
4. A. Colasanti, A. Kisslinger, M. Quarto, et al., *Acta Biochim. Pol.*, **51** (4), 1039 (2004).
5. A. R. Montazerabadi., A. Sazgarnia, M. H. Bahreyni-Toosi, et al., *J. Photochem Photobiol B*, **109**, 42 (2012). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.01.004
6. B. W. Pogue, J. A. O'Hara, E. Demidenko, et al., *Cancer Res.*, **63** (5), 1025 (2003).
7. М. А. Каплан, А. И. Малыгина, Г. В. Пономарев и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **14**, 79 (2015).
8. Ю. С. Романко, А. Ф. Цыб, М. А. Каплан и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **139** (4), 456 (2005).
9. D. Xu, A. Baidya, K. Deng, et al., *Oncol. Rep.*, **45** (2), 547 (2021). DOI: 10.3892/or.2020.7871
10. A. Hak, M. S. Ali, S. A. Sankaranarayanan, et al., *ACS Appl. Bio Mater.*, **6** (2), 349 (2023). DOI: 10.1021/acsbm.2c00891
11. L. Wang, G. Li, L. Cao, et al., *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **5** (2), 110 (2022). DOI: 10.1021/acspsci.1c00249
12. J. S. Russell, K. Brady, W. E. Burgan, et al., *Cancer Res.*, **63** (21), 7377 (2003).
13. H. H. Y. Chang, N. R. Pannunzio, N. Adachi, et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **18** (8), 495 (2017). DOI: 10.1038/nrm.2017.48
14. K. Tsouroula, A. Furst, M. Rogier, et al., *Mol. Cell*, **63** (2), 293 (2016). DOI: 10.1016/j.molcel.2016.06.002
15. F. Aymard, B. Bugler, C. K. Schmidt, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21** (4), 366 (2014). DOI: 10.1038/nsmb.2796
16. A. Ciccia and S. J. Elledge, *Mol. Cell*, **40** (2), 179 (2010). DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.019
17. A. M. Schmitt, J. T. Garcia, T. Hung, et al., *Nat. Genet.*, **48** (11), 1370 (2016). DOI: 10.1038/ng.3673
18. M. P. A. Luna-Vargas and J. E. Chipuk, *Trends Cell Biol.*, **26** (12), 906 (2016). DOI: 10.1016/j.tcb.2016.07.002
19. H. Rezaeejam, A. Shirazi, M. Valizadeh, et al., *J. Cancer Res. Ther.*, **11** (3), 549 (2015). DOI: 10.4103/0973-1482.160912
20. М. А. Грин, И. С. Лонин, С. В. Федунин, et al., *Mendeleev Commun.*, **17**, 209 (2007).
21. А. В. Ефременко, А. А. Игнатова, А. А. Боршева, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11** (4), 645 (2012).
22. А. В. Ефременко, А. А. Игнатова, М. А. Грин, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **13**, 92 (2014).
23. Г. В. Пономарев, *Рос. биотерапевтич. журн.*, **6** (1), 24 (2007).
24. Г. В. Пономарев, С. Ю. Егоров, А. А. Стрижаков и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **12** (2), 68 (2013).

25. И. А. Кондратьева, Н. В. Воробьева, О. В. Буракова и др., в кн. *Практикум по иммунологии*, под ред. И. Кондратьева и В. Самуилова (Изд. МГУ, М., 2001), сс. 17–32.
26. K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Methods*, **25** (4), 402 (2001), DOI: 10.1006/meth.2001.1262
27. J.W. Tukey, *Biometrics*, **5** (2), (1949).
28. A. Hafner, M. L. Bulyk, A. Jambhekar, et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20** (4), 199 (2019), DOI: 10.1038/s41580-019-0110-x
29. S. Kobashigawa, K. Suzuki, and S. Yamashita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414** (4), 795 (2011), DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.006

## Cellular Response to Exposure to Ionizing Radiation and Light in the Presence of a Photosensitizer

S.V. Akulinichev\*, \*\*, S.I. Glukhov\*, \*\*\*, A.V. Efremenko\*\*\*\*, D.A. Kokontsev\*, \*\*, E.A. Kuznetsova\*\*\*, V.V. Martynova\*, A.V. Feofanov\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, and I.A. Yakovlev\*, \*\*

\**Institute for Nuclear Research, Russian Academy of Sciences, Fizicheskaya ul. 27, Troitsk, Moscow, 108840 Russia*

\*\**B.V. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Abrikosovskii per. 2, Moscow, 119991 Russia*

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

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

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

This study has been conducted to investigate the effects of X-ray irradiation in combination with photodynamic therapy on human lung adenocarcinoma cell line A549 used as a lung cancer model. It has been established that the concomitant use of these two types of radiation leads to much lower survival rate of tumor cells than that observed after the sequential use of these types of radiation or exposure to each type of radiation measured separately. For different combinations of the two mentioned types of radiation, the mRNA expression levels of some genes involved in cell cycle regulation (*p21*, *DINOL*), apoptosis (*BAX*, *PUMA*), and DNA repair (*PARP1*, *OGG1*, *Rad51*, *Lig4*) were determined in cells. The highest level of expression after exposure to different combinations of radiation was observed for the lncRNA *DINOL* gene. The increased expression of the *BAX* and *PUMA* genes indicates the development of apoptosis. The results obtained confirm that there is synergism in X-ray radiation and photodynamic therapy due to the concomitant use of these types of radiation.

*Keywords: X-rays, chlorine derivatives, photodynamic therapy, A549 cells*

УДК 577.35.085

## ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И АКТИВНОСТЬ ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В КРАСНОМ КОСТНОМ МОЗГЕ ГИБЕРНИРУЮЩИХ СУСЛИКОВ *Urocitellus undulatus*

© 2023 г. Г.Е. Аксёнова\*, О.С. Логвинович\*\*, В.Н. Афанасьев\*, К.И. Лизоркина\*

\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, ул. Институтская, 3 Пушкино Московской области, 142290,

E-mail: AksyonovaGE@rambler.ru

\*\*Гомельский государственный медицинский университет, ул. Ланге, 5, Гомель, 246000, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

В сезон гибернации у межбаутных активных сусликов *Urocitellus undulatus* параметры клеточного цикла клеток красного костного мозга не отличаются от летних значений. У животных в состоянии оцепенения по сравнению с состоянием межбаутной активности суммарная доля покоящихся (G0) и находящихся в пресинтетической (G1) фазе клеток увеличена с 71.8 до 76.0%, доля клеток в синтетической (S) фазе снижена с 19.3 до 15.3%. Суммарная доля клеток в постсинтетической (G2) фазе и в митозе (M) не меняется, но растёт соотношение (G2+M)/S. При входе в состояние оцепенения изменения параметров наблюдаются при снижении температуры тела ниже 25°C, их зависимость от температуры немонотонна. Активность ключевого фермента синтеза полиаминов орнитиндекарбоксилазы, маркера активации и пролиферации клеток, у межбаутных активных и летних животных достоверно не отличается, во время входа в состояние оцепенения при температуре тела ниже 25°C резко снижается, и остаётся на низком уровне в течение баута спячки и при пробуждении до достижения температуры тела 30°C. Обсуждается роль изменений параметров, связанных с пролиферативной активностью, в адаптации кроветворной ткани при гибернации якутского суслика.

*Ключевые слова:* гибернация, костный мозг, клеточный цикл, пролиферация, орнитиндекарбоксилаза.

DOI: 10.31857/S0006302923050174, EDN: PGWGKV

Зимоспящие млекопитающие являются уникальным объектом для изучения адаптивных возможностей организма, в частности, адаптации активно пролиферирующих тканей, к которым относится гемопоэтическая ткань красного костного мозга. Зимняя спячка сусликов состоит из циклов (баутов) оцепенения, или торпора, или собственно спячки, прерываемых кратковременными пробуждениями. Продолжительность баута спячки составляет от нескольких дней до трех недель, температура тела (Т<sub>т</sub>) достигает значений, близких к нулю, частота сердечных сокращений – нескольких ударов в минуту, уровень метаболизма снижен на 96–98% [1, 2]. При пробуждении животные за короткий период (2–3 ч) возвращаются к нормотермии, восстанавливая изменённый во время баута спячки уровень физиологических и обменных процессов [1–3]. Период меж-

баутной активности обычно длится от нескольких часов до суток, реже, у крупных видов сусликов (к которым относится якутский суслик *U. undulatus*) – до двух суток [1–4]. Вход в состояние оцепенения происходит медленнее, чем пробуждение, и занимает у мелких видов сусликов 12–18 ч [1, 2], у крупных – до 24 ч [5].

Пролиферация клеток – энергоёмкий процесс, который сильно зависит от температуры и уровня метаболизма. В состоянии торпора показано резкое снижение митотического индекса в быстро обновляющихся тканях – слизистой оболочке органов желудочно-кишечного тракта [6, 7], костном мозге [8], селезенке [9]; при пробуждении митотическая активность восстанавливается. В периоды межбаутной активности также возобновляется рост зубов [10], восстанавливается нормальный клеточный состав крови (в состоянии оцепенения у большинства видов наблюдается лейко- и тромбоцитопения) [11, 12]. В сезон гибернации у сусликов с января начинает восста-

Сокращения: Т<sub>т</sub> – температура тела; ОДК – орнитиндекарбоксилаза.

навливаясь подвергаясь инволюции лимфоидная ткань селезенки [13] и кишечника [14]. Сохранение морфофункциональной целостности быстро обновляющихся тканей в период сезонной гетеротермии свидетельствует о надежных механизмах, обеспечивающих как их защиту от повреждений при изменении в широких пределах температуры, уровня метаболизма, циркуляции крови, так и возобновление пролиферации в короткие периоды межбаутной нормотермии. Для многих клеточных культур млекопитающих глубокая (ниже 10°C), а для некоторых линий и умеренная (25°C) гипотермия вызывает повреждение клеточных структур и апоптоз после возвращения к оптимальным условиям культивирования [15–19]. Важным адаптивным механизмом клеток является задержка клеточного (митотического) цикла при неблагоприятных условиях [20, 21]. Снижение температуры культивирования вызывает накопление клеток преимущественно в G<sub>1</sub>-, реже – в G<sub>2</sub>-фазе [15, 16, 22–24]. У гибернирующих сусликов в состоянии оцепенения показано накопление клеток крипт эпителия кишечника в G<sub>2</sub>-фазе [7]. У крыс, перенесших искусственный гипобиоз, наблюдалось накопление тимоцитов в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла [25].

Пролиферация клеток и тканей требует синтеза полиаминов. Полиамины путресцин, спермидин и спермин являются алифатическими поликатионами, присутствующими в клетках эукариот и прокариот [26], которые связаны с нормальным и неопластическим ростом тканей [26, 27]. В клетках млекопитающих ключевым скоростью-лимитирующим ферментом биосинтеза полиаминов является орнитиндекарбоксилаза (ОДК, КФ 4.1.1.17), продуцирующая путресцин. Стимуляция клеточной пролиферации сопровождается резким повышением активности ОДК, что приводит к увеличению внутриклеточных концентраций полиаминов [26–28]. Ингибирование синтеза полиаминов приводит к торможению пролиферации [29–31] с накоплением клеток преимущественно в фазе G<sub>1</sub> [30, 31]. У крыс в условиях искусственного гипобиоза было показано резкое падение активности ОДК в органах системы крови – костном мозге [32], тимусе и селезенке [25]. В настоящей работе мы использовали параметры распределения клеток по стадиям митотического цикла (G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>+M, (G<sub>2</sub>+M)/S) и активность ОДК красного костного мозга для изучения процессов адаптации в кроветворной ткани в ходе баутов спячки при гибернации якутского суслика.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали меченый L-[1-<sup>14</sup>C] орнитин фирмы Amersham International (США),

дителиотреитол, L-орнитин, трис фирмы Sigma (США), пиридоксаль-5'-фосфат от Ferak (Германия), Na<sub>2</sub>-ЭДТА фирмы Acros (США), остальные реактивы отечественного производства квалификации не ниже «х.ч.».

В экспериментах использовали длиннохвостых сусликов *Uroditellus undulatus* (прежнее название *Spermophilus undulatus*) обоих полов массой 500–800 г, средняя масса 590 ± 15 г, отловленных летом в окрестностях г. Якутска и содержавшихся в стандартных условиях вивария ИБК РАН (температура воздуха 20–21°C, влажность 65%) в индивидуальных клетках при естественном освещении. Гнездовой материал и пищу давали *ad libitum*. Перед сезоном спячки сусликов переносили в темное помещение с температурой 1–3°C и размещали в деревянных боксах размером 20 × 20 × 25 см с гнездовым материалом. Для регистрации состояния животных в подстилку гнезд были вмонтированы термодатчики. Температура «подстилки» у гибернирующих животных была порядка 2–4°C и при выходе из спячки поднималась до 12–16°C.

Опыты на сусликах *U. undulatus* проводили в летний период со второй декады июня до первой декады июля включительно (летние суслики) и в сезон гибернации (конец декабря – начало марта). Суслики были разделены на пять групп: группа 1 – летние (n = 18); группа 2 – межбаутные активные животные (n = 11), которых умервщляли через 3–24 ч после пробуждения, с T<sub>T</sub> 37°C; группа 3 – входящие в состояние оцепенения суслики (n = 28), которых умервщляли при входе в спячку; группа 4 – спящие животные (n = 18), которых декапитировали на третьи-десятые (в среднем пятые) сутки спячки, при T<sub>T</sub> 1–7°C; группа 5 – пробуждающиеся от спячки животные при T<sub>T</sub> 6–31°C (n = 15), которых декапитировали до завершения их выхода в активное состояние.

Различия в средней массе у различных групп животных не превышали 3.5% и не были достоверны.

Сусликов декапитировали с помощью гильотины, немедленно вскрывали и измеряли температуру в области сердца датчиком электротермометра ТЭМП-60 с точностью до 0.2°C. Красный костный мозг из передних конечностей (плечевая кость) извлекали на леду. Распределение клеток по фазам митотического цикла определяли методом проточной цитофлуориметрии. Клеточную суспензию готовили в среде Хенкса без ионов кальция. Фиксацию проводили добавлением холодного 96% этанола при встряхивании (1 : 1 по объему) и выдерживали при –20°C не менее суток. Окрашивали ДНК-специфичным флуоресцентным красителем Hoechst-33258 (1 мкг/мл в 0.1 М трис–HCl-буфере, pH 7.4, содержащем 0.1 М NaCl) в течение 30 мин при 37°C. Анализ

проводили на приборе ЛАКС-1, разработанном в ИБК РАН [33].

Подсчет ядерных клеток костного мозга проводили в камере Горяева. Навеску ткани суспендировали в 400–500 объемах 4%-й уксусной кислоты.

Для определения активности ОДК замороженную в жидком азоте ткань костного мозга помещали в стеклянный гомогенизатор с фторопластовым пестиком с добавлением 10–15 объемов буфера (0.1 М трис–НСI (рН 7.5), 5 мМ дитиотреитола, 0.5 мМ ЭДТА и 40 мкМ предварительно нейтрализованного пиридоксаль-5'-фосфата), и гомогенизировали в течение 0.5 мин при 2°C. Гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 30 мин при 2°C и в супернатанте определяли активность ОДК (при 37°C) радиоизотопным методом по освобождению  $^{14}\text{CO}_2$  из меченого L-[1- $^{14}\text{C}$ ]орнитина [34] с некоторыми модификациями [35]. Белок в супернатанте (экстрагируемый белок) определяли методом Лоури.

Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка, достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки изменений пролиферативной активности гемопоэтической ткани гибернирующих сусликов *U. undulatus* было исследовано распределение ядерных клеток красного костного мозга (миелокариоцитов) по фазам клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии. Показатели клеточного цикла у летних и межбавутных активных сусликов были примерно одинаковы (рис. 1, группы 1 и 2). В сезон гибернации у спящих сусликов доля клеток в фазе синтеза ДНК (S-фаза) достоверно снижена по отношению к межбавутным активным животным (с 19.3% до 15.3% соответственно), в то же время увеличена доля суммарной популяции покоящихся клеток (фаза  $G_0$ ) и клеток в пресинтетической фазе  $G_1$  ( $G_0+G_1$ ) с 71.8% до 76.0%. Доля клеток в постсинтетической и митотической фазах ( $G_2+M$ ) у летних, зимних активных и спящих сусликов была примерно одинакова. Отношение количества клеток в ( $G_2+M$ )- и S-фазах у индивидуальных животных ( $G_2+M$ )/S в состоянии оцепенения достоверно увеличивается по отношению к межбавутным активным и летним животным (рис. 1, группы 1, 2 и 4).

Для выявления динамики изменения рассматриваемых нами параметров в переходные периоды циклов оцепенения – межбавутной активности мы разделили данные, полученные в группе входящих в спячку сусликов (группа 3) на четыре

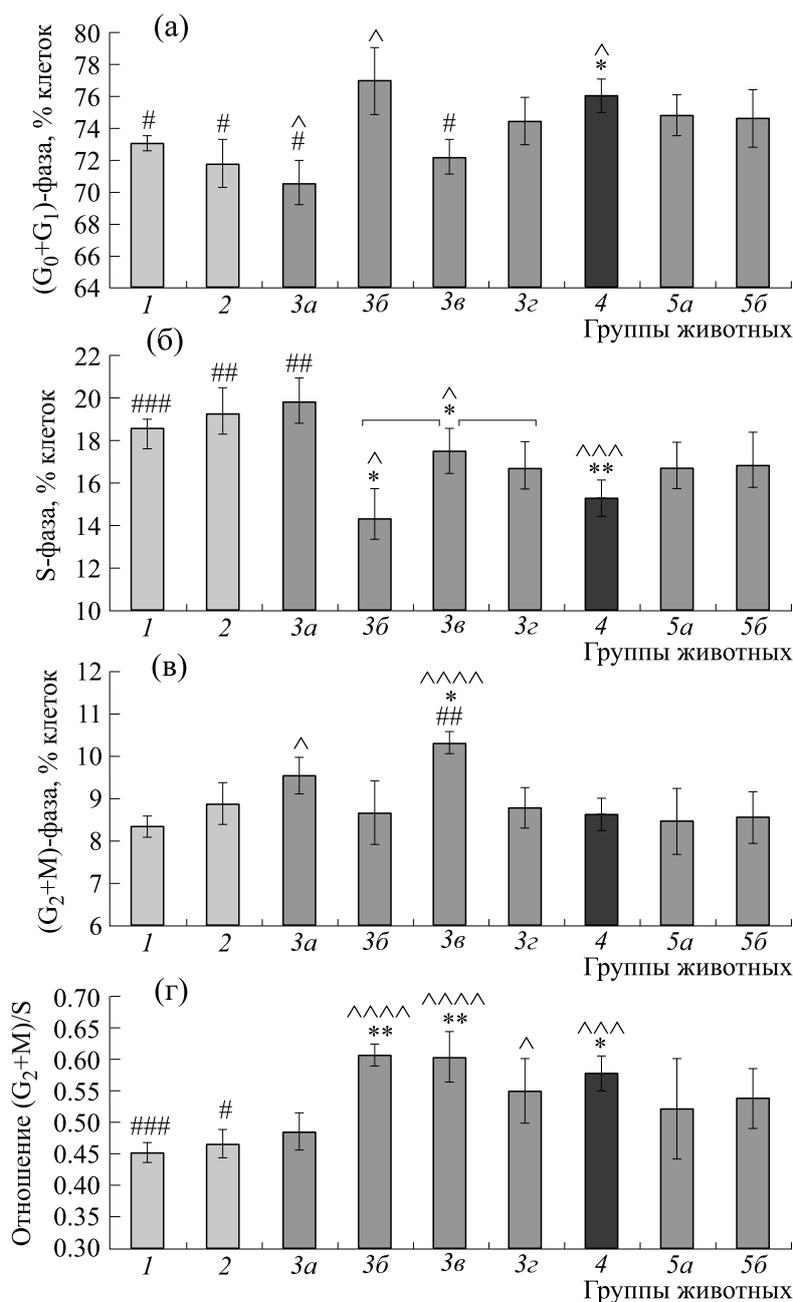
подгруппы: 3a –  $T_T$  в области сердца от 35 до 25°C включительно, 3б –  $T_T$  от 25 до 20°C включительно, 3в –  $T_T$  от 20 до 14°C включительно, 3г –  $T_T$  ниже 14°C. Данные, полученные в группе выходящих из спячки сусликов (группа 5), разделили на две подгруппы: 5a –  $T_T$  до 20°C включительно, 5б –  $T_T$  от 20°C до 31°C.

У входящих в спячку животных с температурой тела не ниже 25°C (подгруппа 3a), распределение клеток костного мозга по фазам клеточного цикла не отличалось от межбавутных активных, для ( $G_0+G_1$ )- и S-фаз сохранялось достоверное различие с группой спящих животных (рис. 1). В интервале температур от 25 до 20°C (подгруппа 3б) наблюдалось снижение доли клеток в S-фаза, увеличение до уровня спящих сусликов – в ( $G_0+G_1$ )-фаза. Отношение ( $G_2+M$ )/S также выросло до уровня спящих животных. При дальнейшем снижении температуры тела, в интервале температур от 20 до 14°C (подгруппа 3в), доля клеток в ( $G_0+G_1$ )-фаза снова становилась достоверно ниже, чем у спящих животных, при этом росла суммарная доля клеток в постсинтетической и митотической фазах ( $G_2+M$ ). Однако отношение ( $G_2+M$ )/S в подгруппах 3б и 3в не менялось. У выходящих из спячки сусликов параметры клеточного цикла не отличались достоверно от остальных групп.

Количество ядерных клеток красного костного мозга у спящих животных снижено по сравнению с летними, у межбавутных активных не отличалось достоверно от спящих и летних (рис. 2).

В сезон гибернации активность орнитиндекарбоксилазы в ткани костного мозга спящих сусликов *U. undulatus* резко, на 87%, снижена по сравнению с межбавутными активными животными. Различия в средних значениях фермента между группами нормотермных животных – летними и межбавутными активными – не были достоверны (рис. 3). При входе сусликов в состояние оцепенения, при температуре тела от 25°C и выше (подгруппа 3a), активность ОДК (в расчете на грамм ткани) не отличается от межбавутных активных животных, в подгруппах 3б-г, когда температура тела ( $T_T$ ) опускается ниже 25°C, активность ОДК достоверно не отличается от уровня спящих животных. У выходящих из спячки сусликов активность фермента остается на уровне спящих (рис. 3).

Выход экстрагируемого белка костного мозга у летних, межбавутных активных и спящих животных не отличался и составлял  $75.0 \pm 2.7$ ,  $70.9 \pm 9.9$  и  $75.8 \pm 5.3$  мг/г ткани соответственно.

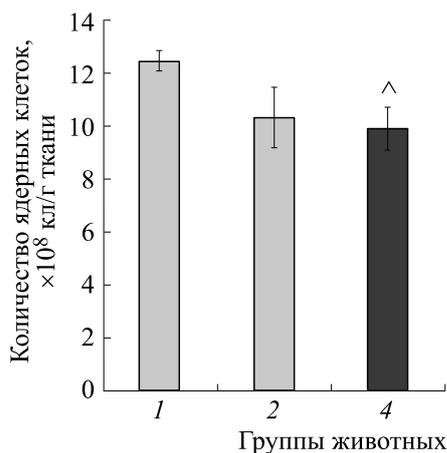


**Рис. 1.** Распределение клеток красного костного мозга сусликов *U. undulatus* по фазам клеточного цикла в летний период и в сезон гибернации. По оси X – обозначения групп животных (в скобках указано количество животных в группе): группа 1 – летние ( $n = 18$ ); группа 2 – межбугорные активные ( $n = 11$ ); 3 – входящие в состояние оцепенения (спячку): группа 3a –  $T_T$  от  $35^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $29.7 \pm 2.0^\circ\text{C}$  ( $n = 6$ ); группа 3б –  $T_T$  от  $25^\circ\text{C}$  включительно до  $20^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $22.1 \pm 0.6^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 3в –  $T_T$  от  $20^\circ\text{C}$  включительно до  $14^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $16.2 \pm 0.7^\circ\text{C}$  ( $n = 8$ ); группа 3г –  $T_T$  от  $14^\circ\text{C}$  включительно и ниже, средняя  $T_T$   $10.1 \pm 0.9^\circ\text{C}$  ( $n = 9$ ); группа 4 – спящие, средняя  $T_T$   $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  ( $n = 18$ ); группа 5 – пробуждающиеся (выходящие из спячки): группа 5a –  $T_T$  до  $20^\circ\text{C}$  включительно, средняя  $T_T$   $12.7 \pm 2.3^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 5б –  $T_T$  от  $20^\circ\text{C}$  до  $31^\circ\text{C}$ , средняя  $T_T$   $28.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$  ( $n = 10$ ). ^ – Различия достоверны по отношению к летним (группа 1) сусликам,  $p < 0.05$ ; ^^^ –  $p < 0.005$ ; ^^^^ –  $p < 0.001$ . \* – Различия достоверны по отношению к межбугорным активным (группа 2) сусликам,  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ . # – Различия достоверны по отношению к спящим (группа 4) сусликам,  $p < 0.05$ ; ## –  $p < 0.01$ ; ### –  $p < 0.005$ .

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Красный костный мозг представляет собой активно пролиферирующую ткань. Это центральный орган кроветворения, в котором из ство-

ловых кроветворных клеток развиваются эритроциты, нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулоциты, моноциты, В-лимфоциты, предшественники Т-лимфоцитов и тром-



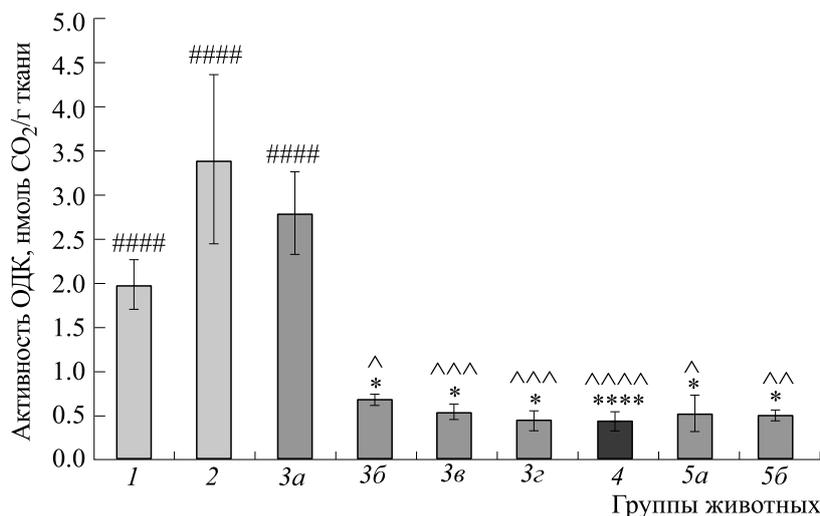
**Рис. 2.** Содержание ядерных клеток в красном костном мозге сусликов *U. undulatus* в летний период и в сезон гибернации. По оси X – обозначения групп животных: группа 1 – летние ( $n = 7$ ), группа 2 – межбаутные активные ( $n = 12$ ), группа 4 – спящие ( $n = 14$ ). ^ – Различия достоверны по отношению к летним (группа 1) сусликам,  $p < 0.05$ .

боциты. Несмотря на гетерогенность популяции клеток красного костного мозга, у человека и лабораторных животных показатели клеточного цикла в норме характеризуются высокой стабильностью и свидетельствуют о скорости пролиферации [34, 35]. Данные параметры у нормотермных сусликов *U. undulatus* в летний период и в сезон гибернации не отличаются по средним значени-

ям (рис. 1), и мы можем предположить, что у межбаутных активных сусликов восстанавливается скорость пролиферации, характерная для летних активных животных. В пользу этого предположения свидетельствует также восстановление активности ОДК до летнего контроля в период межбаутной активности (рис. 3), а также описанное ранее восстановление митотического индекса в красном костном мозге [8].

Параметры клеточного цикла клеток костного мозга сусликов также достаточно стабильны в ходе баутов гибернации, для них характерна небольшая амплитуда колебаний между физиологическими состояниями активности и торпора (рис. 1). Во время торпора наблюдается накопление клеток в ( $G_0+G_1$ )-фазе за счет их снижения в S-фазе.

В состоянии торпора в условиях глубокой гипотермии продвижение по клеточному циклу остановлено или резко замедлено, и сохраняется распределение, которое отражает адаптивные процессы, происходившие на этапе вхождения в спячку при более высоких температурах. Кроме фактора температуры, имеет место активная негативная регуляция клеточного цикла, что представляет собой адаптивную реакцию клеточной системы. К увеличению доли ( $G_0+G_1$ )-фаз может приводить как задержка вступления пролиферирующих клеток в синтетическую фазу (увеличение  $G_1$ ), так и увеличение доли зрелых покоящихся ядерных клеток ( $G_0$ ) в костном мозге. Это мо-



**Рис. 3.** Активность орнитиндекарбоксилазы красного костного мозга сусликов *U. undulatus* в летний период и в сезон гибернации. Обозначения, как на рис. 1, далее указаны отличающиеся параметры: группа 1 – ( $n = 12$ ); группа 2 – ( $n = 7$ ); группа 3a – средняя  $T_T 31.4 \pm 2.8^\circ\text{C}$  ( $n = 4$ ); группа 3б – средняя  $T_T 22.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 3в – средняя  $T_T 16.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$  ( $n = 7$ ); группа 3г – средняя  $T_T 11.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ); группа 4 – средняя  $T_T 3.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$  ( $n = 14$ ); группа 5a – средняя  $T_T 10.9 \pm 1.8^\circ\text{C}$  ( $n = 4$ ); группа 5б – средняя  $T_T 29.4 \pm 1.9^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ). ^ – Различия достоверны по отношению к летним (группа 1) сусликам,  $p < 0.05$ ; ^^ –  $p < 0.01$ ; ^^ –  $p < 0.005$ ; ^^ –  $p < 0.001$ . \* – Различия достоверны по отношению к межбаутным активным (группа 2) сусликам,  $p < 0.05$ ; \*\*\*\* –  $p < 0.001$ . #### – Различия достоверны по отношению к спящим (группа 4) сусликам,  $p < 0.001$ .

жет происходить, в свою очередь, за счет задержки выхода созревших клеток в кровотоки и/или депонирования лейкоцитов крови. При этом следует отметить, что в состоянии торпора общее количество ядерных клеток в костном мозге не увеличивается по сравнению с межбугорными активными животными (рис. 2). По литературным данным, лейкопения у торпидных животных обусловлена депонированием лимфоцитов в периферических лимфоидных органах, но не в селезенке [38, 39], нейтрофилы прикрепляются к стенкам кровеносных сосудов в легких [40, 41]. Отношение  $(G_2+M)/S$  является характеристикой пролиферирующей клеточной популяции и не зависит от возможного изменения содержания в костном мозге зрелых или покоящихся клеток (фаза  $G_0$ ). Увеличение данного отношения в состоянии оцепенения свидетельствует о негативной регуляции клеточного цикла и позволяет говорить о некотором накоплении делящихся клеток у спящих сусликов также и в фазе  $G_2$  (рис. 1), несмотря на отсутствие разницы в доле клеток в фазе  $(G_2+M)$  для общей популяции.

Неблагоприятные условия приводят к задержке клеточного цикла в так называемых контрольных точках (checkpoints) — переходах  $G_1/S$  и  $G_2/M$  [20]. Для клеточных культур млекопитающих, растущих при субфизиологических температурах, характерно накопление клеток преимущественно в фазе  $G_1$ , так как переход  $G_1/S$  наиболее чувствителен к гипотермии и его задержка происходит в интервале температур 33–25°C, который разные авторы определяют как мягкую либо умеренную гипотермию [15, 16, 18, 22]. К задержке клеточного цикла приводит индукция белков p53 и p21. Стабилизация и активация транскрипционного фактора p53 при генотоксическом и негенотоксическом клеточном стрессе приводит, в частности, к экспрессии белков-ингибиторов циклинзависимых киназ семейства p21 (p21, p27 и p57) и задержке клеточного цикла в контрольной точке  $G_1/S$  [21], и в ряде случаев, особенно при генотоксическом стрессе, — к апоптозу. Холодовой стресс приводит к увеличению содержания p53 и p21 (p27) [23, 42] в клеточных культурах и задержке клеточного цикла, однако апоптоз при мягкой/умеренной гипотермии в большинстве случаев ингибируется [15, 24, 43]. Дефицит p53 может предотвращать накопление клеток в  $G_1$ -фазе при гипотермии [23]. В костном мозге тринадцатиполосных сусликов в сезон гibernации в семь раз увеличено количество транскриптов гена-ингибитора циклинзависимой киназы 1A CDKN1A (p21, Cip1); в состоянии оцепенения также была снижена экспрессия генов трех убиквитинлигаз (TOPORS, UBE2L6, RFWD3), которые используют p53 в качестве субстрата, что

может приводить к стабилизации этого цитостатического транскрипционного фактора [12].

При мягкой/умеренной (до 25°C) гипотермии также происходит индукция РНК-связывающих белков, называемых белками холодового шока — CIRBP (CIRP) (cold-inducible RNA binding protein) и RBP3 (RNA binding motif protein 3) [15, 16]. CIRBP может выступать негативным регулятором клеточного цикла [16, 44]. При мягкой гипотермии (32°C) в мышечных фибробластах индуцировалась экспрессия CIRBP и замедлялся рост клеток. Задержка роста клеток при гипотермии частично отменялась при подавлении индукции CIRBP антисмысловыми олигонуклеотидами. Сверхэкспрессия CIRBP вызывала замедление роста при физиологической температуре с накоплением клеток в  $G_1$ -фазе. При температуре 25°C индукция CIRBP снижалась, а при 15°C — не наблюдалась [16, 44]. Эти данные также подтверждают, что наиболее активно адаптивные процессы в клеточных популяциях развиваются при температурах не ниже 25°C. Количество транскриптов гена CIRBP в костном мозге тринадцатиполосных сусликов в сезон гibernации было увеличено по сравнению с летним контролем в 1.4 и 2.3 раза у межбугорных активных (37°C) и спящих (менее 10°C) животных соответственно [12]. Однако отсутствуют данные об экспрессии этого белка в переходные периоды при оптимальной для этого температуре тела около 30°C.

Как мы видим, в костном мозге в интервале температур 25–20°C параметры клеточного цикла ( $G_0+G_1$ )-, S-, ( $G_2+M$ )-фазы, отношение  $(G_2+M)/S$ , уже соответствуют физиологическому состоянию оцепенения (рис. 1). Учитывая инерционность клеточного цикла, это свидетельствует о развитии адаптивных процессов торможения (негативной регуляции) клеточного цикла заранее, в интервале мягкой/умеренной гипотермии и, возможно, до начала падения температуры тела.

Изменения в подгруппе 3в (20–15°C) — вторичное падение доли клеток в  $G_1$  фазе (достоверное, в том числе, по отношению к подгруппе 3б), рост в ( $G_2+M$ ) фазах, тенденция к увеличению S-фазы — могут быть связаны как с продвижением по клеточному циклу с задержкой в контрольной точке  $G_2/M$ , так и с возможным временным снижением содержания в костном мозге зрелых клеток (фаза  $G_0$ ) в этот период. Ранее при входе в спячку в этом же интервале температур мы наблюдали временное снижение содержания ядерных клеток в селезенке сусликов [45].

ОДК — быстро обменивающийся, короткоживущий и динамично регулируемый фермент с периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) в нормальных тканях 10–30 мин [27]. Регуляция ОДК осуществляется

на уровне транскрипции, стабилизации мРНК, трансляции, дегградации фермента, индукции специфичных белков – негативных регуляторов семейства антизимов (AZ), ингибитора антизима (AZI) – и зависит от типа клеток, тканей, характера воздействия [28, 46, 47]. Регуляция экспрессии ОДК и других ферментов метаболизма полиаминов в значительной степени осуществляется на посттранскрипционном уровне [46]. Исследование транскриптома костного мозга тринадцатиполосного суслика [12] не выявило различий в количестве мРНК орнитиндекарбоксилазы (транскрипт гена ODC1) у торпидных и межбаутовых активных животных. Также не было различий в количестве мРНК основного белка – негативного регулятора орнитиндекарбоксилазы антизима 1 и минорного антизима 2 (транскрипты генов OAZ1 и OAZ2 соответственно) ([12], Suppl. fig. 1). Каталитически активным является гомодимер продуктов гена ODC1. Связываясь с мономерами ОДК, антизим разрушает активный реакционный центр фермента и способствуют их быстрой дегградации 26S протеосомой по убиквитин-независимому пути [46]. Мы можем полагать, что регуляция активности ОДК (включая регуляцию экспрессии антизимов) в костном мозге сусликов *U. undulatus* в ходе баутов спячки также осуществляется на посттранскрипционном уровне.

Адаптация на клеточном уровне включена в адаптивные реакции на уровне систем органов и целого организма. Ранее мы показали, что при входе в спячку активность ОДК селезенки сусликов и параметры, связанные с накоплением в селезенке эритроцитов (масса, содержание общего белка, гемоглобина), принимают значения, характерные для торпора, в это же время, когда  $T_T$  падает ниже границы мягкой/умеренной гипотермии до 25–20°C [45]. Таким образом, у входящих в спячку сусликов в органах системы крови – костном мозге и селезенке – параметры, относящихся к биохимическим (активность ОДК), физиологическим (депонирование эритроцитов в селезенке) и клеточным (параметры клеточного цикла) процессам, имеющим разную скорость регуляции, скоординировано приводятся к значениям, характерным для торпора, в один и тот же период. Регулирующие торпор сигналы для этих процессов, по-видимому, индуцируются в разное время заранее, и поэтому, в том числе, развитие торпора не является стремительным, однако обеспечивается оптимальная защита органов, тканей и клеток при прохождении баутов спячки.

Разница в динамике регуляции активности ОДК и клеточного цикла отчетливо проявляется в модели искусственного гипобиоза. У крыс при охлаждении в условиях гипоксии/гиперкапнии быстро развивается гипобиоз, и различные по

скорости адаптивные процессы индуцируются в течение короткого времени. Крысы помещались в закрытый сосуд на три-три с половиной часа при температуре 1–2°C, причем их вход в состояние гипобиоза (с  $T_T$  15–18°C) происходил за еще более короткое время, по мере нарастания гипоксии и гиперкапнии. За это время активность ОДК падала до 20% от контроля в тимусе, до 24% в селезенке [25] и до 6% – в костном мозге [32], при отсутствии сдвигов в распределении тимоцитов и миелокариоцитов по фазам клеточного цикла [25, 32]. После возвращения к стандартным условиям животные выходят из состояния гипобиоза за два-три часа, однако наблюдаются эффекты последствия на клеточном и биохимическом уровне вследствие запущенных ранее процессов. Через 24 и 48 ч после окончания охлаждения у крыс наблюдалось накопление тимоцитов в фазе  $G_1$  со снижением доли S-фазы, и только через 72 ч происходило возвращение к контрольным значениям [25]. Клетки костного мозга крыс демонстрировали устойчивость к последствию гипобиоза, через 24 ч после окончания охлаждения параметры клеточного цикла не отличались от контроля [32]. Активность ОДК в тимусе и костном мозге полностью восстанавливалась через 48 часов [25, 32].

Поскольку в данном исследовании клетки костного мозга сусликов были выделены из плечевых костей передних конечностей, а у крыс из бедренных костей, в планируемых далее экспериментах любопытным представляется сравнение параметров клеточного цикла костного мозга, выделенного также и из бедренных костей сусликов. Интерес в проведении таких исследований связан не только с тем, что бедренные кости являются одним из мест наибольшего сосредоточения красного костного мозга, но и главным образом с тем, что из-за особенностей кровотока разность температур между передней и задней половиной тела в максимальной точке разогрева у гибернантов достигает 14–15°C; при отогреве охлажденных крыс разности температур не наблюдается [48–50].

Механизмы задержки клеточного цикла при гипотермии и дефиците полиаминов сходны [23, 30, 31, 42], однако действие ингибиторов синтеза полиаминов приводит к изменениям параметров клеточного цикла более чем через сутки [31]. При гипобиозе крыс истощение полиаминов может вносить вклад в задержку клеточного цикла тимоцитов, так как снижение и восстановление доли клеток в S-фазе на сутки отстает от соответствующих изменений активности ОДК [25]. У сусликов падение активности ОДК в костном мозге не следует рассматривать причиной задержки вступления клеток в S-фазу, так как эти эффекты наблюдаются в одном интервале времени при входе в

спячку. При рассмотрении адаптивного характера изменений активности ОДК костного мозга, то, что она не включена в негативную регуляцию клеточного цикла при входе сусликов в спячку, может объясняться необходимостью полностью использовать для синтеза полиаминов короткий период эутермии. Снижение активности ОДК может играть роль в клеточной адаптации при выходе из спячки. Активность фермента не растет до достижения животными  $T_T$  30°C (рис. 3). Низкий уровень ОДК при пробуждении животных способствует предупреждению преждевременной стимуляции пролиферации клеток в неблагоприятных условиях при быстром росте температуры и оксигенации, что может приводить к апоптозу. Культивируемые клетки, получившие повреждения в условиях гипотермии, подвергаются апоптозу после возвращения к нормотермии [15–19]. С другой стороны, было показано [51–53], что уменьшение внутриклеточного пула полиаминов при ингибировании ОДК, наряду с задержкой клеточного роста, может вызывать индукцию антиапоптотических факторов и защищать клетки от апоптоза при повреждающих воздействиях.

В целом, приведенные в работе данные укладываются в концепцию, что устойчивость и заблаговременную подготовку пролиферирующих тканей гибернантов к прохождению периодов гипотермии во многом обеспечивает координация системных адаптивных реакций на клеточном и организменном уровне.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями Институтской комиссии по этике и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. V. Carey, M. T. Andrews, and S. L. Martin, *Physiol. Rev.*, **83** (4), 1153 (2003).
2. F. Geiser, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 239 (2004).
3. Q. Guo, X. Mi, X. Sun et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 10509 (2017).
4. Ø. Tøien, K. L. Drew, M. L. Chao, and M. E. Rice, *Am. J. Physiol.*, **281** (2), R572 (2001).
5. T. R. Jinka, Ø. Tøien, and K. L. Drew, *J. Neurosci.*, **31** (30), 10752 (2011).
6. M. S. Vinogradova, *Comp. Biochem. Physiol. A*, **91** (2), 235 (1988).
7. I. I. Kruman, E. N. Ilyasova, S. A. Rudchenko, and Z. S. Khurkhulu, *Comp. Biochem. Physiol. A*, **90** (2), 233 (1988).
8. В. М. Юнкер и Г. В. Алексеева, *Эволюц. биохимия и физиология*, № 2, 193 (1974).
9. E. W. Carlier, *J. Anat. Physiol.*, **27** (Pt 3), nil9, 354 (1893).
10. Г. А. Клевезаль и А. И. Ануфриев, *Зоологич. журн.*, **92** (4), 481 (2013).
11. H. R. Bouma, A. M. Strijkstra, A. S. Boerema, et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **136** (3–4), 319 (2010).
12. S. T. Cooper, S. S. Sell, M. Fahrenkrog, et al., *Physiol. Genomics* **48** (7), 513 (2016).
13. Т. М. Шивачева и А. И. Хаджиолов, *Арх. анат. гистол. эмбриол.*, **92** (5), 48 (1987).
14. Т. М. Shivatcheva and A. I. Hadjioloff, *Dev. Comp. Immunol.*, **11** (4), 791 (1987).
15. M. B. Al-Fageeh and C. M. Smales, *Biochem. J.*, **397** (2), 247 (2006).
16. J. Fujita, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **1** (2), 243 (1999).
17. A. Roobol, M. J. Carden, R. J. Newsam, and C. M. Smales, *FEBS J.*, **276** (1), 286 (2009).
18. T. Neutelings, C. A. Lambert, B. V. Nusgens, et al., *PLoS One*, **8** (7), e69687 (2013).
19. А. К. Гулевский, Ю. С. Ахатова и И. И. Щенявский, *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, **27** (2), 97 (2017).
20. L. Hartwell, in *Cell Cycle Control*, Ed. by C. Hutchison and D. M. Glover, (Oxford University Press, 1995), pp. 1–15.
21. C. W. Anderson, E. Appella, R. Bradshaw, and E. Dennis, in *Regulation in organelle and cell compartment signaling* (New York: Acad. Press, 2011), pp. 235–254.
22. C. L. Rieder and R. W. Cole, *Cell Cycle*, **1** (3), 169 (2002).
23. Z. Matijasevic, J. E. Snyder, and D. B. Ludlum, *Oncol. Res.*, **10**, 605 (1998).
24. A. Moore, J. Mercer, G. Dutina, et al., *Cytotechnology*, **23**, 47 (1997).
25. Г. Е. Аксенова, О. С. Логвинович, Л. А. Фиалковская и др., *Биохимия*, **75** (9), 1257 (2010).
26. H. M. Wallace, A. V. Fraser, and A. Hughes, *Biochem. J.*, **376** (1), 1 (2003).
27. Н. К. Бердинских, С. П. Залеток, *Полиамины и опухолевый рост* (Наук. Думка, Киев, 1985).
28. A. E. Pegg, *J. Biol. Chem.* **281** (21), 14529 (2006).
29. T. Thomas, T. J. Thomas, *Cell. Mol. Life Sci.*, **58** (2), 244 (2001).
30. R. M. Ray, B. J. Zimmerman, S. A. McCormack, et al., *Am. J. Physiol.*, **276** (3), C684 (1999).
31. D. L. Kramer, B.-D. Chang, Y. Chen, et al., *Cancer Res.*, **61** (21), 7754 (2001).
32. I. K. Kolomyitseva, L. N. Markevich, N. I. Perepelkina, et al., in *Hypothermia: prevention, recognition and treatment*, Ed. by J. I.V. Delgado and V. G. F. Garza (Nova Sci. Publ., N.Y., 2012), pp.1–42.

33. V. N. Afanasyev, B. A. Korol, N. P. Matylevich, et al., *Cytometry*, **14** (6), 603 (1993).
34. J. Jänne, and H. G. Williams–Ashman, *J. Biol. Chem.*, **246** (6), 1725 (1971).
35. L. V. Slozhenikina, L. A. Fialkovskaya, and I. K. Kolomiytseva, *Int. J. Radiat. Biol.*, **75** (2), 193 (1999).
36. Г. И. Козинец, В. М. Погорелов, В.М. Котельников и др., *Лаб. дело*, № 7, 3 (1988).
37. Д. А. Шмаров, *Клин. Лаб. диагн.*, № 5, 40 (1993).
38. H. R. Bouma, F. G. M. Kroese, J. W. Kok, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (5), 2052 (2011).
39. C. C. Kurtz and H. V. Carey, *Dev. Comp. Immunol.*, **31** (4), 415 (2007).
40. M. Bohr, A. R. Brooks, and C. C. Kurtz, *Dev. Comp. Immunol.*, **47** (2), 178 (2014).
41. H. R. Bouma, G. J. Dugbartey, A. S. Boerema, et al., *J. Leukoc. Biol.*, **94** (3), 431 (2013).
42. T. Ohnishi, X. Wang, K. Ohnishi, and A. Takahashi, *Oncogene*, **16** (11), 1507 (1998).
43. T. Sakurai, K. Itoh, Y. Liu, et al., *Exp. Cell. Res.*, **309** (2), 264 (2005).
44. H. Nishiyama, K. Itoh, Y. Kaneko, et al., *J. Cell. Biol.*, **137** (4), 899 (1997).
45. Г. Е. Аксенова, О. С. Логвинович, Д. А. Игнатьев и И. К. Коломийцева, *Биофизика*, **63** (2), 311 (2018).
46. S. I. Hayashi and Y. Murakami, *Biochem. J.*, **306** (1), 1 (1995).
47. U. Mangold and E. Leberer, *Biochem. J.*, **385** (1), 21 (2005).
48. G. S. Travlos, *Toxicol. Pathol.*, **34** (5), 548 (2006).
49. R. W. Bullard and G. E. Funkhouser, *Am. J. Physiol.*, **203** (2), 266 (1962).
50. Н. М. Захарова, *Фундаментальные исследования*, **6**, 1401 (2014).
51. H. M. Zhang, J. N. Rao, X. Guo, et al., *J. Biol. Chem.*, **279**, 22539 (2004).
52. S. Bhattacharya, R. M. Ray, and L. R. Johnson, *Biochem J.*, **392**, 335 (2005).
53. P. Kucharewska, J. E. Welch, K. J. Svensson, and M. Belting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380** (2), 413 (2009).

## Cell Cycle Parameters and Ornithine Decarboxylase Activity in the Red Bone Marrow of Hibernating Ground Squirrels *Urocitellus undulatus*

G.E. Aksyonova\*, O.S. Logvinovich\*\*, V.N. Afanasyev\*, and K.I. Lizorkina\*

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

\*\**Gomel State Medical University, ul. Lange 5, Gomel, 246000, Belarus*

During the hibernation season, the values for the parameters of the cell cycle of red bone marrow cells in the hibernating ground squirrels *Urocitellus undulatus*, when they return to an active-like state between periods of torpor and interbout arousal, do not differ from those observed in summer-active animals. In animals that enter a state of torpor, the cumulative percentage of cells in the resting phase (G0 phase) and pre-synthesis phase (G1 phase) increased from 71.8 to 76.0%, the percentage of cells in the synthesis phase (S phase) decreased from 19.3 to 15.3% compared to those animals that return to an active-like state between periods of torpor and interbout arousal. The cumulative percentage of cells in the post DNA synthesis phase (G2 phase) and mitosis (M) does not change, but (G2 + M)/S ratio increases. When animals enter a state of torpor, changes in parameter values are observed when the animal's body temperature drops below 25°C, this effect refers to a system whose thermal relaxation time is a nonmonotonic function of the initial temperature. The activity of the key enzyme of polyamine synthesis ornithine decarboxylase, a marker of cell activation and proliferation during interbout arousal does not significantly differ from that observed in summer-active animals; the enzymatic activity decreases sharply, when animals decrease their body temperature below 25°C and enter a state of torpor, and this activity remains at a low level during hibernation and arousal until body temperature reaches 30°C. The role of changes in the parameter values associated with proliferative activity in adaptation of hematopoietic tissue during hibernation of the Yakutian ground squirrel is discussed.

*Keywords: hibernation, bone marrow, cell cycle, proliferation, ornithine decarboxylase*

УДК 577.23

## СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИНА И ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТА НА КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ N1E-115 (КЛОН C-1300)

© 2023 г. С.Н. Мякишева\*.,# , Ю.Л. Бабурина\*\*, М.И. Кобякова\*\*, Р.Р. Крестинин\*\*,  
Л.Д. Сотникова\*\*, О.В. Крестинина\*\*.,##

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

#E-mail: \*myakisheva@mail.ru

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

##E-mail: \*ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023 г.

После доработки 07.07.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Изучено действие диэтилдителиокарбамата натрия, мелатонина и их совместного применения на пролиферативную активность, изменение цитозольного  $Ca^{2+}$ , мембранного потенциала и продукции активных форм кислорода в культуре клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). Было показано, что диэтилдителиокарбамат натрия и мелатонин ингибируют пролиферацию и усиливают дифференцировку клеток. При этом содержание анти-апоптотического белка Bcl-2 снижается, тогда как содержание про-апоптотического белка Bax повышается, что может предполагать запуск апоптотического каскада. Однако применение этих двух препаратов совместно не усиливало наблюдаемые эффекты. Видимо, механизмы, благодаря которым диэтилдителиокарбаматы и мелатонин действуют на клетки, различны.

*Ключевые слова:* диэтилдителиокарбамат натрия, мелатонин, пролиферация, дифференцировка, субъединицы комплексов дыхательной цепи митохондрий, продукция активных форм кислорода, митохондриальный мембранный потенциал, цитозольный кальций.

DOI: 10.31857/S0006302923050186, EDN: NAZGQY

Дителиокарбаматы являются хелаторами металлов на основе серы, которые содержат дителиокарбоксильную функциональную группу, конъюгированную с алифатической вторичной аминогруппой [1]. Дителиокарбаматы способны оказывать как прооксидантные, так и антиоксидантные эффекты в биологических системах [2]. Они широко применяются в качестве сельскохозяйственных инсектицидов, гербицидов и фунгицидов [3]. Обнаружены нейропротекторные, антимикробные и иммуномодулирующие свойства дителиокарбаматов. Дителиокарбаматы применяются в качестве спиновой ловушки нитрооксидного радикала NO в онкологических исследованиях. Более того, было показано, что в клетках нейробластомы SH-SY5Y дителиокарбаматы снижают жиз-

неспособность клеток, запускают апоптоз нейронов, индуцируют митохондриальную дисфункцию и генерируют продукцию активных форм кислорода (АФК) в дозозависимой манере. Дителиокарбаматы индуцировали апоптоз в клетках нейробластомы, повышая внутриклеточный уровень меди, запускающий высвобождение цитохрома c и активацию каспазы [1, 4]. В настоящее время дителиокарбаматы изучаются в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов в сочетании с другими лекарственными препаратами. Возможный синергизм или антагонизм дителиокарбаматов в сочетании с другими лекарственными препаратами может представлять интерес для исследования. Недавно мы исследовали совместное действие дителиокарбамата и B12b и заключили, что применение этих препаратов оказывает синергическое токсическое действие на опухолевые клетки (HEp-2), вызывая выраженный стресс эндоплазматического ретикула, обширную вакуолизацию и ингибирование апопто-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ДК – дителиокарбамат натрия, PBS – фосфатно-солевой буфер, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, NSE – нейронспецифическая енолаза (neuron specific enolase).

за, что в конечном итоге приводит к индукции параптозоподобной гибели клеток [5].

В последние несколько лет в качестве лекарственного препарата, используемого в противоопухолевой терапии, применяется производное биогенного амина серотонина – эпифизарный гормон N-ацетил-5-метокситриптамин (мелатонин). Амфифильные характеристики мелатонина позволяют ему достигать любого участка клетки или биологической жидкости [6]. Было показано, что мелатонин участвует в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки [7]. В наших исследованиях на культурах опухолевых клеток было обнаружено, что мелатонин обладает противоопухолевым действием [8–12].

Целью настоящего исследования было изучить влияние дитиокарбамата натрия (ДК) и мелатонина на пролиферативную активность, изменение цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , мембранного потенциала и продукции АФК в клетках нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные культуры и условия культивирования.** Исследования проводили на культуре клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300), полученной из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки нейробластомы культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки (fetal bovine serum, Flow Laboratories, Великобритания) при 37°C, в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . В экспериментах в качестве контроля использовали среду DMEM без сыворотки и экспериментальную среду DMEM без сыворотки с добавлением диэтилдитиокарбамата натрия в концентрации  $10^{-6}$  М и мелатонина в концентрации  $10^{-5}$  М. Исследуемые препараты добавляли в культуру в логарифмической фазе роста через 24 ч после посева клеток во флаконы. Подсчет клеток проводили в девяти произвольно выбранных областях флакона. В контрольной и экспериментальной группах было не менее трех флаконов в каждой. Плотность посева в пластиковых флаконах объемом 50 мл составляла  $5.5 \cdot 10^3$  клеток на  $\text{см}^2$  при объеме среды 5 мл.

**Оценка цитотоксического действия исследуемых препаратов на клетки нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300).** Жизнеспособность клеток оценивали с использованием метода извлечения резазурина. Клетки с плотностью  $5 \cdot 10^3$  клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч клетки обрабатывали мелатонином (Sigma-Aldrich, США) ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) или ДК (Sigma-Aldrich, США) ( $10^{-7}$ – $10^{-3}$  М). Через 24 ч

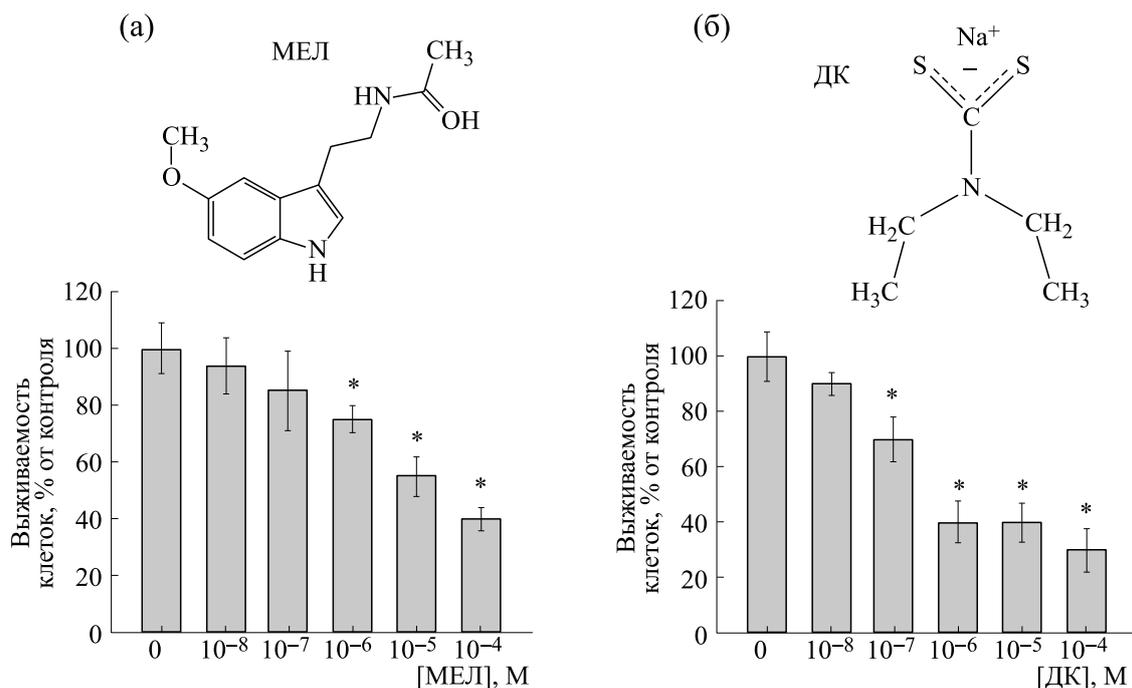
после добавления исследуемых веществ в каждую лунку добавляли резазурин (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 4 ч в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. Флуоресцентный анализ проводили на устройстве для считывания микропланшетов Infinite F200 (Tecan, Швейцария) при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны испускания 595 нм.

**Измерение внутриклеточной продукции активных форм кислорода.** Продукцию АФК измеряли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich, США) (длина волны возбуждения 485 нм, длина волны испускания 530 нм). Для анализа продукции АФК в клетке ( $5 \cdot 10^5$  клеток/мл) добавляли 10 мкМ красителя, после чего клетки инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение 10 мин. После этого клетки однократно промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS).  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. Измерение окислительной активности проводили на проточном цитометре BD Accuri C6 (Biosciences, США).

**Измерение митохондриального мембранного потенциала.** Для анализа митохондриального потенциала использовали флуоресцентный краситель 3,3'-дигексилосакарбонцианин йодид DiOC6(3) (Sigma-Aldrich, США) (длина волны возбуждения 482 нм, длина волны испускания 501 нм). К клеточной суспензии ( $5 \cdot 10^5$  клеток/мл) добавляли 10 нМ красителя и инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение 30 мин. После этого клетки однократно промывали в PBS. Валиномицин (250 нМ) использовали в качестве положительного контроля. Изменение мембранного потенциала измеряли на проточном цитометре BD Accuri C6 (Biosciences, США).

**Измерение содержания цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ .** Изменение содержания цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  проводили с помощью флуоресцентного красителя Fluo-4 AM (Sigma-Aldrich, США) (длина волны возбуждения 494 нм, длина волны испускания 516 нм). Для оценки изменения содержания цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $5 \cdot 10^5$  клеток/мл) клеток отмывали в PBS. К клеточной суспензии добавляли Fluo-4 AM (2 мкМ) и инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение 30 мин. После окрашивания клетки дважды промывали PBS. Содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле измеряли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (Biosciences, США).

**Электрофорез и вестерн-блоттинг.** К клеточной суспензии добавляли выбранные количества мелатонина ( $10^{-5}$  М) и ДК ( $10^{-6}$  М). Через 24 ч клетки дважды промывали ледяным PBS и центрифугировали при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок



**Рис. 1.** Зависимость жизнеспособности клеток нейробластомы мыши N1E-115 от концентрации мелатонина (а) и дитиокарбоната натрия (б). Долю живых клеток определяли через 24 ч после добавления препаратов и интенсивности восстановления резазурина. Количество клеток интактной культуры (без обработки препаратами) принимали за 100%. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ( $n = 6$ ), \* $p < 0.05$  – достоверная разница по сравнению с контролем.

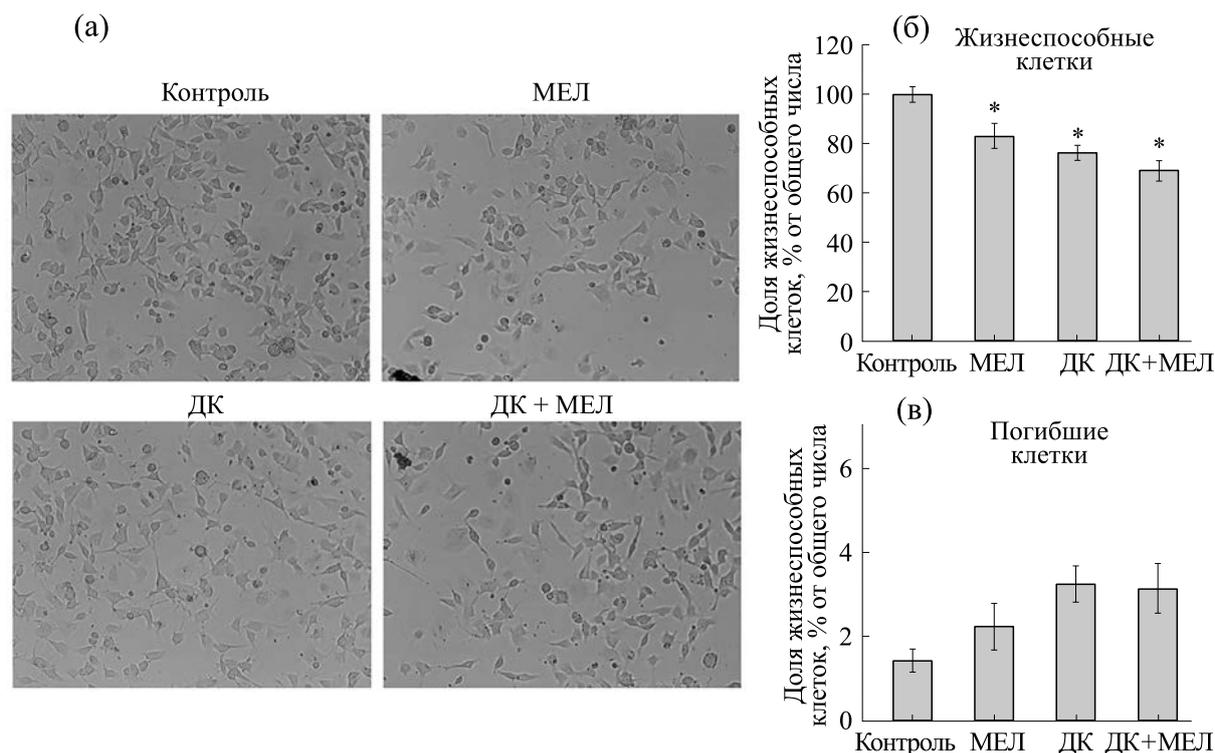
солюбилизировали в лизирующем буфере (RIPA) с добавлением ингибиторов протеиназ/фосфатаз, держали во льду в течение 30 минут и центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка в супернатантах измеряли по методу Брэдфорда. Полученные образцы растворяли в буфере для образцов по Лэммли (Bio-Rad, США) и нагревали до 95°C в течение 5 мин. Полученные лизаты разделяли на белки с помощью электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле. Затем белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) с помощью метода вестерн-блоттинга. Мембрану блокировали в растворе Roti-block (Carl Roth GmbH, Германия) при комнатной температуре в течение одного часа. Затем мембрану промывали водой и инкубировали с первичными антителами, как описано в инструкции. Изменения в уровнях основных субъединиц электронно-транспортной цепи определяли с помощью коктейля антител Total Oxphos Rodent WB Antibody Cocktail (моноклональные антитела). Коктейль антител Oxphos состоит из альфа-субъединицы комплекса V (CV-ATP5A – 55 кДа), цитохрома *b-c1 complex subunit 2* комплекса III (CIII-UQCRC2-48 кДа), сукцинатдегидрогеназы комплекса II (CII-SDHB – 30 кДа), NADH:убихинон оксидоредуктазы Complex Assembly Factor 8 – 20 кДа комплекса I (CI-NDUFB8). Моноклональные антитела к Vcl-2 были произведе-

ны в компании Santa Cruz Biotechnology (США), моноклональные антитела к Вах – в компании Abcam (Великобритания). Для нормализации белка использовали анти-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) (Cell Signaling, США). Белковые полосы иницировали с использованием системы обнаружения ECL (ChemiDoc Touch Imaging System, Bio-Rad, США).

**Статистический анализ.** Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ и соответствующий апостериорный анализ (Стьюдента–Ньюмена–Кеулса). Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чтобы выявить цитотоксическое действие препаратов, клетки нейробластомы мыши N1E-115 культивировали в течение 24 ч с различными концентрациями мелатонина (от 10<sup>-8</sup> до 10<sup>-3</sup> М) и ДК (от 10<sup>-7</sup> до 10<sup>-4</sup> М) (рис. 1). На рис. 1а показана структурная формула мелатонина и диаграмма, отражающая жизнеспособность клеток. Мелатонин при концентрации 10<sup>-8</sup> и 10<sup>-7</sup> М не оказывал влияния на жизнеспособность клеток нейробластомы мыши. Однако при концентрации мелатонина от 10<sup>-6</sup> до 10<sup>-4</sup> М жизнеспособ-



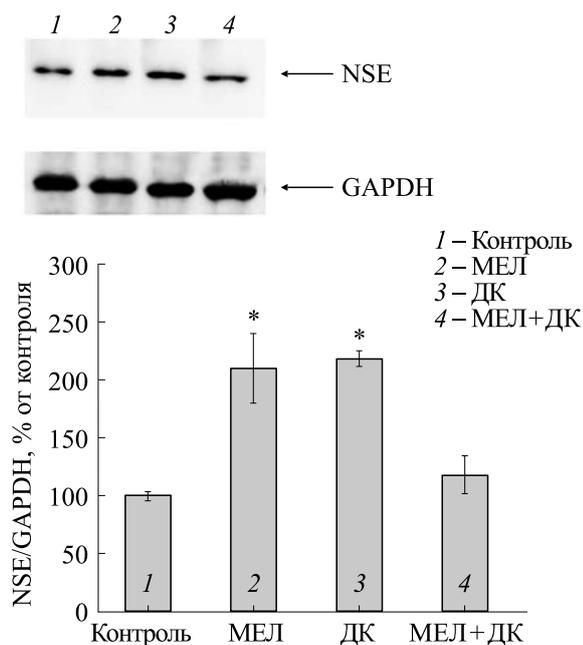
**Рис. 2.** Морфологический статус культуры нейробластомы мыши N1E-115 при инкубации с мелатонином ( $10^{-5}$  М), дитиокарбоматом натрия ( $10^{-6}$  М) и их совместным действием через 24 ч культивирования: (а) – микрофотографии клеток с исследуемыми веществами; (б) – изменение количества жизнеспособных клеток после 24 ч культивирования в средах, содержащих мелатонин и ДК; (в) – изменение количества погибших клеток. Количественные изменения отображены в процентах относительно общего количества клеток. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 6$ ); \* $p < 0.05$  – достоверная разница по сравнению с контролем.

ность клеток снижалась на 25, 45 и 60% соответственно относительно контроля. Аналогичным образом мы подобрали нетоксичную концентрацию ДК (рис. 16). Из рисунка видно, что ДК при  $10^{-7}$  М не оказывал влияния на жизнеспособность клеток нейробластомы, тогда как с увеличением концентрации от  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  М жизнеспособность клеток снижалась на 25, 60 и 70% соответственно. Поскольку жизнеспособность клеток снижалась почти на 50% при воздействии мелатонина в концентрации  $10^{-5}$  М и ДК в концентрации  $10^{-6}$  М, эти концентрации препаратов мы использовали для дальнейшего исследования.

На следующем этапе исследования изучали изменение пролиферации в клетках нейробластомы мыши N1E-115 в наших экспериментальных условиях (рис. 2). Было выявлено, что культивирование клеток с мелатонином в течение 24 ч приводило к снижению прироста клеток на 20% (рис. 2а), тогда как ДК снижал число жизнеспособных клеток на 25%. Обработка клеток совместно с мелатонином и ДК позволила снизить число живых клеток на 30% относительно контроля. Стоит отметить, что число погибших кле-

ток во всех изучаемых условиях было незначительным и не отличалось от контроля (рис. 2б).

Известно, что белок нейронспецифическая енолаза (NSE) считается одной из структурных разновидностей фермента енолазы. Клетки нейробластомы характеризуются высоким потенциалом дифференцировки *in vivo* и *in vitro* и поэтому представляют собой идеальную модель для изучения модуляции экспрессии специфических молекул во время дифференцировки нейронов. В качестве маркера дифференцировки используется NSE [13]. На рис. 3 показано изменение содержания NSE в клетках нейробластомы мыши в присутствии мелатонина и ДК и их совместное действие через 24 ч культивирования. Верхняя часть рисунка – вестерн-блот, окрашенный антителами к NSE и GAPDH, нижняя часть отражает количественную характеристику изменения фермента как соотношение NSE к GAPDH. Из рис. 3 видно, что мелатонин повышал содержание белка на 40%, тогда как ДК – на 50% по сравнению с контролем. Совместное действие мелатонина и ДК не изменяло уровня белка относительно контроля.



**Рис. 3.** Влияние мелатонина и ДК на изменение содержания нейронспецифичной енолазы в клетках нейробластомы мыши N1E-115: (а) – иммуноокрашивание антителами к NSE и GAPDH в клетках нейробластомы; (б) – диаграмма, количественно отражающая изменения содержания белка, нормированного на GAPDH (в % от контроля). Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные по трем независимым экспериментам представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, \* $p < 0.05$  – достоверное различие по сравнению с контролем.

Далее мы проанализировали изменение уровня основных субъединиц комплексов ЭТЦ в клетках нейробластомы мыши в наших экспериментальных условиях. На рис. 4 показан вестерн-блот, окрашенный антителами к OXPHOS и представлены количественные изменения как соотношении белков к GAPDH. Из рисунка видно, что мелатонин повышал содержание субъединицы АТФазы АТР5А на 50%, тогда как ДК – на 25%. При совместном действии уровень субъединицы АТР5А увеличивался на 40% по сравнению с контролем (рис. 4б). Содержание субъединицы UQCRC2 комплекса III (рис. 4в) в присутствии мелатонина не изменялось по сравнению с контролем, в то время как ДК повышал уровень субъединицы на 25%, а при совместном применении двух препаратов – на 23%. Содержание субъединицы SDHB комплекса II под действием мелатонина не изменялось, ДК снижал ее на 40%, тогда как при их совместном использовании уровень субъединицы не изменялся по сравнению с контролем (рис. 4г). Мелатонин снижал уровень субъединицы NDUFB8 комплекса I на 25%, а ДК – на 30%. При совместном действии мелато-

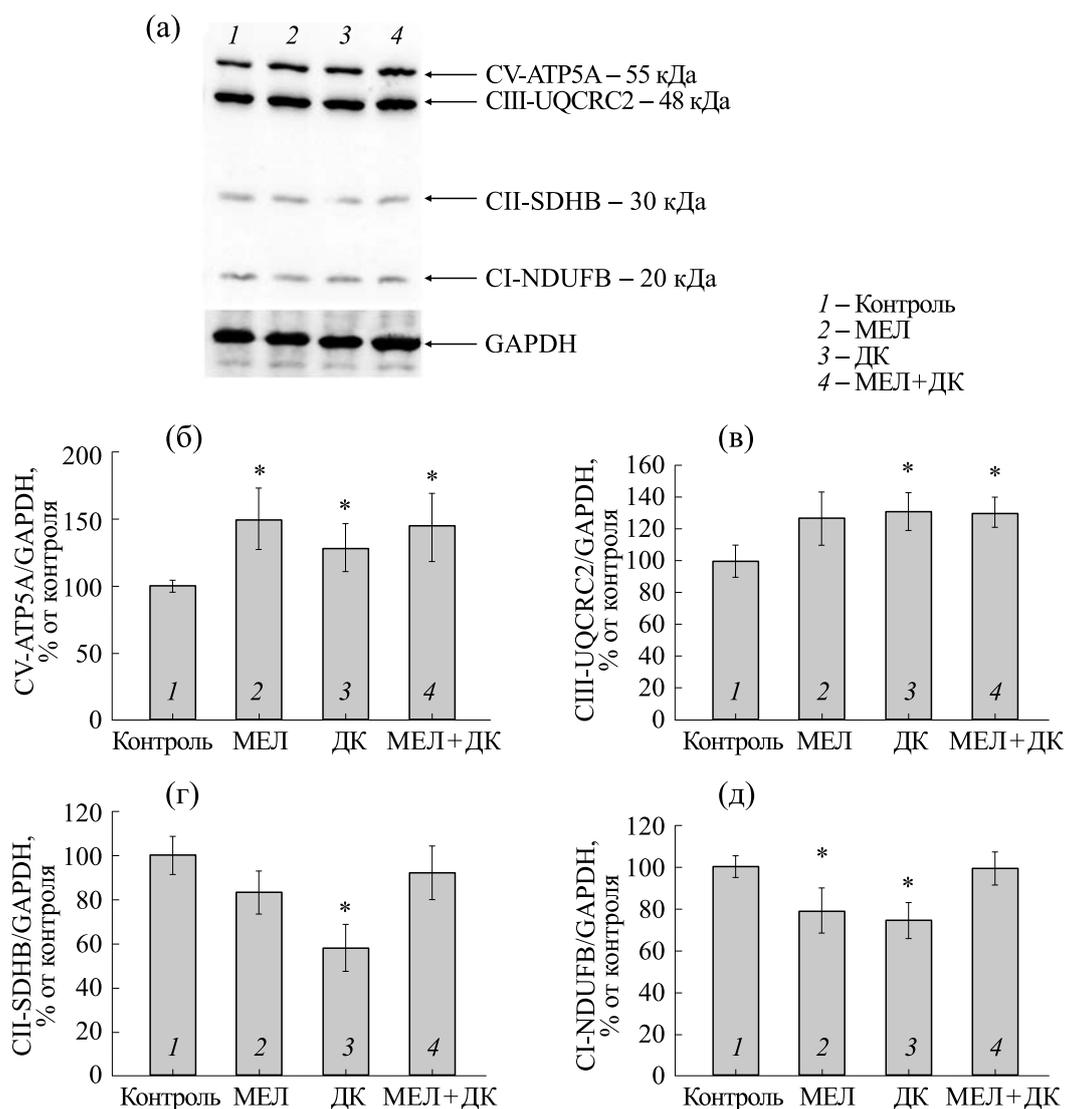
нина и ДК содержание NDUFB8 не изменялось по сравнению с контролем (рис. 4д).

На следующем этапе мы исследовали влияние мелатонина и ДК на изменение митохондриального мембранного потенциала  $\Delta\Psi_m$ , продукции АФК и цитозольного  $Ca^{2+}$  (рис. 5) в клетках нейробластомы мыши. Валиномицин (250 нМ),  $H_2O_2$  и туникамицин использовали соответственно в качестве положительного контроля. Мелатонин снижал  $\Delta\Psi_m$  в 6 раз, ДК – на 50% по сравнению с контролем, тогда как при совместном применении мелатонина и ДК эффект не наблюдался (рис. 5а). При обработке клеток мелатонином продукция АФК снижалась на 50%, в то время как ДК не изменял этот параметр по сравнению с контролем. При совместном действии мелатонина и ДК продукция АФК увеличивалась в 6 раз по сравнению с контролем (рис. 5б). Содержание цитозольного  $Ca^{2+}$  снижалось на 10% в присутствии мелатонина, на 15% в присутствии ДК и не изменялось при совместном использовании этих двух препаратов (рис. 5в).

Известно, что мелатонин способен модулировать индукцию апоптоза в различных типах клеточных линий, поэтому мы проверили изменение содержания анти- и проапоптотических белков, таких как соответственно Bcl-2 и Bax, в наших экспериментальных условиях в клетках нейробластомы. На рис. 6 показаны вестерн-блоты, окрашенные антителами к Bcl-2 и Bax. GAPDH использовали как контроль белковой нагрузки. Количественные характеристики представлены как соотношение оптической плотности белков к GAPDH. Из рисунка видно, что мелатонин снижал содержание Bcl-2 на 35% и повышал Bax в 2 раза по сравнению с контролем. Уровень Bcl-2 снижался на 50% в присутствии ДК, а уровень Bax – в 3 раза по сравнению с контролем. При совместном использовании препаратов мы заметили, что мелатонин снижал содержание Bcl-2 на 80%, тогда как содержание Bax повышалось в 2 раза.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Совместное использование препаратов, направленных на снижение/повышение пролиферативной активности представляет собой многообещающий терапевтический подход к заболеваниям различной природы. Так недавно было установлено, что дитиокарбамат, который считается хелатором ионов тяжелых металлов [2], в комплексе с другим членом тиолсодержащего препарата может применяться в антираковой терапии [14–16]. Другим препаратом, широко используемым в последнее время в онкологической практике как дополнение к общеизвестным химиотерапевтическим препаратам, является мела-

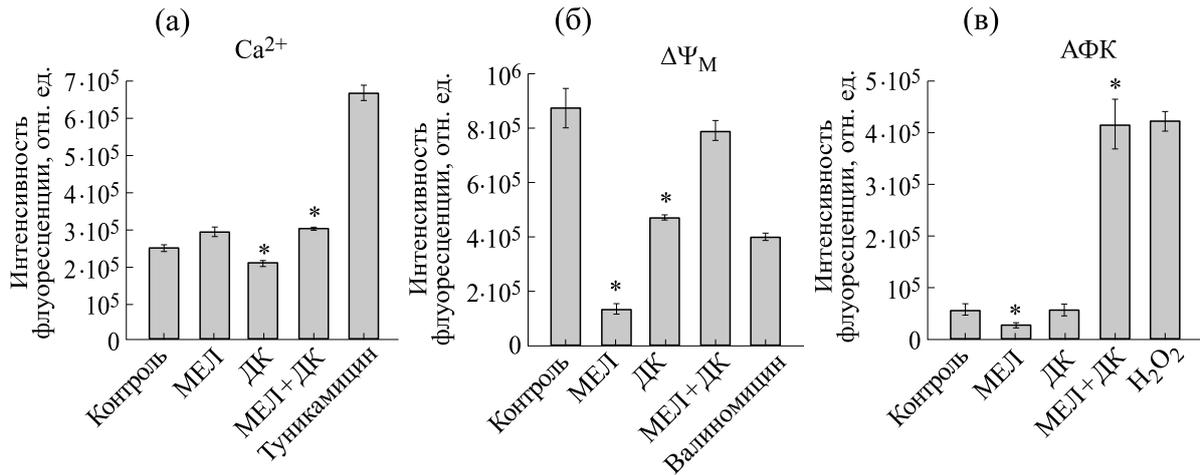


**Рис. 4.** Влияние мелатонина и ДК на изменение уровней основных субъединиц комплексов дыхательной цепи в клетках нейробластомы мыши N1E-115. GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки: (а) – иммуноокрашивание коктейлем антител OXPHOS и GAPDH (контроль белковой нагрузки); (б) – количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии. Данные по трем независимым экспериментам представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, \* $p < 0.05$  – достоверное различие по сравнению с контролем.

тонин [17]. В настоящем исследовании, мы выяснили, способны ли ДК и мелатонин, применяемые совместно, усиливать свои действия в клетках нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300). Мы наблюдали, что ДК и мелатонин тормозили пролиферацию как по отдельности, так и совместно, причем совместное использование этих двух препаратов не усиливало торможение пролиферации.

Клеточная дифференцировка представляет собой процесс, в результате которого клетка становится специализированной, т.е. приобретает химические, морфологические и функциональные особенности. Культура клеток нейробласто-

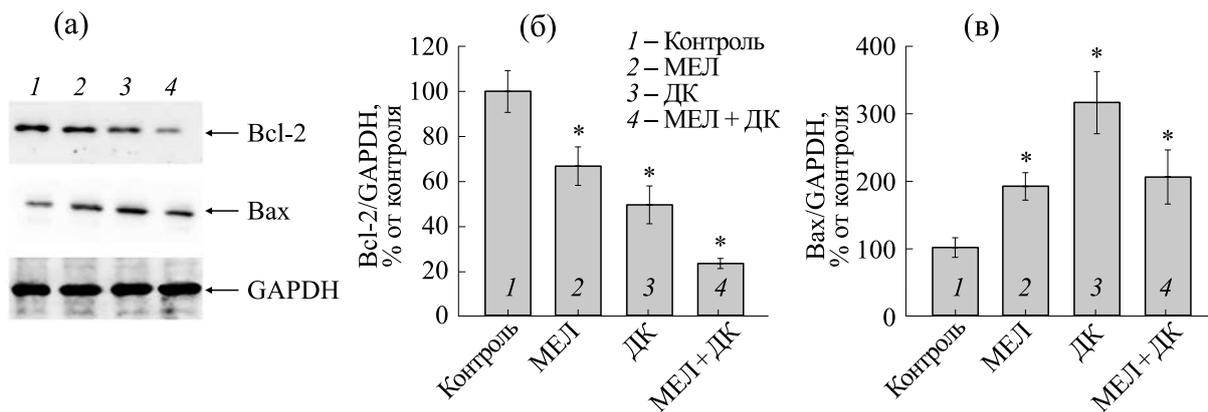
мы мыши N1E-115 (клон С-1300) при определенных условиях способствует дифференцировке нейрона, демонстрирует синтез нейромедиаторов и специфических ферментов, наличие электрической и химической возбудимости [18]. Более того, показано, что мелатонин усиливает клеточную пролиферацию и способствует дифференцировке [7, 19]. В наших экспериментальных условиях мы наблюдали, что как мелатонин, так и ДК усиливали клеточную дифференцировку (рис. 3) по сравнению с контролем, однако при их совместном использовании значения не отличались от контрольных.



**Рис. 5.** Влияние мелатонина и ДК на изменение содержания цитозольного Ca<sup>2+</sup>, митохондриального мембранного потенциала (ΔΨ<sub>М</sub>) и внутриклеточной продукции АФК в клетках нейробластомы мыши N1E-115: (а) — изменение содержания цитозольного Ca<sup>2+</sup> туникамицин использовали в качестве положительного контроля; (б) — изменение ΔΨ<sub>М</sub>, валиномицин использовали в качестве положительного контроля; (в) — изменение внутриклеточной продукции АФК, Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> использовали в качестве положительного контроля. Данные по трем независимым экспериментам представлены в виде среднего ± стандартное отклонение, \**p* < 0.05 — достоверное различие по сравнению с контролем.

Известно, что на изменение концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитозоле активно реагируют различные органеллы клетки, в первую очередь митохондрии [20]. Накопление сверхпорогового Ca<sup>2+</sup> в матриксе митохондрий может привести к различным нарушениям, таким как снижение мембранного потенциала и повышение продукции АФК, и тем самым вызвать окислительный стресс [21–23]. Сообщалось, что в опухолевых клетках мелатонин инициирует апоптоз и увеличивает клеточное содержание АФК [24, 25], что сопровождается снижением митохондриального потенциала

[26–28]. Согласно полученным результатам, мелатонин повышал содержание цитозольного Ca<sup>2+</sup> по сравнению с контролем, при этом мы наблюдали драматичное снижение ΔΨ<sub>М</sub> и снижение АФК в клетках нейробластомы. В этих условиях в присутствии ДК происходило уменьшение цитозольного Ca<sup>2+</sup> и ΔΨ<sub>М</sub>, тогда как внутриклеточная продукция АФК не отличалась от контроля. Совместное применение мелатонина и ДК приводило к повышению цитозольного Ca<sup>2+</sup>, снижению ΔΨ<sub>М</sub> и драматичному повышению продукции



**Рис. 6.** Влияние мелатонина и ДК на изменение уровней апоптотических белков в клетках нейробластомы мыши N1E-115: (а) — иммуноокрашивание антителами к Bcl-2, Bax и GAPDH (контроль белковой нагрузки); (б) — количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, представленное как соотношение Bcl-2 к GAPDH; (в) — количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, представленное как соотношение Bax к GAPDH. Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные по трем независимым экспериментам представлены в виде среднего ± стандартное отклонение, \**p* < 0.05 — достоверная разница по сравнению с контролем.

АФК. По-видимому, повышение содержания  $\text{Ca}^{2+}$  при комбинированном применении мелатонина и ДК было обусловлено действием мелатонина, тогда как снижение  $\Delta\Psi_m$  было менее значительным, чем при действии препаратов по отдельности. Вероятно, механизмы действия мелатонина и ДК по отдельности и при совместном их применении различны.

Как известно, мутации в раковых клетках, затрагивающие субъединицы дыхательной цепи, указывают на центральную роль окислительного фосфорилирования в онкогенезе. Недавние исследования показали, что такие мутации комплексов дыхательной цепи влияют на индукцию апоптоза [29]. Митохондриальная дыхательная цепь состоит из четырех связанных с мембраной мультимерных комплексов и катализирует окисление восстанавливающих эквивалентов, в основном никотинамидадениндинуклеотида (НАДН), используя терминальный акцептор электронов кислород ( $\text{O}_2$ ) во внутренней митохондриальной мембране [30]. Перенос электронов по дыхательной цепи завершается конечным комплексом АТФ-синтазой (комплекс V), который генерирует АТФ. Следует отметить, что утечка электронов может возникать на всем протяжении дыхательной цепи и приводить к образованию АФК. Ингибирование митохондриального дыхания является одной из стратегий по усилению индуцированного лекарственными средствами апоптоза в различных типах раковых клеток [31]. Полученные нами результаты показывают, что содержание субъединицы комплекса V повышалось при действии ДК, мелатонина и при их совместном применении, тогда как уровень субъединицы комплекса III повышался при действии ДК и совместно ДК с мелатонином. ДК ингибировал содержание субъединицы комплекса II, хотя ни мелатонин, ни совместное применение не оказывали влияние на изменение субъединицы комплекса II. Содержание субъединицы комплекса I снижалось в присутствии мелатонина и ДК, но их совместное добавление не отличалось от контроля.

Семейство Bcl-2 представляет собой наиболее охарактеризованное семейство белков, участвующих в регуляции апоптотической гибели клеток, состоящее из антиапоптотических и проапоптотических членов. Это белковое семейство включает как ингибиторы, так и индукторы клеточной гибели. Вместе они регулируют процессы, митохондриального внутреннего апоптоза, приводящие к гибели клеток. Этот путь необходим для нормального эмбрионального развития и для предотвращения рака [32]. Мы исследовали изменение содержания антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического Bax. Согласно полученным результатам как ДК, так и мелатонин по-

вышали содержание Bcl-2, причем их совместное применение усиливало этот эффект. Что касается изменения Bax, то и ДК, и мелатонин повышали содержание Bax, тогда как при их совместном применении усиление эффекта не наблюдалось.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили действие ДК, мелатонина и их совместное применение на культуру клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). Несмотря на то, что оба препарата ингибируют пролиферацию и усиливают дифференцировку, а также повышают содержание проапоптотического белка и снижают уровень антиапоптотического белка, что предполагает запуск апоптотического каскада, мы наблюдали, что по отдельности эти препараты обладают более сильными эффектами, чем при совместном применении. Мы предполагаем, что поскольку ДК и мелатонин не усиливают действия друг друга, по-видимому, механизмы их действия различны, поэтому их совместное применение в культуре клеток нейробластомы N1E-115 (клон C-1300) нецелесообразно.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№№ 075-01025-23-01 и 075-00957-23-00).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. C. Matias, T. M. Manieri, S. S. Cipriano, et al., *Toxicol. In Vitro*, **27** (1), 349 (2013).
2. C. I. Nobel, M. Kimland, B. Lind, et al., *J. Biol. Chem.*, **270** (44), 26202 (1995).
3. O. M. Viquez, H. L. Valentine, K. Amarnath, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **229** (1), 77 (2008).
4. C. Liu, Z. Liu, Y. Fang, et al., *Environ. Int.*, **171**, 107696 (2023).
5. M. Solovieva, Y. Shatalin, R. Fadeev, et al., *Biomolecules*, **10** (1), 69 (2020).
6. A. Menendez-Pelaez, R. Reiter, *J. Pineal Res.*, **15** (2), 59 (1993).
7. S. Cos, R. Verduga, C. Fernandez-Viadero, et al., *Neurosci. Lett.*, **216** (2), 113 (1996).

8. Y. Baburina, A. Lomovsky, and O. Krestinina, *J. Pers. Med.*, **11** (4), N274 (2021).
9. A. Lomovsky, Y. Baburina, I. Odinkova, et al., *Antioxidants (Basel)*, **9** (11), (2020).
10. A. I. Lomovsky, Y. L. Baburina, R. S. Fadeev, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **88** (1), 73 (2023).
11. А. И. Ломовский, Ю. Л. Бабурина, М. И. Кобякова и др., *Биол. мембраны*, **37** (2), 103 (2020).
12. О. В. Крестинина, С. Н. Мякишева, Ю. Л. Бабурина и др., *Нейрохимия*, **34** (1), 41 (2017).
13. V. Matranga, D. Oliva, S. Sciarrino, et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, **13** (2), 137 (1993).
14. M. E. Solovieva, Y. V. Shatalin, V. V. Solovyev, et al., *Redox Biol.*, **20**, 28 (2019).
15. I. Ali, W. A. Wani, K. Saleem, and M.-F. Hseih, *Polyhedron*, **56**, 134 (2013).
16. M. Altaf, M. Monim-UI-Mehboob, A. N. Kawde, et al., *Oncotarget*, **8** (1), 490 (2017).
17. W. H. Talib, A. R. Alsayed, A. Abuawad, et al., *Molecules*, **26** (9), 2506 (2021).
18. T. Amano, E. Richelson, and M. Nirenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69** (1), 258 (1972).
19. W. J. Lee, L. C. Chen, J. H. Lin, et al., *Cancer Medicine*, **8** (10), 4821 (2019).
20. C. Giorgi, A. Romagnoli, P. Pinton, and R. Rizzuto, *Curr. Mol. Med.*, **8** (2), 119 (2008).
21. I. Kruman, Q. Guo, and M. P. Mattson, *J. Neurosci. Res.*, **51** (3), 293 (1998).
22. E. N. Maciel, A. E. Vercesi, and R. F. Castilho, *J. Neurochem.*, **79** (6), 1237 (2001).
23. P. Pinton, C. Giorgi, R. Siviero, et al., *Oncogene*, **27** (50), 6407 (2008).
24. D. Lanoix, A. A. Lacasse, R. J. Reiter, and C. Vaillancourt, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **348** (1), 1 (2012).
25. F. Radogna, L. Paternoster, M. De Nicola, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **239** (1), 37 (2009).
26. A. P. Batista, T. G. da Silva, A. Teixeira, et al., *Life Sci.*, **93** (23), 882 (2013).
27. A. P. Batista, T. G. da Silva, A. A. Teixeira, et al., *Micron (Oxford)*, **59**, 17 (2014).
28. I. Bejarano, J. Espino, A. M. Marchena, et al., *Mol. Cell. Biochem.*, **353** (1-2), 167 (2011).
29. A. Lemarie, S. Grimm, *Oncogene*, **30** (38), 3985 (2011).
30. G. Lenaz and M. L. Genova, *Antioxid. Redox Signal.*, **12** (8), 961 (2010).
31. H. Pelicano, L. Feng, Y. Zhou, et al., *J. Biol. Chem.*, **278** (39), 37832 (2003).
32. J. M. Hardwick and L. Soane, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5** (2), a008722 (2013).

## Effect of Combined Use of Melatonin and Diethyldithiocarbamate on the N1E-115 Cell Line (a Clone of Cells from Mouse Neuroblastoma C-1300)

S.N. Myakisheva\*, Y.L. Baburina\*\*, M.I. Kobyakova\*\*, R.R. Krestinin\*\*,  
L.D. Sotnikova\*\*, and O.V. Krestinina\*\*

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

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

A study has been made on the effects of sodium diethyldithiocarbamate and melatonin and their interaction on proliferative activity, the variation in cytosolic Ca<sup>2+</sup>, membrane potential and reactive oxygen species production in the neuroblastoma N1E-115 cell line (a clone of cells from mouse neuroblastoma C-1300). This study showed that combined use of diethyldithiocarbamates and melatonin inhibited proliferation and enhanced cell differentiation. At the same time, the content of Bcl-2 decreased, while the content of Bax increased, that were likely to trigger an apoptotic cascade. However, the use of these two drugs in combination did not enhance the observed effects. Therefore, this study suggests that the mechanisms by which diethyldithiocarbamates and melatonin act are apparently different.

*Keywords: sodium diethyldithiocarbamate, melatonin, proliferation, differentiation, subunits of mitochondrial respiratory chain complexes, production of reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, cytosolic calcium*

УДК 577.3

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЮТЕИНА И ЦИСПЛАТИНА В СОЧЕТАНИИ С ЛИПОСОМАМИ ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛЕТКАМ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРОШЕДШИМ ВОЗДЕЙСТВИЕ РАДИОТЕРАПИИ

© 2023 г. Р.А. Лафта\*, М.В. Шафаа\*, #, В.М. Дарвиш\*\*, М.С. Эль-Нагди\*

\*Факультет естественных наук, Хелуанский университет, Каир, 11765, Египет

\*\*Отдел полимеров и пигментов Национального исследовательского центра,  
ул. Эльбухут, округ Докки, Гиза, 12622, Египет

#E-mail: Shafaa@science.helwan.edu.eg

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

После доработки 10.11.2021 г.

Принята к публикации 26.11.2021 г.

Охарактеризованы взаимодействия противоопухолевого вещества цисплатина и антиоксидантного вещества лютеина с липосомами, выбранными в качестве модельных мембран. Морфология всех липосом была практически сферической, при этом в отсутствие этих веществ липосомы были более равномерно распределены и менее склонны к агрегации. Средний размер ненагруженных липосомных образцов составлял  $617.90 \pm 75.64$  нм, в то время как после включения цисплатина, лютеина и их комбинации он составлял  $425.60 \pm 64.74$  нм,  $877.85 \pm 93.90$  нм и  $189.91 \pm 136.84$  нм, соответственно. Включение цисплатина или лютеина в липосомные мембраны приводило к увеличению значений дзета-потенциала. В присутствии цисплатина в комбинации с лютеином дзета-потенциал достигал наименьших значений. Включение цисплатина в липосомы приводило к сдвигу в сторону более высокой температуры плавления по сравнению с основным пиком ненагруженных липосом, что указывает на конформационное нарушение структуры фосфолипидов. Добавление лютеина приводило к исчезновению основного характерного для чистых липосом эндотермического пика. Исследование методом ИК-Фурье-спектроскопии подтвердило взаимодействие лютеина и цисплатина с функциональными группами липосом. В отсутствие внешнего гамма-облучения значение  $IC_{50}$  для свободного лютеина в тесте цитотоксичности с клетками MCF-7 составило 10.62 мкг/мл, в то время как для свободного цисплатина оно составило 41,02 мкг/мл. Для нанолипосомного лютеина и цисплатина значение  $IC_{50}$  составило 65.84 мкг/мл и 34.29 мкг/мл соответственно. При использовании комбинированной терапии с дозой гамма-излучения 5 Гр и затем 10 Гр,  $IC_{50}$  свободного лютеина снизилась с 17.0 до 9.5 мкг/мл. Для свободного цисплатина  $IC_{50}$  изменилась с 51.00 до 43.09 мкг/мл. Эта работа показала, что цитотоксический эффект стандартной формы лютеина сильнее, чем нанолипосомального лютеина. Согласно обнаруженным фактам можно предложить новый протокол терапии, в котором цисплатин следует заменить свободным лютеином для увеличения эффективности терапии против опухолевых клеток линии MCF-7.

*Ключевые слова:* лютеин; цисплатин; липосомы; FTIR-спектроскопия; цитотоксичность; гамма-облучение.

DOI: 10.31857/S0006302923050198, EDN: MZUSUE

Рак — это термин, используемый для описания группы заболеваний, при которых аномальные

клетки делятся и распространяются бесконтрольно. В отсутствие сдерживания опухолевого роста это ведет к смерти. Рак является второй наиболее распространенной причиной смерти после заболеваний сердечно-сосудистой системы, вызывающих один случай смерти из четырех. Среди методов лечения рака применяются хирургия, радиотерапия, химиотерапия, иммунотерапия и направленная терапия [1].

*Сокращения:* DPPA — дипальмитоилфосфатидная кислота, FTIR-спектроскопия — инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием, LipoCis — липосомы с цисплатином, LipoLut — липосомы с лютеином, LipoCisLut — липосомы с цисплатином в сочетании с лютеином, ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия, МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, ИПД — индекс полидисперсности.

Наряду с раком легкого рак груди (рак молочной железы) – вторая по распространенности причина смертности. Согласно Всемирной организации здравоохранения ожидается, что в 2050 г. будет зарегистрировано 27 миллионов случаев рака молочной железы и 17.5 миллионов случаев смерти от него [2].

Применение наноразмерных носителей, в том числе на основе липидов, позволило добиться существенных успехов в лечении рака. В настоящее время доступны разные формы липидных носителей – липидные наночастицы и другие наноструктурированные липидные носители. Вследствие их биосовместимости и биodeградируемости эти липидные модели менее токсичны, чем другие системы доставки лекарств, такие, как полимерные наночастицы. Липосомы – это сферические искусственные носители, состоящие из липидного бислоя и полости внутри, которая может быть заполнена химиотерапевтическим средством для его доставки в очаг опухоли [3]. Вследствие их эффективности, биосовместимости, неиммуногенности, повышенной растворимости в них химических агентов и способности к инкапсуляции широкого диапазона веществ, эти наноразмерные пузырьки липидного бислоя стали широко распространены в системах доставки лекарств. В результате липосомальное применение противораковых веществ увеличивает их эффективность, снижая воздействие веществ на здоровые ткани или снижая дозу, необходимую для проявления цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам.

Дипальмитоилфосфатидная кислота (DPPA) – важный промежуточный метаболит, производимый в основном вследствие гидролиза глицерофосфолипидов фосфолипазой D. DPPA важна для контроля входа веществ внутрь клетки через плазматическую мембрану [4]. DPPA обладает рядом преимуществ, включая способность предотвращать агрегацию липосом вследствие электростатического отталкивания, способность образовывать латеральные нанокластеры по заряд-зависимому механизму, способность накапливаться в опухолях и поглощаться по механизму эндоцитоза, и способность увеличивать стабильность липосом. Таким образом, в последние годы возрастает интерес к использованию DPPA как основного компонента липидного бислоя при приготовлении липосом [5, 6].

Цисплатин – это вещество на основе платины, широко используемое для лечения различных солидных опухолей (плоскоклеточный рак головы и шеи, карциномы семенников и яичников, продвинутые стадии рака мочевого пузыря, злокачественные глиомы, метастазированный рак простаты, молочной железы, меланомы, мезотелиома). Благодаря высокому атомному номеру платины (78) увеличивается вероятность взаимодействия излучения с цисплатином, что приводит

к высвобождению высокоэнергетического вторичного электрона. Цисплатин также способен генерировать свободные радикалы, что вызывает существенные повреждения ДНК [7]. Цисплатин может выступать как радиосенсибилизатор, увеличивая дозу радиации, поглощенную опухолевым очагом. Радиосенсибилизаторы используются в лучевой терапии для увеличения поглощенной дозы радиации через увеличение собственной радиочувствительности раковых клеток. Благодаря этому может проводиться терапия меньшими дозами радиации, что снижает побочное воздействие на нормальные клетки [8].

Лучевая терапия – это метод, который обычно используется тогда, когда опухоль ограничена конкретной зоной организма, на которую можно физически воздействовать. Поскольку она разрушает ДНК, в том числе гены, контролирующие репликацию и развитие, она является эффективным методом лечения рака. Вследствие прямого поглощения радиация может вызывать повреждения ДНК и клеточную гибель, а кроме того, она может запускать образование свободных радикалов, ионизируя молекулы воды внутри клеток, в особенности вблизи молекул ДНК [9].

Комбинация цисплатина и лучевой терапии – распространенная схема лечения различных форм рака. Во время терапии эти два агента оказывают значительную синергию, но механизм этой синергии в целом не до конца ясен. Механизм радиосенсибилизации цисплатином был исследован на *in vitro* моделях рака груди, который все еще остается значительной проблемой для мирового здравоохранения. Поскольку большинство опухолей такого типа диагностируются очагово, лучевая терапия является самым эффективным способом лечения.

Каротиноиды – это липофильные пигменты полиизопреноидной структуры, получаемые в основном из растений. Согласно эпидемиологическим исследованиям, женщины с повышенным уровнем каротиноидов в пище – таких, как  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -каротин, ликопин и лютеин/зеаксантин, обладают меньшим риском развития рака молочной железы [10]. Каротиноид лютеин является нетоксичным, по крайней мере для людей, потребляющих его в терапевтических дозах [11]. Предыдущие исследования показали, что лютеин оказывает многоплановое воздействие – противовоспалительное, антиоксидантное, противораковое, в частности, замедление роста и цитотоксическое действие на ряде раковых клеточных линий и опухолей на животных моделях [12].

Насколько нам известно, до сих пор не проводилось исследований взаимодействия цисплатина с фосфолипидами в отсутствие или в присутствии лютеина с точки зрения термотропного фазового поведения фосфолипидов, изменения конформации ацильных цепей или характерных

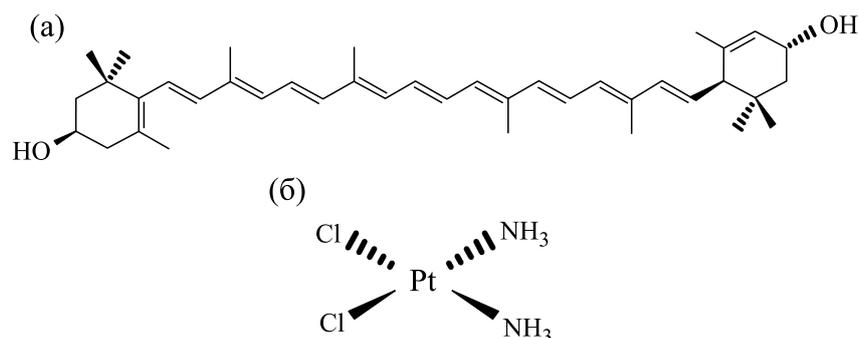


Рис. 1. Химическая структура лютеина (а) и цисплатина (б).

для  $\text{PO}_2^-$ -групп полярных головок полос в спектрах. К настоящему времени также не проводились исследования цисплатина, лютеина и их комбинации в свободной или нанولیпосомной формах в плане их воздействия на клеточную линию MCF-7 (культура клеток рака молочной железы).

Данное исследование проводилось с целью оценки изменений, вносимых цисплатином в физическую структуру и свойства дипальмитоилфосфатидной кислоты как модельной липидной мембраны в отсутствие и в присутствии лютеина через оценку возмущений в тонкой структуре бислоя с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR-спектроскопии), просвечивающей электронной микроскопии, динамического светорассеяния, измерений полидисперсности, дзета-потенциала и дифференциальной сканирующей калориметрии. Кроме того, в статье исследуется эффективность цитотоксического действия свободного цисплатина в отсутствие или в присутствии свободного лютеина, а также липосомальных форм этих веществ, на клетки линии MCF-7 (линия рака молочной железы) в комбинированной терапии после гамма-облучения различными дозами.

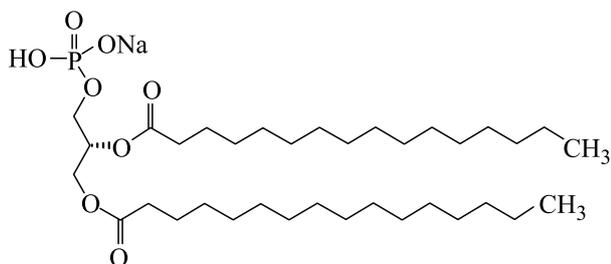


Рис. 2. Схематичная структурная формула дипальмитоилфосфатидной кислоты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** Лютеин получали из природных источников и оценивали их чистоту с помощью методов тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Структуру лютеина подтверждали спектроскопическими методами. Молекулярная масса лютеина составляет 568.87 Да. Цисплатин был приобретен в компании Sigma (Сент-Луис, США). Его молекулярная масса составила 300.05 Да. Молекулярная структура лютеина и цисплатина показана на рис. 1.

Этиловый спирт (абсолютный, чистотой 99.9%) приобретали в компании DaeJung Chemicals (Сихын, Кёнгидо, Республика Корея). Дипальмитоилфосфатидную кислоту приобретали в компании Sigma (Сент-Луис, США). Ее молекулярная масса составляла 648.9, чистота 99% (рис. 2). Трис покупали в основной форме (молекулярная масса 121.1 Да) в компании CDH (Нью-Дели, Индия). Клетки линии MCF7 (клеточная линия рака молочной железы) хранили при  $-180^\circ\text{C}$  в жидком азоте согласно рекомендациям ATCC. Затем культуры размножали посредством серийных пересевов в Центре вакцинации Ваксера (Каир, Египет). Диметилсульфоксид, среда DMEM, бикарбонат натрия, трипановый синий (0.05%-й изотонический раствор в физиологическом растворе), пенициллин/стрептомицин, трипсин, уксусная кислота, плодная сыворотка телянка, сульфородамин В (0.4%-й раствор в 1%-й уксусной кислоте), трихлоруксусная кислота, изопропанол были приобретены в компании Sigma Chemical Co. (США). Все растворы готовили на основе чистой дистиллированной воде. Все растворители и другие реактивы были хроматографической чистоты.

**Приготовление липосом.** Смесь DPPA : цисплатин в молярном соотношении 7 : 2 использовали для приготовления нейтральных мультиламеллярных везикул методом гидратации тонкой пленки по Бангхэму [13]. 20 мг DPPA и 2.64 мг цисплатина в отсутствие или в присутствии 5 мг лютеина (молярное отношение к DPPA 2 : 7) пере-

носили в колбу объемом 100 мл с круглым дном. Затем добавляли 20 мл этанола и встряхивали колбу до растворения всех компонентов. С помощью ротационного вакуумного испарителя в теплой водяной бане (50°C) последовательно удаляли органический растворитель для образования однородной тонкой пленки липида на внутренней стенке колбы. Затем липид гидратировали буферным раствором с трисом (0.2 М, pH 7.2 при 37°C) для последующего образования мультимеллярных везикул на водяной бане при 50°C в течение 15 мин. После этого колбу ставили на механический встряхиватель при 50°C на 1 час и использовали ток азота для продувки колбы, после чего колбу закрывали. Ненагруженных липосомы, служившие в качестве контроля, готовили по такой же схеме, используя только аликвоты DPPA, равные тем, что использовались в опытных образцах.

**Измерение эффективности инкапсуляции.** Эффективность инкапсуляции цисплатина в липосомы DPPA измеряли после экстракции невключенного в липосомы цисплатина и центрифугирования при 14000 об/мин в течение 20 мин. Цисплатин, оставшийся в супернатанте, определяли спектрофотометрически по поглощению при 301 нм на спектрофотометре Jasco V-630. Длина волны соответствовала максимуму поглощения цисплатина. Поглощение супернатанта каждого образца сравнивали с калибровочной

кривой, построенной для разных концентраций цисплатина.

Для определения эффективности включения в липосомы лютеина экстракцию проводили в соответствии с методикой, опубликованной в работе [14]. Для получения свободного лютеина в суспензии, 2 мл этанола и 100 мкл аликвоты липосом, нагруженных лютеином, тщательно перемешивали в течение 3 мин на встряхивателе. Затем образцы центрифугировали 20 мин при 6000 об/мин для отделения супернатанта. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях. Поглощение лютеина измеряли спектрофотометрически при 446 нм. Определяли содержание лютеина в экстрактах, используя следующую формулу для расчета:

$$W \text{ (мг)} = \frac{A \cdot V \cdot 10^3}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100} \cdot DF,$$

где  $W$  – масса каротиноида,  $A$  – оптическая плотность (значение должно быть от 0.2 до 0.8),  $V$  – объем лютеинсодержащей жидкости,  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  – коэффициент экстинкции каротиноида (2550 для лютеина в этаноле),  $DF$  – фактор разбавления [15].

Определение эффективности включения вещества в липосомы. Эффективность включения вещества ( $EE$ , %) рассчитывали через следующее соотношение:

$$EE = \frac{\text{Total drug input (мг)} - \text{Drug in supernatant (мг)}}{\text{Total drug input (мг)}} \cdot 100, \quad (1)$$

где  $\text{Total drug input}$  – общая масса вещества,  $\text{Drug in supernatant}$  – масса вещества в супернатанте.

**Исследование морфологии липосом на просвечивающем электронном микроскопе.** Размер и морфологию ненагруженных липосом и липосом с цисплатином (LipoCis), лютеином (LipoLut) или цисплатином в сочетании с лютеином (LipoCis-Lut) анализировали с применением просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Japan), работающего при напряжении 200 кВ, с применением негативного контрастирования. Водный раствор фосфовольфрамовой кислоты (1% w/v) использовался как агент для негативного контрастирования. Образцы липосом сперва разбавляли 1:10 буферным раствором (трис-HCl, pH 7.4 при 37°C), для микроскопического исследования отбирали по 20 мкл образца, наносимого на покрытую углеродом медную сетку микроскопа. Затем раствор оставляли на 1 мин, после чего удаляли излишки образца с сетки. Полученные на электронном микроскопе микрофотографии образца объединяли и обрабатывали.

**Динамическое светорассеяние и дзета-потенциал.** Дзета-потенциал, средний размер частиц и распределение по размеру липосом, нагруженных цисплатином и лютеином, только цисплатином, только лютеином, а также ненагруженных липосом, были рассчитаны с помощью метода PSS (particle sizing method), примененного для данных динамического светорассеяния при pH 7.4 в буферном растворе триса при 25°C. Эксперимент проводили в трех повторностях, все данные выражали как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

**Измерения методом дифференциальной сканирующей калориметрии.** Для определения поведения ненагруженных липосом и липосом, нагруженных цисплатином, лютеином или комбинацией цисплатина и лютеина при нагревании использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью прибора Setaram (Labsys, Франция), откалиброванного по индиевому образцу. Анализ проводили на образцах массой 5 мг, запечатанных в стандартные алюминиевые ячейки. Каждую термограмму

строили в диапазоне температур 25–200°C при скорости нагрева 3°C/мин.

**Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием.** FTIR-спектры лиофилизированных образцов липосом, нагруженных лютеином, цисплатином, их комбинацией и ненагруженных липосом, нанесенных на диски из бромида калия, регистрировали с помощью спектрометра Alpha II (Bruker, Швейцария). Сканирование осуществляли со скоростью 2 мм/с в диапазоне 400–4000 см<sup>-1</sup> при комнатной температуре.

**Оценка цитотоксичности *in vitro* с помощью МТТ-теста.** Клетки карциномы молочной железы линии MCF-7 промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали трипсином и ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640, затем считали жизнеспособные клетки в камере гемоцитометра с помощью методики с трипановым синим [16]. Для анализа хемочувствительности клетки культивировали в 96-луночном планшете при плотности 10<sup>4</sup> клеток на лунку в течение 24 ч перед обработкой химиотерапевтическим агентом, чтобы клетки могли прикрепиться к стенкам планшета. Через 24 ч из каждой лунки удаляли среду и заменяли свежей, содержащей исследуемые вещества при разных концентрациях, методом двукратных разведений. Потенциальную цитотоксичность чистых липосом и липосом, нагруженных цисплатином, лютеином или комбинацией цисплатина и лютеина оценивали в отдельных экспериментах. Для каждого вещества и каждой дозы эксперимент проводили в трех повторностях.

Затем монослои клеток инкубировали в течение 48 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> с разными концентрациями химиотерапевтических агентов. Среду, содержащую необходимые вещества, затем удаляли, а клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером. В каждую лунку немедленно добавляли 50 мкл раствора (0.5 мг/мл) желтой соли метилтиазиолтетразолия (МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем удаляли среду и добавляли 50 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана.

Для оценки доли жизнеспособных клеток поглощение образующегося хромофорного субстрата анализировали при 490 нм с помощью прибора для иммуноферментного ELISA-анализа (Boster Immunoleader, США). Выживаемость клеток определяли как истинное поглощение лунок, поделенное на поглощение контроля и выраженное в процентах. Зависимости между выживаемостью клеток и концентрацией вещества представляли в виде графиков кривой выживаемости клеток рака груди линии MCF-7 по отношению к каждому конкретному препарату, по полученным кривым рассчитывали концентрацию веществ, ингибиру-

ющую рост клеток на 50% (полуингибирующая концентрация, IC<sub>50</sub>).

***In vitro* облучение линии клеток карциномы молочной железы MCF-7.** Клеточную линию рака молочной железы MCF-7 выращивали в течение 24 ч в культуральных колбах с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> до значений плотности клеток 1·10<sup>4</sup>, после этого обрабатывали исследуемым веществом в концентрации, рассчитанной из МТТ-теста и равной IC<sub>50</sub>. Затем проводили облучение гамма-лучами в дозах 5 и 10 Гр с помощью установки на изотопе <sup>137</sup>Cs Gamma-cell 40 (Канада) с дозой излучаемой радиации 0.653 рад/с.

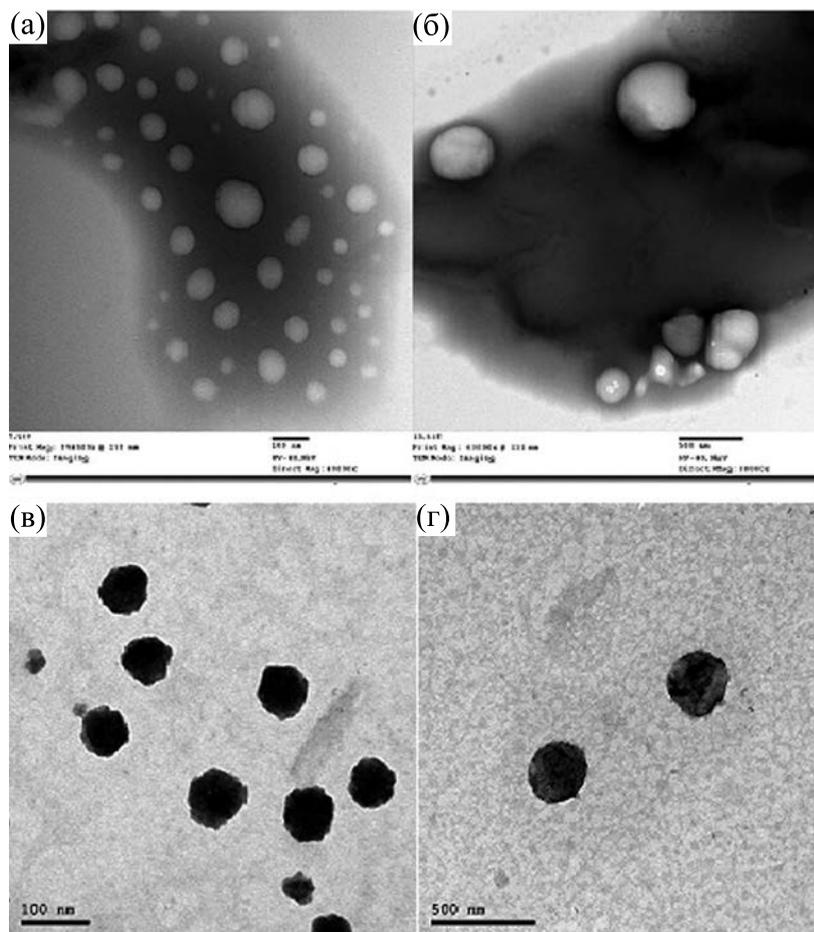
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность включения вещества в липосомы составляла более 90% для всех приготовленных суспензий липосом, когда вещество смешивали с порошком липида до растворения в этаноле.

Изображения, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, показаны на рис. 3. Морфология всех липосом, приготовленных в работе, была почти сферической, равномерной, с малой долей агрегатов для ненагруженных (рис. 3а) и нагруженных везикул. Микроскопия показала, что добавление цисплатина коррелирует со способностью липосом к плотной упаковке на поверхности (рис. 3б). Присутствие лютеина в липосомах (LipoLut, рис. 3в) увеличивало промежутки между соседними бислоями, что приводило к большему размеру липосом в сравнении с контрольными. Увеличение размера частиц может быть связано с более сильным взаимодействием лютеина с липидными бислоями липосом через образование водородных связей. Предполагается, что лютеин может встраиваться в гидрофобный участок бислоя, эти наблюдения согласуются с данными ДСК и FTIR-спектроскопии.

Гомогенность частиц коллоидной суспензии эффективно описывается индексом полидисперсности (ИПД). Значения этого индекса более 0.7 означают, что в образце очень большой диапазон размера частиц и в данном случае метод динамического светорассеяния неспособен дать стабильные результаты [17].

Рис. 4а показывает распределение по размеру образца чистых липосом из DPPA, мода которого была около 617.9 ± 75.64 нм с индексом полидисперсности (ИПД). Рис. 4б показывает снижение среднего размера до 425.6 ± 64.74 нм с ИПД 0.337 после включения цисплатина в липосомы, это может быть связано с электростатическим притяжением между отрицательно заряженными PO<sub>2</sub><sup>-</sup>-группами DPPA и NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-группой цисплатина, при этом, поскольку цисплатин считается гидрофильным веществом, он должен быть со-



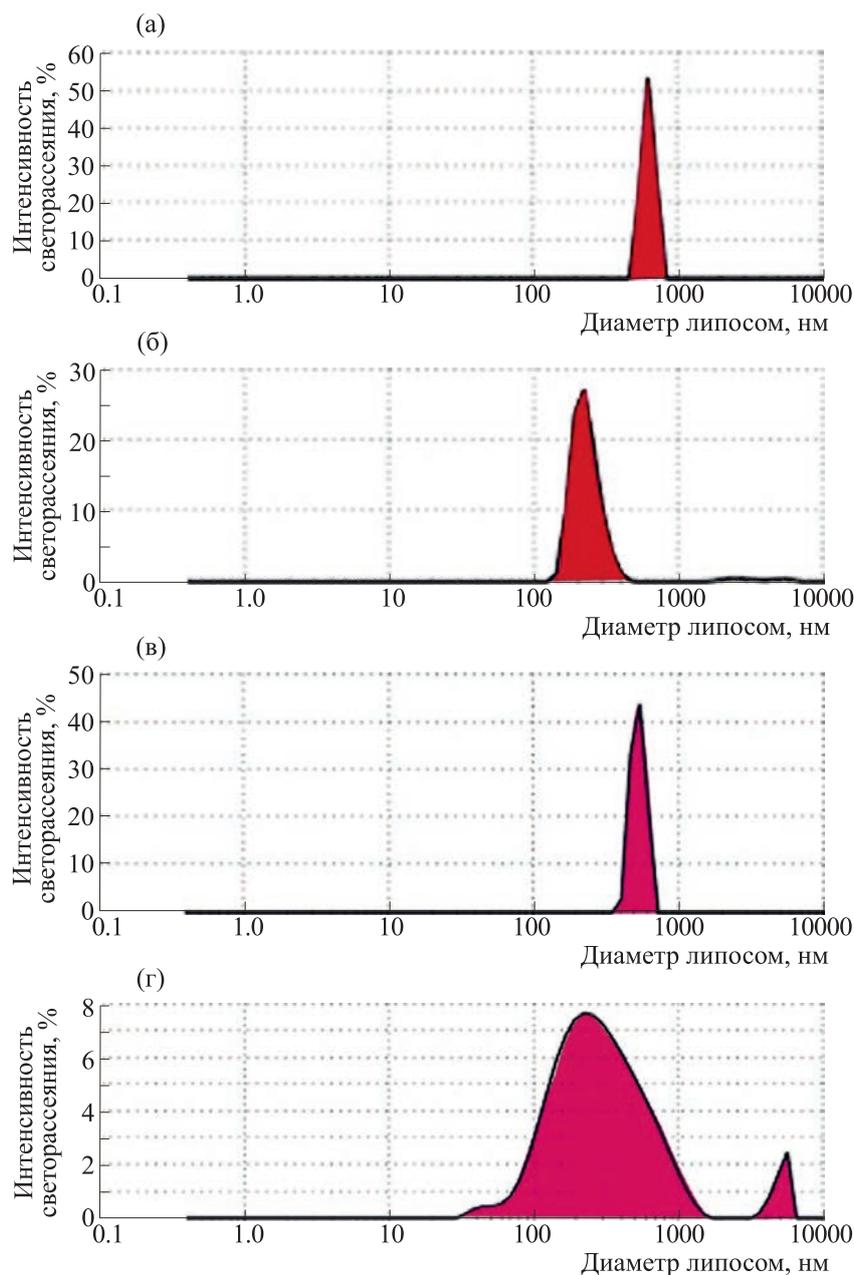
**Рис. 3.** Микрофотографии, полученные методом трансмиссионной микроскопии, ненагруженных липосом (а), липосом с цисплатином (б), липосом с лютеином (в) и липосом с комбинацией лютеина и цисплатина (г).

средоточен в гидрофильном ядре бислоя. Когда цисплатин добавляли в липосомы, расстояние между соседними бислоями уменьшалось, что приводило к уменьшению размеров липосом. Включение лютеина в DPPA приводило к увеличению расчетной моды диаметра липосом до  $877.85 \pm 93.90$  с ИПД 0.527. После добавления лютеина к липосомам расстояние между соседними бислоями увеличивалось, в результате липосомы становились больше, чем контрольные. Более сильные взаимодействия вещества с полярной головкой фосфолипидов возле  $\text{PO}_2^-$ -группы с образованием водородных связей могут объяснить изменение размера липосом на рис. 4в. Лютеин может входить в ламеллярную структуру фосфолипида и должен располагаться параллельно углеводородной цепи фосфолипидного бислоя. Два его полярных конца находятся в контакте с противоположными полярными участками бислоя, что приводит к высокой смешиваемости с фосфолипидным бислоем и объясняет увеличение размера [18]. Рис. 4г показывает снижение расчетного значения размера липосом до  $189.91 \pm$

136.84 нм с ИПД 0.426 после включения цисплатина в ассоциате с лютеином внутри липосом. Результаты показывают, что липосомы могут быть физически ассоциированы с цисплатином или лютеином в центре и их молекулы в большой степени взаимодействуют с липидным бислоем и нарушают их структуры. Эти данные хорошо согласуются с исследованиями методами динамического светорассеяния и FTIR-спектроскопии.

Амплитуда дзета-потенциала отражает стабильность коллоидной системы. По мере роста дзета-потенциала растет отталкивание между частицами, что приводит к большей стабильности коллоидной дисперсии. Если все взвешенные частицы обладают значительным отрицательным или положительным дзета-потенциалом, то они отталкиваются друг от друга и не склонны слипаться друг с другом [19].

Согласно данным других исследователей, ненагруженные липосомы обладают отрицательным дзета-потенциалом ( $-13.1 \pm 6.49$  мВ) [20–23]. У липосом, нагруженных цисплатином или лютеином, значения дзета-потенциала были

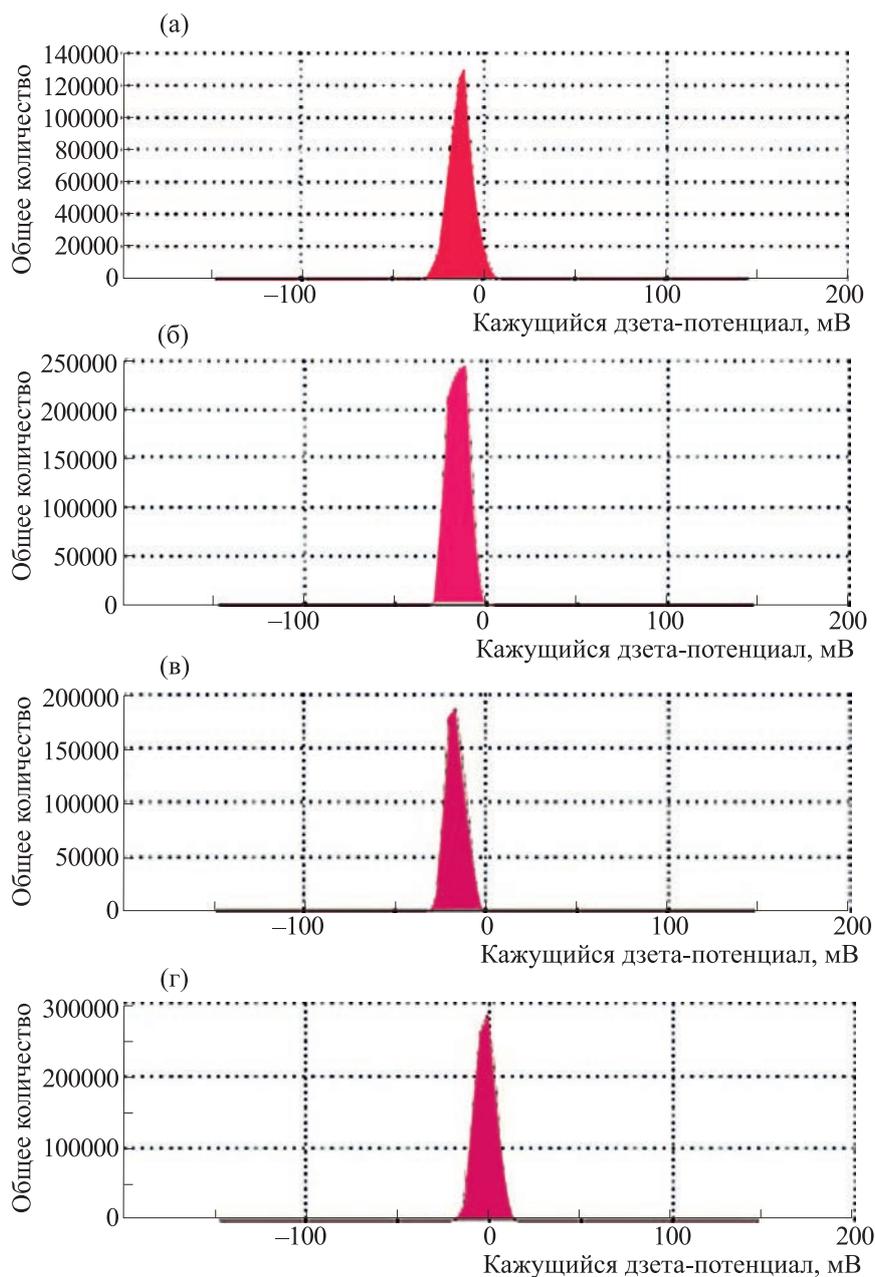


**Рис. 4.** Измеренные методом динамического светорассеяния размеры образца ненагруженных липосом (а), липосом с включением цисплатина (б), липосом с включением лютеина (в) и липосом с комбинацией цисплатина и лютеина (г).

еще более отрицательными ( $-14.52 \pm 4.11$  мВ и  $-15.55 \pm 5.35$  мВ, соответственно), чем у ненагруженных липосом, вследствие включения обоих веществ в липосомные мембраны. Наночастицы с дзета-потенциалом более  $+30$  мВ или менее  $-30$  мВ в общем случае обладают большей стабильностью. Наличие цисплатина (LipoCis) или лютеина (LipoLut) в липосомных мембранах, по-видимому, увеличивает поверхностную плотность отрицательного заряда, что приводит к более отрицательным значениям дзета-потенциала.

Липосомная система с цисплатином и лютеином (LipoCisLut) продемонстрировала наименее низкие значения среди всех исследованных веществ ( $-2.11 \pm 5.66$  мВ) по причине того, что отталкивание между частицами становится меньше, поэтому и коллоидная дисперсия становится менее стабильной (рис. 5). Результаты измерения размера частиц и дзета-потенциала липосомных дисперсий с различным составом приведены в табл. 1.

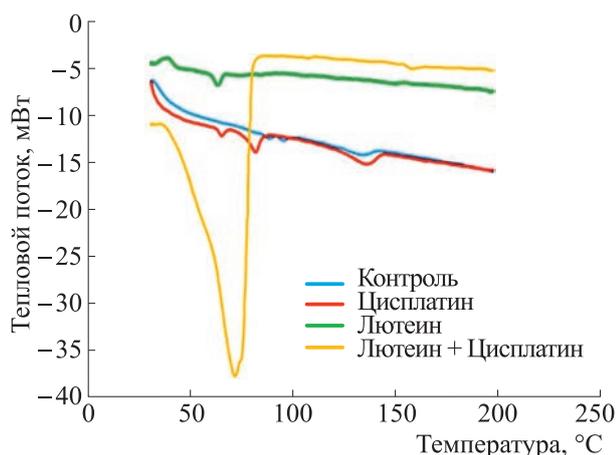
Вследствие изменения взаимодействий между включенными веществами и липосомами метод



**Рис. 5.** Дзета-потенциал для образца ненагруженных липосом DPPA (а), липосом с включением цисплатина (б), липосом с включением лютеина (в) и липосом с комбинацией цисплатина и лютеина (г).

**Таблица 1.** Данные, полученные для размера частиц, измеренного методом динамического светорассеяния, и дзета-потенциала липосом до и после включения цисплатина, лютеина и цисплатина в комбинации с лютеином

Название образца	Диаметр, среднее $\pm$ станд. отклонение, нм	Среднее значение ИПД	Дзета-потенциал, среднее $\pm$ станд. отклонение, мВ
Ненагруженные липосомы	$617.9 \pm 75.64$	0.7	$-13.1 \pm 6.49$
LipoCis	$425.6 \pm 64.74$	0.337	$-14.52 \pm 4.11$
LipoLut	$877.85 \pm 93.90$	0.527	$-15.55 \pm 5.35$
LipoCisLut	$189.91 \pm 136.84$	0.426	$-2.11 \pm 5.66$



**Рис. 6.** Термограммы, полученные методом ДСК для липосом из чистой DPPA, а также липосом, нагруженных цисплатином, лютеином или комбинацией обоих веществ. По оси абсцисс — температура, по оси ординат — скорость теплового потока, мВт.

ДСК использовали для исследования изменений в фазовом переходе липидного бислоя [24, 25].

Везикулы DPPA используются как модельные мембраны, потому что этот фосфолипид имитирует многие свойства биологических мембран. Чистые везикулы DPPA после дегидратации демонстрировали значительный главный эндотермический пик ( $T_m$ ) при 130.7 °C (рис. 6) в процессе ДСК. Это согласуется с другими исследованиями [26–28]. Чистые липосомы DPPA также обладают двумя максимумами, соответствующими температурам пред-переходов ( $T_p$ ) в районе 95.4 и 87.0 °C соответственно.

Присутствие дополнительных соединений в мембранах DPPA может влиять на термотропные параметры фазового перехода везикул. Включение цисплатина в липосомы DPPA показало сдвиг в сторону более высоких температур, до 135.2 °C, в сравнении с главным эндотермическим пиком чистых липосом при 130.7 °C, что показывает существенный эффект цисплатина на бислой DPPA, выражающийся в конформационных изменениях внутри бислоя и снижении кооперативности фазового перехода липидных ацильных цепей [29, 30]. Увеличенная температура главного эндотермического пика ( $T_m$ ) свидетельствует о том, что цисплатин приводит к более нарушенному и рыхлому расположению ацильных цепей. Два пика температуры пред-перехода в цисплатиновых липосомах снижаются (78.5 и 65.0 °C соответственно), что указывает на взаимодействие цисплатина с полярными группами фосфолипидов (рис. 6).

Когда лютеин включен в липосомы DPPA, он обладает более выраженным эффектом. Лютеин в основном встраивается, сопрягаясь с липидными

бислоями, сильно взаимодействуя с ними и нарушая их структуру, что приводит к исчезновению главного эндотермического пика, который для чистых DPPA имеет место при 130.7 °C.

Температура второго пред-перехода снизилась с 87.0 °C до 63.1 °C для липосом DPPA, нагруженных лютеином, что продемонстрировало эффект увеличения жесткости мембран. Пик первого пред-перехода, который у чистых DPPA приходится на 95.4 °C, у лютеинизированных липосом исчезает. Встраивание биомолекул в липидные бислои может быть важной причиной исчезновения пика пред-перехода [31]. Встраивание фармакофора между полярных головок DPPA обеспечивает более предпочтительное значение тепловых параметров для образования менее упорядоченной жидкокристаллической фазы, чем для образования фазы геля, и, как показывает ДСК, немного снижает температуру перехода геля в жидкий кристалл [32].

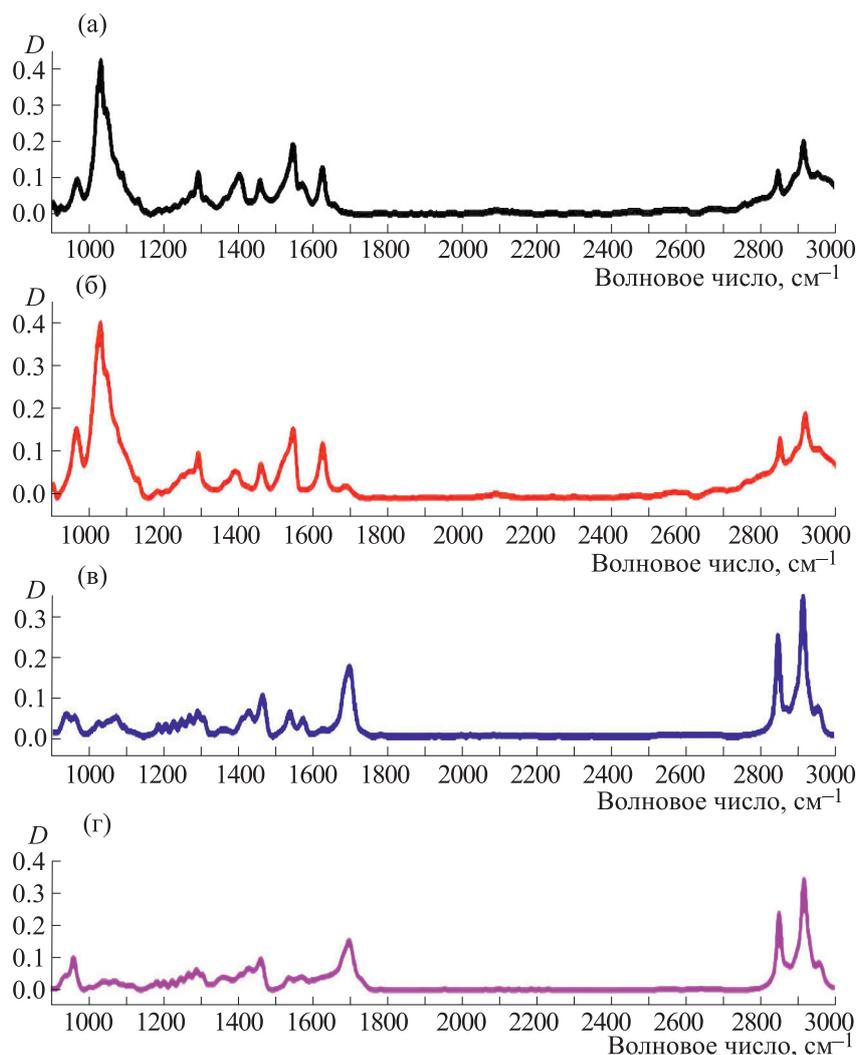
Главный эндотермический пик чистых DPPA, который имеет место при 130.7 °C, уширяется и сдвигается в зону более высоких температур (157.4 °C), когда цисплатин встраивается в липосомы из DPPA в сочетании с лютеином. К удивлению, пик пред-перехода ( $T_p$ ) для комбинации DPPA/(цисплатин + лютеин) увеличивается и составляет почти 71 °C (рис. 6). Включение инкапсулированного цисплатина в ассоциации с лютеином в липофильную часть мембранного бислоя и их взаимодействие с полярной головкой может быть отражено в сдвиге этого пика ( $T_p$ ). С помощью ДСК было показано, что смеси DPPA и лютеина или цисплатина обладают одним пиком, что указывает на их смешиваемость [33].

FTIR-спектроскопию использовали для определения изменений в структуре липосомных мембран по анализу волнового числа разных колебательных мод, чтобы подтвердить изменения, обнаруженные методом ДСК.

Для исследования потенциальных изменений структуры DPPA FTIR-спектроскопию использовали для оценки волнового числа разных функциональных групп в присутствии или в отсутствие чужеродных молекул, принимая во внимание вклад ацильных цепей и полярных головок липидных групп.

На рис. 7 показаны FTIR-спектры чистых лиофилизированных липосом DPPA в сравнении с липосомами, нагруженными цисплатином, лютеином или их комбинацией, в диапазоне волновых чисел 3000–1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Наиболее высокий характерный пик FTIR-спектров имел место у липосомных везикул [34]. Включение лютеина в липосомы DPPA привело к изменению волнового числа симметричных полос растяжения ацильных цепей (рис. 7), это указывает на то, что лютеин наводит конформационную упорядоченность внутри ацильных



**Рис. 7.** Полные ИК-Фурье-спектры ненагруженных DPPA-липосом (а) и липосом, нагруженных цисплатином (б), лютеином (в) или обоими веществами (г). По оси абсцисс — волновое число, по оси ординат — поглощение.

цепей фосфолипидов. Другими словами, его молекулы повлияли на упорядоченность мембранной структуры. Пик при  $2849.11 \text{ см}^{-1}$  для чистых DPPA-липосом в случае лютеиновых липосом сдвинут в область более низких значений,  $2847.05 \text{ см}^{-1}$ . Это может указывать на снижение количества гош-конформеров, что приводит к возрастанию упорядоченности бислоя [35]. Интересно, что интенсивность сигнала липосом, нагруженных лютеином, становится выше по сравнению с ненагруженными липосомами. После включения цисплатина или лютеина в сочетании с лютеином в липосомы DPPA пик при  $2849.11 \text{ см}^{-1}$  остается стабильным, что дает основания предположить стабилизацию системы в фазе геля и фазе жидкости.

Полоса антисимметричного колебания  $\text{CH}_2$ -групп сдвинулась в сторону более низких значе-

ний при добавлении лютеина или лютеина в комбинации с цисплатином ( $2915.03 \text{ см}^{-1}$ ) в сравнении со значением, свойственным чистым DPPA-липосомам ( $2917.09 \text{ см}^{-1}$ ) (рис. 7).

Пики симметричных и антисимметричных колебаний  $\text{CH}_2$ -групп на растяжение используются как чувствительные индикаторы степени упорядоченности алкильных цепей. В волновом числе для полосы колебаний  $\text{CH}_2$  имеются значительные изменения, свидетельствующие о том, что лютеин снизил количество гош-конформеров, а следовательно, увеличил конформационную упорядоченность бислоя [36, 37]

Для определения взаимодействия цисплатина, лютеина либо обоих этих веществ с глицериновым остовом вблизи головки фосфолипидов (в «интерфазе») анализировали полосы колебаний связи  $\text{C}=\text{O}$  [38]. Как видно из рис. 7, поглощение

**Таблица 2.** Химические сдвиги, наблюдаемые для цисплатина, лютеина или их комбинации после встраивания их в липосомы

Тип колебания	Волновое число, см <sup>-1</sup>	Волновое число, см <sup>-1</sup>			
		Контроль	Цисплатин	Лютеин	Цисплатин в сочетании с лютеином
Симметричное растяжение группы СН <sub>2</sub> ацильной цепи	(2800–2855)	2849.11	2849.11	2847.05	2849.11
Антисимметричное растяжение группы СН <sub>2</sub> в ацильной цепи	(2900–2925)	2917.09	2917.09	2915.03	2915.03
Растяжение карбонильной группы С=О	(1730–1740)	1629.53	1629.53	1627.47	–
«Ножницеобразное» колебание СН <sub>2</sub> -группы	(1456–1470)	1462.66	1462.66	1466.78	1466.78
Антисимметричное растяжение группы РО <sub>2</sub> -	(1200–1300)	1295	1293.74	1293.74	1293.74

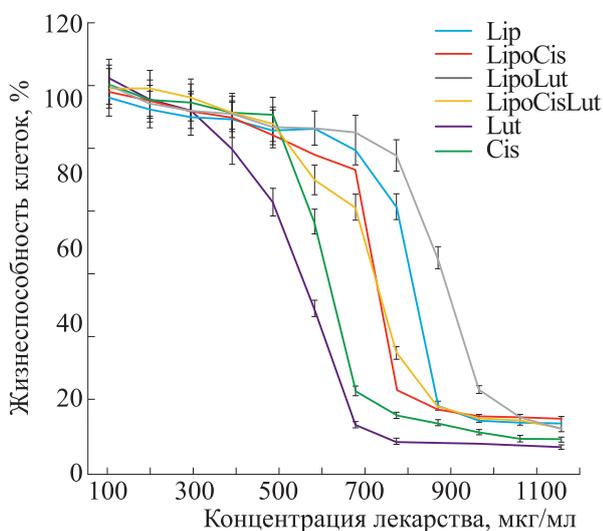
группы С=О с волновым числом 1629.53 см<sup>-1</sup> снижается или исчезает в образцах липосом с лютеином (1627.47 см<sup>-1</sup>) или лютеином и цисплатином соответственно, что, очевидно, указывает на образование водородных связей. В глицериновом остове молекулы DPPA сдвиги контура колебания сложноэфирной С=О-группы регулируют образование водородных связей. Значит, любые

изменения спектра в этой области могут быть вызваны взаимодействием лютеина или цисплатина с границей раздела полярной и неполярной областей мембраны [39].

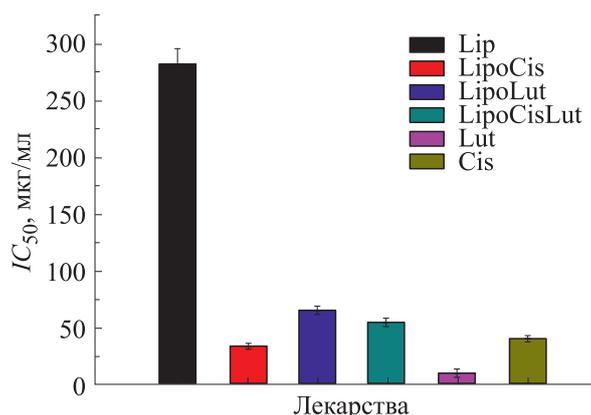
Взаимодействие цисплатина, лютеина или обоих веществ с полярной головкой в липосомах DPPA исследовалось через анализ полосы антисимметричного колебания РО<sub>2</sub><sup>-</sup>-группы при 1295 см<sup>-1</sup>. Как показано на рис. 7, волновое число было сдвинуто в более низкие значения после добавления к липосомам DPPA цисплатина (1293.74 см<sup>-1</sup>), лютеина (1293.74 см<sup>-1</sup>) или смеси обоих веществ (1293.74 см<sup>-1</sup>). Это указывает на образование водородных связей между головкой липида липосомы и лютеином или цисплатином. Уменьшение волнового числа указывает либо на то, что существующие водородные связи становятся сильнее, либо на то, что образуются новые водородные связи между компонентами [35].

Ксантофиллы или полярные каротиноиды, такие как лютеин, располагаются практически перпендикулярно плоскости мембраны в полярном участке липидных головок, а также пересекают липидный бислой, заякориваясь своими гидроксильными группами и оставаясь неподвижными в толще мембраны [40].

Включение лютеина или его комбинации с цисплатином в препарат липосом DPPA влияет на «ножницеобразные» колебания СН<sub>2</sub>-группы, мода которых имеет волновое число 1462.66 см<sup>-1</sup>. После инкапсуляции лютеина или его конъюгата с цисплатином в липосомы DPPA это значение увеличивается до 1466.78 см<sup>-1</sup>. Это позволяет утверждать, что лютеин или его комбинация с цисплатином играют роль своеобразных малых спейсеров для полярной группы липида, вызывая малые нарушения в углеводородной цепи. В табл. 2 приводятся значения химических сдвигов



**Рис. 8.** *In vitro* цитотоксичность свободных липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut) и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) в отсутствие внешнего гамма-облучения на клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7; инкубацию проводили в течение 48 ч при разных концентрациях веществ — от 100 до 1200 мкг/мл. Для измерения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Результаты приведены как среднее и стандартное отклонение в трех повторностях. По оси абсцисс — концентрация, мкг/мл; по оси ординат — жизнеспособность клеток, %.



**Рис. 9.** Значения  $IC_{50}$  для свободных липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut) и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut и LipoCisLut) в отсутствие внешнего гамма-излучения в тесте цитотоксичности (МТТ-тесте) на клетках карциномы молочной железы через 48 ч после обработки.

для цисплатина, лютеина или их смеси после включения в липосомы из DPPA.

Эффективность систем доставки фармакопрепаратов в отсутствие и в присутствии гамма-излучения проверяли на линии клеток карциномы молочной железы (MCF-7) с помощью МТТ-теста выживаемости клеток (тест цитотоксичности *in vitro*) при разных концентрациях чистых липосом, свободного цисплатина, свободного лютеина, и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut и LipoCisLut) [16]. Необработанные клетки использовались как контрольные (точки нулевой концентрации каждого вещества). В отдельном исследовании линия раковых клеток MCF-7 была проинкубирована при различных концентрациях веществ в диапазоне от 100 до 1200 мкг/мл в течение 48 ч (рис. 8). Тест заканчивали через 48 ч и проводили измерение жизнеспособности клеток.

В отсутствие внешнего гамма-облучения наибольшей цитотоксичностью против клеток линии MCF-7, которые обрабатывали веществами в одном и том же диапазоне концентраций, обладал свободный лютеин. Клетки MCF-7 при максимальной концентрации лютеина (1200 мкг/мл) обладали выживаемостью около 7% через 48 ч после инкубации. В то же время со свободным цисплатином выживаемость клеток была около 9.32%, а с липосомами, нагруженными лютеином (LipoLut) жизнеспособность клеток составляла 11.84%, в сравнении с 14.82% для цисплатиновых липосом (LipoCis) при той же концентрации (1200 мкг/мл). Такая сниженная эффективность веществ, солюбилизованных в виде липосом, может быть отнесена к их включению внутрь множества липоидных доменов внутри везикул. Цисплатин был наиболее токсичен для линии клеток рака груди MDA-MB-23, за ними следовали клетки рака молочной железы MCF-7 и затем нормальные фибробласты линии NIH/3T3, что было сходно с результатами нашей работы [8].

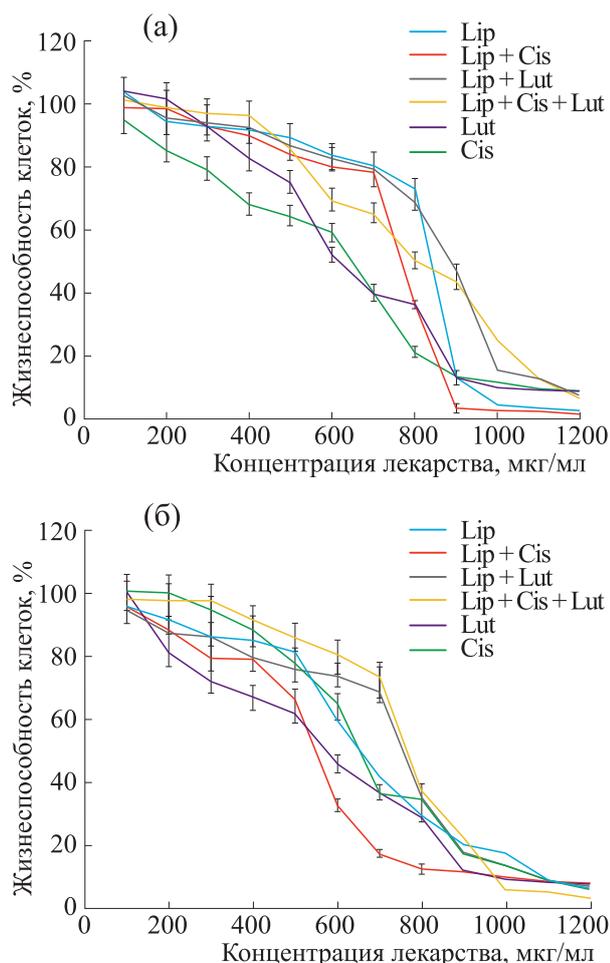
Интересно, что ненагруженные липосомы проявляли выраженное снижение выживаемости клеток в тестах на линии MCF-7 при той же концентрации (1200 мкг/мл). Жизнеспособность клеток составляла 13.60%. Это указывает на то, что клетки повреждались высокими концентрациями липосом DPPA. DPPA подавляла пролиферацию клеток и ангиогенез в опухолевых тканях трижды негативного рака молочной железы, согласно работам [5, 6]. В этих исследованиях предлагались предварительные доказательства применимости DPPA в терапии TNBC.

Интересно, что липосомная форма комбинации цисплатина и лютеина не приводила к сильному снижению выживаемости клеток MCF-7 при той же концентрации (1200 мкг/мл) в сравнении с другими веществами, встроенными в липосомы. Жизнеспособность клеток была равна примерно 12.72%. Видимо, комбинация цисплатина с лютеином не обладает способностью к синергии.

Цитотоксическое действие различных форм веществ при высоких концентрациях снижалось в следующем порядке: Lut > Cis LipoLut > LipoCisLut > Lipo > LipoCis, согласно рис. 8.

При более низкой концентрации (700 мкг/мл), клетки MCF-7, обработанные лютеином, показали выживаемость 13.23%, в то время как для его липосомной формы она была около 90.70%, а для цисплатина в свободной форме и его липосомной формы составила 22.14% и 80.88% соответственно (рис. 8).

В отсутствие внешнего гамма-облучения значение  $IC_{50}$  для свободного лютеина в цитотоксическом тесте с MCF-7 составило 10.62 мкг/мл, в то время как для свободного цисплатина оно равнялось 41.02 мкг/мл. Для липосомных форм лютеина и цисплатина оно составило 65.84 мкг/мл и 34.29 мкг/мл соответственно. На основании вышеприведенных результатов и в зависимости от типа клеток видно, что свободный лютеин про-



**Рис. 10.** *In vitro* цитотоксичность ненагруженных липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut), и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) в присутствии внешнего гамма-излучения в дозах 5 Гр (а) и 10 Гр (б) против клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7, инкубированной в течение 48 ч с различными концентрациями веществ – от 100 до 1200 мкг/мл. Для измерения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Результаты приведены как среднее и стандартное отклонение по трем повторностям. По оси абсцисс – концентрация, мкг/мл; по оси ординат – жизнеспособность клеток, %.

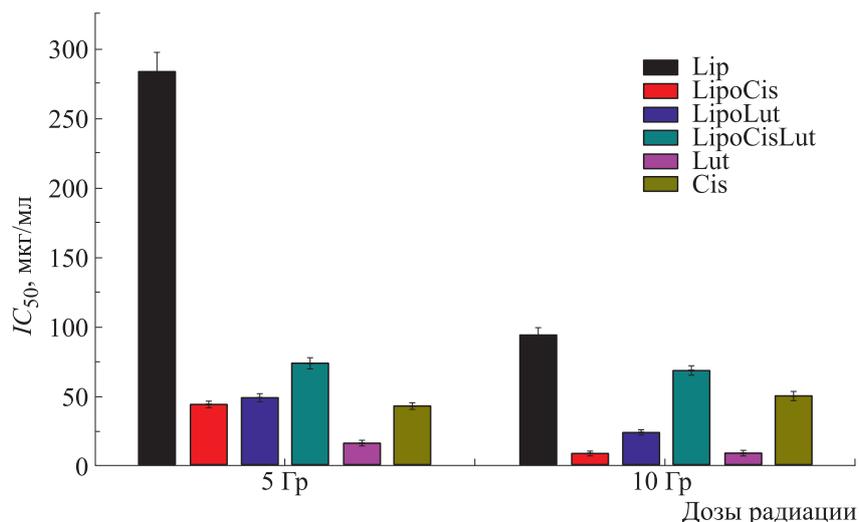
явил самую выраженную терапевтическую эффективность против клеток линии MCF-7 (рис. 9). Можно отметить, что  $IC_{50}$  для чистых липосом в тесте цитотоксичности на MCF-7 была равна 281.67 мкг/мл. Для липосомной комбинации цисплатина и лютеина она составила 55.56 мкг/мл. На линии клеток MCF-7 исследовались эффекты совместного применения бета-каротина и лютеина с очищенным астаксантином, выделенным из креветок, на цитотоксичность, окислительный статус, генерацию активных форм кислорода и активность опосредованных апоптозом сигнальных путей. Когда

астаксантин использовали в сочетании с низкими концентрациями бета-каротина и лютеина (5 мкмоль/л),  $IC_{50}$  и значения комбинационного индекса показали увеличение цитотоксичности и уровня окислительного стресса в сравнении с каротиноидами, примененными по отдельности. Результаты исследования избирательной гибели клеток MCF-7 обеспечивают лучшее понимание эффекта синергии между выделенным из креветок астаксантином и бета-каротином и лютеином [41].

Согласно работе [42], каротиноид лютеин селективно ингибирует развитие клеток рака молочной железы. Это следует из повышенной продукции активных форм кислорода, активации внутриклеточной сигнализации, такой, как p53-сигнальный путь, и увеличенной экспрессии HSP60, которые являются составными частями реализации этого механизма. Результаты, представленные в работе [42], позволяют предположить роль лютеина как нетоксичного селективного вещества, которое вызывает прерывание клеточного цикла и апоптоз в клетках линии рака молочной железы, включая трижды негативные клетки.

Степень сенсibilизации измеряли при разных вариантах обработки для того, чтобы исследовать характер соотношений между тестируемыми формами цисплатина и лютеина, дозой радиации и сенсibilизирующим действием цисплатина и лютеина.

Пролиферация/жизнеспособность клеток линии MCF-7 оценивали по МТТ-тесту после инкубации с тестируемыми химиотерапевтическими средствами в присутствии внешней радиации с дозами 5 и 10 Гр соответственно (рис. 10а,б) с применением  $^{137}\text{Cs}$  в качестве излучающего изотопа. Цитотоксический эффект исследуемых веществ увеличивался при увеличении дозы от 5 до 10 Гр. Токсичность всех проверенных химиотерапевтических агентов возрастала в зависимости от концентрации. При максимальной концентрации (1200 мкг/мл) комбинированной с дозой радиации 5 Гр (рисунок 10а), токсический эффект LipoCis и свободных липосом значительно снижал жизнеспособность клеток – с 14.82% до 1.67% и с 13.60% до 3.13% соответственно. В этом тесте цитотоксичности липосомная форма комбинации цисплатина и лютеина (LipoCisLut) вызывала больше смертей клеток по сравнению с Lut и Cis по отдельности в виде свободных веществ. Жизнеспособность клеток снижалась с 12.72% до 7.88%. LipoLut выражено снижал выживаемость клеток с 11.84% до 6.67%. Такая возросшая цитотоксичность может быть вызвана преимущественным захватом клетками наночастиц, а не свободных веществ. Lut или Cis по отдельности не проявляли большей токсичности в присутствии дозы излучения 5 Гр, в этих случаях жизне-



**Рис. 11.** значения  $IC_{50}$  для чистых липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut) и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) при гамма-облучении дозами 5 и 10 Гр по отношению к клеткам карциномы молочной железы (MCF-7) по данным МТТ-теста через 48 ч после обработки.

способность клеток сохранялась на уровне 8.67% и 9.33% соответственно.

Очевидно, что режим комбинированной терапии (LipoCis, Lip, LipoLut или LipoCisLut + радиация) обладает более выраженным противораковым эффектом по сравнению с режимом, не включающим облучение. Это позволяет заключить, что комбинация химиотерапии и радиотерапии будет более успешна, чем изолированные типы терапии.

Цитотоксическое действие различных комбинаций веществ при максимальной концентрации (1200 мкг/мл) и облучении клеток дозой 5 Гр снижалось, согласно рис. 10а, в следующем порядке: LipoCis > Lipo > LipoLut > LipoCisLut > Lut > Cis.

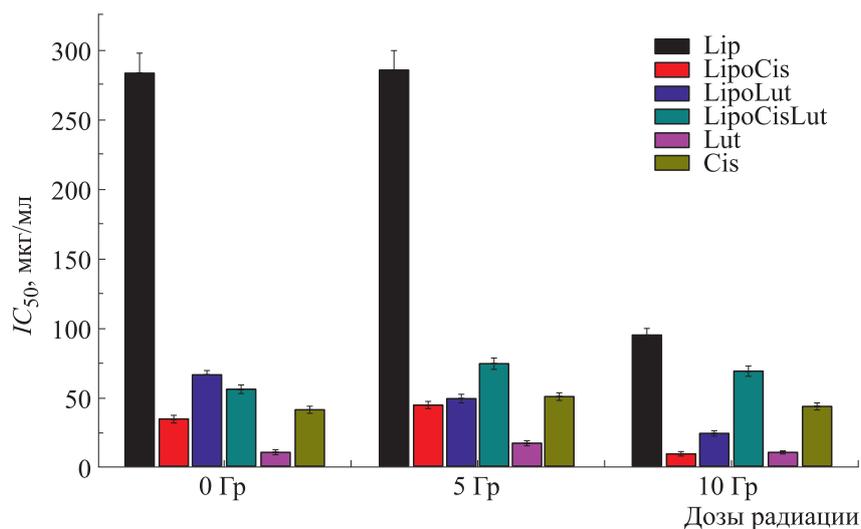
При более низкой концентрации веществ (700 мкг/мл) в комбинации с дозой радиации 5 Гр жизнеспособность клеток MCF-7, обработанных свободным лютеином, составляла 39.33% (сравним с липосомной формой, для которой она составила около 80.30%). В то же время для свободной формы цисплатина и его липосомной формы значения жизнеспособности составили 40.67% и 78.13% соответственно (рис. 10а).

Значение  $IC_{50}$  для свободного лютеина в тесте цитотоксичности с клетками MCF-7 в сочетании с дозой радиации 5 Гр равнялось 17 мкг/мл, в то время как для свободного цистеина оно составило 51 мкг/мл. Для липосомальных форм оно было равно 49.22 мкг/мл для лютеина и 44.27 мкг/мл для цисплатина. На основании вышеперечисленных результатов и в зависимости от типов раковых клеток свободный лютеин показал наивысшую терапевтическую активность против линии клеток MCF-7 (рис. 11). Можно заметить, что

$IC_{50}$  свободных липосом была равна 284.5 мкг/мл в тесте цитотоксичности с MCF-7.  $IC_{50}$  для MCF-7, обработанных комбинацией цисплатина и лютеина в липосомах, составила 74.46 мкг/мл.

При максимальной концентрации (1200 мкг/мл) и высокой дозе радиации (10 Гр) цитотоксичность различных форм веществ убывала в следующем порядке: LipoCisLut > Lipo > LipoLut > Cis > Lut > LipoCis (см. рис. 10б). При более низкой концентрации (700 мкг/мл) и высокой дозе радиации (10 Гр) цитотоксичность снижалась в следующем порядке: LipoCis > Lut > Cis > Lipo > LipoLut > LipoLutCis (рис. 10б). Экспозиция клеток при более высокой дозе радиации увеличивает их чувствительность к химиотерапевтическим агентам. Это явно наблюдается при сравнении ответов клеток на дозу 5 Гр в сравнении с дозой 10 Гр (рис. 10а и 10б).

В присутствии гамма-радиации в дозах 10 Гр значение  $IC_{50}$  для свободного лютеина в тесте цитотоксичности на MCF-7 составило 9.5 мкг/мл, в то время как свободный цисплатин обладал значением  $IC_{50}$ , равным 43.09 мкг/мл. Для лютеина в форме липосом значение  $IC_{50}$  составило 24.2 мкг/мл, а для цисплатина в форме липосом — 9.29 мкг/мл. На основании вышеизложенных результатов свободный лютеин и липосомальный цисплатин показали максимальную терапевтическую активность против клеточной линии MCF-7 (рис. 11). Можно отметить, что  $IC_{50}$  ненагруженных липосом составила 94.84 мкг/мл в тесте цитотоксичности с MCF-7. Значение  $IC_{50}$  для липосом с комбинацией LipoCisLut составило 68.73 мкг/мл. Рис. 12 представляет суммирован-



**Рис. 12.** Значения  $IC_{50}$ , полученные для чистых липосом (Lip), свободного цисплатина (Cis), свободного лютеина (Lut), и их липосомных препаратов (LipoCis, LipoLut и LipoCisLut) в отсутствие и в присутствии гамма-радиации в различных дозах по отношению к клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7 с использованием МТТ-теста через 48 ч после обработки.

ные значения  $IC_{50}$ , полученные с помощью МТТ-теста для ненагруженных липосом, свободного цисплатина, свободного лютеина и их липосомных форм (LipoCis, LipoLut, LipoCisLut) в отсутствие и в присутствии гамма-излучения в различных дозах против линии карциномы молочной железы (MCF-7).

Цисплатин действует как радиосенсибилизатор, увеличивая количество радиации, доставляемое в зону опухоли. Радиосенсибилизаторы используются в радиационной терапии для увеличения поглощенной дозы радиации в очаге опухоли посредством увеличения собственной радиочувствительности раковых клеток. Поэтому терапия может производиться меньшими дозами радиации, снижая побочный эффект воздействия на нормальные клетки [8].

Существует существенная разница в цитотоксическом действии свободного лютеина и лютеина в липосомной форме. Мы предположили, что включение лютеина в липосомы DPPA может увеличивать способность наночастиц к агрегации, а это имеет место при высоких концентрациях и ведет к увеличению их размера (см. табл. 1). Авторы работы [43] обнаружили, что размер наночастиц играет очень важную роль в радиосенсибилизации. В результате наночастицы, нагруженные лекарствами, имели меньший радиосенсибилизирующий эффект, чем ненагруженные, особенно при высоких концентрациях лекарств. В результате химиотерапевтический эффект компенсировался этим снижением. В дополнение к эффективности в сочетании с локальной радиотерапией химиотерапия в комбинации с

радиацией очень важна, потому что химиотерапевтические агенты контролируют образование метастазов и предотвращают репарацию клеток. Также сниженная эффективность лютеина, солюбилизированного липосомами, может быть отнесена к его включению во многие липоидные домены внутри наночастиц.

Представленные данные позволяют предположить новый режим терапии, в котором свободный лютеин будет заменен цисплатином для увеличения противораковой активности против линии раковых клеток MCF-7. Имеются доказательства, что свободный лютеин обладает более выраженным токсическим эффектом на линии клеток рака груди. Авторы работы [18] предположили, что присутствие двух ортогонально ориентированных пулов лютеина, одного перпендикулярного поверхности мембраны и другого – параллельного плоскости мембраны, в результате приведет к большей стабильности лютеина в биомембранах. Натуральные терапевтические агенты могут быть лучшей заменой в терапии рака, позволяя избежать различных побочных эффектов, вызываемых химиотерапией и радиотерапией. Эта схема лечения может позволять эффективно избегать повреждения нормальных, здоровых клеток в районе вблизи опухолевых клеток [9].

## ВЫВОДЫ

Итак, в представленном исследовании показано, что комбинация химиотерапии и высокой дозы (10 Гр) ионизирующей радиации приводит к синергии в отношении ингибирования роста клеток карциномы молочной железы благодаря ин-

дукции цитотоксичности, и данный подход может быть перспективен в терапии молочной железы, несмотря на то, что нужны дополнительные исследования. Вышеизложенные наблюдения указывают на то, что лютеин может быть использован как новый противораковый агент, позволяющий использовать цитотоксичные препараты в более низких дозах, что приведет к более селективной и менее токсичной для организма схеме терапии рака молочной железы у человека. Представленные доказательства эффективности позволяют выдвинуть новую схему терапии, в которой свободный лютеин может быть замещен цисплатином для увеличения противораковой активности против линии раковых клеток MCF-7. Результаты показали, что натуральное вещество (лютеин) может быть альтернативой стандартному фармакологическому вмешательству в лечении карциномы молочной железы.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии какого бы то ни было конфликта интересов, относящегося к данной статье

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Tarver, *Cancer facts & figures* (American Cancer Society, Atlanta, 2012).
2. S. V. Talluri, G. Kuppusamy, V. V. S. R. Karri, et al., *Drug Delivery*, **23** (4), 1291 (2016).
3. S. E. Leucuta, *Curr. Clin. Pharmacol.*, **5**, 257 (2010).
4. M. Khvedelidze, T. Mdzinarashvili, E. Shekiladze, et al., *J. Liposome Res.*, **25**, 20 (2015).
5. Q. Q. Zhang, J. Chen, D. L. Zhou, et al., *Int. J. Biol. Sci.*, **13** (4), 471 (2017).
6. J. Chen, Z. Zhou, Y. Yao, et al., *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 4760 (2018).
7. L. Cui, S. Her, M. Dunne, et al., *Radiat. Res.*, **187** (2), 147 (2017).
8. N. Sisin, K. Abdul Razak, S. Zainal Abidin, et al., *Int. J. Nanomed.*, **14**, 9941 (2019).
9. R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, K.-W. Yeoh, *Int. J. Med. Sci.*, **9** (3), 193 (2012).
10. B. Yan, M. S. Lu, L. Wang, et al., *Br. J. Nutr.*, **115**, 129 (2016).
11. E. J. Johnson, *Nutr. Rev.*, **72**, 605 (2014).
12. T. Tanaka, M. Shnimizu, and H. Moriwaki, *Molecules*, **17**, 3202 (2012).
13. A. D. Bangham, M. W. Hill, and N. G. A. Miller, In *Methods in Membrane Biology*, ed. by E. D. Karn (Plenum Press, New York, 1974), Vol. 1, pp. 1–68.
14. M. W. Shafaa, H. A. Diehl, and C. Socaciu, *Biophys. Chem.*, **129**, 111 (2007).
15. D. B. Rodriguez-Amaya, *A guide to carotenoid analysis in foods*, Vol. 71 (ILSI Press, Washington, 2001).
16. P. K. Bellamakondi, A. Godavarthi, M. Ibrahim, et al., *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **7** (2), 17 (2014).
17. U. Kätzel, PhD Thesis (Technische Universität, Dresden, 2007), <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:swb:14-1197634640783-66357>.
18. A. Sujak, J. Gabrielska, and W. Grudzecki, *Arch. Biochem. Biophys.*, **371**, 301 (1999).
19. D. Paolino, M. Fresta, P. Sinha, and M. Ferrari, In *Encyclopedia of medical devices and instrumentation*, 2nd ed., Ed. by J. G. Webster (Wiley, New York, 2006), pp. 437–495.
20. L. Plank, C. E. Dahl, and B. R. Ware, *Chem. Phys. Lipids*, **36** (4), 319 (1985).
21. J. W. Klein, B. R. Ware, G. Barclay, and H. R. Petty, *Chem. Phys. Lipids*, **43** (1), 13 (1987).
22. S. Law, W. Lo, S. Pai, and G. The, *Int. J. Pharmaceut.*, **43** (3), 257 (1988).
23. K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, et al., *Biophys. Chem.*, **41** (2), 175 (1991).
24. I. Kolman, N. Pippa, A. Meristoudi, et al., *J. Therm. Analysis Calorimetry*, **123** (3), 2257 (2016).
25. K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1788** (5), 954 (2009).
26. R. Koynova and M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Biomembranes*, **1376** (1), 91 (1998).
27. C. H. Spink, *Methods Cell Biol.*, **84**, 115 (2008).
28. M. W. Shafaa, N. M. Sabra, and R. A. Fouad, *Biopharmaceut. Drug Disposition*, **32** (9), 507 (2011).
29. T. B. Pedersen, T. Kaasgaard, M. Ø. Jensen, et al., *Biophys. J.*, **89** (4), 2494 (2005).
30. A. V. Popova and D. K. Hinch, *Biophys. J.*, **93** (4), 1204 (2007).
31. W. I. Gruszecki and K. Strzałka, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis of Disease*, **1740** (2), 108 (2005).
32. N. Fa, S. Ronkart, A. Schanck, et al., *Chem. Phys. Lipids*, **144** (1), 108 (2006).
33. S. S. Bafna, T. Sun, and D. G. Baird, *Polymer*, **34** (4), 708 (1993).
34. A. Blume, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **1**, 64 (1996).
35. F. Severcan, I. Sahin, and N. Kazancı, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1668** (2), 215 (2005).
36. M. M. Mady, M. W. Shafaa, E. R. Abbase, and A. H. Fahium, *Cell biochem. biophys.*, **62** (3), 481 (2012).
37. K. Kushwaha, J. Saxena, B. K. Tripathi, and M. K. Agarwal, *J. BioSci. Biotechnol.*, **3** (3), 253 (2014).
38. M. J. Llansola-Portoles, A. A. Pascal, and B. Robert, *J. Roy. Soc. Interface.*, **14** (135), 20170504 (2017).
39. A. Blume, W. Hubner, and G. Messner, *Biochemistry.*, **27**, 8239 (1988).

40. W. Grudzinski, L. Nierzwicki, R. Welc, et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 1 (2017).  
 41. P. R.-R. Sowmya, B. P. Arathi, K. Vijay, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **106**, 58 (2017).  
 42. X. Gong, J. R. Smith, H. M. Swanson, and L. P. Rubin, *Molecules*, **23** (4), 905 (2018).  
 43. X. D. Zhang, D. Wu, X. Shen, et al., *Biomaterials*, **33** (27), 6408 (2012).

## Comparative Cytotoxic Activity of Lutein or Cisplatin Doped with Liposomes against Breast Cancer Cell Lines after Radiotherapy

R.A. Lafta\*, M.W. Shafaa\*, W.M. Darwish\*\*, and M.S. El-Nagdy\*

\*Faculty of Natural Sciences, Helwan University, Cairo, 11765 Egypt

\*\*Department of Polymers and Pigments, National Research Centre, Elbohouth St., Dokki, Giza, 12622 Egypt

Interactions of the anticancer drug cisplatin or the antioxidant drug lutein with liposomes as model membranes were characterized. All liposomes had the almost spherical shape, taking into account that liposomes without the said drugs were more evenly dispersed and tended to aggregate less. The mean size diameter of empty liposomal samples was  $617.90 \pm 75.64$  nm, while liposomes loaded with cisplatin, lutein and a cisplatin+lutein combination were  $425.60 \pm 64.74$  nm,  $877.85 \pm 93.90$  nm and  $189.91 \pm 136.84$  nm, respectively, in diameter. The incorporation of cisplatin or lutein into liposome membranes resulted in an increase in the zeta potential values. The lowest zeta potential value was achieved in liposomes containing cisplatin in combination with lutein. The addition of cisplatin to liposomes caused a shift in the melting temperature towards higher values than those of the main peak of empty liposomes indicating a conformational disorder within the phospholipids. Encapsulation of lutein into liposomes resulted in the disappearance of the main characteristic endothermic peak of pure liposomes. FTIR spectroscopy confirmed the interaction of lutein or cisplatin with functional groups in liposomes. In the absence of external gamma-irradiation, the  $IC_{50}$  value for free lutein in the cytotoxic assay with MCF-7 treated cells was  $10.62 \mu\text{g/ml}$ , while free cisplatin showed the  $IC_{50}$  value of  $41.02 \mu\text{g/ml}$ .  $IC_{50}$  was  $65.84 \mu\text{g/ml}$  and  $34.29 \mu\text{g/ml}$  for nanoliposomal lutein and cisplatin, respectively. Using the combined therapy of gamma irradiation at dose rate 5 Gray followed by 10 Gray, the  $IC_{50}$  value for free lutein changed from 17.0 to  $9.5 \mu\text{g/ml}$ .  $IC_{50}$  for free cisplatin changed from 51.00 to  $43.09 \mu\text{g/ml}$ . This study showed that cytotoxic effect of a standard form of lutein is stronger than that of nanoliposomal lutein. The current evidence reveals a new regimen for the treatment during which replacing cisplatin with free lutein increases anticancer activity against the MCF-7 cancer cell line.

*Keywords: lutein, cisplatin, liposomes, FTIR spectroscopy, cytotoxicity, gamma irradiation*

## НИЗКОАКТИВНЫЕ ФОРМЫ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ КОНТЕКСТАХ

© 2023 г. Л.Н. Плеханова\*.\*, С.Н. Удальцов\*, А.С. Сыроватко\*\*.\*, Н.Н. Каширская\*

\*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институтская ул., 2/2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

\*E-mail: dianthus1@rambler.ru

\*\*МБУ «Коломенский археологический центр», Кремлевская ул., 5, Коломна Московской области, 140400, Россия

\*\*\*Институт географии РАН, Старомонетный пер., 29/4, Москва, 119017, Россия

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 21.08.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Представлены результаты исследования низкоактивных форм целлюлозолитических микроорганизмов в почвах археологических памятников. Объектами исследования послужили грунты со следами древесных конструкций в погребениях вятичей (XII в.). К настоящему времени следы древесины не проявляются на макроуровне. Полученные данные сопоставлены с результатами лабораторного эксперимента по определению скоростей разложения целлюлозы в грунтах из различных археологических контекстов. Целлюлозолитическую активность определяли аппликационным методом. Показано, что целлюлазная активность почвогрунтов со следами погребальных деревянных конструкций составляет 20% от уровня современных почв. Это позволяет предполагать пробуждение либо наличие живых низкоактивных микроорганизмов, сохранившихся в почве на протяжении 800 лет.

*Ключевые слова:* палеопочвы, целлюлоза, целлюлаза, микроорганизмы, погребальный грунт, кремации, захоронения.

DOI: 10.31857/S0006302923050204, EDN: MZZDIC

Различные типы антропогенного воздействия на почву изменяют условия существования почвенных микроорганизмов и нарушают нормальное протекание в почвах процессов микробной трансформации, в том числе, оставляя в почвах следы присутствия различных антропогенных нарушений. Последствия антропогенного воздействия на почвенные микроорганизмы изучены слабо, в особенности — антропогенного воздействия в древности.

К концепции биологической памяти почв археологическое почвоведение вплотную приблизилось через традиционные работы по палеоклиматическим реконструкциям ([1–6] и др.), присовокупив к ним микробиологическую составляющую ([7–9] и др.). Этот этап длился около двадцати лет. Следующим шагом стали отдельные работы по культурным слоям древних поселений и идентификации их хозяйственно-бытовых зон с определенными физико-химическими

и микробиологическими свойствами [10–12], и единичные работы с диагностикой древних пастбищных нагрузок [13, 14].

Целлюлоза является наиболее распространенным полисахаридом растительного мира и представляет собой высокомолекулярный полимер с неразветвленной цепью, состоящей из соединенных 1,4-связями глюкозных остатков, число которых в молекуле глюкозы колеблется от 300 до 3000. В состав целлюлозы (клетчатки) входит более 50% всего органического углерода биосферы. Микроорганизмы, разлагающие целлюлозу, играют важную роль в процессе минерализации и круговороте углерода. Первым этапом в разложении целлюлозы является ферментативный гидролиз этого полимера, процесс протекает под влиянием фермента целлюлазы. Нерастворимая в воде клетчатка превращается в дисахарид целлобиозу, которая затем под влиянием фермента целлобиазы гидролизует и переходит в глюкозу. При аэробном разложении целлюлозы в основном получаются два продукта — углекислый газ и

Сокращения: КОЕ — колониеобразующие единицы, КМЦ — карбоксиметилцеллюлоза.

вода. При этом могут накапливаться небольшие количества органических кислот.

Целлюлозоразрушающая активность микроорганизмов, преимущественно, бактерий, является одним из показателей биологической активности почвы. Биологическая активность почв играет роль при оценке почвенного плодородия, оценке возможности вовлечения в биологический круговорот содержащихся в почвах элементов азотного и зольного питания. Разнообразие микрофлоры, способной разлагать целлюлозу в почве, позволяет трансформировать это вещество в различных условиях аэрации, при кислой или щелочной pH, низкой или высокой влажности и при разной температуре. Целлюлозу разлагают аэробные микроорганизмы (бактерии, миксобактерии, актиномицеты и грибы) и анаэробные бактерии. Наиболее богата в почве представлена группа аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

В отличие от шерсти, кожи или войлока, целлюлоза является основным компонентом тканей, созданных из растительного сырья, например, льна. Остатки тканей растительного происхождения могут быть надежно идентифицированы с помощью фитолитного анализа, возможно применение споро-пыльцевого анализа. Мы пробуем применить микробиологический метод с целью идентификации поступления целлюлозы антропогенного происхождения в почвогрунты захоронений и погребальных конструкций 800-летнего возраста.

В археологическом почвоведении сейчас сформулирована концепция биологической памяти почв и культурных слоев археологических памятников. Под этим термином предлагается понимать информацию об условиях почвообразования в прошлом, носителями которой являются живые организмы [15], их генеративные и покоящиеся формы, отмершие и минерализованные организмы и ткани, биоорганические соединения, низко- и супрамолекулярные продукты микробной трансформации органического вещества, а также следы и продукты жизнедеятельности живых организмов в почвенном профиле. Установленные на сегодняшний день временные масштабы функционирования микробной и ферментной памяти почв составляют до нескольких тысяч лет.

На почвогрунтах из древних сосудов показан механизм функционирования микробной памяти почв, способность микробного сообщества почв сохранять изменения своей структуры, функциональное разнообразие и биологическую активность, возникшие в результате действия природных или антропогенных факторов в прошлом. Так, установлено что уровень липазной активности в почве прямо зависит от количества поступа-

ющего субстрата (жира) в образцах грунта из керамических сосудов [16], то есть после разложения органических остатков в почве формируется ферментный пул, который может сохраняться на протяжении неопределенно длительного периода времени. Например, был реконструирован состав пищи под развалом крупного сосуда эпохи поздней бронзы [17], то есть сохраняются не только естественные турбации [18], что позволяет прочтение истории ландшафта, но и локальные участки привноса вещества, что детализирует историю антропогенных воздействий.

В одном из горшков из погребения эпохи бронзы (II тыс до н.э.) путем мультисубстратного тестирования дыхательной активности микроорганизмов были выявлены индикаторные соединения, такие как лактат и ацетат — из группы солей карбоновых кислот, цистеин — из группы аминокислот, перспективные для реконструкции исходного содержимого ритуальных сосудов. Эталонами сравнения стали данные длительного двухгодичного инкубационного эксперимента по скорости разложения почвогрунтов с добавленными различными субстратами [19]. Показано, что при инкубационном эксперименте изменяются функциональные особенности микробных сообществ. Эти изменения оцениваются с помощью мультисубстратного тестирования дыхательной активности микроорганизмов, когда почвенным микробным сообществам предлагаются низкомолекулярные индукторы дыхания (аминокислоты и карбоновые кислоты) и проводится регистрация изменения интенсивности выделения углекислого газа почвенными микроорганизмами. Специфические дыхательные отклики микробных сообществ на внесение солей карбоновых кислот вместе с высокой микробной биомассой придонного слоя в горшке указывают на то, что горшок изначально содержал белковый продукт с возможной составляющей масла и крахмала.

По аналогии с определением субстратов животного происхождения, кератина и коллагена, входящих в состав шерсти и кож [20], а также определения наличия специфичных групп, таких как термофилы [21], нами сделана попытка применить методы чашечного посева с целью определения поступления целлюлозы.

Любые попадающие в почву вещества, такие как шерсть с кожей или целлюлозосодержащие ткани, будут являться питательными субстратами для почвенных микроорганизмов. Подобный подход к определению животных субстратов ранее применялся для идентификации содержимого ритуальных сосудов [22]. Численность молочнокислых бактерий, выращенных из грунта погребального сосуда срубной культуры (XVI—XV вв. до н.э.) увеличилась в три раза на молочной среде по сравнению с контролем, что свидетель-

ствовало о наличии молочного продукта. Поскольку в аэробных условиях клетчатку разлагают многие микроорганизмы различных систематических групп, мы предлагаем при проведении археологических исследований определять увеличение общей численности микробного сообщества на субстрате, содержащем целлюлозу.

Изложим основания, позволяющие нам предполагать отклик целлюлозолитиков на внесение субстратов в древности. Ранее для определения кератинолитической активности в почве был разработан метод приманок [23], позволяющий судить о степени выраженности данного показателя по интенсивности зарастания субстрата — конского или человеческого волоса — колониями кератинолитических грибов. Для выявления следов навоза, внесенного на поля в древности, были использованы микробиологические посева термофильных микроорганизмов [24, 25]. Показана высокая сохранность ферментативной активности в культурных слоях поселений эпохи бронзы [26, 27]. Иными словами, определять таким образом другие субстраты оказалось возможным.

Пионерные работы по обнаружению целлюлазной активности в археологических контекстах уже проводились в лаборатории археологического почвоведения ИФХиБПП РАН на двух объектах. При микробиологических исследованиях каштановых палеопочв, погребенных под валом Анны Иоанновны (1718—1720 гг.), было установлено, что микробные сообщества погребенных почв отличались от современных по ряду характеристик, в числе которых присутствовала и целлюлазная активность [28]. Более подробно изучались культурные слои поселения аланской культуры Подкумское-2 (II—IV вв. н. э.) и современных дерново-карбонатных почв вблизи поселения, имеющих различное хозяйственное использование. Наряду с показателями суммарной микробной биомассы, мицелия микроскопических грибов, уреазной активности были выявлены повышенные значения целлюлазной активности именно в культурных слоях. Это позволяет заключить, что исходные характеристики микробиологических свойств профиля более полутора тысяч лет сохраняются с отличиями от современных фоновых почв [24].

Скорость деструкции целлюлозы в почве может служить индикаторным показателем общей биологической активности в почвах, биологической трансформации растительных остатков в биоценозе, что, в свою очередь будет отражать процессы самовосстановления почвенного сообщества микроорганизмов после прекращения кратковременного антропогенного воздействия. Считается, что скорость разложения целлюлозы находится в прямой зависимости от содержания доступного микроорганизмам азота [29—32]. В

нашей стране ведутся многолетние наблюдения за последовательными изменениями биологической активности почв, с целью выработки стратегий природопользования в нарушенных местообитаниях. Но даже в таких работах целлюлазная активность исследуется редко, исследователей больше интересуют метанотрофы в разных типах почв, в том числе и в серых лесных [33], как в нашем эксперименте. Константы минерализации целлюлозы были рассчитаны для серой лесной почвы в целях биоиндикации минерализуемого пула органического вещества почвы [34]. Используются аппликационные методы, которые основаны на получении следов воздействия микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности на те или иные материалы непосредственно в почве.

В середине XX века было предложено учитывать скорость разложения клетчатки по убыли в весе льняного или бумажного полотна, заложенного в почву [35—37]. Синтез белков или аминокислот на ткани протекает интенсивно в той зоне, где она более активно разрушается микробами. Накопление на ткани, помещенной в почву, заметного количества аминокислот, пропорционально биологической активности почвы. Хотя при использовании этого подхода определение биологической активности производится не непосредственно в почве, а в зоне контакта ее с льняным полотном, тем не менее, метод дает возможность определять активность *in situ* и рекомендован для широкого использования [38], поскольку дает возможность приблизиться к определению протекания процессов в природных условиях различных биоценозов, оценить микробно-экологические пейзажи по генетическим горизонтам. Лидером по доступности исполнения и информативности стала методика определения биологической активности почв, а именно, целлюлозоразрушающей активности в почвенном слое 0—20 см путем закладки полотен на срок, близкий к длительности всего вегетационного сезона, с поэтапным снятием данных. Максимум биологической активности на изученных почвах приходится на слой 10—20 см, что обусловлено длительным сохранением влаги на этой глубине [39]. Установлена четкая зависимость целлюлазной активности от поступающих тепла и влаги, выявлена динамика показателей внутри вегетационного сезона, выявлены лимитирующие факторы, в степной зоне таким фактором является влага [40, 41]. Иными словами, в черноземных почвах степной зоны заложенные целлюлозные полотна разлагаются за один или несколько полевых сезонов, в зависимости от влажности и глубины залегания. Соответственно, для исторических периодов и древности на почвах других природных зон мы можем ожидать только отклика на вновь внесенный питательный

субстрат пробуждением именно тех покоящихся форм, что могут сохраняться.

Целью настоящей работы является оценка численности целлюлозолитических микроорганизмов, большинство из которых в почвах эксперимента будут грибами, в глубоких слоях серых лесных супесчаных почв для выявления следов привнесения целлюлозы в погребениях и погребальных конструкциях 800-летнего возраста.

### ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы грунта из средневековых погребений были отобраны при раскопках курганных могильников Кременье и Щурово (Южное Подмосковье, вблизи г. Ступино). Эти могильники расположены в ландшафте на надпойменных террасах р. Оки; прилегающие почвы формируются на песках и супесях, что позволяет корректно сопоставлять данные. Для могильника Кременье установлен факт сочетания архаичного погребального обряда, когда грунтовые кремации помещены в небольшие ямки или рассыпанные по древней поверхности, с поздней датой – не ранее середины XII в., т.е., времени вятичей. Отмечена синхронность грунтовых кремаций курганной части могильника и кремированных захоронений, которые представляли собой единый комплекс в глубине «вятической» территории и с «вятическими» вещами [42, 43]. Образцы для анализа грунтов были взяты из погребений-кремаций №№ 5, 8, 10, из участков контакта слоя кремации (темно-серого песка с углем и кальцинированными костями) с материковым светло-серым или светло-желтым песком. На могильнике Щурово, расположенном на некотором расстоянии от могильника Кременье, образцы были отобраны из ямы 47 (участок 15, раскоп II); это кремированное погребение с множественными костями, принявшими вертикальное положение, вероятно, после просадки грунта в полость под деревянным перекрытием. Основной образец представляет собой «тело» кремации, другой взят из обрамления кремации, представляющего собой коричневый грунт. Образец из канавки квадрата 577 (участок 18, раскоп II) отобран для характеристики круговой конструкции, опоясывающей кремированное погребение.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Определение численности колониеобразующих единиц целлюлозолитических микроорганизмов.** Основные результаты были получены посевами на среды, методом, модифицированном в лаборатории археологического почвоведения ИФХи-БПП РАН. Образцы почвогрунтов для посевов из конструкций захоронений разных сезонов раскопок отбирали с соблюдением условий стерильно-

сти, после отбора до трех суток образцы хранили охлажденными при 4°C, длительное хранение осуществлялось при –24°C, что находится в пределах температур, характерных для данной климатической природной зоны. Перед экспериментом образцы были разморожены, а затем инкубированы 7 суток при 22°C и влажности до 60% полной полевой влагоемкости.

Для подсчета общей численности колониеобразующих единиц (КОЕ) на целлюлозном субстрате использовали 20%-й почвенный агар с добавлением 10% карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Стерилизацию среды проводили в 2 этапа. Для учета контрольной численности КОЕ применяли чистый почвенный агар. Навеску грунта массой 1 г заливали 10 мл 0.5%-го раствора пиродифосфата натрия, затем обрабатывали ультразвуком при мощности 50 Вт и частоте 22 кГц в течение 15 с для дезинтеграции почвенных частиц. Из третьего разведения полученной суспензии на поверхность твердых питательных сред наносили каплю объемом 50 мкл. Инкубацию проводили в течение 10–14 суток при 26°C. Общую численность КОЕ после подсчета колоний определяли по формуле:

$$N = (a/v \times 1000 \times 1000) / (m \times K_{\text{вл}} \times 1000),$$

где  $N$  – общая численность КОЕ (тыс. / г почвы),  $a$  – число колоний на поверхности питательной среды,  $v$  – объем капли (мкл), 1000 – число мкл в 1 мл, 1000 – третье разведение суспензии,  $m$  – масса навески,  $K_{\text{вл}}$  – коэффициент увлажненности почвы для расчета общей численности КОЕ на 1 г абсолютно сухого грунта.

Увеличение общей численности КОЕ на почвенном агаре с карбоксиметилцеллюлозой относительно их общей численности на чистом почвенном агаре определяли по формуле:

$$X = (N_{(\text{ПА}+\text{КМЦ})} - N_{(\text{ПА})}) / N_{(\text{ПА})} \times 100\%,$$

где  $X$  – искомый прирост общей численности КОЕ микробного сообщества, %;  $N_{(\text{ПА}+\text{КМЦ})}$  – общая численность КОЕ микроорганизмов на почвенном агаре с карбоксиметилцеллюлозой;  $N_{(\text{ПА})}$  – общая численность КОЕ микроорганизмов на чистом почвенном агаре.

**Термостатный эксперимент по установлению скоростей разложения целлюлозы почвами в природной зоне изучаемых кремированных погребений.** Данный эксперимент был проведен для понимания скоростей процессов в связи с вариабельностью свойств почв различных природных зон (и, соответственно, их целлюлозоразлагающей активности) на усредненном почвогрунте заполнения круговой канавки вокруг погребения 5. В целлюлозоразлагающем термостатном эксперименте использовали образцы, привезенные охлажденными (4°C) в лабораторию непосредственно

после отбора. Эксперимент проведен в условиях постоянной температуры (30°C, термостат) и влажности, составляющей 60% от полной полевой влагоемкости (с поддержкой каждые 5 суток). Целлюлазную активность почв определяли аппликационным методом [23], который был модифицирован в лаборатории археологического почвоведения [24]. Для этого в чашки Петри помещали слой увлажненной до 60% полной влагоемкости почвы, поверх которого помещали стерильную капроновую сетку с ячейками 3×3 мм. На сетку укладывали диск из грубой стерильной льняной ткани, который также перекрывали сеткой. Сверху насыпали еще один слой почвы. Чашки помещали в термостат при температуре 30°C. После 30 суток инкубации образцы ткани извлекали из чашек, тщательно промывали, помещали в сушильный шкаф и высушивали при температуре 105°C до постоянного веса. Целлюлазную активность рассчитывали по изменению массы образцов ткани после инкубации от исходной. Поэтому активность выражена в процентах по убыли веса заложенного в чашки полотна, что не позволяет сравнивать напрямую эти данные с числом колониеобразующих единиц. Мы использовали этот метод для понимания скоростей разложения целлюлозы в нашем биогеоценозе и сопоставления с литературными данными, увеличив время инкубации с последовательным снятием результатов в пяти повторностях на сроках 10–30–40–60 суток.

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами [44].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность колоний целлюлозоразлагающих микроорганизмов в наших экспериментах (табл. 1) мы сравниваем со значениями из фоновой почвы того же возраста, что и кремированные захоронения, выделяя случаи достоверного превышения фоновых значений.

Для интерпретации данных рассмотрим результаты термостатного эксперимента (рис. 1). В этом эксперименте на всех сроках экспозиции в пяти повторностях достоверно для каждого срока была зафиксирована убыль в массе как для льняных дисков, так и для целлюлозных фильтров. Льняные диски демонстрируют убыль в массе от 5 до 10% на различных сроках экспозиции. Убыль в массе целлюлозных фильтров колеблется от 3 до 20%, демонстрируя разброс данных. Однако нижний диск во всех случаях, как для льна, так и для целлюлозных фильтров, разлагался более интенсивно по сравнению с верхним диском, что объясняется более высокой влажностью на дне чашки Петри и плотным контактом с грунтом. Отметим, что эти результаты сравнимы (с учетом уменьшения из-за легкого гранулометрического

состава нашей почвы и более холодной природной зоны) с данными по целлюлазной активности как культурных слоев поселения Подкумское [24, 28], так и с данными для биогеоценозов [40], поскольку выражены в одних и тех же единицах.

Для каждого срока экспозиции мы рассчитали скорость разложения целлюлозных субстратов, выраженную в процентной убыли массы в сутки. При этом целлюлозные фильтры демонстрируют падение скорости разложения в зависимости от срока экспозиции, но имеют флуктуации. Льняные диски демонстрируют повышенные скорости разложения субстрата в первые десять суток эксперимента, на уровне 0.7% в сутки. К тридцатым суткам экспозиции скорость падает до 0.2% в сутки и держится на этом уровне до конца эксперимента, демонстрируя стабилизацию. Соответственно, выявлено, что начальные скорости разложения льняных дисков в три раза выше, чем средняя стабильная скорость. Подобная картина начальных процессов почвообразования в биогеоценозах многократно демонстрировалась на других почвенных показателях.

Проводя сравнения целлюлазной активности культурных слоев для ключевого участка Подкумское-2 [24], отметим значимое ее повышение (в два раза по сравнению с фоном, в абсолютных значениях до 60% при фоновых значениях на уровне 17–33%) всего в одном образце из двух десятков. Образец был взят с глубины 10–30 см, в зоне I поселения, где разрез культурного слоя расположен у стенки большой западины внутри загона, ограниченного со всех сторон развалами стен. Эта зона использовалась для содержания скота, где загоны выстилались подстилками.

Второе значимое повышение поселения Подкумское в абсолютных значениях невелико, на уровне 30%, что сопоставимо с фоном, но находится на глубине 70–80 см зоны II эксплуатации, где не видны контуры развалов построек, что предполагает иной характер использования территории в аланское время (жилая зона II–IV вв. н.э.), поэтому объяснимо антропогенным приростом вещества.

Эти данные хорошо сопоставимы с нашими, когда у нас в термостатном эксперименте серыми лесными супесями террасы р. Оки в Московской области Московской области за два месяца разлагается до 10–20% внесенного субстрата, в то время как фоновые значения горных черноземов первой речной террасы Карачаево-Черкесской республики демонстрируют максимальные значения до 30–40%. Антропогенная нагрузка от проживания населения оставляет след в виде измененной ферментативной активности почв.

Переходя от целлюлазной активности естественных почв биогеоценозов, через подтвержденные следы различного антропогенного воз-

**Таблица 1.** Характеристики исследуемых участков генома *S. cerevisiae*

Характеристика анализируемого грунта, средняя глубина залегания, см;	Численность микробных колоний, млн. КОЕ/г почвы		Увеличение численности колоний при добавлении целлюлозы в почвенный агар, %
	Почвенный агар	Почвенный агар с добавлением КМЦ	
<b>Могильник Кременье</b>			
Разрез современной почвы на насыпи кургана			
А1 (10 см)	0.97 ± 0.03	1.91 ± 0.57	97
АВ насыпи (20 см)	0.63 ± 0.03	0.62 ± 0.10	нет
АВ насыпи (38 см)	0.59 ± 0.01	0.83 ± 0.11	41
Фрагмент строительной конструкции кургана с печиной (60 см)	0.88 ± 0.18	0.87 ± 0.05	нет
В насыпи (75 см)	0.85 ± 0.01	0.65 ± 0.01	нет
<b>Могильник Кременье</b>			
Захоронения с кремированными останками			
Раскоп 1, участок 8, погребение 5, заполнение канавки			
Северная часть, придонный слой	1.66 ± 0.26	1.31 ± 0.03	нет
Восточная часть, низ кремации	0.97 ± 0.01	1.11 ± 0.09	14
Левая сторона восточной части, коричневый грунт	0.68 ± 0.08	0.71 ± 0.05	нет
Правая сторона восточной части	2.03 ± 0.07	1.95 ± 0.69	нет
Нижний слой восточной части, черный грунт	1.26 ± 0.16	1.22 ± 0.22	нет
Восточная часть, коричнево-охристый грунт	1.44 ± 0.24	1.54 ± 0.08	нет
Западная часть	1.50 ± 0.12	1.31 ± 0.05	нет
Заполнение канавки, усредненный образец грунта	3.04 ± 0.04	3.07 ± 0.09	нет
Раскоп 1, участок 9, погребение 8			
Центр погребения, дно	2.53 ± 0.07	2.30 ± 0.11	нет
Центр погребения, придонная часть	1.06 ± 0.08	1.24 ± 0.05	17
Правая сторона придонной части	1.33 ± 0.03	1.38 ± 0.02	нет
Левая стенка	0.71 ± 0.10	0.69 ± 0.12	нет
<b>Могильник Щурово, кремированные захоронения</b>			
Раскоп II, участок 15, яма 47, обрамление кремации, коричневый грунт	0.57 ± 0.01	0.73 ± 0.01	29
Раскоп II, участок 15, яма 47, «тело» кремации	0.57 ± 0.08	0.54 ± 0.02	нет
Раскоп II, участок 18, кв. 577, круговая канавка	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.01	нет

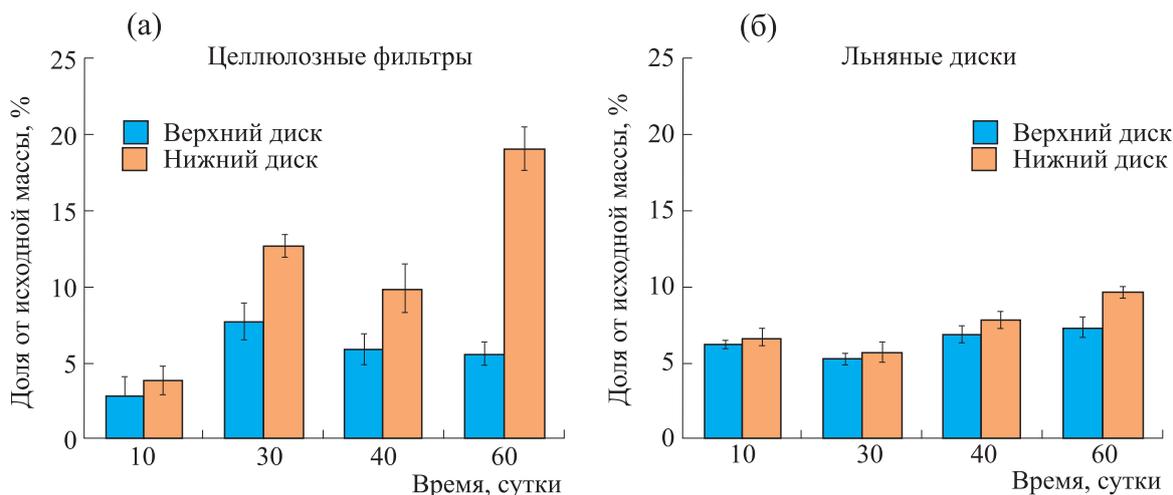


Рис. 1. Целлюлазная активность усредненных почвогрунтов круговой канавки погребения 5 (Кремень) в термостатном 60-суточном эксперименте при использовании целлюлозных фильтров (а) и льняных дисков (б).

действия, в частности, загонного содержания скота, к кремированным захоронениям, остановимся на фоновых значениях почвы курганной насыпи 800-летнего возраста, выступающей корректным одновозрастным фоном для наших исследуемых кремированных погребений. Здесь отмечено достоверное увеличение КОЕ в верхнем горизонте фоновой почвы до 97% (табл. 1), что свидетельствует о работоспособности примененного метода.

Также увеличение КОЕ целлюлозолитиков по сравнению с почвенным агаром без карбоксиметилцеллюлозы, получено еще в трех образцах из всей выборки в 22 образца. Слабое превышение — на 17% — было зафиксировано в центре погребения 8, в его придонной части. В канавке погребения 5, в восточной ее части, также было отмечено увеличение КОЕ целлюлозолитиков на 14%.

Превышение на 30% зафиксировано в коричневом грунте обрамления, в кремации ямы 47 могильника Щурово. Проявившие целлюлазную активность микроорганизмы позволяют реконструировать наличие у данной кремации обертки растительного происхождения. Поскольку температура горения при кремировании превышает 750°C, то неполное сгорание горящих материалов, входящих в состав самих кремированных останков, можно исключить. Поэтому, реконструируя диагенез, мы предполагаем либо укутывание этой кремации в ткани, либо размещение их на деревянной конструкции (метод не позволяет отделить лигнин), которая сгнила, и кости кремации просели вниз, где в данный момент грунты демонстрируют превышение численности микроорганизмов на почвенном агаре, содержащем карбоксиметилцеллюлозу.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целлюлазная активность почвогрунтов погребальных сооружений и захоронений в зоне серых лесных супесчаных почв зафиксирована на уровне до 20% на примере образцов из окружной канавки погребения 5 в ходе лабораторного 60-суточного термостатного эксперимента при 22°C.

Впервые методом чашечного посева в шести повторностях, по разнице в числе колониеобразующих единиц на среде с внесением целлюлозного субстрата, зафиксированы превышения целлюлазной активности в трех образцах почвогрунтов кремированных захоронений 800-летнего возраста. Отметим, что при детальном изучении культурных слоев поселения Подкумское, значимая разница по целлюлазной активности получена всего в двух образцах [24], но хорошо и логично объяснима типом хозяйственного использования территории.

У нас фоновые значения естественной целлюлазной активности в верхнем горизонте значительно превышают активность почвогрунтов, но в горизонте на глубине до 40 см уже сопоставимы с максимумами в кремированных грунтах. Кремированные объекты позволяют предполагать выгорание привнесенных в древности целлюлозосодержащих предметов, но даже в этом случае придонная часть погребения 8 демонстрирует некоторое повышенное значение, что позволяет предполагать новую тканевую обертку при захоронении уже кремированных остатков, иными словами, уже кремированные остатки перенесли и захоронили в новой обертке, которая не побывала в огне. Этот же образец продемонстрировал повышенную кератинолитическую активность [20].

В кремации, расположенной в яме 47 Щуровского могильника, где превышение численности колониобразующих единиц целлюлозолитических микроорганизмов составляло 30%, предполагается исходное присутствие целлюлозы в древности. Это позволяет археологам предположить наличие при захоронении деревянного перекрытия над полостью, не имеющего морфологических следов к настоящему времени.

По сравнению с кератинолитической активностью, для которой ранее нами демонстрировалось превышение до восьми раз по сравнению с фоном [20], целлюлазная активность более сложна в интерпретации относительно фоновых значений ввиду высокой распространенности этого биополимера в природе и круговоротах в биогеоценозах. Но при этом, если превышение зафиксировано, оно не является случайностью, позволяя получать логичные объяснения археологическим контекстам.

Изменения климатических условий и древние антропогенные воздействия отражаются в микробной памяти погребенных почв в виде изменения биомассы и эколого-трофической структуры почвенного микробного сообщества. В микробной памяти антропогенный привнос веществ в почву сохраняется в виде увеличения численности микроорганизмов, специализирующихся на разложении данного субстрата; в ферментативной памяти — в виде увеличения активности экзо- и эндоферментов [26], которые участвуют в утилизации этих субстратов почвенными микроорганизмами. Применительно к почвам со следами древнего антропогенного преобразования наряду с микробной памятью реализуется ферментная память, позволяющая реконструировать поступление в почву неспецифичных для нее субстратов, в первую очередь субстратов антропогенной природы.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Лабораторный эксперимент по определению целлюлазной активности в динамике выполнен в рамках Государственного задания № АААА-А18-118013190175-5 «Развитие почв в условиях меняющегося климата и антропогенных воздействий». Определение целлюлазной активности почвогрунтов кремированных погребений, а также адаптация методики применительно к древним объектам, выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-68-00010, рук. А.В. Борисов).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Кудеяров, В. А. Демкин, Д. А. Гиличинский и др., Почвоведение, № 9, 1027 (2009).
2. Ю. Г. Чендев, А. Л. Александровский, О. С. Хохлова и др., Почвоведение, № 1, 3 (2017).
3. T. Alekseeva, A. Alekseev, V. Demkin, and B. A. Mather, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **249** (1–2), 103 (2007).
4. L. N. Plekhanova and V. A. Demkin, *Eur. Soil Sci.*, **41** (1), 1 (2008)
5. N. E. Ryabogina, A. S. Afonin, S. N. Ivanov, et al., *Quat. Intern.*, **528**, 73 (2019)
6. A. Rusakov, A. Popov, A. Makeev, et al., *Quat. Intern.*, **502** (Part B), 197 (2019).
7. T. S. Demkina, V. A. Demkin, and A. V. Borisov, *Eur. Soil Sci.*, **33** (9), 978 (2000)
8. T. E. Khomutova, N. N. Kashirskaya, T. S. Demkina, et al., *Quat. Intern.* **507**, 84 (2019). DOI: 10.1016/j.quaint.2019.02.013
9. Е. В. Благодатская, О. С. Хохлова, Т. Х. Андерсон и С. А. Благодатский, *Микробиология*, **72** (6), 847 (2003).
10. L. N. Plekhanova and V. A. Demkin. *Eur. Soil Sci.*, **38** (9), 973 (2005).
11. А. В. Борисов, *Поволжская археология*, № 4 (6), 235 (2013).
12. А. В. Борисов, А. В. Бухонов, Е. И. Гак и Л. Н. Плеханова, в сб. *Археология Восточно-Европейской степи. Материалы IV Нижневолжской международной археологической конференции* (Саратов, 2013), сс. 66–74.
13. L. N. Plekhanova, *Arid Ecosystems*, **9** (3), 187 (2019). DOI: 10.1134/S2079096119030077
14. E. Chernysheva, T. Khomutova., A. Borisov, et al., *J. Archaeol. Sci.: Reports*, **37**, 103012 (2021). DOI: 10.1016/j.jasrep.2021.103012
15. А. В. Борисов, Т. С. Демкина, Н. Н. Каширская и др., *Почвоведение*, № 7, 849 (2021). DOI: 10.31857/S0032180X21070029
16. Е. В. Чернышева, А. В. Борисов и В. Ю. Малашев, *Краткие сообщения Института археологии*, № 263, 105 (2021). DOI: 10.25681/IARAS.0130-2620.263.105-116
17. О. С. Тупахина, Д. С. Тупахин, Р. А. Колесников и Л. Н. Плеханова, *Российская археология*, № 2, 47 (2022). DOI: 10.31857/S0869606322020192
18. L. N. Plekhanova and O. S. Tupakhina, *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **817**, 011001 (2021). DOI: 10.1088/1755-1315/817/1/011001
19. Т. Э. Хомутова, К. С. Душанова и А. В. Борисов, *Нижневолжский археологич. вестн.*, **19** (1), 188 (2020). DOI: 10.15688/nav.jvolsu.2020.1.10

20. Н. Н. Каширская, Л. Н. Плеханова, А. А. Петросян и др., *Нижеволжский археологич. вестн.*, **17** (2), 95 (2018). DOI: 10.15688/nav.jvolsu.2018.2.8
21. Е. В. Чернышева, Н. Н. Каширская, Е. В. Демкина и др., *Микробиология*, **88** (5), 624 (2019). DOI: 10.1134/S0026365619050045
22. В. А. Демкин, Т. С. Демкина и С. Н. Удальцов, *Вестн. археологии, антропологии и этнографии*, № 2 (25), 148 (2014).
23. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* (Изд-во МГУ, М., 1991).
24. Е. В. Чернышева, Автореферат дис. ...канд. биол. наук (Воронеж, 2015)
25. N. Kashirskaya, E. Chernysheva, L. Plekhanova, and A. Borisov, in *Proc. 19th Int. Multidisc. Sci. Geocnf. SGEM 2022*, **19** (3.2), 569 (2019). DOI: 10.5593/sgem2019/3.2/S13.074
26. Н. Н. Каширская, Л. Н. Плеханова, С. Н. Удальцов и др., *Биофизика*, **62** (6), 1235 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917060094.
27. Н. Н. Каширская, Л. Н. Плеханова, Е. В. Чернышева и др., *Почвоведение*, № 1, 89 (2020). DOI: 10.1134/S0032180X20010098.
28. Е. В. Чернышева, Н. Н. Каширская, А. В. Борисов и др., *Вестн. Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки*, **18** (3), 842 (2013).
29. В. Н. Кудяров и Т. В. Кузнецова, *Почвоведение*, № 11, 79 (1990).
30. Т. В. Кузнецова, А. К. Ходжаева, Н. А. Семенова, и др., *Агрехимия*, № 6, 5 (2006).
31. В. М. Семенов, Л. А. Иванникова, Т. В. Кузнецова и др., *Почвоведение*, № 5, 569 (2001).
32. I. A. Mendelssohn, B. K. Sorrell, H. Brix, et al., *Aquatic Botany*, **64** (3–4), 381 (1999).
33. И. К. Кравченко, В. М. Семенов, Т. В. Кузнецова и др., *Микробиология*, **74** (2), 255 (2005).
34. В. М. Семенов, Л. А. Иванникова, Т. В. Кузнецова и др., *Почвоведение*, № 11, 1352 (2007).
35. Е. Н. Мишустин и А. Н. Петрова, *Микробиология*, **32** (3), 479 (1963).
36. Е. Н. Мишустин и И. С. Востров, *Аппликационные методы в почвенной микробиологии // Микробиологические и биохимические исследования почв* (Изд-во «Урожай», Киев, 1971).
37. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* (Изд-во МГУ, М., 1980).
38. *Почвенный и биотический мониторинг заповедных экосистем* (Изд-во КМК Scientific Press, М., 1996).
39. Л. А. Савченко, О. С. Бойко и И. С. Оликова, в сб. *Труды Центрально-черноземного госзаповедника* (Изд-во КМК Scientific Press, М., 1997), вып. 15, сс. 30–44.
40. А. В. Прохорова и Л. Н. Плеханова, *Проблемы региональной экологии*, № 2, 67 (2016).
41. L. N. Plekhanova, in *Proc. 19th Int. Multidisc. Sci. Geocnf. SGEM 2018*, **18** (5.2), 173 (2018). DOI: 10.5593/sgem2018/5.2/S20.023
42. А. С. Сыроватко, *Российская археология*, № 4, 48 (2014).
43. А. С. Сыроватко и Э. Э. Фомченко, в сб. *Оки связующая нить: археология Среднего Поочья: Матер. VII–VIII региональной науч.-практич. конф.* (Ступинский историко-художественный музей, Ступино, 2015), сс. 132–138.
44. Е. А. Дмитриев, *Математическая статистика в почвоведении* (Изд-во МГУ, М., 1995).

## Low-Active Forms of Cellulosolitic Microorganisms in Archaeological Contexts

L.N. Plekhanova\*, S.N. Udaltsov\*, A.S. Syrovatko\*\*, \*\*\*, and N.N. Kashirskaya\*

\**Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\**Archaeological Center of Kolomna, Kremlevskaya ul. 5, Kolomna, Moscow Region, 140400 Russia*

\*\*\**Institute of Geography, Russian Academy of Sciences, Staromonety per. 29/4, Moscow, 119017 Russia*

This article presents the results of the study on low-active forms of cellulosolitic microorganisms in the soils of archaeological sites. The objects of the study were soils with traces of wooden structures in Vyatichi burials (12th century). To date, traces of wood are not visible at the macro level. The data obtained are compared with the results of a laboratory experiment to determine rates of cellulose decomposition in soils from various archaeological contexts. Cellulosolitic activity was determined by the application method. It has been shown that the cellulase activity of soils with traces of burial wooden structures is 20% of the level of modern soils. This suggests the awakening or presence of living, low-active microorganisms that have survived in the soil for 800 years.

*Keywords: paleosols, cellulose, cellulase, microorganisms, burial soil, cremations, burials*

УДК 576.5

## ГЛУБОКАЯ ГИПОТЕРМИЯ ИНВЕРТИРУЕТ ИНОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ ИЗОПРОТЕРЕНОЛА В МИОКАРДЕ КРЫСЫ

© 2023 г. К.В. Самодурова\*, \*\*, Ф.В. Тюрин\*, А.С. Аверин\*, #

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

\*\*Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, Московский просп., 24-26/49, 190013, Россия

#E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 10.08.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

Проведено исследование эффектов агониста  $\beta$ -адренорецепторов изопротеренола на сократительную активность папиллярной мышцы правого желудочка сердца крысы как при температуре близкой к физиологической ( $30^{\circ}\text{C}$ ), так и в условиях глубокой гипотермии ( $10^{\circ}\text{C}$ ). При  $30^{\circ}\text{C}$  изопротеренол оказывает выраженный положительный инотропный эффект, сила сокращения увеличивается с  $1.2 \pm 0.1$  мН в контроле до  $2.4 \pm 0.4$  мН после добавления агониста, при этом происходит достоверное ускорение временных параметров сокращения, так, время достижения максимума сокращения уменьшалось с  $101 \pm 6$  мс до  $85 \pm 4$  мс; время расслабления до 50% – с  $55 \pm 3$  мс до  $36 \pm 1$  мс. В условиях гипотермии изопротеренол вызывал мощный отрицательный инотропный эффект, снижая силу сокращения с  $2.2 \pm 0.4$  мН до  $1.2 \pm 0.4$  мН. Как и при  $30^{\circ}\text{C}$ , сохранялась тенденция ускорения сокращения: время достижения максимума сокращения уменьшалось с  $717 \pm 52$  мс до  $624 \pm 50$  мс, а время расслабления до 50% – с  $667 \pm 86$  мс до  $450 \pm 40$  мс. Таким образом, в условиях глубокой гипотермии при  $10^{\circ}\text{C}$  направленность инотропного ответа на изопротеренол меняется с положительного на отрицательный, в то время как лузитропный эффект сохраняет негативный характер.

*Ключевые слова:* миокард, гипотермия, изопротеренол.

DOI: 10.31857/S0006302923050216, EDN: NALZOY

В настоящее время гипотермия широко используется в медицинских целях для минимизации ишемических повреждений [1, 2], в то же время гипотермия может нести существенную угрозу здоровью и вызывать множественные расстройств в работе различных органов и систем [3, 4]. Одним из таких последствий может быть недостаточное кровоснабжение органов вызванное падением сердечного выброса [5], в связи с этим изучение инотропных эффектов различных соединений в условиях гипотермии остается крайне актуальной задачей. Широко известна значимость адренергической регуляции сердечно-сосудистой системы которая осуществляется через  $\beta$ ,  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  типы адренорецепторов (АР), внутри каждого из которых существуют подтипы, различающиеся по своей функции и представленности

в различных тканях [6], при этом традиционно ведущая роль в регуляции сократительной активности сердца отводится именно  $\beta$ -АР [7], хотя конечно нельзя игнорировать и роль  $\alpha 1$ -АР [8] и  $\alpha 2$ -АР [9].

$\beta 1$ -АР являются преобладающей формой в сердце и обеспечивают большую часть инотропного ответа миокарда в норме, в то время как при сердечной недостаточности значимость  $\beta 1$ -рецепторов заметно снижается и  $\beta 2$ -рецепторы играют компенсаторную роль [10]. При этом гиперактивация  $\beta 1$ -АР в большинстве случаев расценивается как кардиотоксическая, в то время как активация  $\beta 2$ -АР выполняет кардиопротективную роль [11–13]. Примечательно, что  $\beta 2$ -АР участвуют в кардиопротекторных эффектах холодной акклиматизации [14], что делает изучение этого сигнального пути особенно интересным в контексте гипотермии.  $\beta 3$ -АР весьма малочисленны в здоровом миокарде, но их количество

Сокращения: АР – адренергические рецепторы, сАРМ – циклический аденозинмонофосфат.

возрастает при застойной кардиомиопатии [15], при этом инотропный ответ может носить разнонаправленный характер [15–17]. Этому типу рецепторов также отводится кардиопротекторная роль и их активация рассматривается как возможная терапевтическая стратегия при ишемии сердца и сердечной недостаточности [18–21].

Несмотря на столь широкий выбор потенциальных мишеней для фармакологических исследований в состоянии гипотермии, считается, что преимущественно срабатывает каскад, связанный с активацией  $\beta$ 1-АР, причем традиционно используют малоселективные соединения, такие как изопротеренол или адреналин [22]. Следует отметить, что большинство исследований ограничивается снижением температуры до 20°C, при этом имеются свидетельства как позитивного так и отрицательного инотропного эффектов изопротеренола [23, 24]. Дополнительный интерес к действию изопротеренола в условиях глубокой гипотермии вызван еще и тем, что в клинической практике изопротеренол может восстанавливать нормальное функционирование сердца в случаях нарушения электрической активности сердца, вызванного переохлаждением организма [25, 26]. Таким образом, однозначного понимания эффектов изоротеренола в условиях гипотермии нет, и целью нашего исследования было выявить эти эффекты изопротеренола в условиях, близких физиологическим (30°C), и в условиях глубокой гипотермии (10°C).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на папиллярных мышцах правого желудочка лабораторных крыс породы Wistar с массой тела 200–250 г.

Животных предварительно наркотизировали диэтиловым эфиром. Выделенное сердце помещали в раствор Тироде (20°C) следующего состава (в мМ): NaCl – 135, KCl – 4, MgCl<sub>2</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> – 1.8, NaHCO<sub>3</sub> – 13.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.8, глюкоза – 11 (рН 7.4). Раствор аэрировали газовой смесью: O<sub>2</sub> (95%) + CO<sub>2</sub> (5%). Выделение папиллярных мышц, стимуляцию и измерение силы сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [27] при температуре перфузирующего раствора 30±0.1 и 10±0.1°C. Для исследования их механической активности использовали автоматизированную установку на основе персонального компьютера и плат АЦП–ЦАП (L-Card 154 и L-Card E14-440). Механическую активность мышц регистрировали с помощью механотрона 6X-2M. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными им-

пульсами (напряжение 5 В; длительность 5 мс; сила тока, в 2 раза превышающую пороговую) частотой 0.3 Гц в течение 1 ч для стабилизации силы сокращения. После адаптационного периода в случае экспериментов при 30°C в перфузионный раствор добавляли изопротеренол в концентрации 1 мкМ на протяжении 30 мин; в случае экспериментов при 10°C температуру в камере в течение 20 мин снижали с 30°C до 10°C, после чего папиллярные мышцы дополнительно адаптировали еще 10 мин и уже после этого проводили добавку изопротеренола, как описано ранее.

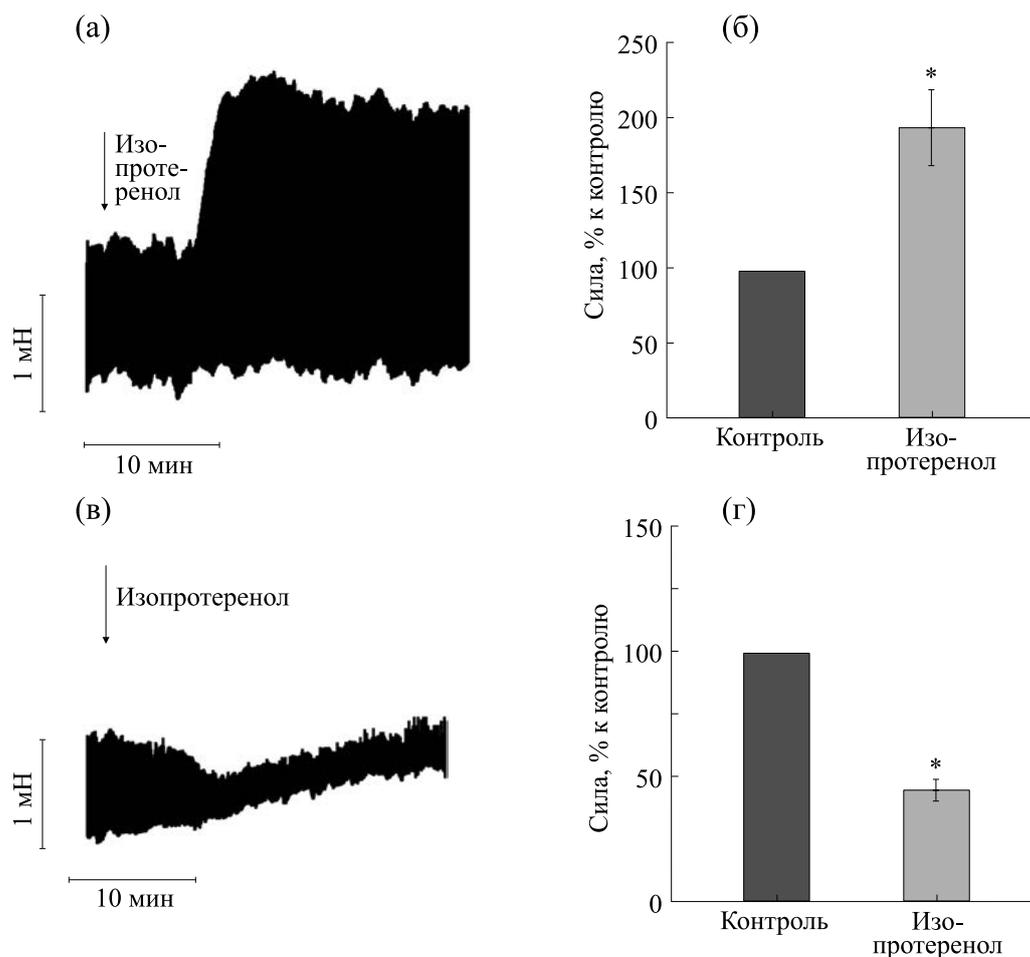
Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента (по уровню значимости  $p < 0.05$ ). Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе проведено исследование эффектов агониста  $\beta$ -адренорецепторов изопротеренола в концентрации 1 мкМ на сократительную активность папиллярной мышцы правого желудочка сердца крысы как при температуре, близкой к физиологической (30°C), так и в условиях гипотермии (10°C). Как видно из рис. 1а,б, при 30°C изопротеренол оказывает выраженный положительный инотропный эффект, сила сокращения увеличивается на 95 ± 23%: с 1.2 ± 0.1 мН в контроле до 2.4 ± 0.4 мН после добавления агониста. Такое увеличение силы сокращений хорошо описано в литературе как для нормотермных животных, таких как хорек [28] и мышь [29], так и для гибернаторов в сезоны летней активности [30, 31]

В то же время при 10°C изопротеренол вызывал мощный отрицательный инотропный эффект, снижая силу сокращения на 54 ± 3%: с 2.2 ± 0.4 мН до 1.2 ± 0.4 мН (рис 1в,г). Сопоставимые данные описаны в литературе: в предсердиях крысы снижение температуры до 28°C уменьшало положительный инотропный эффект изопротеренола, и при 20°C эффект становился отрицательным [23], также схожий эффект обнаруживался и при перфузии целого сердца крысы [32].

Однако в желудочковом миокарде кролика изопротеренол вызывает мощный рост силы сокращений при 30°C [33], который сохраняется даже при 22°C [24]. В то же время в предсердиях кролика охлаждение до 20°C значительно снижает эффект изопротеренола [34]. В предсердии морской свинки в условиях гипотермии изопротеренол также вызывал мощный рост силы сокра-



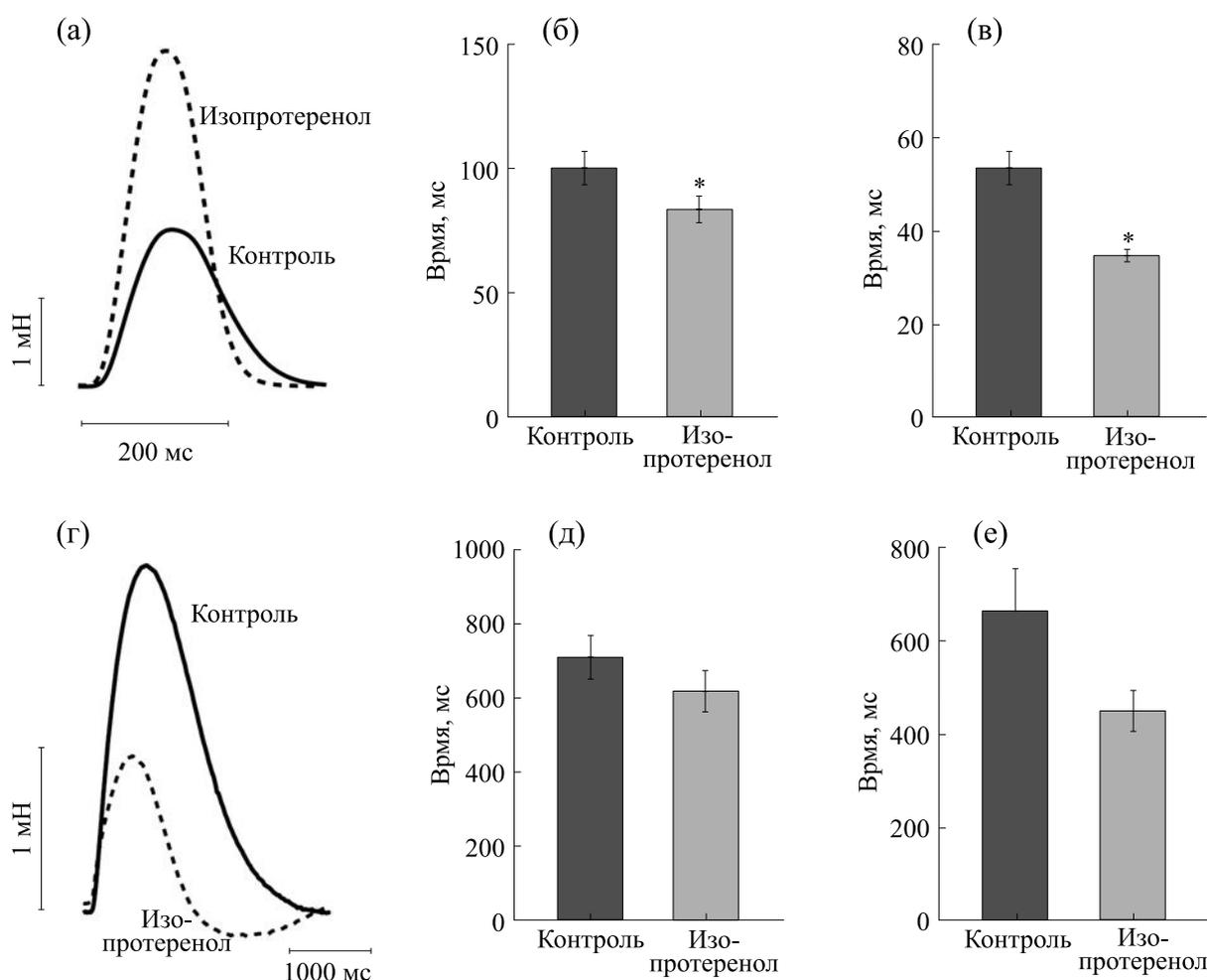
**Рис. 1.** Влияние изопротеренола (1 мкМ) на силу сокращений папиллярной мышцы сердца крысы при температуре, близкой к физиологической (30°C, рис. (а) и (б)), и в условиях глубокой гипотермии (10°C, рис. (в) и (г)): (а) и (в) – примеры оригинальных записей при 30°C и 10°C соответственно; (б) и (г) – соответствующие статистические данные, представленные как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего (\* –  $p < 0.05$ ).

щений [35], в некоторых случаях чувствительность к изопротеренолу даже возрастала в условиях гипотермии [36–38]. Данные факты, по-видимому, иллюстрируют межвидовые различия в физиологии миокарда. Известно, что сокращения желудочкового миокарда кролика значительно больше зависят от входа внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , чем сокращения миокарда желудочков крысы [39], возможно, именно в этом и кроется основная причина различия. Однако для точного установления причинно-следственных связей необходимы дальнейшие исследования.

Следующим фактором, способным повлиять на направление инотропного эффекта, является чувствительность миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$ . В работе [38] было показано увеличение чувствительно-

сти миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$  в условиях гипотермии (27°C) в миокарде морской свинки, что ожидаемо должно было бы привести к росту силы сокращения. Однако полученные нами данные не согласуются с увеличением чувствительности миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$  в условиях гипотермии в миокарде морской свинки и, напротив, хорошо согласуются с данными работы, где для миокарда крысы было показано снижение чувствительности миофиламентов в состоянии гипотермии. Примечательно что в этой же работе миокард морской свинки демонстрировал отсутствие изменений чувствительности миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$  как при 24°C так и при 30°C [40].

Отрицательный инотропный эффект изопротеренола может быть связан с нарушением транс-



**Рис. 2.** Влияние изопротеренола (1 мкМ) на временные параметры сокращений папиллярной мышцы сердца крысы при температуре, близкой к физиологической (30°C, рис. (а)–(в)), и в условиях глубокой гипотермии (10°C, рис. (г)–(е)): (а) и (г) – примеры оригинальных записей сокращений при 30°C и 10°C соответственно; (б) и (д) – соответствующие статистические данные по времени достижения максимума сокращения; (в) и (е) – соответствующие статистические данные по времени расслабления до 50%. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего (\* –  $p < 0,05$ ).

мембранного ионного баланса в условиях гипотермии, что может привести к частичной деполяризации мембраны [41, 42] и, как следствие, к падению входящего  $\text{Ca}^{2+}$ -тока (как было показано на кардиомиоцитах крысы [43]).

Как видно из рис. 2а–в, при 30°C изопротеренол вызывает выраженный отрицательный лузитропный эффект, так, время достижения максимума сокращения уменьшалось с  $101 \pm 6$  мс до  $85 \pm 4$  мс; время расслабления до 50% – с  $55 \pm 3$  мс до  $36 \pm 1$  мс. При 10°C тенденция снижения времени достижения максимума сокращения сохраняется: с  $717 \pm 52$  мс до  $624 \pm 50$  мс, а время расслабления до 50% – с  $667 \pm 86$  мс до  $450 \pm 40$  мс, но достоверность эффекта исчезает

(рис. 2г–е). Следует отметить, что в основе вызываемого  $\beta$ -адренергической стимуляцией лузитропного эффекта лежит увеличение сАМР, что ведет к фосфорилированию множества компонентов электромеханического сопряжения [22]. При этом гипотермия сама по себе значительно увеличивает уровень сАМР [44], что может маскировать лузитропный эффект изопротеренола. В то же время литературные данные показывают, что в состоянии гипотермии образование сАМР в ответ на  $\beta$ -адренергическую стимуляцию может быть даже увеличено. Тогда причина подобного снижения отрицательного лузитропного эффекта изопротеренола связана не с ограничением про-

дукции сАМР, а с  $Ca^{2+}$ -перегрузкой кардиомиоцитов [45].

### ВЫВОДЫ

В условиях глубокой гипотермии при 10°C изопротеренол вызывает отрицательный инотропный ответ, в тоже время сохраняет тенденцию к проявлению негативного лизитропного ответа. Данные факты свидетельствуют о существенном изменении реакции компонентов электромеханического сопряжения миокарда в ответ на  $\beta$ -адренергическую стимуляцию, что и привело к наблюдаемому обращению эффекта изопротеренола.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-25-00204.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 1986, 86/609/ЕЕС.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Arrich, N. Schütz, J. Oppenauer, et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, **5**, CD004128 (2023).
2. T. P. Grazioso and N. Djouder, *iScience*, **26**, 107010 (2023).
3. A. F. Aslam, A. K. Aslam, B. C. Vasavada, et al., *Am. J. Med.*, **119**, 297 (2006).
4. K. C. Wong, *West J. Med.*, **138**, 227 (1983).
5. T. Wood and M. Thoresen, *Semin. Fetal Neonatal Med.*, **20**, 87 (2015).
6. L. Matušková and M. Javorka, *Physiol. Res.*, **70**, S495 (2021).
7. G. Wallukat, *Herz*, **27**, 683 (2002).
8. T. D. O'Connell, B. C. Jensen, A. J. Baker, et al., *Pharmacol. Rev.*, **66**, 308 (2014).
9. O. Yu. Pimenov, M. H. Galimova, E. V. Evdokimovskii, et al., *Biophysics*, **64** (5), 738 (2019).
10. M. Khamssi and O. E. Brodde, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **16** (Suppl 5), S1337 (1990).
11. A. J. Baker, *Pflugers Arch.: Eur. J. Physiol.*, **466**, 1139 (2014).
12. G. Fajardo, M. Zhao, G. Berry, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **51**, 781 (2011).
13. Y. Song, C. Xu, J. Liu, et al., *Circ. Res.*, **128**, 262 (2021).
14. V. Tibenska, A. Marvanova, B. Elsnicova, et al., *J. Appl. Physiol.*, **130**, 746 (2021).
15. S. Moniotte, L. Kobzik, O. Feron, et al., *Circulation*, **103**, 1649 (2001).
16. T. Angelone, E. Filice, A. M. Quintieri, et al., *Acta Physiol. (Oxford)*, **193**, 229 (2008).
17. R. Treinys, D. Zablockaitė, V. Gendvilienė, et al., *J. Membr. Biol.*, **247**, 309 (2014).
18. J. García-Prieto, J. M. García-Ruiz, D. Sanz-Rosa, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **109**, 422 (2014).
19. G. Kayki-Mutlu, I. Karaomerlioglu, E. Arioglu-Inan, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **858**, 172468 (2019).
20. C. Pott, K. Brixius, W. Bloch, et al., *Pharmazie*, **61**, 255 (2006).
21. R. Salie, A. Kh. H. Alsalhin, E. Marais, et al., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **33**, 163 (2019).
22. E. S. Dietrichs, G. Sager, and T. Tveita, *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.*, **24**, 143 (2016).
23. A. L. Melnikov, J. E. Løkebø, D. A. Lathrop, et al., *Gen. Pharmacol.*, **27**, 665 (1996).
24. L. Riishede, F. Nielsen-Kudsk, *Pharmacol. Toxicol.*, **66**, 354 (1990).
25. P. Badertscher, M. Kuehne, B. Schaer, et al., *BMC Cardiovasc. Disord.*, **17**, 277 (2017).
26. T. Takahiro, S. Kou, Y. Toshinobu, et al., *Heart Rhythm*, **12**, 644 (2015).
27. A. S. Averin, M. N. Nenov, V. G. Starkov, et al., *Toxins (Basel)*, **14** (2022).
28. O. Okazaki, N. Suda, K. Hongo, et al., *J. Physiol.*, **423**, 221 (1990).
29. D. B. Hoover, T. R. Ozment, R. Wondergem, et al., *Shock*, **43**, 185 (2015).
30. A. S. Averin, N. M. Zakharova, D. A. Ignat'ev, et al., *Biophysics*, **55** (5), 910 (2010).
31. N. Kondo, *Circ. Res.*, **59**, 221 (1986).
32. K. J. Broadley, *Br. J. Pharmacol.*, **45**, 123 (1972).
33. M. Mattheussen, K. Mubagwa, H. van Aken, et al., *Anest. and Analg.*, **82**, 975 (1996).
34. S. A. Omar, D. Hamad, and S. Varma, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **23**, 199 (1979).
35. T. E. Tenner and J. H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **56**, 926 (1978).
36. K. J. Broadley and J. H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **61**, 572 (1983).
37. R. G. Chess-Williams and K. J. Broadley, *Eur. J. Pharmacol.*, **108**, 25 (1985).
38. Y. Nakae, S. Fujita, and A. Namiki, *Anest. and Analg.*, **93**, 846 (2001).
39. D. M. Bers, *Circ. Res.*, **87**, 275 (2000).
40. S. Miyamoto, M. Hori, M. Izumi, et al., *Jpn. J. Pharmacol.*, **85**, 75 (2001).
41. R. Carpentier and M. Vassalle, *Circ. Res.*, **31**, 507 (1972).
42. J. Deleze, *Circ. Res.*, **8**, 553 (1960).
43. Y. Kokoz, A. S. Grichenko, A. F. Korystova, et al., *Biosci. Rep.*, **19**, 17 (1999).
44. D. Reinhardt, R. Butzheim, O. E. Brodde, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **48**, 107 (1978).
45. E. S. Dietrichs, T. Schanche, T. Kondratiev, et al., *Cryobiology*, **70**, 9 (2015).

## The Inversion of the Inotropic Effect of Isoproterenol in the Rat Myocardium during Deep Hypothermia

C.V. Samodurova\*, \*\*, F.V. Turin\*, and A.S. Averin\*

\**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 1422290 Russia*

\*\**St. Petersburg State Institute of Technology, Moskovskii prosp. 24-26/49, St. Petersburg, 190013 Russia*

The present study examined the effects of the  $\beta$ -adrenergic receptor agonist, isoproterenol, on contractile activity of right ventricle papillary muscles in the rat heart at near-physiological temperature (30°C) and under conditions of deep hypothermia (10°C). Isoproterenol exerts a pronounced positive inotropic effect at 30°C. After agonist addition, the force of contraction increases from  $1.2 \pm 0.1$  mN in control to  $2.4 \pm 0.4$  mN that leads to a reliable acceleration of time parameters of contraction. So, time-to-maximum contraction decreased from  $101 \pm 6$  ms to  $85 \pm 4$  ms; time-to-50% relaxation declined from  $55 \pm 3$  ms to  $36 \pm 1$  ms. Under hypothermic conditions, isoproterenol produced a powerful negative inotropic effect, reducing the force of contraction from  $2.2 \pm 0.4$  mN to  $1.2 \pm 0.4$  mN. Similarly as at 30°C, there was a tendency for increase in contraction speed, so time-to-maximum contraction decreased from  $717 \pm 52$  ms to  $624 \pm 50$  ms, and time-to-50% relaxation was shortened from  $667 \pm 86$  ms to  $450 \pm 40$  ms. Thus, under conditions of deep hypothermia at 10°C, the isoproterenol-induced inotropy changes from positive to negative, while negative lusitropic effect remains clear.

*Keywords: myocardium, hypothermia, isoproterenol*

## РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЭФФЕКТАХ СЕРОВОДОРОДА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ

© 2023 г. Д.М. Сорокина\*, И.Ф. Шайдуллов\*, А.Р. Гиззатуллин\*,  
Ф.Г. Ситдииков\*, Г.Ф. Ситдикова\*, #

\*Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская,  
18, Казань, Республика Татарстан, 420008, Россия

#E-mail: guzel.sitdikova@kpfu.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 02.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Исследована роль оксида азота, внутри- и внеклеточного кальция в эффектах сероводорода на спонтанные и вызванные карбахолином сокращения препарата тощей кишки крысы в условиях изометрического сокращения. Донор  $H_2S$  – гидросульфид натрия – приводил к снижению тонуса препарата, амплитуды и частоты спонтанных сокращений, а также параметров сокращений, вызванных неспецифическим агонистом рецепторов ацетилхолина карбахолином. В условиях ингибирования эндогенного синтеза NO с помощью L-NAME эффект донора  $H_2S$  сохранялся, тогда как на фоне действия SNAP, донора NO, эффекты NaHS на амплитуду спонтанных и вызванных карбахолином сокращений были выражены в меньшей степени. Снижение тонуса препарата при действии NaHS предотвращалось дантроленом, блокатором риадиноновых рецепторов. Бескальциевый раствор снижал ингибиторное влияние NaHS на сокращения, вызванные аппликацией карбахолина. Сделано предположение о том, что угнетающее влияние  $H_2S$  связано с динамикой внутриклеточной концентрации ионов кальция, а взаимодействие NO и  $H_2S$  реализуется на уровне общих мишеней действия двух газов.

*Ключевые слова:* сероводород, оксид азота, сократительная активность, тощая кишка крысы, вызванные карбахолином сокращения, кальций.

DOI: 10.31857/S0006302923050228, EDN: NAPRMD

Сероводород ( $H_2S$ ) и оксид азота (NO) относятся к классу газомедиаторов наряду с монооксидом углерода (CO) [1].  $H_2S$  обнаружен во многих системах, включая желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), где он синтезируется ферментами цистатионин- $\beta$ -синтазой и цистатионин- $\gamma$ -лиазой [2]. Третий ферментативный путь синтеза  $H_2S$  осуществляется 2-оксоглутарат-аминотрансферазой совместно с 3-меркаптопируват-сульфотрансферазой [3, 4]. Кроме того,  $H_2S$  продуцируется сульфатредуцирующими бактериями, являющимися частью нормальной энтеробактериальной флоры [2, 5–7]. Ферменты цистатионин- $\beta$ -синтаза, цистатионин- $\gamma$ -лиаза и 3-меркаптопируват-сульфотрансфераза экспрессируются повсеместно ЖКТ в различных типах клеток,

включая гладкомышечные, нейрональные, эпителиальные и интерстициальные клетки Кахала [8–10].

NO продуцируется ферментативно с помощью синтазы оксида азота, а также бактериальной микрофлорой и участвует в регуляции перистальтики кишечника, секреции слизистых желез, переваривания пищи, абсорбции и опорожнении кишечника [11]. Значительное число эфферентов энтеральной нервной системы млекопитающих содержат нейрональную синтазу оксида азота, а выделяющийся NO является неадренергическим и нехолинергическим тормозным нейромедиатором [11]. Известно, что  $H_2S$  также вызывает релаксацию гладких мышц ЖКТ и ингибирует перистальтику, путем активации калиевых каналов и гиперполяризации гладкомышечных клеток [8, 12–17].

Несмотря на наличие собственных механизмов влияния, эти два газомедиатора могут взаи-

*Сокращения:* ЖКТ – желудочно-кишечный тракт, L-NAME – NG-нитро-L-аргинин-метил-эфир, SNAP – S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин, ППК – площадь под кривой.

модействовать друг с другом как на уровне регуляции активности ферментов синтеза, так и мишенной действии [18, 19]. Так, эндогенная продукция  $H_2S$  в ткани аорты усиливалась при действии доноров  $NO$  [19], а взаимодействие  $H_2S$  и  $NO$  необходимы для ангиогенеза и вазодилатации [18], регуляции секреции и двигательной активности желудка [12, 20].  $NO$  может активировать цистатионин- $\gamma$ -лиазу/цистатионин- $\beta$ -синтазу с последующим усилением продукции  $H_2S$ , а  $H_2S$  при этом ингибировал синтазу оксида азота и продукцию  $NO$  [19, 21, 22]. С другой стороны,  $H_2S$  обладает способностью ускорять высвобождение  $NO$  из  $S$ -нитрозоглутатиона [21, 22]. При этом донор  $NO$  ингибировал экспрессию цистатионин- $\beta$ -синтазы [23], а  $H_2S$  снижал экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота [24].

Целью нашего исследования было выявление роли  $NO$ , а также механизмов, связанных с регуляцией внутриклеточного кальция, в эффектах  $H_2S$  на сократимость тощей кишки крысы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по анализу спонтанной и вызванной сократительной активности проводили на изолированных сегментах тощей кишки крысы длиной 5–7 мм в изометрических условиях на установке фирмы Biopac Systems (США). Регистрацию и последующий анализ параметров сокращения препарата проводили с помощью программы AcqKnowledge 4.1. На протяжении всего эксперимента препарат омывался раствором Кребса, который содержал (в  $mM \cdot l^{-1}$ ):  $NaCl$  – 121.0,  $KCl$  – 5.9,  $CaCl_2$  – 2.5,  $MgCl_2$  – 1.2,  $NaHCO_3$  – 25.0,  $NaH_2PO_4$  – 1.2,  $C_6H_{12}O_6$  – 8.0 (Sigma, США) с постоянной подачей карбогена (95%  $O_2$  и 5%  $CO_2$ ), при температуре  $37^\circ C$  и  $pH$  7.2–7.4. После подвешивания препарат разрабатывали в течение 40–60 мин при напряжении 1 г до получения стабильных сокращений.

В качестве донора  $H_2S$  использовали гидросульфид натрия ( $NaHS$ , Sigma, США) в концентрации 200  $\mu M$ . В эксперименте также использовали агонист рецепторов ацетилхолина – карбахолин в концентрации 1  $\mu M$ , блокатор потенциал-зависимых  $Na^+$  каналов – тетродотоксин в концентрации 0.5  $\mu M$ , неспецифический блокатор  $NO$ -синтазы –  $NG$ -нитро- $L$ -аргинин-метил-эфир ( $L$ -NAME) в концентрации 100  $\mu M$ , донор  $NO$  –  $S$ -нитрозо- $N$ -ацетилпеницилламин (SNAP) в концентрации 50  $\mu M$ , блокатор рианодиновых рецепторов – дантролен в концентрации 25  $\mu M$ .

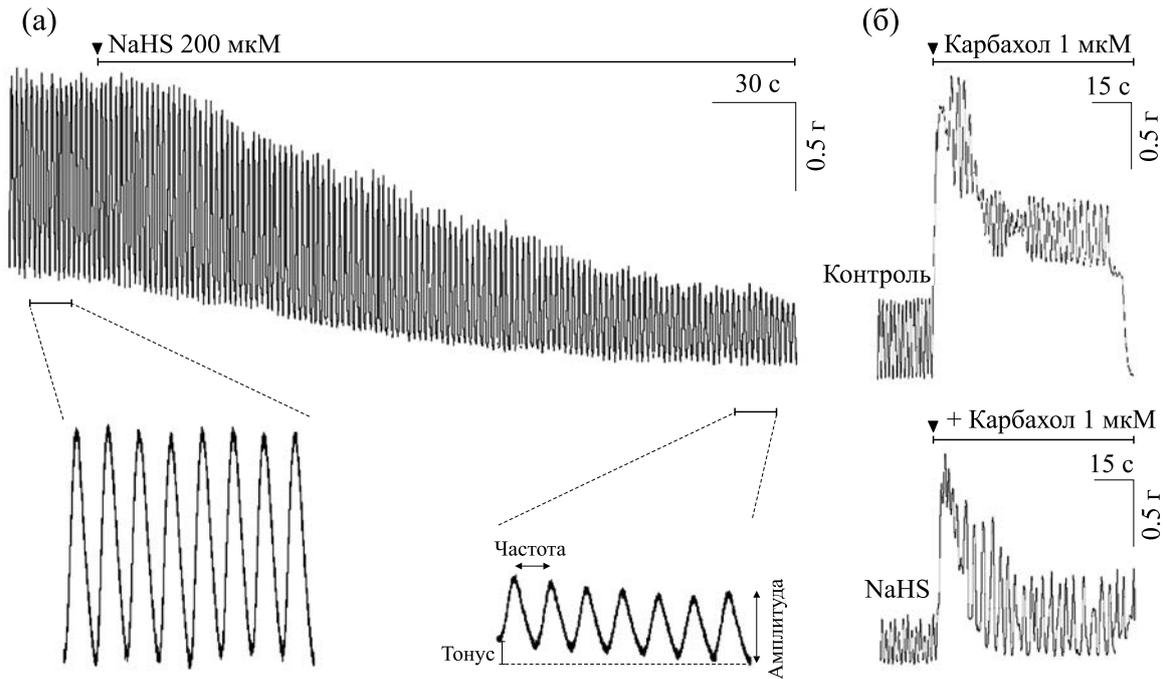
Анализировали амплитуду и частоту спонтанных сокращений, а также тонус сегмента тощей

кишки в контроле и при добавлении исследуемых веществ. Также оценивали амплитуду (в граммах) и площадь под кривой (ППК, в г·с) в течение 1 мин аппликации карбахолина в контроле и на фоне веществ. Реакцию препарата на введение исследуемых веществ рассчитывали в процентах от исходного значения. Параметры сократительной активности в контроле принимали за 100%,  $n$  указывает на количество препаратов. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех животных. Достоверность различий определяли с помощью парного  $t$ -критерия Стьюдента или дисперсионного анализа ANOVA с применением теста Бонферрони. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ . Статистический анализ был выполнен с помощью программы OriginPro 2015 (Origin Lab, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Влияние донора  $H_2S$  гидросульфида натрия на спонтанную и вызванную карбахолином сократительную активность препарата тощей кишки крысы.** Препарат тощей кишки крысы в контроле характеризовался спонтанными сокращениями амплитудой  $0.9 \pm 0.08$  г, возникающих с частотой  $29.3 \pm 0.6$  сокращений  $\cdot \text{мин}^{-1}$ . Донор  $H_2S$  –  $NaHS$  – вызывал угнетение как спонтанных, так и вызванных карбахолином сокращений препаратов тощей кишки крысы, как было показано ранее [25].  $NaHS$  в концентрации 200  $\mu M$  приводил к снижению тонуса препарата до 76% (с  $1.2 \pm 0.09$  г до  $0.99 \pm 0.05$  г,  $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ), амплитуды и частоты спонтанных сокращений – до 43% (с  $0.9 \pm 0.08$  г до  $0.4 \pm 0.06$  г,  $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ) и 80% (с  $29.3 \pm 0.6 \text{ мин}^{-1}$  до  $23.4 \pm 1.1 \text{ мин}^{-1}$ ,  $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ) соответственно, по отношению к контрольным значениям (рис. 1а). Эти эффекты полностью проявлялись и в присутствии блокатора потенциалзависимых  $Na^+$  каналов тетродотоксина: тонус препарата снижался до 60% (с  $1.16 \pm 0.09$  г до  $0.69 \pm 0.04$  г,  $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ), амплитуда – до 30% (с  $0.62 \pm 0.06$  г до  $0.17 \pm 0.01$ ,  $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ) и частота – до 59% (с  $26 \pm 0.26 \text{ мин}^{-1}$  до  $15.5 \pm 0.8 \text{ мин}^{-1}$ ,  $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ).

Аппликация карбахолина (1  $\mu M$ ) вызывала резкое увеличение тонического напряжения, которое достигнув максимального значения, снижалось и держалось на уровне плато.  $NaHS$  угнетал сокращение, вызванное карбахолином: ППК и амплитуда сокращения составили 59% (с  $120.7 \pm 6.4$  г·с до  $67.01 \pm 3.04$  г·с,  $n = 37$ ,  $p < 0.05$ ) и 64% (с  $2.1 \pm 0.1$  г до  $1.3 \pm 0.08$  г,  $n = 37$ ;  $p < 0.05$ ) соответственно по сравнению с эффектами карбахолина в контроле (рис. 1б).



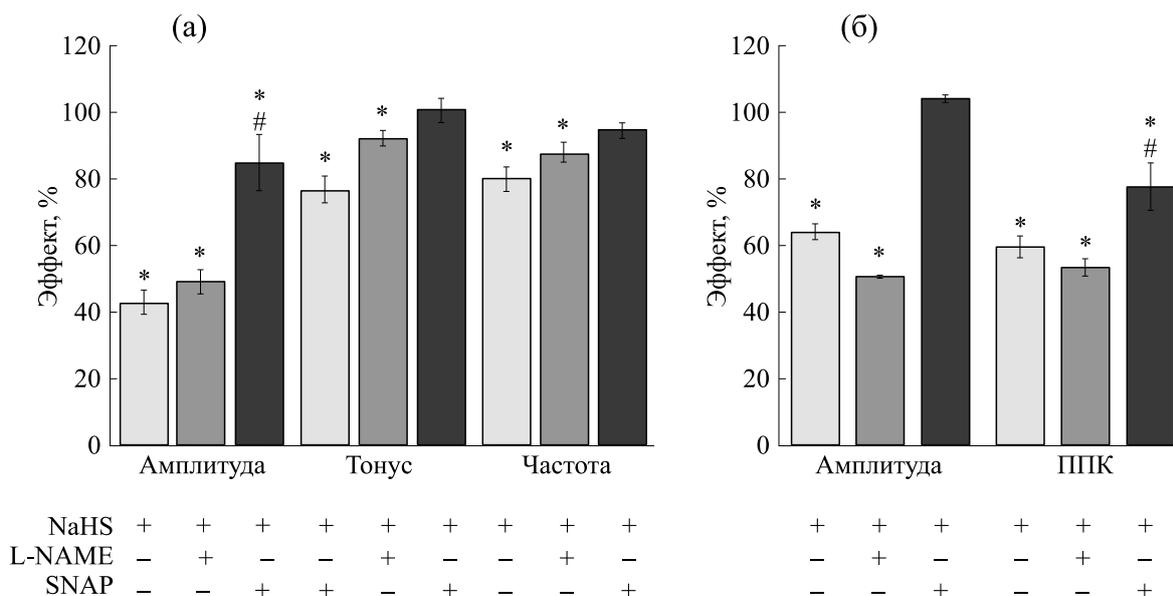
**Рис. 1.** Механограммы спонтанной и вызванной сократительной активности тощей кишки крысы при действии NaHS в концентрации 200 мкМ. (а) — Изменение спонтанной сократительной активности в условиях аппликации NaHS. На врезках показаны сокращения на расширенной временной шкале в контроле и к 7 мин аппликации NaHS. На графике обозначены тоническое напряжение препарата и параметры спонтанных сокращений. (б) — Изменение вызванной карбахолином (1 мкМ, 1 мин) сократительной активности на фоне действия NaHS. Горизонтальная линия указывает на продолжительность действия вещества.

**Роль NO в эффектах NaHS.** Для ингибирования эндогенного синтеза NO использовали L-NAME в концентрации 100 мкМ, аппликация которого приводила к повышению амплитуды спонтанных сокращений до 119% ( $n = 32$ ,  $p < 0.05$ ) от начального уровня, при этом тоническое напряжение препарата и частота спонтанных сокращений не изменялись ( $n = 34$ ,  $p > 0.05$ ) (табл. 1). На фоне L-NAME ингибирующие эффекты NaHS на тонус спонтанных сокращений сохранялись ( $n = 18$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2а, табл. 1). Экзогенный донор NO — SNAP — в концентрации 50 мкМ приводил к снижению амплитуды к 30-й секунде до 55% ( $n = 22$ ,  $p < 0.05$ ), после чего происходило восстановление амплитуды до исходных значений ( $n = 22$ ,  $p > 0.05$ ), при этом тонус препарата и частота спонтанных сокращений не изменялись ( $n = 22$ ,  $p > 0.05$ , табл. 1). На фоне SNAP эффект NaHS на амплитуду спонтанных сокращений был выражен в меньшей степени (84%,  $n = 11$ ,  $p < 0.05$ ), а на тонус препарата (100%,  $n = 11$ ,  $p > 0.05$ ) и частоту сокращений — не проявлялся (94%,  $n = 9$ ,  $p > 0.05$ , рис. 2а, табл. 1).

Аппликация L-NAME или SNAP не влияла на амплитуду и ППК вызванного карбахолином сокращений ( $n = 15$ ,  $p > 0.05$ , табл. 2). Угнетающий эффект NaHS на ответ, вызванный карбахолином, на фоне L-NAME сохранялся ( $n = 27$ ,

$p < 0.05$ , рис. 2б, табл. 2), на фоне действия SNAP был выражен в меньшей степени на ППК ( $n = 12$ ,  $p < 0.05$ ), а на амплитуду вызванных карбахолином сокращений не проявлялся ( $n = 12$ ,  $p > 0.05$ , рис. 2б, табл. 2).

**Роль ионов кальция в эффектах сероводорода на параметры спонтанных и вызванных карбахолином сокращений тощей кишки крысы.** Для анализа роли внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо в эффектах NaHS использовали дантролен в концентрации 25 мкМ, который снижает высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума за счет ингибирования рианодиновых рецепторов [26]. Добавление дантролена не приводило к изменению тонического напряжения (93%,  $n = 17$ ,  $p > 0.05$ ), амплитуды (103%,  $n = 13$ ,  $p > 0.05$ ) и частоты спонтанных сокращений (94%,  $n = 15$ ,  $p > 0.05$ , табл. 1). На фоне дантролена эффекты донора  $\text{H}_2\text{S}$  на амплитуду (50%,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ) и частоту спонтанных сокращений сохранялись (91%,  $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ), а на тоническое напряжение (96%,  $n = 8$ ,  $p > 0.05$ , рис. 3а, табл. 1) не проявлялся. Для анализа роли внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в эффектах NaHS использовали бескальциевый раствор. Замещение нормального раствора на раствор, не содержащий  $\text{Ca}^{2+}$ , характеризовалось снижением тонического напряжения препарата от  $1.38 \pm 0.13$  г



**Рис. 2.** Роль NO в эффектах донора H<sub>2</sub>S на спонтанные и вызванные карбахолином сокращения тощей кишки крысы. (а) – Изменение тонуса препарата, амплитуды и частоты спонтанных сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в контроле (белые столбики), NaHS на фоне блокатора NO-синтазы L-NAME (100 мкМ, серые столбики) и донора NO S-нитрозо-N-ацетилпенициллина (SNAP) (50 мкМ, черные столбики). \* – *p* < 0.05 относительно начальных значений (100%), # – *p* < 0.05 по отношению к эффектам NaHS в контроле. (б) – Амплитуда и ППК вызванных карбахолином сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в контроле (белые столбики), NaHS на фоне L-NAME (100 мкМ, серые столбики) и донора NO SNAP (50 мкМ, черные столбики). \* – *p* < 0.05 по отношению к значениям, полученным при действии карбахолина в контроле (100%), # – *p* < 0.05 по отношению к карбахолин вызванному сокращению на фоне NaHS.

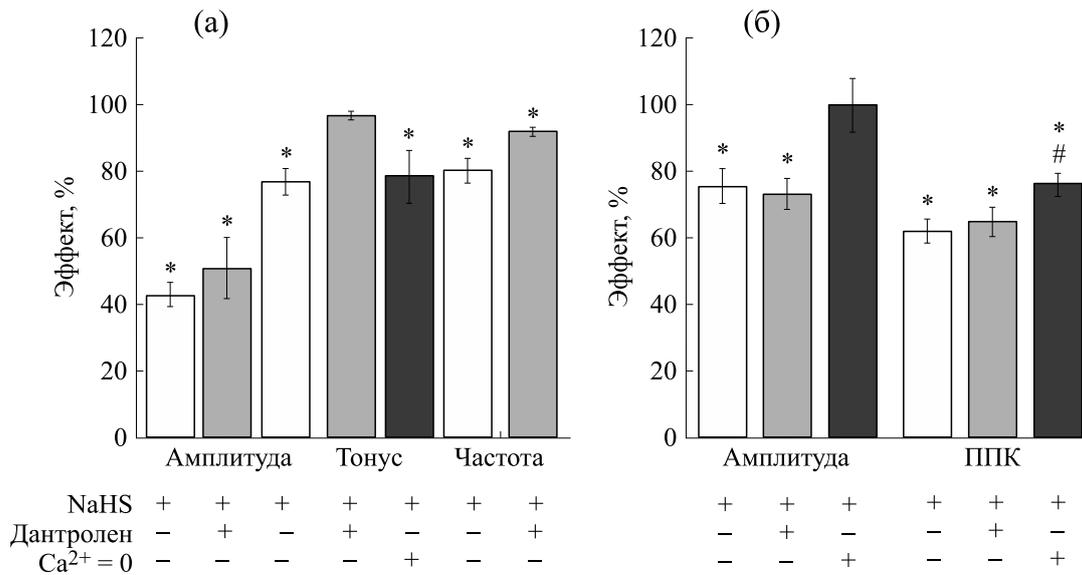
до  $1.13 \pm 0.10$  г ( $n = 12, p < 0.05$ ) и практически полным угнетением спонтанных сокращений, поэтому анализировали влияние NaHS только на тонус. В бескальциевом растворе ингибирующий эффект NaHS на тонус сохранялся (78%;  $n = 8, p < 0.05$ , рис. 3а).

На фоне предварительной аппликации дантролена параметры вызванного карбахолином сокращения не отличались от контроля ( $n = 12, p > 0.05$ ) (табл. 2). На фоне действия дантролена ингибирующие эффекты NaHS на карбахолин вызванные сокращения сохранялись ( $n = 12,$

**Таблица 1.** Роль NO и ионов Ca<sup>2+</sup> в эффектах NaHS на спонтанную сократительную активность тощей кишки крысы

Амплитуда, г	Контроль 0.86 ± 0.04	L-NAME 1 ± 0.06*	L-NAME + NaHS 0.46 ± 0.05*
Тоническое напряжение, г	0.90 ± 0.02	0.87 ± 0.05	0.81 ± 0.04*
Частота, мин <sup>-1</sup>	30.25 ± 0.67	28.25 ± 0.73	24.8 ± 1.17*
Амплитуда, г	Контроль 0.74 ± 0.06	SNAP 0.80 ± 0.06	SNAP + NaHS 0.64 ± 0.06*#
Тоническое напряжение, г	1.28 ± 0.08	1.20 ± 0.08	1.19 ± 0.08
Частота, мин <sup>-1</sup>	28.73 ± 0.47	26 ± 0.46	24.66 ± 0.60
Тоническое напряжение, г	Контроль 1.38 ± 0.13	[Ca <sup>2+</sup> ] = 0 1.13 ± 0.10	[Ca <sup>2+</sup> ] = 0, NaHS 1.01 ± 0.11
Амплитуда, г	Контроль 0.68 ± 0.10	Дантролен 0.67 ± 0.09	Дантролен + NaHS 0.31 ± 0.08*
Тоническое напряжение, г	1.08 ± 0.09	1.01 ± 0.09	0.83 ± 0.09
Частота, мин <sup>-1</sup>	31.2 ± 0.57	29.40 ± 0.70	28 ± 0.97

Примечание. \* – *p* < 0.05 по отношению к исходным значениям, # – *p* < 0.05 по отношению к эффекту NaHS в контроле.



**Рис. 3.** Роль ионов кальция в эффектах NaHS на сократительную активность тощей кишки крысы. (а) – Изменение параметров спонтанных сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в бескальциевом растворе (черный столбик) и на фоне дантролена (25 мкМ, серые столбики). \* –  $p < 0.05$  относительно исходных значений (100%), # –  $p < 0.05$  по отношению к эффектам NaHS в контроле (белые столбики). (б) – Амплитуда и ППК вызванных карбахолином сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в контроле (белые столбики), на фоне действия дантролена (100 мкМ, серые столбики) и в бескальциевом растворе (черные столбики). \* –  $p < 0.05$  по отношению к значениям, полученным при действии карбахолина в контроле (100%), # –  $p < 0.05$  – по отношению к вызванному карбахолином сокращению на фоне NaHS.

$p < 0.05$ , рис. 3б, табл. 2). В бескальциевом растворе амплитуда и ППК сокращения, вызванного карбахолином, снижались до 74% ( $n = 16, p < 0.05$ )

и 73% ( $n = 16, p < 0.05$ ) соответственно (табл. 2). Последующая аппликация NaHS не приводила к изменению амплитуды карбахолин вызванных

**Таблица 2.** Роль NO и ионов Ca<sup>2+</sup> в эффектах NaHS на вызванные карбахолином сокращения тощей кишки крысы

Параметры	Контроль (Карбахолин)	NaHS + Карбахолин	
Амплитуда, г	2.15 ± 0.12	1.36 ± 0.08*	
Площадь под кривой, г·с	120.75 ± 6.46	67.01 ± 3.04*	
		L-NAME + карбахолин	L-NAME + NaHS + карбахолин
Амплитуда, г	2.23 ± 0.11	2.10 ± 0.17	1.06 ± 0.13*
Площадь под кривой, г·с	125.10 ± 6.50	103.96 ± 8.20*	55.64 ± 2.63*
		SNAP + карбахолин	SNAP + NaHS + карбахолин
Амплитуда, г	1.81 ± 0.16	1.80 ± 0.16	1.87 ± 0.16
Площадь под кривой, г·с	118.76 ± 8.90	116.00 ± 8.55	90.15 ± 7.00*#
		Дантролен + карбахолин	Дантролен + NaHS + карбахолин
Амплитуда, г	1.52 ± 0.27	1.36 ± 0.30	0.99 ± 0.14*
Площадь под кривой, г·с	93.17 ± 13.88	88.50 ± 13.68	57.21 ± 5.46*
		[Ca <sup>2+</sup> ] = 0, + карбахолин	[Ca <sup>2+</sup> ] = 0, NaHS + Карбахолин
Амплитуда, г	2.01 ± 0.15	1.41 ± 0.10*	1.25 ± 0.13
Площадь под кривой, г·с	110.68 ± 8,97	77.66 ± 4.40*	58.70 ± 3.99*#

Примечание. \* –  $p < 0.05$  по отношению к значениям, полученным при действии карбахолина в контроле, # –  $p < 0.05$  – по отношению к вызванному карбахолином сокращению на фоне NaHS.

сокращений (99%;  $n = 16$ ;  $p > 0.05$ ), его эффект на ППК был выражен в меньшей степени, чем в контроле (75%,  $n = 16$ ,  $p < 0.05$ ; рис. 36, табл. 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие газовых сигнальных молекул NO и H<sub>2</sub>S показано во многих системах нашего организма [1, 22, 27–30]. В нашей работе мы исследовали роль NO и внутриклеточного кальция в эффектах H<sub>2</sub>S на спонтанные и вызванные карбахолином сокращения тощей кишки крысы. H<sub>2</sub>S на сегодняшний день является общепризнанной сигнальной молекулой, которая синтезируется в ЖКТ и регулирует двигательную активность, процессы секреции, абсорбции [31, 32], а также играет роль в развитии различных патологических процессов, таких как синдром раздраженного кишечника, воспалительные заболевания, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, язвенный колит, болезнь Крона, ожирение и рак [33, 34]. Было показано, что инъекции NaHS, донора H<sub>2</sub>S, заметно облегчают воспаление и окислительный стресс при постинфекционном синдроме раздраженного кишечника [35], а снижение продукции H<sub>2</sub>S приводит к усилению перистальтики.

H<sub>2</sub>S повсеместно продуцируется в ЖКТ [36] и оказывает преимущественно расслабляющие эффекты на двигательную активность [37, 38], а его клеточные мишени зависят от участка ЖКТ, продольных или кольцевых мышечных волокон и вида, используемого в эксперименте животного [15–17, 25, 38]. В нашем исследовании донор H<sub>2</sub>S вызывал расслабление препарата тощей кишки крысы, снижая спонтанную активность и вызванные карбахолином сокращения, что согласуется с ранее полученными данными [8, 12, 15, 25].

В ряде работ предположено участие NO в механизмах действия H<sub>2</sub>S в различных тканях [25, 27, 39, 40]. В желудочно-кишечном тракте NO является основным тормозным медиатором неадренергической, нехолинергической передачи наряду с вазоинтестинальным пептидом и пуринами [11, 41]. Синтаза оксида азота экспрессируется в соме и варикозных расширениях нейронов энтеральной нервной системы и синтезирует NO в ответ на повышение уровня кальция [41, 42]. Для анализа роли NO в эффектах H<sub>2</sub>S использовали ингибитор синтазы оксида азота – L-NAME, аппликация которого вызывала повышение амплитуды спонтанных сокращений, что указывает на тоническое выделение NO из нервных окончаний [43]. Ингибиторные эффекты H<sub>2</sub>S полностью сохранялись на фоне действия L-NAME и также на фоне тетродотоксина, что свидетельствует о прямом действии NaHS на гладкомышечные клетки. Аппликация донора NO на препарат тощей киш-

ки крысы вызывал кратковременное угнетение амплитуды спонтанных сокращений, после чего она возвращалась к исходным значениям. Сходные эффекты были продемонстрированы и в тощей кишке мыши и человека, и этот эффект блокировался ODQ [43, 44], тогда как в циркулярных мышцах тощей кишки крысы донор NO не оказывал существенного влияния на спонтанную активность [45]. В присутствии донора NO эффекты NaHS на амплитуду спонтанных и вызванных карбахолином сокращений были выражены в меньшей степени. Можно предположить, что предварительная аппликация донора NO вызывает активацию внутриклеточных сигнальных путей, общих для NO и H<sub>2</sub>S, что снижает эффективность действия NaHS. Большинство эффектов NO в ЖКТ опосредуется NO-чувствительной гуанилатциклазой, которая экспрессируется в гладкомышечных клетках [11, 46–48]. Активация растворимой гуанилатциклазы приводит к синтезу цГМФ, мишенью которого являются три группы белков – цГМФ-зависимая протеинкиназа, цГМФ-регулируемая фосфодиэстераза и цГМФ-зависимые ионные каналы [48, 49]. цГМФ-регулируемая фосфодиэстераза 3 (цГМФ ингибируемая расщепляющая цАМФ) была показана в гладкомышечных клетках ЖКТ и интерстициальных клетках Кахала [48, 50] и может опосредовать взаимодействие между NO/цГМФ- и цАМФ-сигнализацией, и таким образом действовать на мишени цАМФ (например, HCN-каналы) [48]. цГМФ-зависимая протеинкиназа 1 повсеместно экспрессируется в гладкомышечных клетках и вызывает расслабление преимущественно путем снижения уровня Ca<sup>2+</sup>, угнетая выброс Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо или вход Ca<sup>2+</sup> из внеклеточного пространства [48]. Так, механизмы расслабления продольных гладкомышечных клеток желудка крысы при действии нитропруссид натрия связаны с освобождением Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы и входом Ca<sup>2+</sup> через потенциалзависимые Ca<sup>2+</sup>-каналы L-типа [51, 52]. Поэтому далее анализировали роль внутри- и внеклеточного Ca<sup>2+</sup> в эффектах NaHS.

Тоническое напряжение и амплитуда спонтанных сокращений гладкомышечных клеток определяется мембранным потенциалом покоя и уровнем внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [53, 54]. Действительно, снижение тонуса препарата тощей кишки при действии NaHS предотвращалось в присутствии блокатора рианодиновых рецепторов – дантролена, тогда как в бескальциевом растворе эффект NaHS сохранялся. Однако бескальциевый раствор снижал ингибиторный эффект NaHS на сокращения, вызванные аппликацией карбахолина. По-видимому, H<sub>2</sub>S может влиять

как на вход  $\text{Ca}^{2+}$  в гладкомышечные клетки, так и на его высвобождение из саркоплазматического ретикулума [55]. Известно, что  $\text{H}_2\text{S}$  является активатором  $\text{K}^+$ -каналов различных типов [15–17]. Это может приводить в гиперполяризации мембраны или ускорению реполяризации, что будет вызывать снижение входящего  $\text{Ca}^{2+}$ -тока через потенциал зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы. Кроме того, не исключено и непосредственное ингибирующее влияние  $\text{H}_2\text{S}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа [10]. Снижение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  будет приводить к изменению активности киназы/фосфатазы легких цепей миозина и, как следствие, к снижению эффективности работы сократительных белков [56].

Спонтанная активность гладкомышечных клеток в ЖКТ определяется ритмическими изменениями потенциала мембраны, так называемыми медленными волнами, в генерации которых ключевую роль играют интерстициальные клетки Кахаля, образующие щелевые контакты с низким сопротивлением с гладкомышечными клетками [11].  $\text{NaHS}$  вызывал угнетение частоты спонтанной активности препарата тощей кишки, и этот эффект не изменялся значительно ни при воздействии на синтез  $\text{NO}$ , ни при изменении уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в гладкомышечных клетках, однако предотвращался в присутствии донора  $\text{NO}$ . По-видимому, действие  $\text{NaHS}$  связано с прямыми эффектами газа на интерстициальные клетки Кахаля, который в больших концентрациях угнетал пейсмекерную активность в интерстициальных клетках Кахаля тонкого кишечника мыши [57].

Таким образом, донор  $\text{H}_2\text{S}$  –  $\text{NaHS}$  – вызывает снижение тонуса, частоты и амплитуды спонтанных сокращений препарата тощей кишки крысы, а также сокращения, вызванные активацией мускариновых рецепторов карбахолом. Ингибиторные эффекты  $\text{H}_2\text{S}$  реализуются непосредственно на гладкомышечные клетки, так как сохраняются в присутствии тетродотоксина и блокатора  $\text{NO}$ -синтазы, однако снижаются в присутствии донора  $\text{NO}$ , что может быть связано с его влиянием на  $\text{NO}$ -зависимые механизмы регуляции сократительной активности. Механизмы действия  $\text{H}_2\text{S}$  связаны с изменением уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  вследствие его высвобождения из саркоплазматического ретикулума или входа через потенциалзависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («ПРИОРИТЕТ-2030»).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (86/609/ЕЕС) и одобрены локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015; протокол №33 от 25.11.2021).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Hermann, G. F. Sitdikova, and T. M. Weiger, *Gastrotransmitters Physiol. Pathophysiol.*, 1–204 (2013).
2. M. Jimenez, V. Gil, M. Martinez-Cutillas, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 2805 (2017).
3. M. H. Stipanuk and P. W. Beck, *Biochem. J.*, **206**, 267 (1982).
4. N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 703 (2009).
5. K. Sudha, S. Anitta, P. M. Devi, and G. Thejomayah, *Int. J. Soc. Sci. Interdiscip. Res.*, **4**, 165 (2015).
6. D. R. Yarullina, R. O. Mikheeva, G. I. Sabirullina, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 343 (2016).
7. G. Sitdikova, A. Hermann, A. Yakovlev, *Uchenye Zap. Kazan. Univ. Seriya Estestv. Nauk*, **160**, 686 (2018).
8. M. S. Kasperek, D. R. Linden, G. Farrugia, and M. G. Sarr, *J. Surg. Res.*, **175**, 234 (2012).
9. L. Sha, D. R. Linden, G. Farrugia, and J. H. Szurszewski, *J. Physiol.*, **592**, 1077 (2014).
10. X. Quan, H. Luo, Y. Liu, et al., *PLoS One*, **10**, e0121331 (2015).
11. K. M. Sanders and S. M. Ward, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 212 (2019).
12. D. Gallego, P. Clavé, J. Donovan, et al., *Neurogastroenterol. Motil.*, **20**, 1306 (2008).
13. M. Nagao, J. A. Duenes, and M. G. Sarr, *J. Gastrointest. Surg.*, **16**, 334 (2012).
14. G. F. Sitdikova, N. N. Khaertdinov, and A. L. Zefirov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **151**, 163 (2011).
15. М. У. Шафигуллин, Р. А. Зефиров, Г. И. Сабируллина и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **157**, 275 (2014).
16. Г. И. Сабируллина, М. У. Шафигуллин, Н. Н. Хаертдинов и др., *Вестник науки Сибири*, № 15, 339 (2015).
17. И. Ф. Шайдуллов, М. У. Шафигуллин, Д. М. Габитова, и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **54**, 355 (2018).
18. C. Coletta, A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9161 (2012).
19. W. Zhao, R. Wang, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283** (2), H474 (2002).
20. K. Takeuchi, E. Aihara, M. Kimura, et al., *Curr. Med. Chem.*, **19**, 43 (2012).
21. M. Y. Ali, C. Y. Ping, Y. Y. P. Mok, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **149**, 625 (2006).
22. Z. Wang, Y. Yan, Y. Wang, and F. Tong, *Biomed. Pharmacother.*, **112**, 108736 (2019).

23. G. A. Prathapasinghe, Y. L. Siow, Z. Xu, and O. Karmin, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **295** (4), F912 (2008), DOI: 10.1152/AJPRENAL.00040.2008
24. G. K. Kolluru, X. Shen, and C. G. Kevil, *Redox Biol.*, **1**, 313 (2013).
25. Д. М. Габитова, И. Ф. Шайдуллов, Г. И. Сабируллина и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **160**, 18 (2017).
26. F. Zhao, P. Li, S. R. W. Chen, et al., *J. Biol. Chem.*, **276**, 13810 (2001).
27. M. L. Lo Faro, B. Fox, J. L. Whatmore, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **41**, 38 (2014).
28. B. V. Nagpure and J. S. Bian, *Handb. Exp. Pharmacol.* **230**, 193 (2015).
29. A. Walewska, A. Szewczyk, and P. Koprowski, *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (10), 3227 (2018).
30. D. Wu, Q. Hu, and D. Zhu, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, ID 4579140 (2018).
31. D. R. Linden, M. D. Levitt, G. Farrugia, and J. H. Szurszewski, *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 1135 (2010).
32. R. Wang, *Physiol. Rev.*, **92**, 791 (2012).
33. S. B. Singh and H. C. Lin, *Microorganisms*, **3**, 866 (2015).
34. J. E. Belizário and J. Faintuch, *Exp. Suppl.*, **109**, 459 (2018).
35. S. Yang, D. Deng, Y. Luo, et al., *RSC Adv.*, **6**, 64208 (2016).
36. G. R. Martin, G. W. McKnight, M. S. Dickey, et al., *Dig. Liver Dis.*, **42**, 103 (2010).
37. R. Hosoki, N. Matsuki, and H. Kimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 527 (1997).
38. I. Dhaese, I. Van Colen, and R. A. Lefebvre, *Eur. J. Pharmacol.*, **628**, 179 (2010).
39. L. T. Lucetti, R. O. Silva, A. P. M. Santana, et al., *Dig. Dis. Sci.*, **62**, 93 (2017).
40. Y. Q. Huang, H. F. Jin, H. Zhang, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1315**, 205 (2021).
41. E. Idrizaj, C. Traini, M. G. Vannucchi, and M. C. Vaccari, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (2021).
42. T. Okamoto, M. J. Barton, G. W. Hennig, et al., *Neurogastroenterol. Motil.*, **26**, 556 (2014).
43. N. J. Zyromski, M. L. Kendrick, D. M. Nagorney, et al., *J. Gastrointest. Surg.*, **5**, 588 (2001).
44. T. Ueno, J. A. Duenes, A. E. Zarroug, and M. G. Sarr, *J. Gastrointest. Surg.*, **8**, 831 (2004).
45. B. M. Balsiger, J. A. Duenes, N. Obtani, et al., *J. Gastrointest. Surg.*, **4**, 86 (2000).
46. S. Moncada, R. M. Palmer, and E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, **43** (1991).
47. T. Ördög, S. M. Ward, and K. M. Sanders, *J. Physiol.*, **518**, 257 (1999).
48. D. Groneberg, B. Voussen, and A. Friebe, *Curr. Med. Chem.*, **23**, 2715 (2016).
49. S. H. Francis, J. L. Busch, and J. D. Corbin, *Pharmacol. Rev.*, **62**, 525 (2010).
50. K. Y. So, S. H. Kim, H. M. Sohn, et al., *Mol. Cells*, **27**, 525 (2009).
51. J. Geeson, K. Larsson, S. M. O. Hourani, and N. J. Toms, *Auton. Autacoid Pharmacol.*, **22**, 297 (2002).
52. J. G. De Man, B. Y. De Winter, A. G. Herman, and P. A. Pelckmans, *Br. J. Pharmacol.*, **150**, 88 (2007).
53. C. E. Van Hove, C. Van Der Donckt, A. G. Herman, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **158**, 920 (2009).
54. A. L. Gonzales and S. Earley, *Microcirculation*, **20**, 337 (2013).
55. I. Castro-Piedras and J. F. Perez-Zoghbi, *J. Physiol.*, **591**, 5999 (2013).
56. K. S. Murthy, *Annu. Rev. Physiol.*, **68**, 345 (2006).
57. P. J. Yoon, S. P. Parajuli, D. C. Zuo, et al., *Chonnam Med. J.*, **47**, 72 (2011).

## Role of Nitric Oxide and Calcium Ions in the Effects of Hydrogen Sulfide on Contractile Activity of Rat Jejunum

D.M. Sorokina\*, I.F. Shaidullov\*, A.R. Gizzatullin\*, F.G. Sitdikov\*, and G.F. Sitdikova\*

*Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia*

This study was performed to explore the role of nitric oxide, intracellular and extracellular calcium in the effects of hydrogen sulfide on spontaneous and carbachol-induced contractions of a rat jejunum preparation during an isometric contraction. Application of H<sub>2</sub>S donor, sodium hydrosulfide, led to a decrease in tonic tension, the amplitude and frequency of spontaneous contractions, as well as in the amplitude induced by carbachol, a nonspecific acetylcholine receptor agonist. Inhibiting the production of endogenous NO synthesis by with L-NAME, the effect of H<sub>2</sub>S donor remained unchanged, while in the presence of SNAP, a NO donor, the effects of NaHS on the amplitude of spontaneous and carbachol-induced contractions were less pronounced. Dantrolene, a ryanodine receptor inhibitor was used to stop a decrease in tonic tension in the presence of NaHS. The calcium-free solution reduced the inhibitory effect of NaHS on carbachol-induced contractions. This suggests that the inhibitory effect of H<sub>2</sub>S is associated with the dynamics of the intracellular concentration of calcium ions, and the interaction between NO and H<sub>2</sub>S occurs at the level of common targets of two gases.

*Keywords: hydrogen sulfide, nitric oxide, contractile activity, rat jejunum, carbachol-induced contractions, calcium*

## МИНИМАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЗАВИСИМОСТИ НАПРЯЖЕНИЙ В СТЕНКЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО СОСУДА ОТ ПАРАМЕТРОВ ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКИ

© 2023 г. Н.Х. Шадрина\*, #

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

#E-mail: nkshsh@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

Описана минимальная математическая модель стенки малого артериального сосуда, построенная на основе опубликованных результатов экспериментов на церебральных сосудах крыс. Полагается, что активная составляющая напряжений имеет только окружную компоненту и зависит от окружного растяжения, концентрации кальция в цитоплазме и мембранного потенциала гладкомышечных клеток. Представленная модель стенки малой артерии качественно воспроизводит и результаты более сложных моделей других сосудов в условиях физиологической нормы. В отличие от аналогичной модели, учитывающей лишь один клеточный параметр, введение мембранного потенциала в число аргументов позволило выявить качественное изменение зависимости окружного напряжения от растяжения и радиальной координаты с изменением сосудистого тонуса. При фиксированных значениях мембранного потенциала и концентрации кальция в фазе развития сосудистого тонуса напряжение убывает по мере приближения к наружной стенке сосуда и увеличивается с ростом растяжения, а после того, как он сформируется, направленность изменений окружного напряжения меняется на противоположную.

*Ключевые слова:* миогенная регуляция, резистивный сосуд, напряжение сосудистой стенки, кальций, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S000630292305023X, EDN: NARCNP

Сосудистая стенка состоит из трех основных слоев: внутреннего (интимы), среднего и наружного (адвентиции). Адвентиция состоит преимущественно из волокон коллагена и эластина. Их соотношение, ориентация волокон зависят от типа сосуда и его расположения. В интиму входят коллаген в небольшом количестве, эндотелиальные клетки, гликокаликс на границе между циркулирующей кровью и эндотелием. Наиболее важной особенностью среднего слоя является присутствие, помимо коллагена и эластина, гладкомышечных клеток, за счет которых развиваются активные напряжения. Их сокращение может вызываться нервными, гуморальными, а также механическими воздействиями. Гладкомышечные клетки вместе с эндотелиальным слоем и гликокаликсом являются основными регуляторами сосудистого тонуса [1], физический смысл которого можно определить как напряжение сосудистой стенки, обусловленное сократимостью гладкомышечных клеток. В статье рассматривается регуляция напряжения гладкомышечными клетками в стенке малого артериального сосуда,

относящегося к разряду резистивных, на которые приходится наибольшая часть сосудистого сопротивления. Повышение внутрисосудистого давления сопровождается деполяризацией мембраны гладкомышечных клеток и ростом концентрации ионов кальция в цитоплазме, что приводит к увеличению степени активации и сокращению гладкомышечных клеток, в результате чего просвет сосуда сужается (см. работу [2]). Этот эффект называют миогенной сосудистой реакцией. Сокращение гладкомышечных клеток – результат сложных процессов взаимодействия ионных каналов плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума [2, 3].

В математических моделях последних трех десятилетий, уделяющих основное внимание строению артериальной стенки крупных артерий, часто полагалось, что активная часть напряжения пропорциональна параметру активации. Без уточнения названия этого параметра расчеты делались для крупных сосудов при двух предельных значениях этого параметра – нуле и единице [4–6]. Иногда дополнительно вводилось некоторое

промежуточное значение, соответствующее поведению сосуда в норме [7, 8]. Материал стенки в целом считался всегда гиперупругим, а зависимость напряжений от растяжений определялась экспериментально при двухосном растяжении сосудистых сегментов. Степень подробности описания строения стенки варьировалась, рассматривались однослойные [9], двухслойные [4] и трехслойные [5] модели, учитывалось распределение и ориентация гладкомышечных клеток и волокон коллагена и эластина [4, 10]. Для описания механических свойств стенки использовалась модель Хилла, материал стенки считался несжимаемым.

Общепризнано (см. работу [11]), что регулятором сократительной активности гладкомышечных клеток являются ионы кальция в цитоплазме. Впервые концентрация ионов кальция в качестве параметра, регулирующего диаметр сосуда, была введена С.А. Регирером и его учениками в 1975 г. [12]. В большинстве современных работ [10, 11, 13–15], рассматривающих концентрацию ионов кальция в качестве основного параметра, от которого зависят сокращения гладкомышечных клеток, используется модифицированная модель Hai & Murphy [16], описывающая динамику изменения доли свободных и присоединенных мостиков между актиновыми и миозиновыми нитями. В этих публикациях активная часть напряжений полагается пропорциональной коэффициентам фосфорилирования миозина из уравнений Hai & Murphy, зависящим от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Скорости дефосфорилирования обычно полагаются константами, лишь в работе [11] для них вводится зависимость от растяжений. Часто концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  задавалась как функции времени [10, 13–15]. В работе [11] увеличение поступления концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  извне при растяжениях стенки напрямую зависит от растяжений. Поэтому при расчетах оба эти параметра являются искомыми величинами. Растяжения стенки сосуда характеризовались удлинениями самой гладкомышечной клетки [10, 17] или сократительной единицы [14, 15], изменениями длины участков «перекрывания» нитей миозина и актина [13].

В меньшей части публикаций дополнительно привлекаются уравнения, связывающие концентрацию кальция в цитоплазме гладкомышечной клетки и саркоплазматическом ретикулуме, мембранный потенциал и ионные токи через мембрану [18–21]. При этом не рассматривается влияние внутриклеточных параметров на диаметр сосуда, макропараметр, определяемый в острых экспериментах на животных, прослеживаются лишь смещения миозиновых и актиновых нитей. В публикациях, оценивающих изменения радиуса, его считают пропорциональным длине гладкомышечной клетки [19]. Такие модели могут вклю-

чать до нескольких десятков уравнений, содержащих множество параметров, значения которых неизвестны [18, 19]. Значения параметров берутся либо из данных, полученных на другом экспериментальном материале, либо подбираются методами оптимизации и из соображений правдоподобности результатов. Громоздкость такого подхода практически сводит к нулю их использование для практических расчетов.

Ранее нами была предложена [22] достаточно простая модель стенки малого артериального сосуда для описания экспериментов [23] по раздуванию сегмента малого церебрального сосуда ступенчатым повышением внутрисосудистого давления. В модели активное напряжение полагалось зависящим от растяжений стенки и концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме гладкомышечных клеток. Была получена зависимость активной составляющей окружного напряжения от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Основным источником поступления кальция в клетку являются потенциал-зависимые кальциевые каналы, вероятность открытия которых регулируется мембранным потенциалом. В то же время ионные каналы способствуют установлению и регулированию мембранного потенциала (см. работы [2, 3]). Таким образом, оба эти параметра (концентрация кальция и потенциал) взаимозависимы и влияют на формирование сосудистого тонуса. Вследствие этого в данной работе в число аргументов активной составляющей напряжения вводится второй независимый клеточный параметр, мембранный потенциал гладкомышечной клетки ( $V_m$ ).

## ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Как и в работе [22], предполагается, что форма сосуда близка к цилиндрической, материал стенки однородный, гиперупругий. Деформации стенки осесимметричны, описываются тензором деформаций Грина и в цилиндрических координатах записываются как

$$\varepsilon_{ii} = \frac{1}{2}(\lambda_{ii}^2 - 1), \quad i = r, \theta, z, \quad \varepsilon_{ij} \equiv 0 \quad \text{при } i \neq j, \quad (1)$$

$$\lambda_{\theta\theta} \equiv \lambda_\theta = \frac{r}{r_0}, \quad \lambda_{rr} \equiv \lambda_r = \frac{dr}{dr_0}, \quad \lambda_{zz} \equiv \lambda_z = \frac{z}{z_0}, \quad (2)$$

где  $r, \theta, z$  – радиальная, окружная и продольная координаты,  $\lambda_{ii}$  ( $i = r, \theta, z$ ) – растяжения в соответствующем направлении,  $r_0$  и  $z_0$  – координаты точки в ненагруженном ненапряженном состоянии. Поскольку для малых артерий соответствующие данные отсутствуют, остаточные напряжения не рассматриваются, по той же причине продольные растяжения  $\lambda_{zz}$  полагаются равными единице.

Полное напряжение стенки представляется суммой пассивной и активной составляющих.

Активное напряжение развивается вследствие сокращения гладкомышечных клеток. Поскольку в малых артериях гладкомышечные клетки ориен-

тированы преимущественно в окружном направлении [24,25], считали, что активное напряжение имеет только окружную составляющую:

$$\sigma_{rr} \equiv \sigma_r = q + \sigma_r^{(p)}, \sigma_{\theta\theta} \equiv \sigma_\theta = q + \sigma_\theta^{(p)} + \sigma_\theta^{(a)}, \sigma_{zz} \equiv \sigma_z = q + \sigma_r^{(p)}, \quad (3)$$

где  $\sigma_{rr}$ ,  $\sigma_{\theta\theta}$ ,  $\sigma_{zz}$  – радиальная, окружная и продольная составляющие напряжения соответственно,  $q$  – множитель Лагранжа. Верхние индексы (р) и (а) обозначают пассивную и активную составля-

ющие напряжения. Пассивные напряжения  $\sigma^{(p)}$  находятся из функции энергии деформаций  $W_{pas}$ , представляемой экспонентой от квадратичной формы [26]

$$W_{pas} = \frac{A}{2} [\exp(Q) - 1], \quad Q = a_1 \varepsilon_{\theta\theta}^2 + a_2 \varepsilon_{rr}^2 + 2a_3 \varepsilon_{rr} \varepsilon_{\theta\theta}, \quad (4)$$

$$\sigma_r^{(p)} = \lambda_r^2 \frac{\partial W_{pas}}{\partial \varepsilon_{rr}}, \sigma_\theta^{(p)} = \lambda_\theta \frac{\partial W_{pas}}{\partial \varepsilon_{\theta\theta}}, \sigma_z^{(p)} \equiv 0. \quad (5)$$

Заметим, что  $\varepsilon_{zz} \equiv 0$ . Активная составляющая напряжения  $\sigma_\theta^{(a)}$  полагается функцией растяжений, концентрации кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток ( $C_m$ ) и мембранного потенциала ( $V_m$ ):

$$\sigma_\theta^{(a)} = S_{sm} g_1 f(\lambda_r, \lambda_\theta) \Psi(C_m) \Phi(V_m), \quad (6)$$

где  $S_{sm}$  – доля площади поперечного сечения сосудистой стенки, приходящаяся на гладкомы-

шечный слой,  $S_{sm} = 0.694$  (см. работу [22]). Функция  $f(\lambda_r, \lambda_\theta)$ , как и прежде [22], записывается в виде

$$f = \lambda_\theta \exp\left[-\left(\frac{\lambda_\theta}{g_2} + \frac{\lambda_r}{g_3} - g_4\right)^2\right]. \quad (7)$$

Вместо уравнения (6) можно ввести единую функцию энергии деформаций

$$W = W_{pas} + W_{act},$$

$$W_{act} = \text{const} \cdot \Psi(C_m) \Phi(V_m) \left[ \text{Erf}\left(\frac{\lambda_\theta}{g_2} + \frac{\lambda_r}{g_3} - g_4\right) - 1 \right].$$

где  $\text{const} = S_{sm} \frac{\sqrt{\pi}}{2} g_1 g_2$ . Тогда  $\sigma_\theta^{(a)} = \lambda_\theta^2 \frac{\partial W_{act}}{\partial \varepsilon_{\theta\theta}}$ .

Вид зависимостей  $\Psi(C_m)$  и  $\Phi(V_m)$  задается исходя из экспериментальных кривых  $C_m(p)$  и  $V_m(p)$ , приведенных в работе [23]:

$$\Psi(C_m) = 1 + g_5^{C_m/k} g_6; \quad \Phi(V_m) = g_7 + \text{asinh}(g_8 \cdot V_m + g_9). \quad (8)$$

Коэффициент  $k = 300$  нМ;  $A, a_i$ ,  $A, a_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) в уравнении (4) и  $g_i$  ( $i = 1, \dots, 9$ ) в уравнениях (6)–(8) – постоянные, подлежащие определению.

В соответствии с условиями экспериментов, описанных в работе [23], рассматривается статическая задача распределения напряжений в сосудистой стенке при нагружении трансмуральным давлением. Уравнения равновесия и несжимаемости для стенки имеют следующий вид:

$$\frac{\partial \sigma_r}{\partial r} + \frac{\sigma_r - \sigma_\theta}{r} = 0, \quad (9)$$

$$\lambda_r \lambda_\theta \lambda_z = 1. \quad (10)$$

Не теряя общности, можно считать, что давление на внешней стенке равно нулю, а граничные условия сводятся к

$$\sigma_r = -p, r = r_i; \quad \sigma_r = 0, r = r_i + h, \quad (11)$$

где  $p$  – внутрисосудистое давление,  $r_i$  и  $h$  – внутренний радиус и толщина стенки соответственно.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ И МЕТОД РЕШЕНИЯ**

Вычисления проводили с использованием экспериментальных данных, полученных на сегментах задней мозговой артерии крыс [23], где в диапазоне давлений 10÷100 мм рт. ст. одновременно регистрировались сосудистый радиус, концентрация кальция в цитоплазме и мембранный потенциал гладкомышечной клетки в стенке сосуда. Площадь поперечного сечения сосудистой стенки ( $S_w$ ) определяли по микрофотографиям, приведенным в работе [23],  $S_w = 3790 \text{ мкм}^2$ . Диаметр пассивного сосуда при отсутствии нагрузки вычисляли после аппроксимации статической зависимости «диаметр–давление» для пассивного сосуда из работы [23] рациональной и экспоненциальной функциями. Среднее двух полученных значений диаметра в точке  $p = 0$  использовали в вычислениях. Таким способом получили значение наружного диаметра ненагруженного пассивного сосуда, равное 108 мкм. Зная  $S_w$  и внешний диаметр, можно вычислить толщину стенки в неактивированном состоянии при от-

сутствии нагрузки:  $h_0 = 12.7 \text{ мкм}$ . В качестве характерных значений для линейных величин,  $C_m$ ,  $V_m$ , давления и напряжений при приведении системы уравнений к безразмерному виду использовали соответственно  $r^* = h^* = 98 \text{ мкм}$ ,  $C_m^* = 300 \text{ нМ}$ ,  $V_m = 100 \text{ мВ}$ ,  $p^* = \sigma^* = 100 \text{ мм рт. ст.} = 13.3322 \text{ кПа}$ .

Из уравнений (2) и условия несжимаемости материала стенки (10) следует соотношение

$$r^2 = r_0^2 + C, \tag{12}$$

где  $C$  – константа, которую предстоит определить. Уравнение (9) решается в конечных интегралах. Способ нахождения коэффициентов  $A$  и  $a_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) из решения задачи для пассивного сосуда был описан подробно в работе [27]. После перепроверки измерений радиуса по экспериментальным кривым получили следующие значения:  $A = 54.5 \text{ кПа}$ ,  $a_1 = 0.247$ ,  $a_2 = 0.025$ ,  $a_3 = 0.078$ .

Для нахождения коэффициентов, входящих в функции  $f$ ,  $\Psi$  и  $\Phi$ , уравнение (9) решали для активного сосуда с использованием уже найденных коэффициентов  $A$  и  $a_i$ . Решение для радиальной компоненты напряжения имеет вид:

$$\sigma_r = \sigma_r^{(p)} - S_{sm} g_1 \Psi(C_m) \Phi(V_m) \int_{r_0+h_0}^{r_0} \frac{r_0}{r_0^2 + C} \lambda_\theta \exp\left(-\left(\frac{\lambda_\theta}{g_2} + \frac{\lambda_r}{g_3} - g_4\right)^2\right) dr_0,$$

$$\sigma_r^{(p)} = \frac{A}{2C} \left\{ (r_0 + h_0)^2 \exp(Q(r_0 + h_0)) - r_0^2 \exp(Q(r_0)) - 2 \int_{r_0}^{r_0+h_0} r_0 \exp(Q(r_0)) dr_0 \right\},$$

$$Q(y) = \frac{C^2}{4} \left( \frac{a_1}{y^4} + \frac{a_2}{(y^2 + C)^2} - \frac{2a_3}{y^2(y^2 + C)} \right).$$

Здесь  $r_{0i}$  и  $h_0$  – внутренний радиус и толщина стенки при ненагруженном, ненапряженном состоянии сосуда.

Для окружного напряжения получили соотношение

$$\sigma_\theta = q + \frac{AC}{2} \exp(Q(r_0)) \left( a_1 \frac{r_0^2 + C}{r_0^4} - a_3 \frac{1}{r_0^2} \right) + S_{sm} g_1 \Psi(C_m) \Phi(V_m) \lambda_\theta \exp\left(-\left(\frac{\lambda_\theta}{g_2} + \frac{\lambda_r}{g_3} - g_4\right)^2\right),$$

$$q = \sigma_r - \frac{AC}{2} \left( \frac{a_3}{r_0^2 + C} - \frac{a_2 r_0^2}{(r_0^2 + C)^2} \right) \exp(Q(r_0)).$$

Коэффициенты  $g_i$  ( $i = 1, \dots, 9$ ) определяли минимизацией суммы квадратов отклонений радиального напряжения на внутренней стенке активи-

рованного сосуда от давления с противоположным знаком при 9 значениях давления. Значения коэффициентов приведены в табл. 1. После на-

**Таблица 1.** Значения параметров, входящих в активную составляющую напряжения

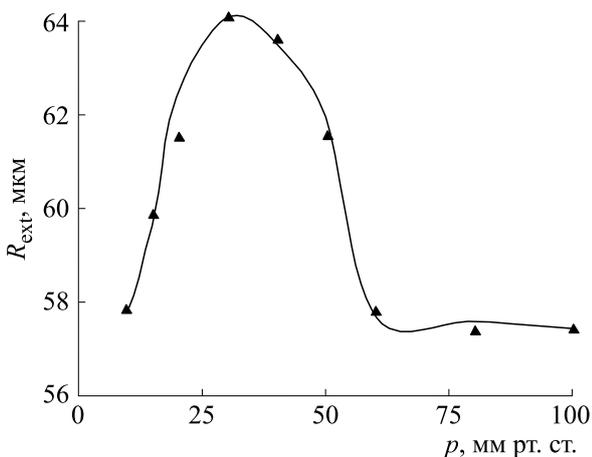
Параметр	Значение	Единица измерения
$g_1$	79	кПа
$g_2$	3.9	б/р
$g_3$	22.85	б/р
$g_4$	2.33	б/р
$g_5$	2.72	б/р
$g_6$	8.28	б/р
$g_7$	1.69	б/р
$g_8$	11.62	мВ <sup>-1</sup>
$g_9$	5.58	б/р

Примечание. б/р – Безразмерная величина.

хождения всех неизвестных коэффициентов из граничного условия (11) вычисляли значения  $C$  для давлений из рассматриваемого диапазона давлений при соответствующих экспериментальных значениях  $C_m$  и  $V_m$ . Зная  $C$ , можно определить радиальную координату из соотношения (12) и механические напряжения в любой точке сосудистой стенки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вычисленные с использованием полученных коэффициентов значения радиуса достаточно хорошо воспроизводят экспериментальные измерения в рассмотренном диапазоне давлений (см.

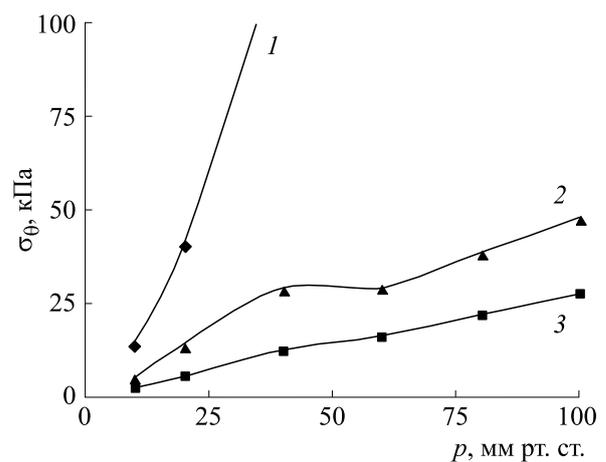


**Рис. 1.** Статическая зависимость внешнего радиуса сосуда от трансмурального давления: сплошная линия – вычисленные значения, маркеры экспериментальные точки [23].

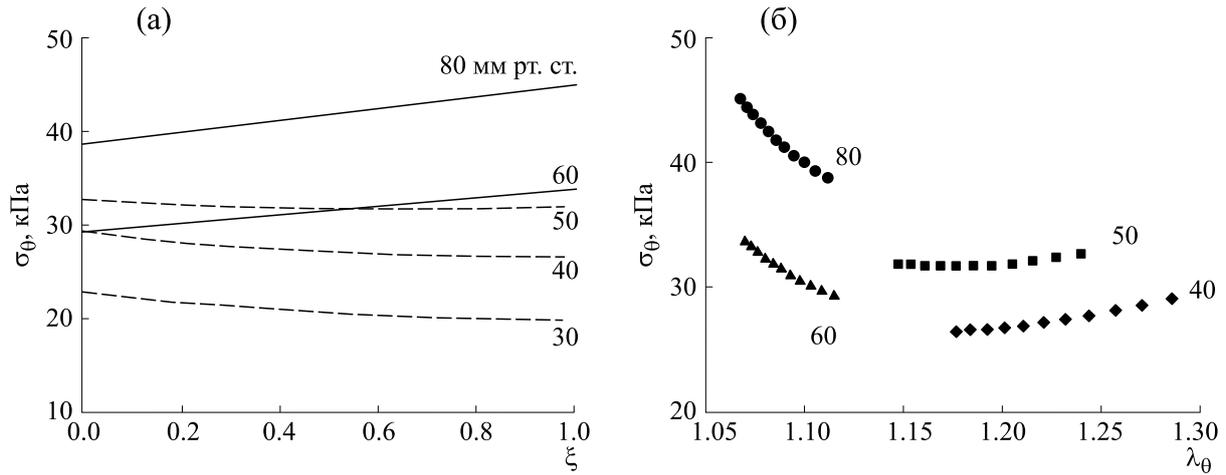
рис. 1). Как следует из результатов экспериментов на сосудах [28], аналогичных рассмотренным в работе [23], диапазон давлений, в котором радиус практически не меняет свое значение с ростом давления, составляет 60÷140 мм рт. ст.

Окружное напряжение в активированном сосуде (рис. 2, кривая 2) значительно ниже по сравнению с пассивным (рис. 2, кривая 1), что отмечалось и во многих других публикациях (см. например, работы [5, 8, 22]). При изменении внутрисосудистого давления от 40 до 60 мм рт. ст. окружное напряжение в стенке практически не меняется (рис. 2, кривая 2). Однако этот эффект отсутствует (рис. 2, кривая 3), если не учитывать зависимость активного напряжения от мембранного потенциала [22]. Диапазон давлений, в котором поддерживается постоянный уровень окружного напряжения, соответствует падающему участку зависимости радиуса от давления (рис. 1), участку формирования сосудистого тонуса. После развития сосудистого тонуса ( $p \geq 60$  мм рт. ст.) окружное напряжение практически линейно зависит от давления. Добавление второго клеточного параметра в число параметров  $\sigma_\theta^{(a)}$  количественно сокращает разницу между напряжениями в активном и пассивном сосуде, этот результат соответствует вычислениям для крупных сосудов [4].

Как показали расчеты, при фиксированных значениях  $C_m$  и  $V_m$  окружное напряжение в радиальном направлении изменяется монотонно, но направление его изменения зависит от величины трансмурального давления (рис. 3а). В фазе развития сосудистого тонуса напряжение убывает по мере приближения к наружной стенке сосуда, а после того, как он сформируется, наименьшее



**Рис. 2.** Зависимости окружного напряжения от давления, вычисленные для пассивного (кривая 1) и активированного сосуда с учетом (кривая 2) и без учета (кривая 3) мембранного потенциала. Маркеры соответствуют точкам, для которых проводили расчеты.



**Рис. 3.** Изменения окружного напряжения в радиальном направлении (а) и при изменении окружного растяжения (б). По оси абсцисс — нормированное расстояние от внутренней стенки, цифры справа от линий — значение давления в мм рт. ст.

окружное напряжение испытывает внутренняя стенка. Зависимость окружного напряжения от растяжений также меняет свое поведение при разном состоянии сосудистого тонуса (рис. 3б). В фазе развития сосудистого тонуса  $\sigma_\theta$  по мере растяжения растет, при сформированном тонусе — снижается. Если в первой фазе различие напряжений при минимальном и максимальном растяжении относительно невелико, то во второй оно увеличивается (рис. 3б).

Такое различие в поведении окружного напряжения в зависимости от тонуса сосуда не удается описать, вводя в активное напряжение только один клеточный параметр  $C_m$  (см. работу [22]). В этом случае во всем рассмотренном диапазоне давлений  $\sigma_\theta$  — растущая функция от растяжения и убывающая — от радиальной координаты.

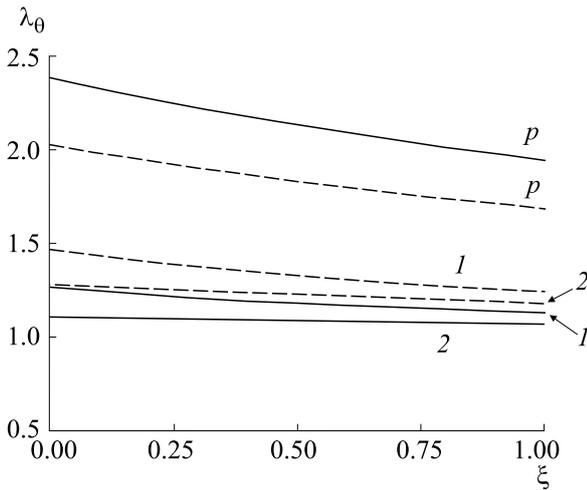
Результаты публикаций, рассматривающих только максимальную степень активации, свидетельствуют о росте окружного напряжения в радиальном направлении [4, 9], что соответствует нашим расчетам для сосуда при более высоких давлениях из рассмотренного диапазона, т.е. при большей степени активации. Влияние степени активации сократительного аппарата гладких мышц на изменения окружного напряжения в радиальном направлении отмечали и в работе [7]. Сравнивали результаты вычислений окружного напряжения при базальном тонусе аорты кролика и после увеличения степени активации вдвое. В первом случае зависимость напряжения от радиальной координаты была убывающей, а после увеличения степени активации стала растущей, что качественно совпадает с результатом, представленным на рис. 3а. Для свинной коронарной артерии с помощью трехмерной модели, учиты-

вающей распределение и ориентацию гладкомышечных клеток и волокон эластина и коллагена в каждом из двух слоев сосудистой стенки, были проведены расчеты для двух разных значений окружного растяжения максимально активированного сосуда [4]. Оказалось, что в зависимости от величины окружного растяжения зависимость  $\sigma_\theta(\xi)$  ведет себя по-разному: при меньшем значении ( $\lambda_\theta = 1.24$ ) она растущая, при большем ( $\lambda_\theta = 1.8$ ) убывающая. На первый взгляд этот результат не согласуется с представленным на рис. 3. Однако в максимально активированном сосуде изменение напряжения обусловлено только растяжениями, с увеличением растяжения, возможно, сосуд начинает вести себя как пассивная трубка. В той же работе показано, что при  $\lambda_\theta = 1.8$  пассивная часть окружного напряжения также уменьшается по мере удаления от внутренней стенки. Можно предположить, что при каком-то значении  $1.24 < \lambda_\theta < 1.8$  в таких артериях происходит переход от «активного» поведения к «пассивному».

Используя соотношения (2) и (12), окружные растяжения сосудистой стенки при отсутствии продольных деформаций, можно записать в виде

$$\lambda_\theta = \frac{\sqrt{(r_0 + \xi h_0)^2 + C}}{r_0 + \xi h_0},$$

где  $\xi$  — нормированная по толщине стенки радиальная координата; на внутренней стенке  $\xi = 0$ , на внешней  $\xi = 1$ . Поскольку производная  $\frac{\partial \lambda_\theta}{\partial \xi} < 0$ , зависимость окружного растяжения от радиальной координаты всегда убывающая (рис. 4).



**Рис. 4.** Расчетные изменения окружного растяжения в радиальном направлении в пассивном ( $p$ ) сосуде и активном при учете одного (кривые 1) и двух (кривые 2) клеточных параметров. Штриховые линии — вычисления для  $p = 40$  мм рт. ст., сплошные — для  $p = 100$  мм рт. ст.

В пассивном сосуде растяжения почти вдвое превышают растяжения стенки активного сосуда, большему давлению соответствуют и большие растяжения (рис. 4, верхняя и нижняя кривые  $p$ ). В активированном сосуде распределение растяжений становится более однородным. Стенка активного сосуда при большей нагрузке ( $p = 100$  мм рт.ст.) подвергается более слабому растяжению (рис. 4, сплошные и штриховые кривые 2) и однородность распределения становится более выраженной. При сравнении двух подходов к описанию активного напряжения оказывается, что учет мембранного потенциала способствует получению большей однородности растяжений вдоль сосуда (рис. 4, сравни кривые 1 и 2). При давлении 100 мм рт. ст. растяжение практически одинаково по сечению сосуда (рис. 4, сплошная линия 2). Уменьшение окружного растяжения по мере удаления от внутренней стенки и увеличение степени однородности распределения растяжения в радиальном направлении с ростом степени активации гладкомышечного слоя отмечали и при расчетах для коронарного сосуда с использованием трехслойной модели [29]. В описываемой модели, как и в работе [29], остаточные деформации в стенке и продольные растяжения не рассматривали. Учет последних дает слабое увеличение растяжений в радиальном направлении по мере удаления от внутренней стенки [5, 7]. Как уже указывалось [27], это можно объяснить различием локальных радиальных координат  $r_0$  в стенке ненагруженного сосуда до и после продольного разреза сосуда, производимого для определения остаточных напряжений. Для малых

артерий сведения об остаточных напряжениях в литературе отсутствуют, поскольку их определение в сосудах диаметром порядка 100 мкм на сегодняшний день практически невозможно. Вследствие этого значение радиуса ненагруженного неактивированного сосуда в представленной модели было получено в результате аппроксимации экспериментальной статической зависимости  $r(p)$  для пассивного сосуда (см. раздел «Определение параметров модели и метод решения»).

Как отмечалось, активные напряжения в модели полагаются зависящими от трех параметров. Коэффициенты функциональных соотношений подбирали минимизацией суммы квадратов отклонений радиального напряжения на внутренней стенке от модуля давления. Зависимость активного напряжения от растяжений в модели, учитывающей два клеточных параметра, представляли такой же, как и при рассмотрении только одного клеточного параметра, концентрации кальция [22], отличие сводилось лишь к значениям коэффициентов. Функциональное же соотношение, связывающее активное напряжение и  $C_m$  в одном и том же диапазоне значений концентрации кальция, после введения  $V_m$  имеет другой вид. Что касается экспериментальной базы, данные такой зависимости были получены лишь на гладкомышечных клетках толстой кишки морской свинки в диапазоне  $C_m = 10^2 \div 15 \cdot 10^{-4}$  нМ [30]. В представленной модели  $\Psi(C_m)$  качественно воспроизводит начальный участок экспериментальной зависимости из этой работы в диапазоне  $C_m = 50 \div 250$  нМ, т.е. при значениях, соответствующих измерениям  $C_m$  на церебральных сосудах [23]. В модели [22] качественно воспроизводится зависимость  $\Psi(C_m)$  на всем диапазоне из работы [30], тогда как в экспериментах на сегментах церебральных артерий диапазон изменений концентрации кальция был существенно меньше.

Предложенная модель позволяет рассчитать напряженное состояние стенки и сосудистый диаметр в физиологическом диапазоне изменений давления при известных значениях внутриклеточных параметров в норме. Сопоставление расчетов по модели с результатами экспериментов на аналогичных сосудах [31] показало, что при тех же значениях давления, концентрации кальция и мембранного потенциала вычисленные значения радиуса находятся в диапазоне измеренных в эксперименте.

Для описания поведения сосудистой стенки после введения блокаторов мембранных каналов требуется введение в модель дополнительных соотношений, связывающих изменения  $C_m$  и  $V_m$  с проводимостью основных каналов, регулирующих поступление кальция.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе экспериментальных данных для малого церебрального сосуда получена простая математическая модель поведения стенки малого резистивного сосуда в статике, включающая макро и микро параметры. Поскольку в малых артериях гладкомышечные клетки ориентированы в окружном направлении, рассматривается только окружная составляющая активного напряжения. Получена функциональная зависимость активного напряжения от растяжений, концентрации кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток и мембранного потенциала. Результаты вычислений показывают существенное снижение окружного напряжения в стенке в результате активации гладкомышечных клеток, увеличение степени однородности распределения окружных растяжений. В отличие от предыдущей, где напряжение является функцией только одного клеточного параметра, концентрации кальция, представленная модель выявила изменение характера зависимости окружного напряжения от растяжений и радиальной координаты с изменением степени активации гладкомышечных клеток. В процессе формирования сосудистого тонуса напряжение растет (убывает) с ростом растяжения (радиальной координаты), при сформированном тонусе эта зависимость убывающая (растущая). Модель качественно воспроизводит результаты практически всех доступных теоретических работ, описывающих поведение сосудистой стенки в условиях физиологической нормы. Дальнейшее развитие модели состоит во введении минимального числа параметров, характеризующих состояние мембранных каналов, через которые кальций поступает в гладкомышечную клетку.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственной программы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030), тема 64.1 «Раскрытие механизмов взаимодействия молекулярно-клеточных и системных регуляций функций внутренних органов» (№ 0134-2019-0001).

## 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. И.В. Гончар, С.А. Балашов, И.А. Валиев и др., Труды МФТИ, **9** (1), 101 (2017).
2. N. R. Tykocki, E. M. Boerman, and W. F. Jackson, *Compr. Physiol.*, **7** (2), 485 (2018). DOI:10.1002/cphy.c160011
3. W. F. Jackson, *Front. Physiol.*, **12**, 770450 (2021). DOI: 10.3389/fphys.2021.770450
4. H. Chen and G. S. Kassab, *Sci. Rep.*, **7** (1), 9339 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-08748-7
5. Y. Lu, J. Wu, Y. Li, et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 13911 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-14276-1
6. K. Takamizawa, *Cardiovasc. Eng. Tech.*, **10** (4), 604 (2019). DOI: 10.1007/s13239-019-00434-1
7. A. Rachev and K. Hayashi, *Ann. Biomed. Eng.* **27**, 459 (1999). DOI: 10.1114/1.19
8. M. A. Zulliger, A. Rachev, and N. Stergiopoulos, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H1335 (2004). DOI: 10.1152/ajpheart.00094.2004
9. B. Zhou, A. Rachev, N. Shazly, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **48**, 28 (2015). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2015.04.004
10. M. Böhl, A. Schmitz, G. Nowak, and T. Siebert, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **13**, 215 (2012). DOI: 10.1016/j.jtbi.2011.11.012
11. K. Uhlmann and D. Balzani, *Biomech. Model. Mech. Anal.*, **22**, 1049 (2023). DOI: 10.1007/s10237-023-01700-x
12. С. А. Регирер, И. М. Руткевич и П. И. Усик, *Механика полимеров*, № 4, 585 (1975).
13. S. Murtada, A. Arner, and G. A. Holzapfel, *J. Theor. Biol.*, **297**, 176 (2012). DOI: 10.1016/j.jtbi.2011.11.012
14. S. Murtada and G. A. Holzapfel, *J. Theor. Biol.*, **358** (7), 1 (2014). DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.04.028
15. Á. Navarrete, P. Varela, M. López, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 924019 (2022). DOI: 10.3389/fbioe.2022.924019
16. C. Hai, and R. A. Murphy, *Am. J. Physiol.*, **255**, 86 (1988).
17. J. Stålhand and G. A. Holzapfel, *J. Theor. Biol.*, **397**, 13 (2016). DOI: 10.1016/j.jtbi.2016.02.028
18. J. Yang, J. W. Clark, R. M. Bryan, and C. A. Robertson, *Med. Engineer. & Physics*, **25**, 691 (2003). DOI: 10.1016/s1350-4533(03)00100-0
19. J. Yang, J. W. Clark, R. M. Bryan, and C. A. Robertson, *Med. Engineer. & Physics*, **25**, 711 (2003). DOI: 10.1016/s1350-4533(03)00101-2
20. M. Koenigsberger, R. Sauser, D. Seppey, et al., *Bophys. J.*, **95** (6), 2728 (2008). DOI: 10.1529/biophysj.108.131136
21. A. Coccarelli, D. H. Edwards, A. Aggarwal, et al., *J. Roy. Soc. Interface*, **15**, 20170732 (2018). DOI: 10.1098/rsif.2017.0732
22. Н. Х. Шадрина, *Биофизика*, **66** (1), 157 (2021).
23. H. J. Knot and M. T. Nelson, *J. Physiol.*, **508** (1), 199 (1998). DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.199br.x
24. G. Gabella, *J. Ultrastruct. Res.*, **84** (1), 24 (1983). DOI:10.1016/s0022-5320(83)90083-7

25. G. E. Sleek and B. R. Duling, *Circ. Res.*, **59**, 620 (1986). DOI: 10.1161/01.res.59.6.620
26. Y. Fung, *Biomechanics* (Springer-Verlag, N.-Y., 1981).
27. Н. Х. Шадрина, *Изв. РАН. Мех. жидк. и газа*, № 2, 3 (2020). DOI: 10.31857/S0568528120020115
28. G. Osol, J. F. Brekke, K. McElroy-Yaggy, and N. I. Gokina, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H2260 (2002). DOI: 10.1152/ajpheart.00634.2002
29. R. Sanft, A. Power, and C. Nicholson, *Math. Biosci.*, **315**, 108223 (2019). DOI: 10.1016/j.mbs.2019.108223
30. A. Arner, *Eur. J. Physiol.*, **395**, 277 (1982). DOI: 10.1007/BF00580790.
31. H. J. Knot, N. B. Standen, and M. T. Nelson, *J. Physiol.*, **508** (1), 211 (1998). DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.211br.x

## Minimal Model for the Dependence of Stresses in the Wall of a Cerebral Vessel on the Parameters of a Smooth Muscle Cell

N.Kh. Shadrina\*

*\*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

A minimal mathematical model of the wall of a small arterial vessel is described. This model is created based on the published results of experiments performed on rat cerebral vessels. It is assumed that the active stress has only a circumferential component and depends on the circumferential stretch, calcium concentration in the cytoplasm, and the membrane potential of smooth muscle cells. The presented model for a small artery can qualitatively reproduce the results of more sophisticated models for other vessels under normal physiological conditions. Unlike a similar model, that accounts for only one cellular parameter, the addition of membrane potential as one of the main parameters was crucial to reveal a qualitative change in the dependency of circumferential stress on stretch and the radial coordinate with an alteration in vascular tone. At fixed values of membrane potential and calcium concentration in the phase of a development of vascular tone, stress decreases as it approaches the outer wall of the vessel and increases as stretch increases, and after it is formed, the direction of changes in the circumferential stress reverses.

*Keywords: myogenic regulation, resistance vessel, vascular wall tension, calcium, membrane potential*

УДК 577.353

## ПРОТЕОСТАЗ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP90 В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА В ПЕРИОД ГИБЕРНАЦИИ

© 2023 г. Ю.В. Грицына\*, С.С. Попова\*, Г.З. Михайлова\*, Л.Г. Бобылёва\*, С.Н. Удальцов\*\*, О.С. Моренков\*\*\*, Н.М. Захарова\*\*\*, И.М. Вихлянцев\*, \*\*\*\*, #

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

\*\* Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения – обособленное подразделение ФИЦ  
«Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,  
Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

\*\*\* Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский  
научный центр биологических исследований Российской академии наук»,  
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

\*\*\*\* Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета,  
ул. Карла Маркса, 76, Казань, 420012, Россия

# E-mail: [ivanvikhlyantsev@gmail.com](mailto:ivanvikhlyantsev@gmail.com)

Поступила в редакцию 24.07.2023 г.

После доработки 01.08.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Исследованы изменения содержания белка теплового шока 90 (HSP90) в *m. soleus* (содержит преимущественно волокна, экспрессирующие «медленную» изоформу I ТЦМ) и *m. gastrocnemius* (содержит преимущественно волокна, экспрессирующие «быстрые» изоформы II ТЦМ) истинного гибернанта длиннохвостого суслика (*Urocitellus undulatus*) в разные периоды годового цикла – летней активности (сезонный контроль), гипотермии/спячки, зимней (межбугорной) активности. Обнаружено, что несмотря на развитие атрофических изменений, более выраженных в «быстрой» *m. gastrocnemius*, содержание HSP90 в обеих мышцах не изменялось на протяжении всего периода гибернации. Обсуждается роль HSP90 в поддержании стабильности молекул гигантского саркомерного белка титина в периоды входа животного в состояние гипотермии и выхода из этого состояния, когда увеличивается активность кальпаиновых протеаз вследствие повышенного содержания  $Ca^{2+}$  в цитозоле мышечных клеток, а также в период гипотермии, когда активность кальпаинов, по всей вероятности, не ингибируется полностью. В период зимней/межбугорной активности, когда наблюдается повышенный оборот титина в поперечно-полосатых мышцах суслика, константное содержание HSP90, по-видимому, необходимо для правильного фолдинга заново синтезированных молекул титина и их встраивания в саркомеры, а также для удаления неправильно свернутых и отслуживших молекул/фрагментов титина и других белков. Таким образом, протеолиз HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика может вносить вклад в поддержание стабильного уровня титина и, возможно, других саркомерных белков в период гибернации, что, в свою очередь, будет способствовать поддержанию высокоупорядоченной саркомерной структуры и необходимого уровня сократительной активности мышц в разные фазы цикла «спячка–бодрствование».

**Ключевые слова:** гибернация, длиннохвостый суслик *Urocitellus undulatus*, скелетные мышцы, белки теплового шока, HSP90.

DOI: 10.31857/S0006302923050241, EDN: NASQXV

Гибернация/зимняя спячка млекопитающих – это состояние гипотермии и сниженного метаболизма, в которое животное входит вследствие эволюционно закрепленной совокупности пове-

денческих, физиологических, клеточных и молекулярных стратегий, позволяющих млекопитающим выживать в суровых условиях окружающей среды [1]. Многочисленные исследования механизмов адаптации зимоспящих животных к условиям зимней спячки свидетельствуют о наличии у разных видов гибернантов общих молекулярно-

Сокращения: ТЦМ – тяжелые цепи миозина, HSP90 – белок теплового шока 90.

генетических и других стратегий выживания в условиях гибернации. Так, проведенные за последние годы исследования выявили дифференциально экспрессирующиеся гены в поперечно-полосатых мышцах, а также других органах зимоспящих, что свидетельствует о молекулярно-генетических механизмах, регулирующих сезонные изменения активности многих сигнальных путей [2–5]. В научной литературе появились новые термины: «гибернационный фенотип», «несущественные гены и процессы» (nonessential genes and processes), которые «выключаются», чтобы сохранить энергоресурсы, необходимые для выживания в условиях зимней спячки [6].

Однако важно отметить, что несмотря на наличие у разных зимоспящих животных (летучих мышей, сонь, сусликов, медведей и др.) общих особенностей их «гибернационного фенотипа» (например, «fast-to-slow» трансформации миозина и мышечных волокон [7,8]; переключения метаболизма с углеводного на липидный [9]), в период гибернации у этих животных наблюдаются неодинаковые и часто противоположные изменения на молекулярном уровне. Эти данные позволяют предположить, что у каждого вида зимоспящего животного существует свой уникальный подход к «погружению» в состояние гибернации, что, несомненно, является чрезвычайно интересным научным аспектом, хотя это значительно усложняет поиск уникальных белковых комплексов с целью использования молекулярно-клеточных стратегий гибернантов для лечения/предотвращения негативных изменений у человека или у негибернирующих животных. В связи с этим исследования особенностей «гибернационного фенотипа» длиннохвостого суслика (*Uroditellus undulatus*), являющегося наименее изученным среди других видов зимоспящих, имеют большую научную значимость.

Исследования, проведенные нами ранее, выявили уникальную молекулярную стратегию длиннохвостого суслика, заключающуюся в поддержании стабильного уровня гигантских миофибриллярных белков толстых и тонких нитей титина и небулина в поперечно-полосатых мышцах в течение всего гибернационного сезона [10–12]. Так, во время оцепенения/спячки в сердечной и ряде скелетных мышц сусликов наблюдалось незначительное уменьшение (в ~1,2 раза) содержания титина. Во время межбугорчатой/зимней активности наблюдался преимущественный синтез титина, что приводило к быстрому восстановлению нормального содержания этого белка в мышцах [12]. При этом не наблюдалось нарушений высокоупорядоченной структуры саркоме-

ров в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика в периоды зимней активности [12].

В данной работе в двух скелетных мышцах длиннохвостого суслика исследованы сезонные изменения содержания белка теплового шока 90 (HSP90), который, являясь шапероном и важным компонентом механизма внутриклеточного «контроля качества белка» (protein quality control, PQC), играет также важную роль в регуляции стабильности молекул гигантского саркомерного белка титина [13]. В научной литературе также обсуждается, что поддержание стабильного уровня или увеличение содержания белков теплового шока, в том числе и HSP90, в разных тканях и органах, включая мышцы, как у зимоспящих млекопитающих [14–18], так и у других животных (черепахи [19], лягушки [20]), впадающих в состояние оцепенения и гипотермии, может являться общей молекулярной стратегией, защищающей клетки и макромолекулы от повреждений в условиях стресса во время гипотермии и при выходе из этого состояния.

Принимая во внимание процитированные выше данные о белках теплового шока, данные о «fast-to-slow» изменениях в скелетных мышцах разных видов зимоспящих в период гибернации [7, 8], а также данные о преобладающем синтезе титина в мышцах длиннохвостого суслика в период зимней активности [12], мы ожидали получить следующие результаты: (1) обнаружить константный уровень HSP90 в «медленной» мышце *m. soleus* на фоне отсутствия или слабо выраженных атрофических изменений в период гипотермии/спячки; (2) выявить уменьшение содержания HSP90 в «быстрой» мышце *m. gastrocnemius* на фоне более выраженных атрофических изменений в период гипотермии/спячки; (3) обнаружить восстановление уровня HSP90 в *m. gastrocnemius* и возможное увеличение содержания этого белка в *m. soleus* длиннохвостого суслика в период зимней (межбугорчатой) активности.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на истинном гибернанте длиннохвостом суслике *Uroditellus undulatus* (прежнее название *Spermophilus undulatus*). Животные были отловлены в окрестностях города Якутска и доставлены в виварий ИБК РАН (Пушино, Московская область), где они содержались в индивидуальных клетках при естественном освещении, температуре воздуха 20–21°C и влажности 65–70%. Гнездовой материал и пища – *ad libitum*. В экспериментах использовали животных обоих полов массой 550–750 г. Животные были

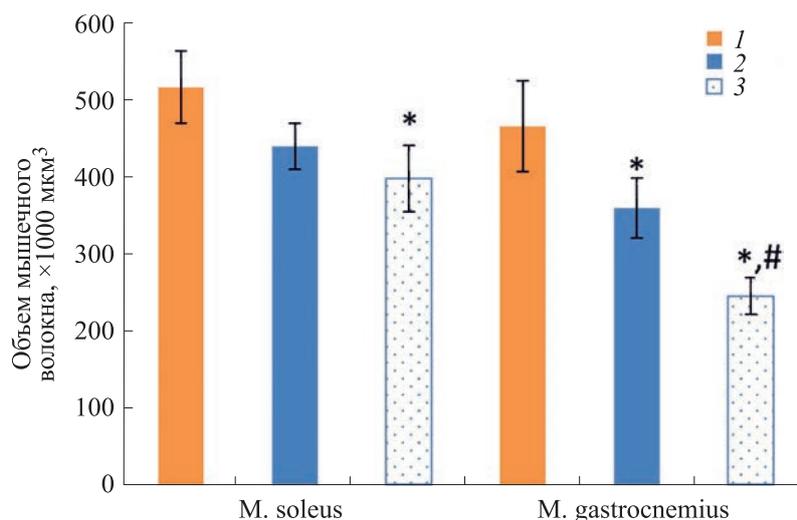
разделены на три группы: «Летняя активность» (нормотермия, 38°C, июнь–июль,  $n = 6$ ); «Гипотермия» (глубокое оцепенение/спячка, декабрь–март, температура сердечной мышцы 1.5–2.0°C, продолжительность периода гипотермии 5–11 суток,  $n = 6$ ); «Зимняя активность» (нормотермия/межбютная активность, 36–37°C, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, взятие материала через 5–14 ч эутермного состояния после пробуждения,  $n = 6$ ). Перед сезоном спячки сусликов переносили в темное помещение с температурой 1–3°C и перед экспериментом размещали в деревянных боксах размером 20×20×25 см с гнездовым материалом. Для регистрации состояния животных в дно деревянного бокса были вмонтированы термодатчики. Температура «подстилки» у животного, пребывающего в состоянии гипотермии (спячки) была порядка 2–4°C, а при выходе животного из спячки температура дна ящика поднималась до 12–16°C.

Процедура мониторинга и отбора животных проводилась сотрудниками лаборатории механизмов природного и искусственного гипобиоза (ИБК РАН, рук. лаб. Н.М. Захарова) и подробно описана в работе [21]. Животных декапитировали с помощью гильотины, немедленно вскрывали грудную полость и измеряли температуру в области сердца температурным датчиком RET2 (Physitemp, США) с точностью до 0.1°C. Мышцы *m. soleus* («медленная») и *m. gastrocnemius medialis* («быстрая») вырезали, замораживали в жидком азоте и хранили при –75°C. Активные суслики подвергались анестезии Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг, внутримышечно).

Для определения методом Вестерн-блоттинга сезонных изменений содержания белка HSP90 экстракцию белков из скелетных мышц сусликов проводили в лизирующем буфере, содержащем 12 мМ трис-НСl, 1.2% додецилсульфата натрия, 5 мМ ЭГТА, 10% глицерина, 2%  $\beta$ -меркаптоэтанола, 5 мкг/мл леупептина и ингибитора E64, рН 7.0. Экстракцию GAPDH (референсного белка) проводили в этом же лизирующем буфере. Белковые образцы нагревали при 95°C в течение трех-четырех минут. На дорожки в геле наносили одинаковые объемы белковых образцов, выравненных по концентрации общего белка, которую определяли методом Бредфорда по протоколу изготовителя (ЗАО «Силекс», Россия), используя бычий сывороточный альбумин как стандарт. ДСН-электрофорез проводили в 9.5–10% полиакриламидном геле по методу, описанному в работе [22]. Перенос белков с геля осуществляли на

PVDF-мембрану. Были использованы первичные антитела к HSP90 $\alpha/\beta$  (1:2000, номер клона 6H1/F8, получены в лаборатории проблем клеточного стресса (ИБК РАН, рук. лаб. О.С. Моренков), более подробная информация об этих антителах представлена в работе [12]) и GAPDH (1:2000, ab37168, Abcam, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (1:3000, ab6722 и ab6790, Abcam, Великобритания). Для визуализации белковых полос на мембранах использовали раствор NBT/BCIP (Roche, Германия). Отмытые гели и блот-мембраны оцифровывали, а затем проводили денситометрический анализ с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11 (Newcastle Upon Tyne, Великобритания).

Для определения атрофических изменений мышечных волокон методом 3D-реконструкции были взяты фрагменты вышеуказанных двух скелетных мышц сусликов трех экспериментальных групп – «Летняя активность» ( $n = 5$ ) (сезонный контроль), «Гипотермия» ( $n = 5$ ), «Зимняя активность» ( $n = 4$ ). Фрагменты мышц фиксировали в течение 16 ч при комнатной температуре, погружая в раствор, содержащий 4% параформальдегида, 2.5% глутарового альдегида и 50 мМ сахарозы в 0.1 М Na-какодилатном буфере (рН 7.4). Для постфиксации использовали 2%-й раствор четырехоксида осмия. После сушки в этаноле и ацетоне ткани заливали эпоксидной смолой EMBed и затем выдерживали в течение 48 ч при 60°C. Серийные срезы толщиной 9 мкм получали из блоков, залитых в эпоксидную смолу на пирамитоме (LKB 11800, Швеция). Визуализацию проводили на микроскопе NU-2E (Carl Zeiss, Германия, объектив E25× Planachromat). Панорамные изображения серийных срезов были выровнены относительно друг друга с помощью компьютерной программы IGL Align sEM Align. Ориентирами служили контуры внешнего периметрия. Контур каждого мышечного волокна были построены путем ручной сегментации в программе IGL Trace (версия 1.20b). Для калибровки был принят во внимание коэффициент усадки мышечной ткани (10%), вызванный процедурами постфиксации. Трехмерные изображения мышечных волокон были сформированы с использованием программного обеспечения IGL Trace. Количественные параметры рассчитывали с помощью коммерческой программы Actify's 3D View. Объемы 120 и 150 мышечных волокон (из расчета 30 волокон для каждого мышечного образца) были рассчитаны для группы «Зимняя активность» и для



**Рис. 1.** Сезонные изменения объема мышечных волокон *m. soleus* и *m. gastrocnemius* длиннохвостого суслика: 1 – «Летняя активность» ( $n = 5$ ), 2 – «Гипотермия» ( $n = 5$ ), 3 – «Зимняя активность» ( $n = 4$ ). Значения представлены как  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее значение,  $SD$  – стандартное отклонение; \* – в сравнении с группой «Летняя активность»,  $p < 0.05$ ; # – в сравнении с группой «Гипотермия»,  $p < 0.05$ .

групп «Летняя активность» и «Гипотермия» соответственно.

Статистическую обработку результатов исследования проводили при помощи пакета SigmaPlot 11.0 (Systat Software, США). В связи с тем, что распределение некоторых выборок данных не являлось нормальным (согласно критерию Шапиро–Уилка), для анализа достоверности наблюдаемых различий использовали непараметрический однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса) с последующим парным сравнением по тесту Тьюки. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Данные представлены как  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее значение,  $SD$  – стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

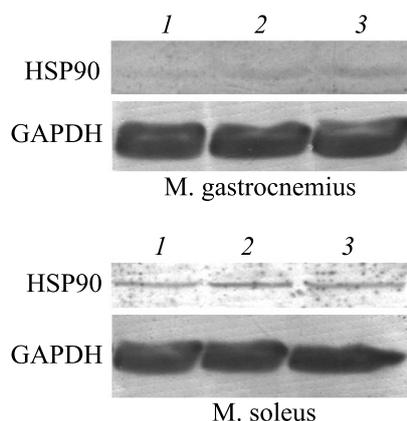
На рис. 1 представлены данные 3D-реконструкции объема мышечных волокон *m. soleus* и *m. gastrocnemius* сусликов трех экспериментальных групп. Результаты указывают на развитие атрофических изменений в двух скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период гибернационного сезона. В частности, обнаружено уменьшение на 23% ( $p < 0.05$ ) объема мышечных волокон «быстрой» икроножной мышцы сусликов группы «Гипотермия» и на 48% ( $p < 0.01$ ) группы «Зимняя активность» в сравнении с группой «Летняя активность». Объем мышечных волокон «медленной» *m. soleus* сусликов группы «Гипотермия» имел тенденцию к уменьшению на ~15%,

однако статистически значимых различий этого параметра в сравнении с группой «Летняя активность» не было. Статистически значимое уменьшение на 23% ( $p < 0.05$ ) объема мышечных волокон *m. soleus* наблюдалось в группе «Зимняя активность». При этом статистически значимых различий в атрофии мышечных волокон *m. soleus* между группами «Гипотермия» и «Зимняя активность» не выявлено. Полученные результаты свидетельствуют о более выраженных атрофических изменениях в «быстрой» мышце *m. gastrocnemius* и менее выраженной атрофии в «медленной» мышце *m. soleus* у длиннохвостого суслика в период гибернации.

На рис. 2 представлены данные Вестерн-блот-анализа сезонных изменений содержания HSP90 в *m. gastrocnemius* и *m. soleus* длиннохвостого суслика. Несмотря на развитие атрофических изменений (рис. 1), статистически значимых различий в содержании HSP90 в исследуемых скелетных мышцах сусликов трех экспериментальных групп не выявлено.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В целом наши предположения о поддержании константного уровня HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период гибернации подтвердились. В чем может заключаться физиологический смысл подобной молекулярной стратегии? Белки теплового шока, в том числе и HSP90, являются важными компонентами механизма внутриклеточного «контроля качества белка» [23]. Внутриклеточный «контроль качества



**Рис. 2.** Вестерн-блот анализ сезонных изменений содержания HSP90 в «быстрой» *m. gastrocnemius* ( $n = 6$ ) и «медленной» *m. soleus* ( $n = 6$ ) мышцах длиннохвостого суслика: 1 – «Летняя активность»; 2 – «Гипотермия»; 3 – «Зимняя активность»; GAPDH – референсный белок.

белка» необходим для поддержания баланса между деградацией белка и его синтезом. Поддержание такого баланса особенно важно в «долгоживущих», интенсивно работающих и испытывающих значительные механические нагрузки клетках поперечно-полосатых мышц. Большое количество белковых компонентов должно быть синтезировано, подвергнуто правильному фолдингу и встроено в саркомер, тогда как пропорциональная часть соответствующих белков должна быть подвергнута деградации [23, 24]. Дисбаланс белкового гомеостаза приводит к накоплению неправильно свернутых белков и их агрегатов в цитозоле, которые являются токсичными для клетки, что, в конечном итоге, ведет к развитию миопатии [24, 25]. Одним из «сложных» объектов для механизма внутриклеточного «контроля качества белка» является гигантский мышечный белок титин. На сегодняшний день точные механизмы «контроля качества» титина ни в норме, ни при патологии, ни при гибернации до конца неясны.

Шаперон HSP90 широко распространен во всех тканях живых организмов и принимает участие в фолдинге, поддержании структуры белков, их деградации, в предотвращении белковой агрегации, а также в процессах внутриклеточной сигнализации [26]. В саркомере HSP90 связывается с миозином, однако в комплексе с белками SET-семейства (содержат SET-домен, обладающий метилтрансферазной активностью) HSP90 способен связываться с N2A-доменом титина, защищая тем самым от протеолиза эту часть молекулы титина в I-зоне саркомера. Для взаимодействия с титином HSP90 должен быть метилирован с помощью SMYD2 [13]. После глутатионилирования или окисления SMYD2 этот комплекс диссоциирует и N2A-область титина оказывается доступной для расщепления кальпаином-1 – основным

протеолитическим ферментом титина. Эти данные свидетельствуют о положительной роли HSP90 в регуляции стабильности молекулы титина [13].

Результаты, полученные в нашем исследовании, свидетельствуют о константном содержании HSP90 в течение всего гибернационного периода как в «быстрой», так и в «медленной» скелетных мышцах длиннохвостого суслика, несмотря на развитие в них атрофических изменений. Аналогичные результаты, свидетельствующие о поддержании константного уровня HSP90 в течение всего сезона спячки в двух других поперечно-полосатых мышцах (миокарде и *m. longissimus dorsi*) длиннохвостого суслика, получены нами ранее [12]. Подобный протеостаз HSP90 несомненно будет играть положительную роль в поддержании стабильности молекул титина как в периоды входа животного в состояние гипотермии и выхода из этого состояния, когда увеличивается активность кальпаиновых протеаз вследствие повышенного содержания  $Ca^{2+}$  в цитозоле мышечных клеток (см. для ссылок работу [12]), так и в период гипотермии, когда активность кальпаинов, судя по нашим данным, не ингибируется полностью [12, 27]. В период зимней/межбугунной активности, когда наблюдается повышенный оборот (turnover) титина в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика [12], константное содержание HSP90 будет необходимо для правильного фолдинга заново синтезированных молекул титина и их встраивания в саркомеры, а также для удаления неправильно свернутых и «старых» молекул/фрагментов титина и других белков. Таким образом, протеостаз HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика может вносить вклад в поддержание стабильного уровня титина и других саркомерных белков в период гибернации, что, в свою очередь, будет способствовать поддержа-

нию высокоупорядоченной саркомерной структуры и необходимого уровня сократительной активности мышц в разные фазы цикла «спячка-бодрствование»: вход в спячку, оцепенение, выход из спячки, межбаутная активность.

Наши данные согласуются с результатами других исследований, тоже свидетельствующими о константом содержании разных белков теплового шока в миокарде тринадцатиполосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) в период гибернации [18]. Авторами сделан вывод о цитопротекторной роли белков теплового шока, способствующих повышению устойчивости миокарда к стрессовым воздействиям в это время. Другие исследователи показали увеличение содержания HSP70 (в 1.7 раза) в грудной мышце и двуглавой мышце плеча у летучей мыши *Murina leucogaster* во время спячки [15]. Был сделан вывод о важной роли повышенного содержания HSP70 в предотвращении атрофии и поддержании нормальной сократительной способности скелетных мышц после их продолжительного (в течение трех месяцев) неиспользования.

Мы полагаем, что поддержание константного уровня HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика вносит вклад в уменьшение протеолиза титина в период оцепенения, а также способствует быстрому обновлению и восстановлению нормального содержания титина в период межбаутных пробуждений. В совокупности полученные нами ранее данные [10–12] и результаты этой работы свидетельствуют о протеостазе титина и HSP90 в попеременно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика. Подобная молекулярная стратегия направлена на сохранение высокоупорядоченной саркомерной структуры и поддержание необходимого уровня сократительной активности мышц в разные фазы цикла «спячка-бодрствование».

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (<https://www.pbcras.ru/services/tskp>).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-01025-23-01.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями Комиссии по биоэтике ИБК РАН и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. M. Mohr, S. N. Bagriantsev, and E. O. Gracheva, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **36**, 315 (2020).
2. K. L. Vermillion, K. J. Anderson, M. Hampton, and M. T. Andrews, *Physiol. Genomics*, **47** (3), 58 (2015).
3. D. A. Mugahid, T. G. Sengul, X. You, et al., *Sci. Rep.*, **9** (1), 19976 (2019).
4. A. V. Goropashnaya, B. M. Barnes, and V. B. Fedorov, *Sci. Rep.*, **10** (1):9010 (2020).
5. E. Tseng, J. G. Underwood, B. D. Evans Hutzenbiler, et al., *Genes, Genomes, Genetics*, **12** (3), jkab422 (2022).
6. W. A. Ingelsson-Filpula and K. B. Storey, *Epigenomes*, 2021 **5**(4):28 (2021).
7. C. J. Cotton, *J. Exp. Biol.*, 219 (Pt 2), 226 (2016).
8. M. V. Lazareva, K. O. Trapeznikova, I. M. Vikhlyantsev, et al., *Biofizika*, **57** (6), 982 (2012).
9. A. G. Hindle, A. Karimpour-Fard, L. E. Epperson, et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301** (5), 1440 (2011).
10. I. M. Vikhlyantsev, E. V. Karaduleva, and Z. A. Podlubnaya, *Biophysics*, **53**, 598 (2008).
11. I. M. Vikhlyantsev and Z. A. Podlubnaya, *Biochemistry (Moscow)*, **77** (13), 1515 (2012).
12. S. Popova, A. Ulanova, Y. Gritsyna, et al., *Sci. Rep.*, **10** (1), 15185 (2020).
13. L. T. Donlin, C. Andresen, S. Just, et al., *Genes Dev.*, **26** (2), 114 (2012).
14. S. F. Eddy, J. D. McNally, and K. B. Storey, *Arch. Biochem. Biophys.*, **435** (1), 103 (2005).
15. K. Lee, J. Y. Park, W. Yoo, et al., *J. Cell Biochem.*, **104** (2):642 (2008).
16. C. W. Wu, K. K. Biggar, J. Zhang, et al., *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **13** (2), 119 (2015).
17. B. E. Luu, S. Wijenayake, J. Zhang, et al., *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **224**, 26 (2018).
18. C. L. Childers, S. N. Tessier, and K. B. Storey, *Peer J.*, **7**, e7587 (2019).
19. A. Krivoruchko and K. B. Storey, *J. Comp. Physiol. B*, **180** (3), 403 (2010).
20. H. M. Rabeae, S. S. Mahfouz, A. K. M. Abdel Latif, et al., *J. Therm. Biol.* **114**, 103490 (2023).
21. Н.М. Захарова, *Фундаментальные исследования*, **6**, 1401 (2014).
22. U. K. Laemmli, *Nature*, **227** (5259), 680 (1970).
23. S. Kötter and M. Krüger, *Front. Physiol.*, **13**, 914296 (2022).
24. K. Hnia, T. Clausen, and C. Moog-Lutz, *Trends Mol. Med.*, **25** (9), 760 (2019).
25. Z. V. Wang and J. A. Hill, *Cell Metab.* **21**(2), 215 (2015).

26. P. Csermely, T. Schnaider, C. Soti, et al., *Pharmacol. Ther.*, **79** (2), 129 (1998). 27. S. S. Popova, I. M. Vikhlyantsev, N. M. Zakharova, et al., *Dokl. Biochem. Biophys.* **472** (1), 56 (2017).

## Proteostasis of Heat Shock Protein 90 in Skeletal Muscles of the Long-Tailed Ground Squirrel during Hibernation

Yu.V. Gritsyna\*, S.S. Popova\*, G.Z. Mikhailova\*, L.G. Bobyleva\*, S.N. Udaltsov\*\*, O.S. Morenkov\*\*\*, N.M. Zakharova\*\*\*, and I.M. Vikhlyantsev\*, \*\*\*\*

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

\*\**Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

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

\*\*\*\**Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, ul. Karla Marksa 76, Kazan, 420012 Russia*

We investigated changes in the content of heat shock protein 90 in m. soleus (comprised of mainly fibers expressing the MyHC slow isoform I) and m. gastrocnemius (composed of mainly fibers expressing the MyHC fast isoforms II) of the long-tailed ground squirrel *Urocyon undulatus* in different periods of the annual cycle: summer activity (seasonal control), hypothermia/torpor, winter (interbout) activity. The content of the protein in both muscles was found not to change throughout the entire hibernation period despite the development of atrophic changes, more pronounced in fast m. gastrocnemius. The role of HSP90 in maintaining the stability of giant sarcomeric titin protein molecules is discussed with reference to animal's entry into and exit from hypothermia, when the activity of calpain proteases increases due to the increased content of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytosol of muscle cells; and with respect to the torpor, when the activity of calpains is, most likely, not inhibited completely. During the interbout activity with an observed increased titin turnover in squirrel's striated muscles, a constant content of HSP90 appears to be required for the correct folding of newly synthesized titin molecules and their integration into sarcomeres, as well as for the removal of misfolded titin molecules and other proteins. Thus, HSP90 proteostasis in skeletal muscles of the long-tailed ground squirrel can contribute to maintaining a steady-state level of titin and, possibly, other sarcomeric proteins during hibernation, which, in turn, will contribute to maintaining a highly ordered sarcomeric structure and the necessary level of muscle contractile activity in different phases of the torpor–arousal cycle.

*Keywords: hibernation, long-tailed ground squirrel Urocyon undulatus, skeletal muscles, heat shock proteins, HSP90*

УДК 577.354

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КРИТИЧЕСКОЙ ЧАСТОТЫ СЛИЯНИЯ МЕЛЬКАНИЙ В ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. С.И. Ляпунов\*, #, И.И. Шошина\*\*, ##, И.С. Ляпунов\*

\*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, ул. Вавилова, 38, Москва, 119991, Россия

#E-mail: dc.cetsil@gmail.com

\*\*Институт когнитивных исследований Санкт-Петербургского государственного университета, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

##E-mail: shoshinai@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2023 г.

После доработки 01.05.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Временная разрешающая способность зрительной системы имеет важное значение для восприятия объективного мира. Наименьшая частота дискретизации последовательности изображений, при которой восприятие становится слитным, называется критической частотой слияния мельканий. Многообразие экспериментальных данных о порогах критической частоты может найти объяснение с позиций предложенной модели контрастной чувствительности зрительной системы, основанной на треморном модуляционном сигнале. Модель описывает зависимость критической частоты слияния мельканий от яркости стимула, яркости адаптации, длительности и углового размера стимула. Модель демонстрирует, что для ярких стимулов с малой длительностью и большим угловым размером значения критической частоты лежат в диапазоне до 1000 Гц; оптимальной для зрительной системы следует считать кадровую частоту 300–500 Гц; для малоразмерных угловых стимулов критическая частота лежит в области низких частот. Различия в скорости слияния мерцаний могут быть объяснены временной чувствительностью нейронов магно- и парвоцеллюлярной зрительных подсистем.

*Ключевые слова:* критическая частота слияния мельканий, треморный модуляционный сигнал, динамическая световая нагрузка, яркость адаптации, магноцеллюлярная система, парвоцеллюлярная система.

DOI: 10.31857/S0006302923050253, EDN: NHUUMD

Скорость, с которой мозг обрабатывает визуальную информацию, имеет важное значение для мозга, обеспечивающего построение внутренней картины внешнего мира и адаптацию к его изменениям. Зрительная система характеризуется разрешающей способностью в пространственной и временной областях. Пространственное разрешение в зрительной системе определяется как способность различать в пространстве два соседних объекта, временное разрешение – способность различать изменения яркости во времени. Наименьшая частота дискретизации (различения) последовательности изображений, при которой восприятие становится слитным, называется критической частотой слияния мельканий (КЧСМ).

В качестве теста для определения КЧСМ обычно используется диск на равномерном фоне, яркость которого модулирована меандром с амплитудой 0 и 1. Меандр – периодический сигнал прямоугольной формы (рис. 1а), у которого длительности положительной и отрицательной полуволн равны. Аналитически меандр может быть записан с помощью функции Хевисайда, широко используемой для представления сигналов, переходящих в определенный момент времени из одного состояния в другое:

$$x(t) = 2A \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left[ h\left(\frac{t}{T} - n\right) - h\left(\frac{t}{T} - n - \frac{1}{S}\right) \right] - 1, (1)$$

где  $S$  – скважность или отношение периода следования (повторения) импульсов к длительности импульса,  $t$  – время,  $T$  – период. Меандр описывается как  $S = 2$ .

Функция Хевисайда – функция единичного скачка [1] (рис. 1б), равная нулю для отрицатель-

Сокращения: КЧСМ – критическая частота слияния мельканий, ТМС – треморный модуляционный сигнал.

ных значений аргумента и единице – для положительных:

$$\theta(x) = \begin{cases} 0, & x < 0; \\ 1, & x \geq 0. \end{cases} \quad (2)$$

Показано, что КЧСМ зависит от яркости адаптации, яркости стимула, углового размера стимула и локализации его проекции на сетчатке, спектрального состава излучения и скважности меандра – соотношения периода повторения световых импульсов к их длительности [2].

Регистрация КЧСМ находит приложение в медицине для оценки состояния центральной нервной системы, особенностей восприятия у лиц с различными расстройствами [3–6]. Технический аспект ее применения распространяется на области от проектирования проблесковых маячков до эргономики источников света и мониторов [7–12].

Для проблесковых источников света с яркостью до  $1000 \text{ кд/м}^2$  КЧСМ определяется следующим выражением [7]:

$$f_c = 12 \log(Lp) + 35, \quad (3)$$

что ограничивает КЧСМ значением 71 Гц.

По мере развития техники телевизионные стандарты кадровой частоты, связанные с КЧСМ, демонстрируют увеличивающиеся значения: 25, 30, 60 и 90 Гц, а производители мониторов компьютеров и смартфонов успешно осваивают кадровые частоты 90, 120, 144, 240 и даже 360 Гц. Показано, что среди источников света глаз регистрирует мерцание ламп дневного света на частотах 100 и 120 Гц [9]. Авторы относительно недавней работы [11] продемонстрировали, что человек способен различать модулированный и постоянный свет с частотой до 500 Гц.

Многообразие экспериментальных данных может найти объяснение с позиций модели контрастной чувствительности зрительной системы, основанной на треморном модуляционном сигнале.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ КЧСМ С ПОЗИЦИЙ ТЕОРИИ ТРЕМОРНОГО МОДУЛЯЦИОННОГО СИГНАЛА

В основу модели треморного модуляционного сигнала (ТМС) положен факт исчезновения восприятия при остановке изображения на сетчатке, полученный и подробно описанный в работе [13]. Из всех движений, совершаемых глазом, в качестве основных движений в модели ТМС приняты тремор и дрейф. Есть две причины этого выбора. Во-первых, из всех движений, осуществляемых глазом, тремор и дрейф являются самыми низкоскоростными (угловая скорость до 0.4 град/с), не

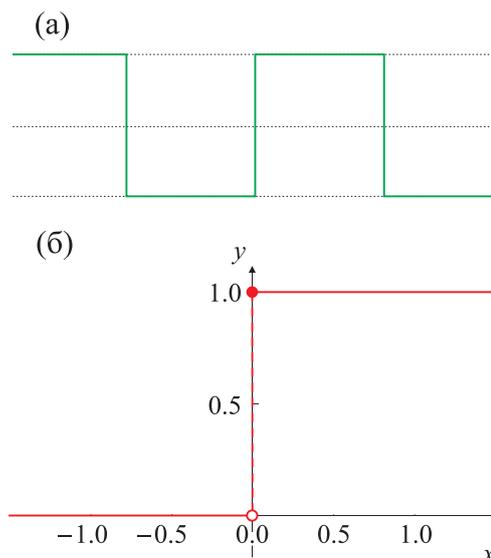
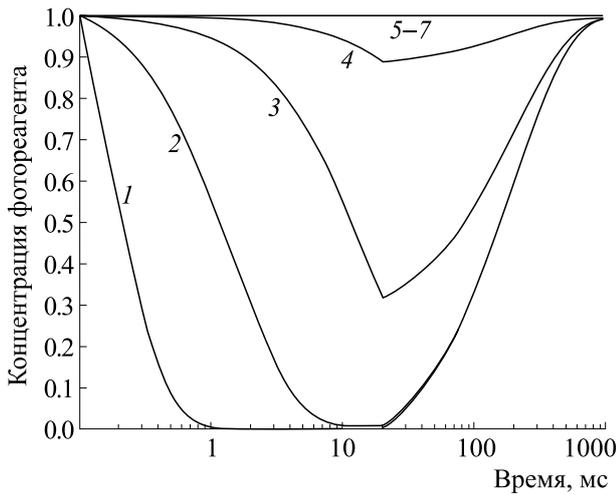


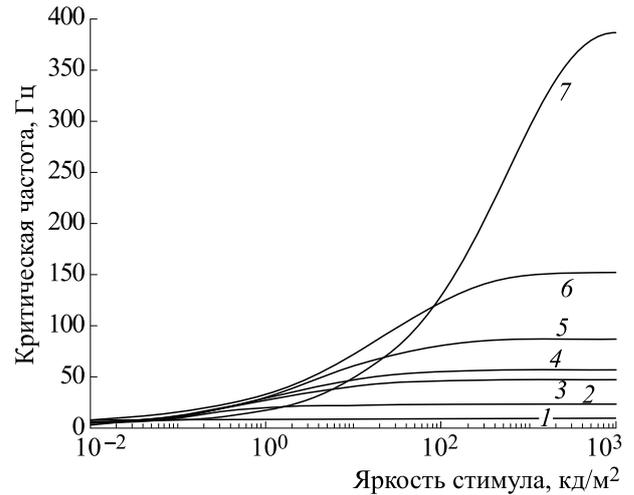
Рис. 1. Сигнал прямоугольной формы – меандр (а) и описывающая его единичная функция Хэвисайда (б), которая при  $x = 0$  доопределена значением 1.

ухудшающими пространственное разрешение и контрастную чувствительность зрительной системы. Это означает, что на данных угловых скоростях зрительная система накапливает отношение сигнал/шум без потерь. Во-вторых, тремор и дрейф составляют пару ортогональных движений и имеют соизмеримую угловую скорость, что обеспечивает двухкоординатную модуляцию сигнала.

Сущность модели ТМС была подробно изложена в серии работ [14–17]. В качестве меры ТМС принята нормированная разность концентрации фотореагента в фоторецепторе в крайних точках тремора [14]. Из этого следует, что источником ТМС являются перепады и градиенты яркости. Постоянная яркость или малые ее изменения в пределах шума спонтанной генерации импульсов ганглиозными клетками или порога возбуждения нейрона дают нулевое значение сигнала. На перепаде или градиенте яркости ТМС может существовать бесконечно долго. Согласно модели именно длительный ТМС является основанием для автоформирования линий возбуждения, которые впоследствии селективируются (повторяются) в высших отделах зрительной системы. Адекватность модели была подтверждена в работах [14–17] для центрального и периферического зрения в большом диапазоне внешних условий – яркости адаптации ( $10^{-3}$ – $10^3 \text{ кд/м}^2$ ), угловых размеров (1–300 угловых минут) и формы тестовых стимулов (диски, кольца Ландольта, миры Фуко, синусоидальные решетки), времени их предъявления ( $10^{-5}$ –5 с). Модель не содержит поправочных коэффициентов и функций во всем диапазо-



**Рис. 2.** Динамика переходных процессов концентрации фотореагента во время воздействия первого светового импульса и после него для яркости адаптации  $0.001 \text{ кд/м}^2$  и длительности стимула  $0.02 \text{ с}$ . Цифрами 1–7 обозначены кривые для яркостей стимула  $L_s = [10000; 1000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01] \text{ кд/м}^2$ .



**Рис. 3.** Зависимость КЧСМ от яркости и длительности стимула при яркости адаптации  $0.001 \text{ кд/м}^2$  и углом размера стимула  $1 \text{ град}$ . Цифрами 1–7 обозначены кривые зависимостей для длительности стимула  $t_1 = [100; 40; 20; 16; 10; 5; 1] \text{ мс}$ .

не внешних условий при восприятии различных тестовых стимулов в пороговых и надпороговых условиях.

Значения КЧСМ в основном определяются переходными фотохимическими процессами в рецепторе, описание которых приведено в Приложении 1. С позиций модели ТМС задача определения КЧСМ сводится к пороговой постановке, когда после окончания воздействия первого светового импульса определяется время переходного процесса концентрации фотореагента, в течение которого формируется ощущение, превышающее пороговое значение. Иначе говоря, зрительная система между первым и вторым световыми импульсами формирует пороговое ощущение прерывания (дискретизации) цельности восприятия.

Модель ТМС позволяет получить численное итерационное решение для КЧСМ:

$$f_c = 1/(t_1 + t_2), \quad (4)$$

где  $t_1$  — длительность светового импульса;  $t_2$  — критическая длительность паузы;

$$t_2 = \ln((1 + \sqrt{(1 - 4D)})/2)/(K_2 + K_1 E_0), \quad (5)$$

$$D = -F/N^2/((1 - c_1/c_0)(K_2 + K_1 E_0)/f_{tr}), \quad (6)$$

$$c_1 = c_0 + (c_s - c_0)(1 - \exp(-(K_2 + K_1 E_s)t_1)), \quad (7)$$

где  $c_0$  — концентрация адаптации;  $c_s$  — установившийся уровень концентрации при воздействии первого светового импульса для  $t = \infty$ ;  $c_1$  — текущий уровень концентрации на момент оконча-

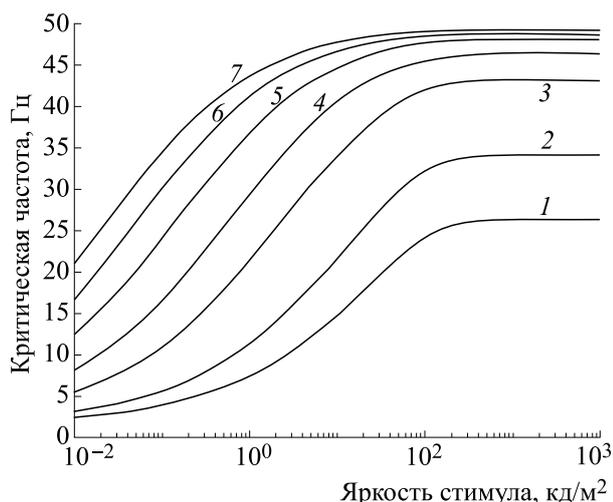
ния первого светового импульса длительностью  $t_1$ ;  $E$  — значение освещенности в плоскости сетчатки;  $K_1$  — концентрация разложения фотореагента;  $K_2$  — концентрация восстановления фотореагента;  $D$  — диаметр;  $F$  — порог нейронного возбуждения. Более подробные пояснения к формулам (4)–(7) приведены в Приложении 1.

На рис. 2 представлена временная динамика переходных процессов концентрации фотореагента во время воздействия первого светового импульса и после него для условий темновой адаптации. Для яркостей стимула менее  $1000 \text{ кд/м}^2$  концентрация фотореагента не достигает установившегося значения, о чем говорит отсутствие участка сглаженного приближения к постоянному уровню.

Очевидно, что при длительности стимула менее  $1 \text{ мс}$  это будет справедливо для всех приведенных на рис. 2 яркостей стимула. С точки зрения эффективного накопления сигнала в зрительной системе длительность стимула должна составлять  $10\text{--}20 \text{ мс}$ .

Результаты ТМС моделирования зависимости КЧСМ от яркости стимула для различных длительностей стимула в условиях темновой адаптации (при яркости адаптации  $0.001 \text{ кд/м}^2$ ) приведены на рис. 3. С позиций модели ТМС оптимальная длительность стимула составляет  $1 \text{ мс}$ , что соответствует времени перехода реакции фототрансдукции в необратимое состояние.

Однако при данных длительностях для малых яркостей стимула эффективность накопления сигнала не достигает установившихся значений.

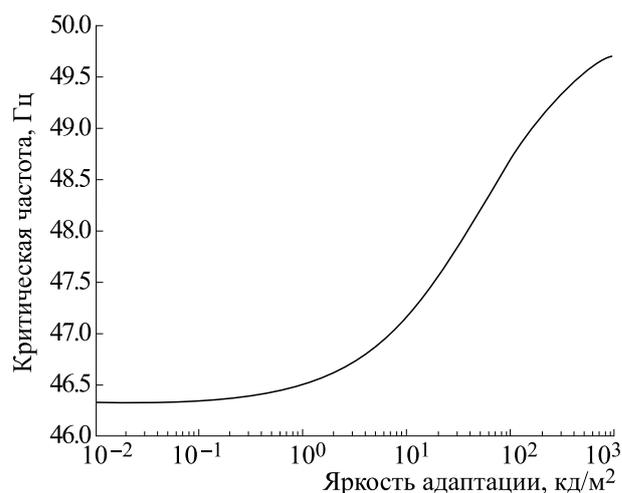


**Рис. 4.** Зависимость КЧСМ от яркости и углового размера стимула при яркости адаптации  $0.001 \text{ кд/м}^2$  и длительности стимула 20 мс. Цифрами 1–7 обозначены кривые для угловых размеров стимула  $N = [5; 10; 30; 60; 120; 200; 300]$  угл. мин.

Для недопущения взаимодействия с треморной модуляцией оптимальной длительностью стимула следует считать 2–3 мс (кадровая частота 300–500 Гц).

Согласно модели ТМС диапазон кадровой частоты  $90 \pm 20$  Гц, соизмеримый с физиологической частотой тремора глаза, физиологически опасен, так как может приводить к перенапряжению зрительной системы и снижению ее контрастной чувствительности за счет высокой доступности ЦНС для внешних стимулов данной частоты и возможной принудительной внешней синхронизации альфа-мотонейронов. Результаты исследований влияния пульсирующих источников света на электрическую активность мозга человека свидетельствуют о том, что видимые низкочастотные (до 90 Гц) пульсации светового потока вызывают зрительный дискомфорт, зрительное и общее утомление, тогда как невидимые пульсации светового потока приводят к перегрузке зрительной системы и изменению естественной электрической активности мозга [18, 19].

Результаты ТМС-моделирования зависимости КЧСМ от яркости стимула для различных угловых размеров стимула в условиях темновой адаптации (при яркости адаптации  $0.001 \text{ кд/м}^2$ ) приведены на рис. 4. Верхний предел моделирования ограничивается тем, что максимальный размер поля площадью суммации составляет 5 угловых градусов. Типовое значение приборных полей составляет 2–3 размера макулы (40–60 градусов). При таком угловом размере крупноразмерных стимулов будет достаточно много, и они будут



**Рис. 5.** Зависимость КЧСМ от яркости адаптации при яркости стимула  $10000 \text{ кд/м}^2$ , длительности 20 мс и углом размере 1 град.

определять значение КЧСМ. Малые угловые размеры стимула имеют существенно меньшие значения КЧСМ и могут быть исключены из рассмотрения.

При увеличении яркости адаптации уменьшается критическое время паузы ( $t_2$  становится много меньше  $t_1$ , см. формулу (4)) и значение КЧСМ стремится к уровню  $1/t_1$  (рис. 5). Можно видеть, что значение КЧСМ практически не зависит от яркости адаптации.

Таким образом, зависимость КЧСМ от яркости стимула носит нелинейный характер; для стимулов с большими угловыми размерами максимальные значения КЧСМ лежат в диапазоне до 1000 Гц; оптимальной для зрительной системы следует считать кадровую частоту 300–500 Гц; для малоразмерных угловых стимулов КЧСМ лежит в области низких частот.

## НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВАНИЯ КЧСМ

Различия в скорости слияния мерцания могут быть объяснены временной чувствительностью магно- и парвоцеллюлярной зрительных подсистем, берущих начало от ганглиозных клеток сетчатки и дающих проекции, соответственно, к крупноклеточным магноцеллюлярным слоям и мелкоклеточным парвоцеллюлярным слоям латерального колоччатого тела таламуса. Отростки нейронов этих слоев направляются к различным слоям первичной зрительной коры и формируют два потока информации из каудальных во фронтальные зоны коры головного мозга [20–27]. Нейроны магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной систем отличаются физиологически и психо-

физически: чувствительностью к восприятию контраста, цвета, движения стимулов, скоростью передачи информации [24, 28, 29].

Разница в скорости слияния хроматических и ахроматических мерцаний обычно приписывается различным путям: либо медленному, чувствительному к красному/зеленому цвету парвоцеллюлярному — Р-пути, либо быстрому ахроматическому магноцеллюлярному — М-пути [22]. Показано, что пороги слияния ахроматического мерцания находятся в диапазоне от 35 до 60 Гц [30] в зависимости от глубины модуляции мерцания, в то время как слияние цветов из красного/зеленого изолюминатного мерцания происходит на гораздо более низких частотах (10–15 Гц) [31].

Исследования у приматов временной структуры корковых зрительных вызванных потенциалов с помощью псевдослучайной ахроматической стимуляции показали нелинейность отклика на изменения яркостного контраста: преобладание волнового комплекса P100–N115 при низких и средних контрастах (<60%), тогда как на высоких контрастах — комплекса N100–P120–N160 [32]. Различия во времени адаптации нейронных генераторов этих двух компонент зрительных вызванных потенциалов обуславливают разделение срезов отклика ядер второго порядка. Второй срез ядер второго порядка показывает пиковую задержку ~25 мс по сравнению с первым срезом. Эти временно отделимые основные вклады в первый и второй срезы ядер второго порядка были идентифицированы как генерируемые нейронами М- и Р-путей на основе сходства с функциями ахроматического контрастного ответа магно- и парвоклеток, зарегистрированными в латеральном колленчатом теле (LGN) таламуса приматов [22, 33].

Авторы работы [34] исследовали взаимосвязь между частотой слияния ахроматических мерцаний и временным анализом крупноклеточного (М) и парвоцеллюлярного (Р) вклада в ахроматические нелинейные мультифокальные зрительные вызванные потенциалы (mfVEP), зарегистрированные в затылочной части головы (Oz) у 72 типично развивающихся молодых людей, использующих четырехстороннюю задачу слияния синусоидальных мерцаний с принудительным выбором. Амплитуды всех нелинейностей, которые демонстрировали компонент, генерируемый М-клетками, отрицательно коррелировали с порогами мерцания. Наиболее сильные из этих корреляций были продемонстрированы главной составляющей нелинейности М (первый срез ядер второго порядка K2.1N70–P100) как для высококонтрастных, так и для низкоконтрастных условий, что указывает на то, что более высокий порог слияния ахроматических мерцаний связан с бо-

лее эффективной (меньшие ядра второго порядка) М-системой. Ни один из пиков, связанных с активностью Р-системы, не показал значительной корреляции. Полученные результаты позволяют рассматривать пороги мерцания как функциональный коррелят функции М-пути, что можно наблюдать при нелинейном анализе потенциалов mfVEP.

Логично, что временная способность обработки и чувствительность магноцеллюлярных (М) и парвоцеллюлярных (Р) подкорковых путей должны частично зависеть от скорости восстановления нейронов после визуальной стимуляции. В соответствии с этим пороги слияния мерцаний для быстро модулированной яркости [30] уже давно используются клинически в качестве меры скорости перцептивной обработки [2]. Измерение порога КЧСМ используется для изучения визуального временного разрешения и при патологических состояниях. Авторы работы [35] показали, что КЧСМ является источником измененного зрительного восприятия при высокой склонности к аутизму. Полученные данные рассматриваются авторами, как свидетельства изменения активности магноцеллюлярной системы при аутизме. Эффективность использования метода регистрации порога КЧСМ в диагностике болезни Альцгеймера, включая ранние этапы ее развития, показана в работе [36].

Таким образом, изучение КЧСМ имеет широкое прикладное значение как в технике, так и в медицине. Понимание природы КЧСМ и ее особенностей дает возможности для изучения работы мозга не только при различных функциональных состояниях в пределах нормы, но и при разного рода патологиях; разработки методов объективной диагностики и мониторинга состояния; развития возможностей трансляционной медицины в неврологии и психиатрии.

## ВЫВОДЫ

Предпринято моделирование КЧСМ с позиций теории треморного модуляционного сигнала. Модель согласуется с эмпирическими фактами и предлагает их возможное объяснение, демонстрирует, что для ярких стимулов с малой длительностью и большим угловым размером значения КЧСМ лежат в диапазоне до 1000 Гц; оптимальной для зрительной системы следует считать кадровую частоту 300–500 Гц; для малоразмерных угловых стимулов КЧСМ лежит в области низких частот. Различия в КЧСМ могут быть объяснены временной чувствительностью нейронов магно- и парвоцеллюлярной зрительных подсистем.

Приложение 1

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Скорость уменьшения концентрации (разложения) фотореагента пропорциональна освещенности  $E$  и текущей концентрации фотореагента  $c$

$$\frac{dc}{dt} = -K_1 E c \quad (\text{п. 1})$$

(п. 1)

Скорость увеличения концентрации (восстановления) фотореагента пропорциональна его концентрации в неактивной фазе  $(1 - c)$

$$\frac{dc}{dt} = K_2 (1 - c) \quad (\text{п. 2})$$

Суммарный процесс, описывающий текущую концентрацию фотореагента, как балансное состояние конкурирующих процессов распада и восстановления, имеет вид:

$$\frac{dc}{dt} = -(K_1 E + K_2) c \quad (\text{п. 3})$$

Числовые значения коэффициентов фотохимической реакции вычисляются для круглого стимула с размером, равным 1 угловой минуте, и постоянны во всех внешних условиях восприятия. Решение уравнения (п. 3) имеет вид:

$$c(t) = c_0 + (c_1 - c_0) \exp(-(K_2 + K_1 E)t), \quad (\text{п. 4})$$

где концентрация  $c$  определяется по формуле:

$$c = \frac{K_2}{(K_1 E + K_2)} \quad (\text{п. 5})$$

Нормированное приращение концентрации должно быть больше порога нейронного возбуждения  $F$ :

$$\frac{(c_0 - c(t))}{c_n} = (c_0 - c_1) \frac{(1 - \exp(-(K_2 + K_1 E)t))}{c_n} \geq F = \text{const} \quad (\text{п. 6})$$

Переход от начального значения  $c_0$  к значению  $c_1$  не происходит мгновенно, а требует определенного времени для достижения балансного состояния конкурирующих процессов распада и восстановления. При этом время распада фотореагента в необратимое состояние характеризуется значением порядка 1 мс и переходные процессы в основном определяются временем восстановления фотореагента.

Если соотносить приращение концентрации для бесконечно большого и текущего времени, можно получить выражение для относительного порога восприятия от времени предъявления стимула. Для сравнения представлены выражение, полученное согласно модели ТМС (п. 7), и выра-

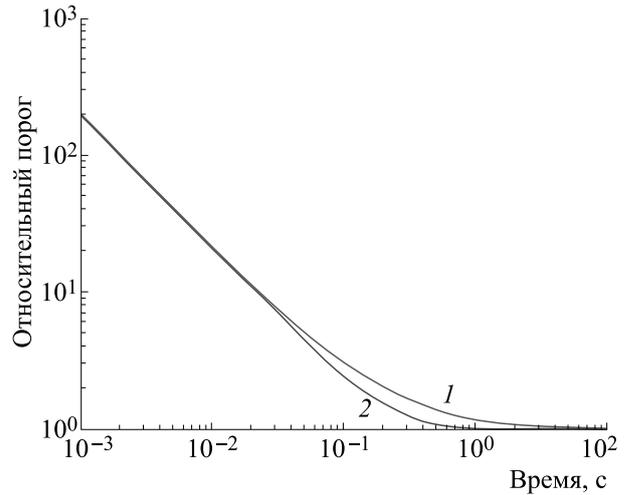


Рис. п1. Зависимость относительного порога восприятия от времени предъявления стимула. Кривые отражают: 1 — закон Блонделя-Рэя и Блоха-Шарпантье, 2 — результаты расчета по уравнению (7).

жение для закона Блонделя-Рэя и Блоха-Шарпантье (п. 8).

$$K_u = \frac{1}{(1 - \exp(-(K_2 + K_1 E)t))}, \quad (\text{п. 7})$$

$$K_u = \frac{t_p}{(t_p + 0,21)}, \quad (\text{п. 8})$$

где  $t_p$  — время предъявления стимула.

Значение освещенности  $E$  в плоскости сетчатки, создаваемой яркостью  $L$  находим по следующим зависимостям:

$$E = \pi \tau L D_p^2 / 4 f^2, \quad (\text{п. 9})$$

где  $D_p$  — диаметр зрачка глаза, определяется по формуле Крауфорда:

$$D_p = 5 - 3 \text{th}(0.4 \lg L_a). \quad (\text{п. 10})$$

Результаты расчета зависимости относительного порога восприятия от времени предъявления стимула представлены на рис. п. 1.

Выражение (6) имеет важную физическую и физиологическую трактовку. Физическая трактовка проливает свет на формирование отношения сигнал/шум в зрительной системе. Преобразуем выражение следующим образом:

$$dc(t)/c_0 = dc/c_0 (1 - \exp(-(K_2 + K_1 E)t)), \quad (\text{п. 11})$$

$$tms(t) = tms_{\max} (1 - \exp(-(K_2 + K_1 E)t)). \quad (\text{п. 12})$$

Максимальное, предельное значение ТМС соответствует перепаду яркости физического стимула в крайних точках тремора, преобразованному в пространство концентрации фотореагента. Функция  $SN(t)$  описывает временную динамику

накопление отношения сигнал/шум в зрительной системе:

$$SN(t) = 1 - \exp(-(K_2 + K_1 E)t). \quad (\text{п. 13})$$

Из формулы (п. 11) получены выражения для порогового восприятия дисков (массив Блекуэлла), мир Фуко и синусоидальных решеток (массив Маккена, Савоя, Кемпбела), колец Ландольта (массив остроты зрения). Формула (п. 11) описывает переход от точки одной яркости адаптации к точке другой яркости объекта в пространстве концентрации фотореагента в рецепторе. При этом полагается, что в точке объекта фоторецептор находится бесконечно долго. В интерпретации модели ТМС фоторецептор в процессе тремора в крайних точках попеременно экспонируется то яркостью адаптации, то яркостью объекта за время равное  $1/f_{tr}$ . Согласно модели, нормированная разность концентрации представляет собой треморный модуляционный сигнал. Процесс попеременного экспонирования повторяется на каждом периоде тремора и ТМС накапливается согласно выражению (п. 13).

Такая интерпретация сохраняет все ранее полученные результаты и одновременно позволяет получить выражение для площадного сигнала переходного процесса, который мы ощущаем как послеобраз.

Поскольку послеобраз пространственно связан к фоторецептору, то очевидно, что треморные колебания не формируют ТМС. При воздействии первого светового импульса длительностью  $t_1$  концентрация в фоторецепторе будет равна:

$$c_1 = c_0 + (c_s - c_0)(1 - \exp(-(K_2 - K_1 E_s)t)). \quad (\text{п. 14})$$

В период паузы между импульсами концентрация в фоторецепторе примет вид:

$$c_2 = c_1 + (c_0 - c_1)(1 - \exp(-(K_2 - K_1 E_0)t)). \quad (\text{п. 51})$$

Но в поле послеобраза есть временная модуляция площадного сигнала, обусловленная переходным процессом от уровня  $c_0$  к уровню  $c_1$ . За временной интервал  $\tau$  концентрация фотореагента в тестирующем поле хоть и незначительно, но меняется. Приращение сигнала переходного процесса равно произведению производной переходного процесса на время  $\tau$ :

$$dc_1(t) = (c_0 - c_1)(N - 2)^2 \exp(-(K_2 + K_1 E_1)t) \times (K_2 + K_1 E_1)\tau(1 - \exp(-(K_2 + K_1 E_1)t)). \quad (\text{п. 16})$$

Поскольку в треморном модуляционном сигнале сравниваются значения концентрации фотореагента в крайних точках тремора, то временной интервал  $\tau$  для временной модуляции выбирается равным временному периоду тремора, что для нормальной частоты тремора 87 Гц составит 11.5 мс:

$$\tau = 1/f_{tr}. \quad (\text{п. 71})$$

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование не получало какого-либо специального гранта от финансирующих агентств в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К. А. Пупков и Н. Д. Егупов, *Математические модели, динамические характеристики и анализ систем автоматического управления* (Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, М., 2004).
2. R. S. Brenton, H. S. Thompson, and C. Maxner, In *New Methods of Sensory Visual Testing* (Springer, NY, 1989), pp 29–52.
3. A. C. Brown, J. L. Peters, C. Parsons, et al., *Front. Hum. Neurosci.*, **14**, 49 (2020).
4. J. I. Thompson, C. E. Peck, G. Karvelas, et al., *Neuropsychologia*, **69**, 148 (2015).
5. Y. Chen, D. Norton, and C. Stromeyer, *Schizophrenia Res.*, **156** (2–3), 190 (2014).
6. B. D. Parsons, S. Gandhi, E. L. Aurbach, et al., *Neuropsychologia*, **51** (2), 372 (2013).
7. С. В. Кравков, *Глаз и его работа* (Изд-во АН СССР, М., 1950).
8. K. R. Boff and J. E. Lincoln, *Engineering Data Compendium: Human Perception and Performance* (Wright-Patterson AFB, OH: USAF Harry G. Armstrong Aerospace Medical Research Laboratory, 1988).
9. R. Küller and T. Laike, *Ergonomics*, **41** (4), 433 (2010).
10. O. de Bruijn and R. Spence, In *Proc. Int. Conf. on Advanced Visual Interfaces AVI-2000* (2000), p. 189.
11. J. Davis, Y.-H. Hsieh, and H.-C. Lee, *Sci. Rep.*, **5** (2015).
12. J. Melzer and C. Spitzer, *Digital avionics handbook*, **22**, 3 (2017).
13. А. Л. Ярбус, *Роль движений глаз в процессе зрения* (Наука, М., 1965).
14. S. I. Lyapunov, *J. Optic. Technol.*, **81** (6), 349 (2014).
15. S. I. Lyapunov, *J. Optic. Technol.*, **84** (9), 613 (2017a).
16. S. I. Lyapunov, *J. Optic. Technol.*, **84** (1), 16 (2017b).
17. S. I. Lyapunov, *J. Optic. Technol.*, **85** (2), 100 (2018).

18. В. А. Ильянок и В. Г. Самсонова, *Светотехника*, **5** (1963).
19. C. Herrmann, *Exp. Brain Res.*, **137**, 346 (2001).
20. L. G. Ungerleider and M. Mishkin, In *Analysis of visual behavior* (MIT Press., Cambridge, 1982).
21. V. H. Perry, R. Oehler, and A. Cowey, *Neuroscience*, **12**, 1101 (1984).
22. A. M. Derrington and P. Lennie, *J. Physiol.*, **357**, 219 (1984).
23. W. H. Merigan, L. M. Katz, and J. H. Maunsell, *J. Neurosci.*, **11**, (4), 994 (1991).
24. W. H. Merigan and J. H. R. Maunsell, *Ann. Rev. Neurosci.*, **16**, 369 (1993).
25. L. J. Croner and E. Kaplan, *Vision Res.*, **35**, 7 (1995).
26. E. H. F. de Haan, S. R. Jackson, and T. Schenk, *Cortex*, **98**, 1 (2018).
27. E. Freud, M. Behrmann, and J. C. Snow, *Open Mind: Discoveries in Cognitive Science*, **4**, 40 (2020).
28. J. J. Nassi and E. M. Callaway, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10** (5), 360 (2009).
29. M. Edwards, S. C. Goodhew, and D. R. Badcock, *Psych. Bull. Rev.*, **28**, 1029 (2021).
30. D. H. de Lange, *JOSA*, **44**, 380 (1954).
31. P. H. Schiller, N. K. Logothetis, and E. R. Charles, *Neuropsychologia*, **29**, 433 (1991).
32. A. Klistorner, D. P. Crewther, and S. G. Crewther, *Vision Res.*, **37**, 2161 (1997).
33. E. Kaplan and R. M. Shapley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2755 (1986).
34. A. Brown, M. Corner, D. P. Crewther, and S. G. Crewther, *Front. Hum. Neurosci.*, **12**, 176 (2018).
35. J. I. R. Thompson, C. E. Peck, G. Karvelas, et al., *Neuropsychologia*, **69**, 148 (2015).
36. A. Abiyev, F. D. Yakaryılmaz, and Z. A. Öztürk, *Dementia & Neuropsychologia*, **16** (1), 89 (2022).

## Modeling the Critical Flicker Fusion Frequency in the Human Visual System

S.I. Lyapunov\*, I.I. Shoshina\*\*, and I.S. Lyapunov\*

\*Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia

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

The temporal resolving power of the visual system is essential for the perception of the objective world. The lowest sampling rate of a sequence of images at which perception becomes fused is called the critical flicker fusion frequency. The variety of experimental data on critical frequency thresholds can be explained from a point of view of a model of the contrast sensitivity of the visual system that based on the tremor modulation signal. The model describes the dependence of critical frequency on stimulus brightness, adaptation brightness, duration, and the angular size of the stimulus. This model demonstrates that for bright stimuli with short duration and a large angular size, critical frequency values lie in the range up to 1000 Hz; the frame rate of 300-500 Hz should be considered optimal for the visual system; for small-sized angular stimuli, the critical frequency lies in the low-frequency region. Differences in the rate of flicker fusion can be explained by temporal sensitivity of magno- and parvocellular neurons.

*Keywords: critical flicker fusion frequency, tremor modulation signal, dynamic light load, adaptation brightness, magnocellular system, parvocellular system*

УДК 577.3

## СЛОЖНАЯ СИСТЕМА МОЗГА МЫШИ – СЕЛЕКЦИЯ НА УСПЕШНОСТЬ РЕШЕНИЯ КОГНИТИВНОГО ТЕСТА

© 2023 г. И.И. Полетаева\*, #, О.В. Перепелкина\*, З.А. Зорина\*

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

#E-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 26.06.2023 г.

После доработки 03.07.2023 г.

Принята к публикации 22.09.2023 г.

Представлены экспериментальные данные по положительным результатам селекционного эксперимента у мышей. Отбор вели на успешное решение когнитивного теста (требующего от животного оперирования правилом «неисчезаемости» предметов) и на не-решение этого теста. Полученные данные показали, что у мышей линии, селектированной на успешное решение теста, были достоверно лучше выражены краткосрочная рабочая память, а также показатели тестов на новизну и на внимание. Это позволяет предполагать, что межлинейные различия касаются не только способности к решению данного теста, а связаны с более четко выраженными «исполнительными функциями».

*Ключевые слова:* когнитивные способности животных, элементарная логическая задача, генетика поведения, селекция, лабораторные мыши.

DOI: 10.31857/S0006302923050265, EDN: NAWPTG:

*Работа посвящается памяти Г.В. Гурского*

Мозг – сложная система, причем некоторые полагают, что это «самая сложная» система организма. Особенно высока сложность мозга человека. В связи с этим большое значение имеют исследования когнитивных способностей на лабораторных животных, поскольку эти объекты и проще по строению, и позволяют оценивать большое число нейрофизиологических признаков, связанных с когнитивными способностями. Вторая половина XX века и начало XXI века ознаменованы накоплением данных (часто уникальных) о возможностях центральной нервной системы (ЦНС) и когнитивных способностях животных многих видов – от дрозофилы [1], муравьев [2], грызунов [3] до человекообразных обезьян [4] (возможности мозга человека здесь не рассматриваются).

Анализ современных исследований способностей животных решать сложные «интеллектуальные» задачи (например, сложные задачи на пространственную ориентацию и др.) показывает, что основное внимание в настоящее время привлечено к созданию моделей (чаще всего, генетических моделей) заболеваний мозга человека [5, 6] и др. В то же время биологические основы функционирования мозга в нормальных услови-

ях в публикациях последних лет – это, преимущественно, сообщения об отличии групп животных «нормального контроля» («дикого типа») от показателей тестов животных либо с измененным геномом, либо с особенностями физиологического состояния вследствие разрушений мозга или действия фармакологических агентов.

Изменчивость признаков поведения, которую обнаруживают животные практически во всех используемых тестах (и, как мы знаем, в «обычном» поведении), имеет генетическую и средовую составляющие, а также составляющую, связанную с генотип-средовыми взаимодействиями. Выполнение животным тех или иных актов поведения (как в лабораторных тестах, так и в природе) основано их на врожденной основе и их сложной модуляции при накоплении опыта. Взаимодействие генотипических и средовых влияний – это важный элемент понимания механизмов поведения, а для этого, однако, важно учитывать это соотношение («врожденного» и «приобретенного») в репертуаре поведения конкретной группы животных (см. напр., [7]).

Важным моментом в оценке относительной роли «врожденного» и «приобретенного» в адаптивных поведенческих реакциях является следу-

ющее. Основные элементы врожденных (инстинктивных) движений (спонтанных или проявляющихся в ответ на определенные сигналы) – это так называемые «фиксированные комплексы действий» (ФКД) – видоспецифические последовательности движений.

Эти ФКД проявляются у всех особей вида в «готовом» виде, без научения, они имеют специфическую, выполняемую «стереотипно» форму, практически не видоизменяясь в течение жизни (например, движения умыывания или вертикальные стойки грызунов). Однако консервативность и стереотипность ФКД находятся в видимом противоречии с принципом пластичности и изменчивости поведения, которому есть огромное число подтверждений (как в лабораторных исследованиях, так и в наблюдениях натуралистов). Наиболее сложным по своему механизму является поведение животного при научении, а также при решении элементарных логических задач, которое складывается из врожденных реакций, выполнение которых «обусловлено» текущей средой ситуацией.

Однако существует и путь выхода из такого кажущегося противоречия – изменчивыми оказываются не сами, иногда сложные, движения (т.е. их конкретная форма), а пороги их инициации. А эти пороги, в свою очередь, могут испытывать модулирующее влияние ряда факторов (температура, сезон, мотивационный и гормональный фон, общая возбудимость, уровень сенсорной стимуляции и т. д.), обнаруживая значимый уровень как межпопуляционной, так и индивидуальной изменчивости. К таким факторам относятся и генотип.

На важное значение частоты проявления ФКД (стереотипных по паттерну) первым еще в 1967 г. обратил внимание выдающийся английский этолог А. Меннинг, анализируя генетические различия в половом поведении дрозофилы [8]. По его мнению, генетическая изменчивость поведения в большой степени определяется изменчивостью порогов провокации и, соответственно, изменениями частоты выполнения важных для адаптации животного ФКД, это может также лежать в основе микроэволюционных изменений поведения. Иными словами, эти «единицы поведения» в силу разных причин могут проявляться чаще или реже (т.е. провоцироваться «легче» или «труднее»).

Анализ наблюдений за поведением насекомых, грызунов и других представителей животного царства дает много материала, подтверждающего правильность высказанной Меннингом гипотезы. Например, в знаменитой работе [9] о генетической основе гигиенического поведения пчел было показано, что колонии пчел различаются по устойчивости к инфекции *Varroa destructor*.

В устойчивых к заболеванию колониях рабочие пчелы, обнаружив (видимо, по запаху) ячейки с пораженными болезнью личинками, вскрывают их и выбрасывают больных личинок из улья. Классический генетический эксперимент позволил выявить эффект двух генов, один из которых «отвечает» за поведение «вскрытия ячейки» (специфические движения, ФКД), а второй – за удаление зараженных личинок из вскрытых ячеек (другие, иные по «рисунку» ФКД). Однако впоследствии выяснилось, что в колониях, подверженных инфекции, рабочие пчелы также обнаруживают ФКД этих двух типов. Иначе говоря, они выполняют два типа движений «гигиенического» поведения, но эти движения (в силу каких-то причин) проявляются у них очень редко и поэтому оказываются неэффективными в плане устранения инфекции. Иными словами, у них высок порог инициации этих движений. У пчел колоний с гигиеническим поведением эти движения иницируются легче, т.е. у них генетически детерминирован более низкий порог инициации. Еще один пример того, как генотип может модулировать проявление поведения именно в связи с уровнем возбудимости ЦНС, дали эксперименты по наследованию пассивно-оборонительного поведения у собак [10].

Таким образом, инстинктивное поведение и условия его экспрессии зависят от генетически детерминированных особенностей мозговых структур, обеспечивающих активацию соответствующих нервных цепей (и, по-видимому, от числа нейронов в ряде структур мозга [11], а также от гормонального фона и благоприятных или, наоборот, вредных для животного внешних условий). Основные свойства сенсомоторных механизмов поведения и реактивности ЦНС на стимулы предопределены в развивающейся нервной системе, они в разной степени зависят от контактов между нейронами, а в своем фенотипическом проявлении обнаруживают существенных «врожденный» компонент.

В то же время на другом конце виртуальной шкалы («врожденное-приобретенное», см. работу [12]) находятся феномены поведения, почти полностью зависящие (и в формировании, и в инициации) от индивидуального опыта животного, хотя в своем проявлении также зависящие от врожденных стереотипных действий, а также от уровня развития ЦНС данного вида. Это, в частности, пластические изменения поведения при процессах обучения разной сложности. Они также связаны со структурными особенностями ЦНС, детерминированными генотипом, но связь имеет очень сложный характер, поскольку в этих случаях имеет место сложное взаимодействие врожденных компонентов поведения с реакцией мозга на внешние воздействия (осуществляющееся во многих случаях на основе эпигенетических

механизмов). Примером могут быть различия между двумя линиями крыс, селективными в начале 1920 г. Р. Трайном, различия между которыми (по данным более поздних исследований) имеют иногда противоречивый характер и связаны также с особенностями гормонального фона крыс этих линий. Усложнение поведения (в эволюционном ряду) в этом случае идет по пути усложнения потенциалов, т.е. *возможностей* носителей данной ЦНС проявить поведение, базирующееся на решении, например, новых задач. А. Меннинг пишет, что в нормальных условиях ни у обезьяны, ни у крысы нет поведения, связанного с решением сложной задачи инструментального научения, т.е. выбору определенного сочетания стимулов, подкрепляемого пищей. Однако ЦНС обезьян обладает *потенциями* к решению подобной задачи, а ЦНС крысы обладает этим в значительно меньшей степени (см. [8]). Наличие или отсутствие таких «потенций» — это свидетельство способности животных данного вида к решению «когнитивных» задач без опыта их решения в прошлом.

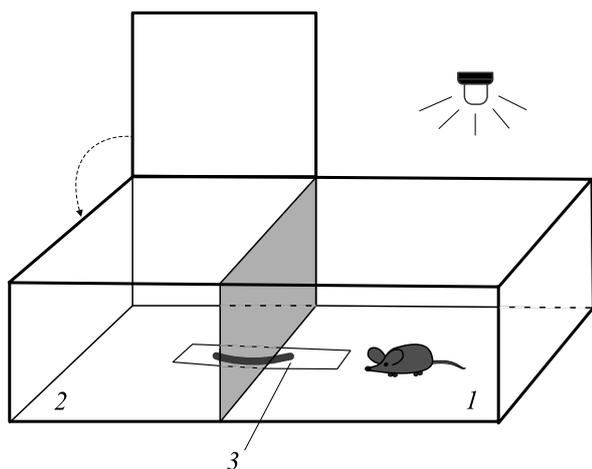
Исследование мозговых механизмов решения таких задач животными разного уровня развития (т.е. задач, с которыми животное сталкивается впервые и, следовательно, не имеет опыта их решения) — это и актуальная задача нейробиологии, и важный в практическом отношении вопрос биологических основ когнитивного поведения человека [13]. В этом плане важны данные по генетическим различиям в проявлении когнитивных способностей животных. Следует отметить, что в современной нейробиологической литературе под термином «когнитивный», как правило, понимается проявление пластичности поведения, т.е. его изменчивости в связи с формированием индивидуального опыта. Однако в более узком понимании данного термина — это способность особи решить впервые встреченную задачу на основе способности к улавливанию закономерностей, связывающих предметы и явления в конкретной ситуации, которую Л.В. Крушинский [14] назвал «элементарной рассудочной деятельностью». На примере способности животных ряда видов к экстраполяции направления движения стимула, скрывшегося из поля зрения, Крушинский и его коллеги показали важность структурной сложности ЦНС животных разных видов, а также (для крыс, мышей и серебристо-черных лисиц) были продемонстрированы генотипические различия в экспрессии этого признака (см. работы [14, 15]).

Очевидно, что накопление знаний о когнитивных способностях животных вызвало потребность к их обобщению. По аналогии с представлением, выдвинутым психологом К. Сперманом [16] о факторе общего интеллекта (*g-factor*), в большом числе исследований на грызунах было

показано, что при использовании «батареи тестов», требующих от животного научения, иногда весьма сложного, у них можно обнаружить значимую корреляцию успешности их выполнения. Такой комплекс способностей также получил название *g-фактор* (работы [17–21] и др.). Следующим шагом в интерпретации этих данных было предположение о существовании у животного (как и у человека) совокупности способностей, которые были названы «исполнительные функции» (*executive functions*). В их число входят «когнитивная пластичность», рабочая память, способность к предвидению, внимание, тормозный контроль и др. Совокупная экспрессия высоких показателей этих «способностей» определяет успешность целенаправленного поведения [22, 23]. При этом исследования нейрофизиологии мозга на крысах показали, например, участие в реализации таких способностей структур переднего мозга [24].

Предметом настоящего исследования был анализ результатов селекции лабораторных мышей на способность к решению когнитивного теста на неисчезаемость (по Ж. Пиаже: объект, ранее воспринимавшийся, продолжает существовать, даже если его в данный момент не видно). Для решения такой элементарной логической задачи животному необходимо и понимание логики конкретной ситуации, и внимание, и рабочая память [25].

В работе представлены данные по результатам отбора лабораторных мышей на высокие и низкие показатели решения когнитивного теста (основанного на врожденной реакции мыши избегать яркое освещение). Исходной популяцией для отбора были мыши линии ЭКС (F20), селектированной ранее [26] на успешность решения задачи на экстраполяцию направления движения стимула, скрывшегося из поля зрения. Отметим, что селекционный эксперимент на способность к экстраполяции дал неустойчивые результаты, и можно считать, что успешной селекции на решение теста на экстраполяцию не произошло. Этому могут быть разные причины, анализ которых дан в разделе «Обсуждение». В настоящем эксперименте признаками для отбора были показатели успешности (линия «плюс») или неудачи (линия «минус») выполнения мышами теста на поиск входа в укрытие (ПВУ) в его наиболее «трудных» проявлениях (см. ниже). Данный тест (в англоязычной литературе — *puzzle-box test* [20]) основан на стремлении животного спрятаться в темноте из ярко освещенной части экспериментальной камеры, когда путь в темноту закрыт препятствием, которое необходимо преодолеть. Этот тест является «когнитивным» тестом *per se*, поскольку для его выполнения не требуется предварительного научения, а его решение — это решение элементарной логической задачи. Его



**Рис. 1.** Схема экспериментальной установки теста на поиск входа в укрытие: 1 – освещенная часть камеры, 2 – темная часть камеры, 3 – углубленный в пол лаз.

описание представлено в разделе «Материалы и методы». В дополнение к оценкам способности к решению этого теста на ПВУ мы оценили проявления краткосрочной рабочей памяти и внимания к новым предметам у этих животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Как упоминалось выше, исходной популяцией для настоящего селекционного эксперимента были мыши 20-го поколения селекции мышей (линия ЭКС) на успешность решения задачи на экстраполяцию. Поведение мышей линии ЭКС сравнивали с таковым мышей неселектированной генетически гетерогенной популяции (КоЭКС). На основе F20 линии ЭКС был начат новый селекционный эксперимент (получено 7 поколений) с отбором на успешность решения теста ПВУ (линия «плюс») и на «не-решение» этого теста (линия «минус»). Суммарно было протестировано более 500 мышей (самцов и самок).

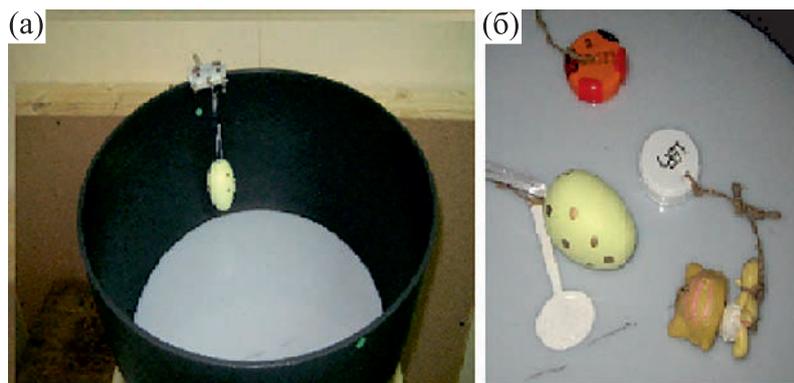
Мышей содержали в пластиковых клетках размером  $42 \times 21.5 \times 15$  см по 6–8 особей в каждой с естественной сменой освещенности и температурой в пределах  $19\text{--}22^\circ\text{C}$ . Они получали стандартный корм (ООО «Лабораторкорм», Москва) и питьевую воду *ad lib*.

**Тест на поиск входа в укрытие.** Начальный вариант этого теста был впервые предложен как часть батареи тестов для оценки у мышей общего фактора *g* [21, 22]. В нашем варианте теста число предъявлений разных его этапов было укорочено до четырех (сложность которых возрастала от первого к третьему), а тестирование можно было провести в течение одного опытного дня (в отличие от трех дней в изначальном варианте М. Голсуорси и др.). Экспериментальная пластиковая камера состоит из двух отделений – ярко освещенного, размером  $30 \times 28 \times 27.7$  см, и темного, размером  $14 \times 28 \times 27.5$  см (рис. 1, 2).

Мышь, помещенная в ярко освещенную часть экспериментальной камеры, стремится убежать и спрятаться в ее темной части, куда ведет углубленный в пол лаз (глубина – 1.5 см, ширина – 4.5 см, длина – 11.5 см). В первой пробе теста лаз открыт, во второй его маскируют чистой стружкой, насыпая ее вровень с уровнем пола, а в третьей и четвертой пробах (которые наиболее трудны мышам) лаз прикрывают и блокируют легкой пробкой из пластика и картона, которую животное может отодвинуть или вынуть зубами из углубленного лаза. На решение первой и второй проб животному дается по 180 с, на решение третьей и четвертой проб – по 240 с. После перехода животного в темную часть камеры, его оставляют в ней на 15–20 с, после чего отсаживают в отдельную клетку и через 45–60 с предъявляют следующую пробу. Регистрируется латентный период перехода мыши в темноту, а также ряд показателей поведения, предшествовавших этому – это латентный период первого подхода мыши к лазу, число подходов до решения теста, число вертикальных стоек, эпизодов груминга и замирания, а также число болюсов дефекации. В случаях с лазом, закрытым пробкой, при отсутствии решения



**Рис. 2.** Тест ПВУ: 1 – лаз открыт; 2 – лаз замаскирован стружкой, мышь ее раскапывает; 3 – мышь «в раздумье», увидев «пробку», скрывающую лаз.



**Рис. 3.** Тест на внимание: (а) — вид камеры с подвешенным на уровне глаз мыши предметом (муляж куриного яйца); (б) — набор использованных предметов, на которых мышь могла фиксировать внимание.

теста отмечали также наличие или отсутствие у мыши движений «манипулирования» пробкой, т.е. попыток (безуспешных) проникнуть в темноту — захватов пробки зубами и ее приподнимания.

**Критерии отбора.** Критериями отбора для сублинии «плюс» было успешное решение теста в его наиболее «трудном» варианте (обеих проб теста с «пробкой»), а для сублинии «минус» — отсутствие такого решения. Поскольку практически все мыши решали первую и вторую пробы теста на ПВУ и выполняли реакцию достаточно быстро, критерием для селекции на успешное решение теста (линия «плюс») было решение третьего и четвертого предъявлений теста в течение времени не дольше, чем 60–90 с. В качестве родителей для следующего поколения линии «минус» отбирали животных, которые не решили этот тест при третьем и четвертом его предъявлениях. Мышей для получения потомства (один самец и одна-две самки) содержали в более маленьких клетках ( $30 \times 10.5 \times 9$  см), беременных самок отсаживали в отдельные клетки такого же размера, в которых их содержали с потомством до прекращения материнского вскармливания (30-е–34-е сутки жизни). После этого мышатам наносили ушные метки и помещали по 6–9 особей (самцов и самок отдельно) в более крупные клетки.

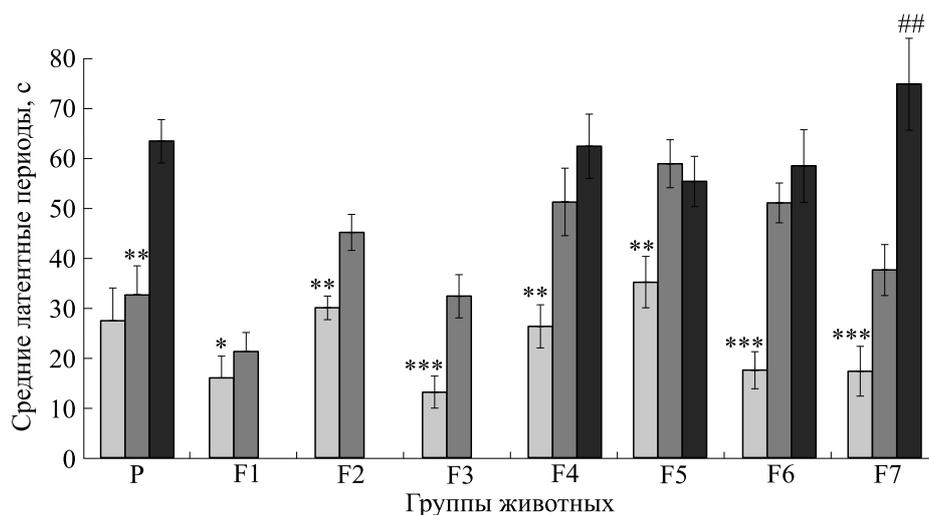
Тестирование поведения мышей начинали в возрасте 2.5–3.0 мес. Каждый из использованных тестов проводил всегда один и тот же экспериментатор. Ранее было показано, что проведение тестирования разными лицами (в том числе и разного пола) влияет на показатели тестов у животных одного и того же генотипа [27, 28].

**Тест приподнятого крестообразного лабиринта.** Установка располагалась на высоте 29 см над поверхностью стола, длина открытых и закрытых рукавов — 21 см, ширина открытых рукавов — 5 см, закрытых — 5.5 см, высота стенок закрытых рукавов — 18 см. Мышь помещали на 3 мин в центр приподнятого крестообразного лабиринта.

Регистрировали (вручную) время пребывания мыши на открытой части лабиринта (открытые рукава и центр), число выходов из темных рукавов на свет, число стоек в темных рукавах, а также число переходов из одного темного рукава в другой.

**Тест на внимание.** Данный тест проводили в круглой камере из черного пластика, диаметром 36 см и высотой 22 см (рис. 3а). По внутренней стенке камеры по ее периметру перемещали подвешенный и закрепленный по краю камеры один из пяти предметов, располагавшийся на уровне головы животного (рис. 3б). Перемещение предмета начинали в момент, когда голова мыши была обращена к предмету (в среднем через 10–15 с после помещения животного в установку). Каждый предмет демонстрировали только в течение одного «круга» его движения, что занимало в среднем 40 с. Фиксировали (вручную) время первого подхода к предмету (латентный период), число таких подходов (приближений мыши к стенке под предметом), число стоек, эпизодов груминга и замираний, а также число болюсов дефекации. В качестве предметов, которые должны были привлекать внимание животных (рис. 3б) были: 1 — светлоокрашенный муляж куриного яйца, 2 — белая пластиковая лопатка (диаметром 2 см), 3 — белый пластиковый диск (диаметром 2.5 см), 4 — темно-окрашенный (цветной) диск (диаметром 3 см) и 5 — пластиковая игрушка неправильной формы ( $2 \times 2.5$  см). Порядок предъявления предметов разным животным был случайным, а при обработке выделяли реакции животных каждой группы на предмет, показанный первым, и предмет, показанный последним.

**Статистическая обработка.** Статистическую оценку достоверности различий между группами животных для величин латентных периодов решения тестов проводили с помощью одно- и двухфакторного анализа ANOVA (с последующей оценкой post hoc по методу LSD Фишера). Досто-



**Рис. 4.** Средние латентные периоды перехода в темное отделение камеры в тесте на поиск входа в укрытие мышами разных групп, когда лаз замаскирован стружкой. По оси ординат – средние латентные периоды, с; по оси абсцисс – группы животных: P – мыши «родительских» пар, выбранных для последующей селекции линий «плюс» и «минус»; F1–F7 – мыши последовательных поколений селекции и контрольной группы КоЭКС (неселектируемой генетически гетерогенной популяции). Светло-серые столбцы – мыши линии «плюс», темно-серые столбцы – линии «минус», черные столбцы – мыши популяции КоЭКС; \*, \*\*, \*\*\* – достоверное отличие от показателей линии минус и от контрольной группы, #, ## – достоверные различия между группой линии «минус» и КоЭКС при  $p < 0.01$  (post hoc test LSD Фишера, однофакторный анализ ANOVA).

верность различий между долями мышей каждой группы, решивших и не решивших тест ПВУ, определяли с помощью метода ф Фишера для альтернативных долей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

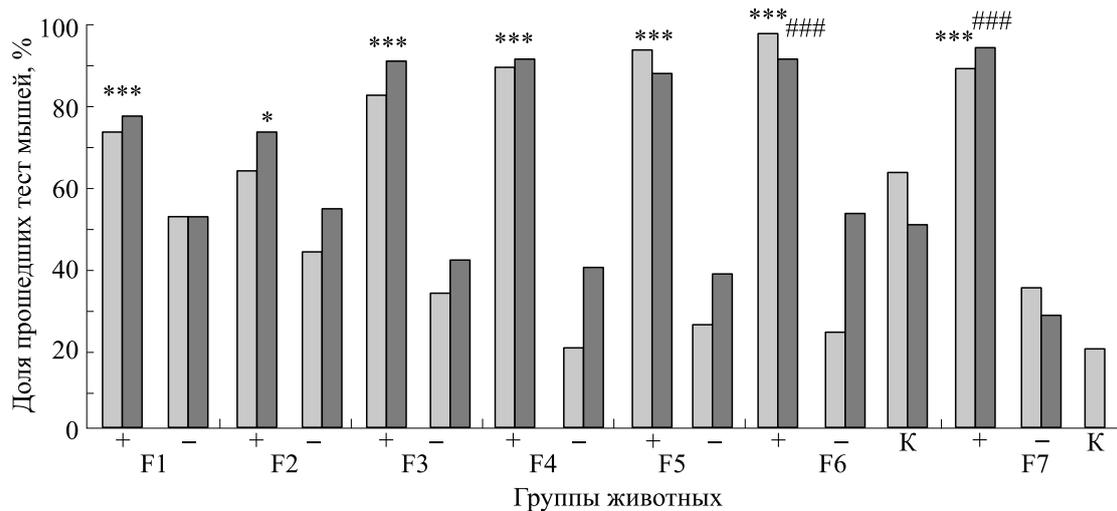
**Решение теста на поиск входа в укрытие.** Приводятся результаты решения теста ПВУ, предъявленного мышам генетических групп. Это были мыши последовательных поколений селекции на решение и не решение когнитивного теста, а также (в F6 и F7) мыши контрольной неселектированной популяции КоЭКС ( $n = 34$ ) [26, 27].

На рис. 4 представлены данные по средним величинам латентного периода решения теста ПВУ при его первых двух предъявлениях (когда лаз открыт и лаз замаскирован стружкой) в поколениях F1–F7, а также мышей родительского поколения линии ЭКС F20. Практически мыши всех тестируемых групп успешно, но с разными результатами по длительности латентного периода, переходили в темное отделение камеры. Обращает на себя внимание довольно быстрое решение теста при лазе, замаскированном стружкой. По нашим наблюдениям, наличие стружки, закрывающей лаз, вызывает быструю «позитивную» реакцию ее раскапывания практически у всех животных (поскольку это, видимо, относится к репертуару врожденных стереотипов поведения), однако практически во всех случаях мыши, селективируемые на «не решение» теста ПВУ, переходили в

темное отделение камеры при маскировке лаза стружкой более медленно, чем мыши «плюс».

Таким образом, выполнение теста ПВУ в первых двух пробах (лаз открыт и замаскирован стружкой) было успешным у мышей всех групп и достаточно быстрым, тогда как различия между «плюс»- и «минус»-группами мышей этих поколений четко обнаруживались в предъявлениях теста. В предъявлениях теста, когда лаз был закрыт пробкой, выявились различия в успешности решения теста (рис. 5), что может быть ответом на отбор в этих поколениях. Решение теста ПВУ мышами КоЭКС в третьей и четвертой пробах теста, когда «лаз» в темное отделение камеры закрыт пробкой, было значительно менее успешным, чем у мышей обеих линий селекции.

Наблюдения за поведением мышей показали, что в случаях, когда лаз был замаскирован пробкой, а решения теста не произошло, в большинстве случаев мыши обеих линий стараются зацепить или толкнуть пробку, т.е. обнаруживают «манипулирование» этим объектом, это наблюдалось и у мышей F20 (исходной популяции для селекционного эксперимента). Это поведение можно рассматривать как свидетельство того, что мышь пытается пройти через лаз, но не может преодолеть это препятствие, т.е. обнаруживает «понимание» неисключаемости искомого объекта. Мышей, которые не «манипулировали» пробкой, было очень мало. Например, в F3 в сублинии «плюс» было одно такое животное (из 83), в сублинии «минус» – два животных (из 73). В то же



**Рис. 5.** Доли мышей (ось ординат, %) поколений селекции F1–F7 («+» и «-»), и мышей контрольной популяции («К»), успешно решивших тест ПВУ (стадии 3 и 4 теста, светло-серые и темно-серые столбцы соответственно, когда лаз закрыт пробкой); \*\*\* – достоверное отличие от доли линии «минус» при  $p < 0.001$ , ### – достоверное отличие от группы «К»,  $p < 0.001$  (ф-тест Фишера для оценки достоверности различий альтернативных долей).

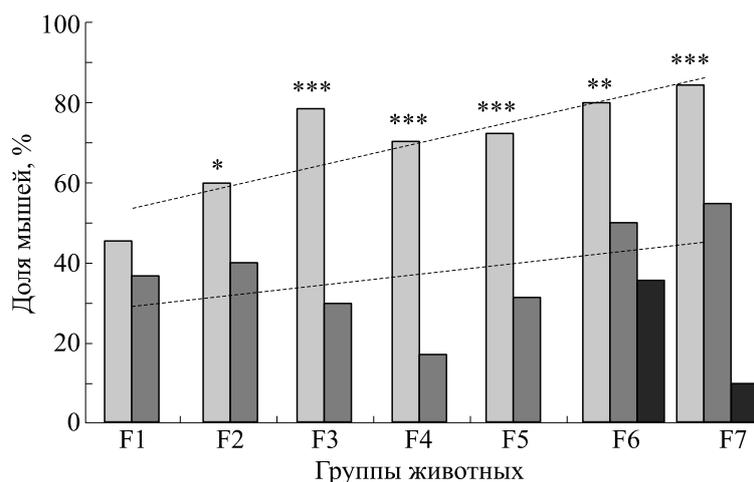
время среди контрольных мышей КоЭКС (тестированных в те же сроки, что и мыши F3), «не манипулировавших» пробкой животных было 8 из 34. Различия в успешности решения «трудных» этапов теста ПВУ, выраженные достаточно четко, начиная с F3, могут служить свидетельством эффективности отбора по этим контрастным признакам. Следует напомнить, что обе сублинии происходили из линии ЭКС, в 20 поколениях которой проводили отбор на успешное решение когнитивного теста на экстраполяцию направления движения [27]. Сложности экспериментов такого рода известны [28, 29].

Сравнение времени решения теста при первом и втором предъявлении теста с лазером, замаскированным пробкой позволило увидеть дополнительно различия между линиями «плюс» и «минус». Доли мышей, у которых латентный период решения второго предъявления пробки был короче, чем при первом ее предъявлении, в линии «плюс» были больше, чем в линии «минус» (рис. 6). Это можно интерпретировать как более четкое проявление краткосрочной рабочей памяти у мышей линии «плюс», что находится в соответствии с их более успешным решением теста ПВУ на стадии предъявления лаза, закрытого «пробкой».

**Тест на внимание с движущимися предметами.** В решении этого теста (впервые использованного в данной работе) также выявились межлинейные различия, хотя следует отметить, что они были более четкими в шестом поколении селекции (см. рис. 7).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Генетические основы решения животными тестов на элементарную рассудочную деятельность (на примере теста на экстраполяцию) анализировались Л.В. Крушинским и его коллегами ранее [14, 29]. Это были сравнительные исследования выполнения теста на экстраполяцию серебристо-черными лисицами разных генотипов (на базе ИЦиГ в Новосибирске), а также попытка селекции крыс на способность к экстраполяции на основе популяции гибридов диких крыс-пасюков и крыс лабораторной линии Крушинского–Молодкиной. Селекция крыс была прекращена на уровне F4, поскольку практически все животные этого поколения обнаружили столь высокий уровень тревожности в обстановке эксперимента, что определить их способность к решению теста на экстраполяцию не представлялось возможным. Ввиду этого селекция мышей на способность к решению теста на экстраполяцию (т.е. создание линии ЭКС), начатая значительно позднее, проводилась с отбором производителей не только по высоким показателям решения теста на экстраполяцию, но и по проявлению тревожности в обстановке этого эксперимента. Иными словами, в селекцию не брали животных, которые медленно и очень осторожно пили молоко через центральное отверстие (откуда начиналось движение поилки с молоком, которую следовало отыскать, перемещаясь в направлении ее исчезновения). Для формирования производителей для получения следующего поколения мышей линии ЭКС не брали также тех животных, которые обнаруживали признаки испуга при начале движения поилки, когда животное отскакивало



**Рис. 6.** Доли мышей ряда поколений селекции и контрольных мышей КоЭКС групп, у которых латентный период решения теста на поиск входа в укрытие при втором предъявлении лаза, закрытого пробкой, стал короче, чем при первом предъявлении этой задачи. Светло-серые столбики — мыши линии «плюс», темно-серые столбики — мыши линии «минус», черные столбики — мыши контрольной неселектированной популяции КоЭКС; \*, \*\*, \*\*\* — достоверное отличие от показателей групп линии «минус» и контрольной популяции при  $p < 0.05, 0.01$  и  $0.001$  (φ-тест Фишера для оценки достоверности различий альтернативных долей).

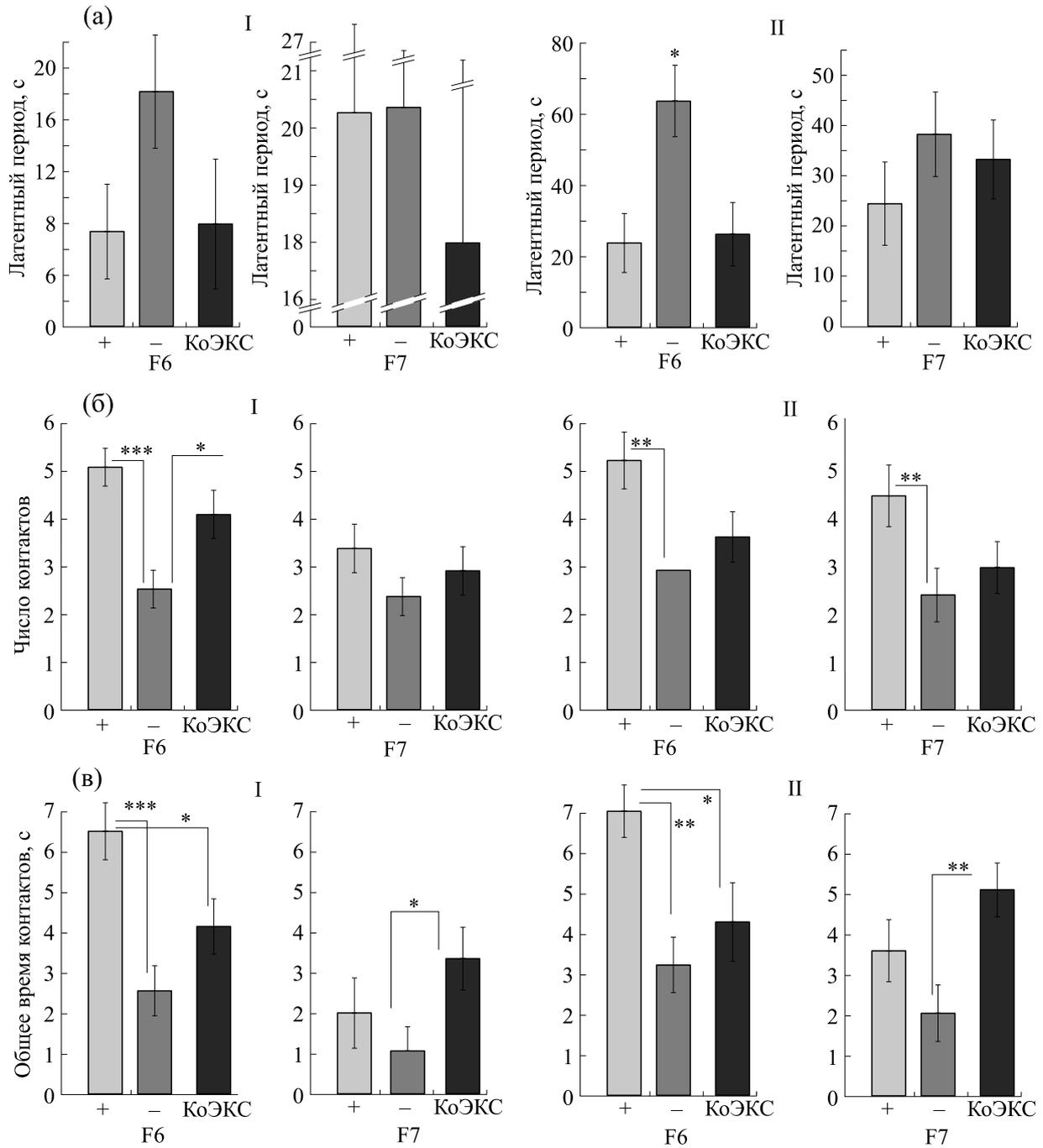
от центрального отверстия, не успев проследить начало движения поилки [26].

У мышей первых поколений селекции линии ЭКС было отмечено некоторое превышение доли правильных решений теста на экстраполяцию над случайным 50%-м уровнем [26], однако в последующих поколениях (начиная с F9–F10) такое превышение стало обнаруживаться нерегулярно. Можно полагать, что селекция на способность к экстраполяции не была успешной (и у крыс, и у мышей) из-за сложности этого признака [25, 26]. Мы полагаем также, что отбор на этот когнитивный признак мог сопровождаться усилением функции глутаматергической системы в ЦНС, поскольку роль этой системы в обеспечении пластических изменений поведения была показана в большом числе исследований [30–32]. Однако при отборе на высокие показатели решения данного теста изменения в глутаматергической системе могли проявиться не только в структурах переднего мозга, важных для проявления когнитивных способностей, но и в других структурах. Существуют свидетельства участия в реализации реакцией страха и тревоги глутаматных рецепторов нейронов дорсальной части центрального серого вещества (см., например, работы [33, 34]).

Логическая структура теста и на экстраполяцию, и на ПВУ предполагает, что для успешного решения животное должно оперировать закономерно «неисчезаемости», т.е. понимать, что исчезнувший (из поля зрения) объект (поилка с молоком или замаскированный лаз) продолжают существовать, и их можно искать. Данные настоящей работы показывают, что мыши линий

«плюс» и «минус» обладали в определенной степени «пониманием» принципа неисчезаемости, что и проявилось в том, что подавляющее большинство мышей, даже не решивших стадии теста с пробками, пытались проникнуть в лаз, толкая и приподнимая пробку. Можно сделать заключение, что селекция на успешное и не успешное решение теста ПВУ в его варианте с пробкой выявила различия не только в решении теста, но и в способности животного «добиться» конкретного решения задачи. Это обстоятельство заставляет предположить, что различия между новыми линиями затронули проявление так называемых «исполнительных функций» (executive function) [20, 25, 35].

Успешность выполнения теста, т.е. реализация «исполнительных функций» у мышей разного генотипа была показана в одной из первых работ с использованием данного теста [21]. При выполнении теста ПВУ при открытом лазе, а также при лазе, замаскированном стружкой, различия в проявлении исполнительных функций обнаруживались не в успешности решения этих этапов, а, видимо, только в скорости реализации решения. Мыши «плюс»-групп переходили в темноту с меньшим латентным периодом (рис. 4). С целью предварительной оценки возможных межлинейных различий в экспрессии именно «исполнительных функций» мышам двух поколений селекции (F6 и F7) был предъявлен тест на внимание, т.е. на отслеживание движения предмета (не исчезающим из поля зрения).



**Рис. 7.** Реакции мышей-самцов (средние значения  $\pm$  ошибка среднего) групп F6 и F7 на движущиеся в поле зрения новые предметы (тест на внимание): (а) – латентный период первого подхода к предмету, (б) – число контактов с предметом за 40 с движения предмета по кругу, (в) – общее время контактов с предметом. I – Предмет, предъявленный первым, II – предмет, предъявленный последним; светло серые столбики – линия «плюс», темно серые столбики – линия «минус», черные столбики – контрольная популяция КоЭКС. \*, \*\*, \*\*\* – достоверные различия при  $p < 0.05$ , 0.01 и 0.001 соответственно (однофакторный анализ ANOVA, фактор «генотип», post hoc LSD-тест по Фишеру).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что в литературе по анализу когнитивного поведения лабораторных грызунов (т.е. их способности к решению элементарных логических задач) аналогов представленного ис-

следования нет. В настоящее время основное внимание нейрогенетиков, занимает анализ модуляции экспрессии большого числа генов у генетически измененных животных, и подобный список работ насчитывает многие десятки исследо-

ваний. Особенно много получено данных, принципиально важных для исследования генеза заболеваний ЦНС человека (например, работы [35–37] и др.). Но селекционные эксперименты, в которых проводился бы отбор по экспрессии когнитивных признаков, практически не проводятся, хотя экспериментальный подход с использованием «батареи тестов» [20, 38–40] используется уже достаточно давно. В целом эта область нейробиологии, несмотря на большой прогресс в выявлении важных для когнитивного поведения структур мозга, многих сигнальных путей и групп специфических нейронов, остается пока недостаточно исследованной. Оценивая различия в результатах анализа поведения лабораторных грызунов, точнее, его аспектов, сходных с темой настоящей работы, следует также помнить о большом числе часто неконтролируемых переменных, которые могут влиять даже на «знак» получаемых межлинейных или межгрупповых различий (важность соблюдения единой последовательности тестов, учитывать влияния признаков конкретного экспериментатора, например, в работе [28], и др.).

Таким образом, в работе описаны достоверные различия в решении элементарной логической задачи, т.е. различия в экспрессии «исполнительных функций» у мышей, которые прошли семь поколений селекции на «успешность» и «неуспешность» решения теста на «неисчезаемость».

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственной программы № ААА-А16-116021660055-1.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. M. Tomchik and R. L. Davis, *Nature*, **453** (7199), 1192 (2008).
2. Z. Reznikova, *Anim. Cogn.*, **23** (6), 1143- (2020). DOI: 10.1007/s10071-020-01423-x
3. Behavioral Genetics of the Mouse, Ed. by W. E. Crusio, F. Sluyter, R. T. Gerlai, and S. Pietropaolo, *Genetics of Behavioral Phenotypes* (Cambridge University Press, 2013), v. **1**, pp. 357.
4. А. Зорина и А. А. Смирнова, *О чем рассказали «говорящие обезьяны. Способны ли высшие животные оперировать символами?»* (Изд-во «Языки славянской культуры», 2008).
5. E. I. Rogaev, *Front. Genet.*, **3** (3), ID 00045 (2012). DOI: 10.3389/fgene.2012.00045
6. A. Fernández-Blanco and M. Dierssen, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9039 (2020). DOI: 10.3390/ijms21239039
7. M. Mameli and P. Bateson, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **366**, 436 (2011). DOI: 10.1098/rstb.2010.0174
8. A. Manning, In: *Psychobiology: Biological basis of behavior*, Ed. by J. McGough (Acad Press, N-Y, London, 1971), pp. 1–52.
9. W. C. Rothenbuhler, *Am. Zool.*, **4**, 111 (1964)
10. И. И. Полетаева, *Природа*, № 8, 150 (1999).
11. R. W. Williams, R. C. Strom, and D. Goldowitz, *J. Neurosci.*, **18** (1), 138 (1998).
12. P. Bateson and M. Mameli, *Dev. Psychobiol.*, **49** (8), 818 (2007). DOI: 10.1002/dev.20277
13. B. Anderson, *Am. J. Ment. Retard.*, **99** (1), 50 (1994).
14. Л. В. Крушинский, *Элементарная рассудочная деятельность* (Изд-во МГУ, М., 1976).
15. I. I. Poletaeva and Z. A. Zorina, *Russ. J. Cogn. Sci.*, **1** (3), 31 (2014).
16. A. R. Jensen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **702** (1), 103 (1993). DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb17244.x
17. B. Anderson, In *Novartis Found Symp., discussion 90-5*, **233**, 79 (2000).
18. L. D. Matzel and S. Kolata, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **34** (1), 23 (2010). DOI: 10.1016/j.neubiorev.2009.07.002
19. S. Kolata, K. Light, H. C. Grossman, et al., *Learn. Mem.*, **14** (1), 22 (2007). DOI: 10.1101/lm.408507
20. M. J. Galsworthy, J. L. Paya-Cano, L. Liu, et al., *Behav. Genet.*, **35** (5), 675 (2005). DOI: 10.1007/s10519-005-3423-9
21. N. M. Ben Abdallah, J. Fuss, M. Trusel, et al., *Exp. Neurol.* **227** (1), 42 (2011). DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.09.008
22. S. Kolata, K. Light, and L. D. Matzel, *Intelligence*, **36**, 619 (2008), DOI: 10.1016/j.intell.2007.12.001
23. S. R. O. Nilsson, J. Alsiöa, E. M. Somerville, and P. G. Clifton, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **56**, 1 (2015). DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.06.015
24. V. Kolisnyk, M. A. Al-Onaizi, P. H. F. Hirata, et al., *J. Neurosci.*, **33** (37), 14908 (2013).
25. О. В. Перепелкина и И. И. Полетаева, *Докл. РАН*, **499**, 322 (2021).
26. О. В. Перепелкина, Н. В. Маркина, В. А. Голибродо и др., *Журн. высш. нерв деятельности им. И.П. Павлова*, **61** (6), 742 (2011).
27. K. S. Van Driel and J. C. Talling, *Behav. Brain Res.*, **159** (2), 243 (2005). DOI: 10.1016/j.bbr.2004.11.005
28. P. Georgiou, T. M. Zanos, X. Mou, et al., *Nat. Neurosci.*, **25** (9), 1191 (2022). DOI: 10.1038/s41593-022-01146-x
29. И. И. Полетаева и З. А. Зорина, в сб. *Формирование поведения животных в норме и патологии: к 100-летию со дня рождения Л. В. Крушинского (1911–1984)*, Сост. И. И. Полетаева и З. А. Зорина (ЯСК, М., 2013), сс. 2–8.
30. R. M. O'Connor, B. C. Finger, P. J. Flor, and J. F. Cryan, *Eur. J. Pharmacol.*, **639** (1–3), 123 (2010). DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.02.059

31. J. L. Brigman, E. M. Powell, G. Mittleman, and J. W. Young, *Physiol. Behav.*, **107** (5), 666 (2012). DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.12.024
32. D. A. Hamilton and J. L. Brigman, *Genes, Brain and Behavior*, **14**, 4 (2015).
33. A. E. Reimer, A. R. De Oliveira, and M. L. Brandao, *Neuroscience*, **219**, 72 (2012).
34. R. R. Rozeske, D. Jercog, N. Karalis, et al., *Neuron*, **97** (4), 898 (2018). DOI: 10.1016/j.neuron.2017.12.044
35. J. Talpos and M. Shoaib, *Handbook Exp. Pharmacol.*, **228**, 191 (2015). DOI: 10.1007/978-3-319-16522-6\_6
36. L. Giménez-Llort, S. N. Schiffmann, T. Schmidt, et al., *Neurobiol. Learn. Mem.*, **87** (1), 42 (2007). DOI: 10.1016/j.nlm.2006.05.004
37. Q. Li, S. Y. Chan, K. K. Wong, et al., *Behav. Genet.*, **46** (4), 529–537 (2016).
38. J. R. Homberg, E. J. Kyzar, M. Nguyen, et al., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **65**, 292 (2016). DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.03.013
39. C. Locurto, A. Benoit, C. Crowley, and A. Miele, *J. Comp. Psychol.*, **120** (4), 378 (2006).
40. H. M. Ene, N. Z. Kara., N. Barak, et al., *Acta Neuropsychiatr.*, **28** (2), 85 (2016). DOI: 10.1017/neu.2015.53

## A Complex System of the Mouse Brain – Selection for Successful Solution of a Cognitive Test

I.I. Poletaeva\*, O.V. Perepelkina\*, and Z.A. Zorina\*

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

The study provides a review of experimental research on selection of mice that yields positive results. The selection of mice was high (the task required mice to understand that an object which has become invisible, still exists and could be found) and poor performance in a cognitive test. The results obtained revealed better short term memory in mice, selected for high performance scores, and that these mice also showed higher performance in tests for novelty and attention. This suggests that differences between mice used in the experiment are associated not only with cognitive abilities in tests, but also with more pronounced “executive functions”.

*Keywords: animal cognitive abilities, elementary logic task, behavior genetics, selection, laboratory mice*

## АНАЛИЗ РАЗВИТИЯ ТРЕНДОВ СОВРЕМЕННОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И ФАКТОРОВ ИХ ЛОКАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

© 2023 г. А. Ю. Переварюха\*, #

\*Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр РАН, 14-ая линия, 39, С.-Петербург, 199178, Россия

#E-mail: temp\_elf@mail.ru

Поступила в редакцию 26.01.2023 г.

После доработки 13.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

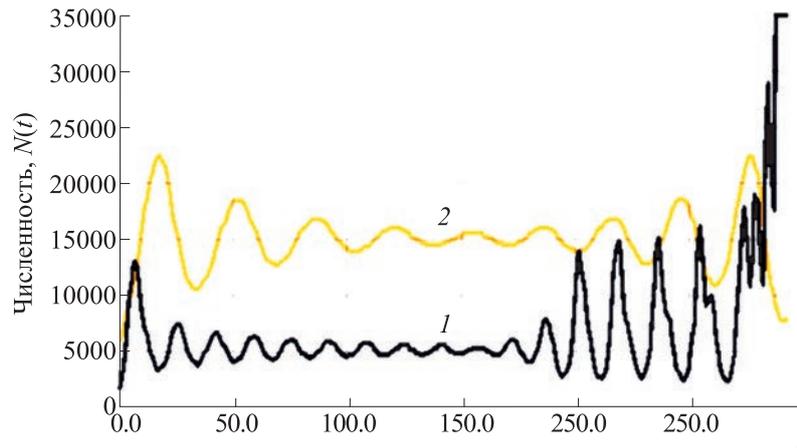
Анализируются специфические процессы локальной эпидемической динамики COVID-19 с сопоставлением качественных различий колебаний в 2020 и в 2023 гг. Исследование методами нелинейной динамики развития эпидемических процессов в контексте быстро менявшейся обстановки потребовало классификации типичных трендов и уникальных ситуаций, сменявшихся иногда с необычайной быстротой. Отличительная особенность современной пандемии — достаточно резкая смена локальных трендов: эффекта затухания первичной вспышки заболеваемости и внезапное резкое начало новой эпидемической волны после длительного тренда уменьшения суточных заражений. Минимизация заражений не стала победой над распространением вируса, но создавал ложную иллюзию успеха. Имевшийся опыт построения прогнозов на основе моделей прошлых эпидемических процессов не смог помочь при столкновении с новым эволюционирующим вирусом. Полученное ранее представление о развитии и завершении эпидемических процессов для штаммов гриппа скорее помешали при прогнозировании сценария завершения распространения новой инфекции, что связано и с событийным характером процесса и многообразием динамических ситуаций. Объявлявшаяся многими странами победа над COVID в фазе минимума после волны оказалась преждевременной. Новая Зеландия и Япония, выбравшие стратегию строгих мер изоляции в 2020 г., испытали в начале 2023 г. рост случаев заражений из-за прорывающих вакцинный иммунитет новых штаммов. Пандемии респираторных вирусов «испанки» и «свиного» гриппа, на аналогии с которыми многие строили прогнозы, затухали естественным образом после прохождения двух или трех волн. В начале 2023 г. на фоне глобального позитивного тренда в некоторых странах наблюдали рекордный рост показателей и смертности и суточной заболеваемости в связи с появлением локально циркулирующих «тревожных» штаммов. Современный этап с обособлением стабильных региональных штаммов обосновывает классификацию ряда дифференцированных свойств динамики региональных эпидемических ситуаций. Среди наблюдавшихся эпидемических эффектов отдельно выделены экстремальные явления в форме моментального бифуркационного разрушения установившихся режимов — резкого перехода от длительно затухающих осцилляций к новой экспоненциальной вспышке числа заражений. Выделенные варианты развития эпидемических переходных колебательных процессов по отдельности описываются уравнениями с запаздыванием для локальных эпидемических трендов. Предложены уравнения для описания трех вариантов развития наблюдавшихся этапов локальных эпидемий. Задача построения обобщающей прогностической модели пандемии для описания взаимосвязанных региональных процессов на данном этапе неразрешима.

*Ключевые слова:* эпидемические волны, особенности региональных эпидемий, сценарии затухания осцилляций, эволюция коронавируса, уравнения с запаздыванием, бифуркации колебательных режимов, факторы субпопуляционной иммунной устойчивости к COVID.

DOI: 10.31857/S0006302923050277, EDN: MZEEIT

В статье сосредоточим внимание на анализе с точки зрения нелинейной динамики новых аспектов продолжающейся современной пандемии коронавируса, часто менявшейся за прошедшие три года свой динамический облик. Смены стадий развития пандемии мы аналитически обсуждали кратко в предыдущих работах по моделированию ряда стадийных быстро меняющихся биофизиче-

ских процессов [1]. Сведения из открытых баз данных, агрегирующих информацию о ситуации с COVID в регионах мира, позволят нам сделать ряд неожиданных выводов, обоснованных в соответствии с теорией бифуркаций. Ранее в 2020 г. [2] мы уже отметили признаки качественно различных осциллирующих сценариев локальных эпидемий в регионах [3], некоторые из которых



**Рис. 1.** Сравнение бифуркационных сценариев двух моделей: 1 – разрушение колебательного режима в уравнении (1), 2 – образование цикла в уравнении Хатчинсона.

теперь получили трактовку свойств с точки зрения теории динамических систем. Схожие выводы о важных региональных различиях сделали индийские авторы, основываясь на данных о темпах заражений в разных штатах Индии [4]. Возможности резких изменений важно понимать для оценки ресурсов системы здравоохранения и прогнозирования нужных резервов.

Отечественные авторы предлагали и меры профилактики инфекции, и перспективные средства противодействия [5, 6], и мишени для оригинальных противовирусных препаратов, например ингибиторов вирусной протеазы [7]. В работе [8] анализировали причины цитокинового шторма, стремительного опасного сопутствующего инфекции эффекта, – как последствия дисрегуляции при иммунной активации, вызванной активностью вируса.

#### ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ТРЕНДОВ И НЕЛИНЕЙНЫЕ ЭФФЕКТЫ

С точки зрения формальных методов математической биофизики особый интерес привлекают

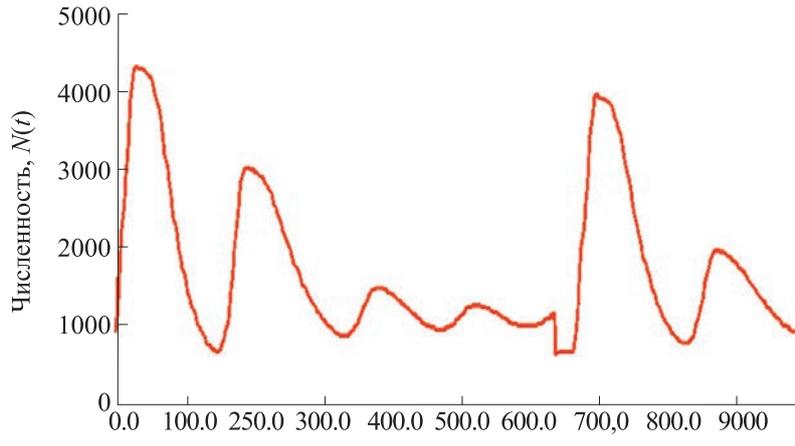
неожиданные эффекты резкой смены трендов в количестве суточных случаев заражения, – имеющие математическую трактовку в теории динамических систем. Например, мы отметили в работе [3] внезапное возникновение на юге Бразилии в начале марте 2021 г. резких релаксационных колебаний суточных заражений с большой амплитудой, согласно теории нелинейной динамики эффект соответствует явлению бифуркации с жесткой «катастрофической» потерей прошлого установившегося режима траектории.

Данный сценарий перехода к новой фазе вспышки можно трактовать как следствие проявления качественных изменений в базовых характеристиках эпидемического процесса. Явление можно отразить получаемым метаморфозом фазового портрета. Сценарий со стремительным разрушением колебаний и новой  $\Lambda$ -образной вспышкой получим в следующем нашем уравнении с запаздыванием  $\tau$  и двумя пороговыми значениями  $H$  и  $K$ , а их достижение влечет качественные перемены в развитии процесса:

$$\frac{dN}{dt} = R_0 N(t) \left(1 - \frac{N(t - \tau)}{K}\right) (H - N(t - \tau)), 0 < H < K, N(0) < H, \quad (1)$$

где увеличение базового репродуктивного числа  $R_0$  (называемого иногда репродуктивным индексом – количество индивидуумов, которые будут заражены *средним* заболевшим в полностью неиммунизированном окружении) приведет к возникновению осцилляций числа ежедневных заражений из ранее устойчивого равновесия  $H$ , но эти колебания далее сами разрушаются при превышении максимумом колебаний критиче-

ского значения  $K$ . На рис. 1 приведена динамика с образованием псевдопериодической траектории в «катастрофическом» решении нашего уравнения (1) после одинакового увеличения репродуктивного параметра  $r$  в сравнении с мягкой бифуркацией Андронова–Хопфа, например, в решении известного популяционного уравнения с запаздыванием Дж. Хатчинсона [9], являющегося при  $\theta = 1$  обобщением «логистической» модели



**Рис. 2.** Сценарий затухающей осциллирующей эпидемии с повторной вспышкой из-за внешнего воздействия в решении модели (3) ( $R_0 = 47$ ,  $\tau = 27$ ,  $\delta = 27$ ,  $A = 5000$ ,  $\Delta N = 150$ ).

Ферхюльста–Пирла с квадратичной саморегуляцией:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left( 1 - \frac{N(t - \tau)}{K} \right)^{\theta}. \quad (2)$$

Наше уравнение (1) предполагает сценарий перехода к стремительной вспышке, но в правую часть уравнения необходимо добавить ситуативную нелинейную функцию затухания вспышки  $\Psi(N^k(t - \tau_1))$ , так как это явление конечного переходного процесса. В решении (2) после данной бифуркации следует появление из потерявшего устойчивость при  $r\tau > \pi/2$  равновесия гармонического цикла  $N_*(t; r\tau)$ . При увеличении  $r\tau$  решение (2) становится релаксационным циклом с большой амплитудой и глубокими минимумами со свойством  $\lim_{r\tau \rightarrow \infty} \min N_*(t; r\tau) = 0$  и резкими отдельно стоящими пиками, что не соответствует обычно наблюдаемой популяционной цикличности.

Предложим альтернативную модель для затухающих колебаний и без явного включения предельного числа восприимчивых в популяции  $K$ . Можно сделать вывод, что не обязательно изменять ответственные за интенсивность передачи вируса параметры модели  $R_0, \tau$ , чтобы вызвать переход от фазы затухания к новой серии колебаний:

$$\frac{dN}{dt} = R_0 N(t - \tau) \exp(-bN(t - \tau)) - q \frac{N(t - 2\tau)}{A - N(t - \tau)}. \quad (3)$$

Для реализации новой серии осцилляций в форме пиков с большой амплитудой из-за новых цепочек заражений и массовых мероприятий без появления новых штаммов, как на рис. 2, в уравнении (3) достаточно вывести траекторию решения из окрестности равновесия, находящуюся в режиме затухающих колебаний в фазе прохожде-

ния минимума цикла импульсным внешним воздействием, которому достаточно быть около  $0.1N(t)$ :

$$N(\tau_{\min} + \varepsilon) = \min N_*(t, R_0\tau) + \Delta N, |\Delta N| = N(t).$$

В данной модели равновесное состояние для затухающего цикла после окончания индуцированного нового переходного колебательного режима не изменяется, но это свойство решения не трудно изменить, модифицировав второй член в правой части (3).

В сценарии запускается стремительно новый переходный колебательный процесс и с длинным затуханием после максимума. Моделируемый нами новый всплеск колебаний отличается от появления  $\Lambda$ -пика, выделяющегося по сравнению с предшествующими, и от «бразильского» сценария разрушения режима затухающих колебаний новым штаммом.

Подобный сценарий развития эпидемии отмечен в Нью-Йорке. Эпидемия в этом мегаполисе с самого начала существенно отличалась в негативную сторону от агрегированных данных по всем штатам США. Наиболее стремительно развившаяся вспышка заболеваемости в Нью-Йорке, в 2.5 раза превосходящая предыдущие, произошла сразу после рождественских праздников 2021 г., январе 2022, что не было связано с новыми штаммами, так сказала усталость общества от долгих эпидемических ограничений. В январе 2023 г. аналогичная ситуация с переходом от плавно затухающих колебаний к вспышке заражений снова развивается в Нью-Йорке. После длительных затухающих колебаний, образовавшихся после окончания «волны омикрона», за рождественские праздники госпитализация с COVID в Нью-Йорке снова значительно и резко увеличилась. Следовательно, в плотной популяции наблюдается типичный и повторяющийся эпидемический

сценарий развития новой волны из-за генерации новых цепочек заражений. В отличие от «бразильского» — бифуркационного и связанного с увеличением параметра  $R_0$  такая эпидемическая волна (назовем «Нью-Йорского типа») затухает быстрее. Доминировал в США в декабре 2022 г. штамм BQ.1.1, в 2023 г. — обновленный вариант ХВВ.1.5, что не было критическим фактором смены тренда для ряда других стран.

С целью описания экстремальных вариантов колебательной динамики эпидемии мы предлагаем использовать в уравнении с запаздыванием  $N(t - \tau)$  вместо квадратичной логарифмическую регуляцию с функцией  $\Psi(N(t - \tau_1))$ , определяющей затухание:

$$\frac{dN}{dt} = R_0 N(t) \ln \left( \frac{K - \sqrt{N(t)}}{N(t - \tau)} \right) - \Psi(N(t - \tau_1)). \quad (4)$$

Выбор функции  $\Psi$  определит динамику затухания (4) после первичной вспышки. Подобная выбираемая ситуативно функция  $\Psi(N(t - \tau_1))$  предполагает использование пороговых величин  $\Psi = q \frac{N(t - 2\tau)}{A - N(t - \tau)}$ , или для варианта затухания релаксационного цикла со снижающимся положением равновесия  $\Psi = q \frac{N^m(t - \tau_1)}{(A - N(t - \tau))^k}, m < k$ .

Допустимо использование в правой части уравнения сразу двух независимых вариантов функций  $\Psi, \Psi_1$  затухания колебательного процесса для описания нелинейного демпфирования или фактора стохастичности, когда вторая функция возмущена случайной величиной  $\Psi(\gamma t)$ .

Разработанные нами модели позволят описать частные сценарии затухающих осцилляций различной формы или варианты с бифуркационными переходами к новым вспышкам. При грамотном использовании выбранных нелинейных эффектов и гибридных уравнений описательные возможности математического аппарата расширяются, но варианты поведения получаемых решений будут ограничены в сравнении с реальностью.

Запаздывание  $\tau$  в выражении (2) — это феноменологический способ описания популяционных флуктуаций, которые возникают у численности видов даже в изолированных лабораторных условиях и во многих других биофизических процессах без явного внешнего периодического воздействия [10]. Величина  $\tau$  в выражении (2) не находится из биологических характеристик популяции. Насекомые вредители с коротким жизненным циклом могут генерировать серии убывающих пиков вспышек с длинным периодом [11].

Согласно нашему подходу к моделированию биофизических процессов фактор запаздывания

$N(t - \tau)$  в уравнениях — это агрегированная характеристика процесса, возникающая при взаимодействии биологического объекта и данной конкретной среды, что в контексте эпидемии будет связано с накоплением иммунной памяти. Для эпидемических процессов запаздывание  $\tau$  при репродукции естественно, так как всегда есть латентный период от заражения до начала активного распространения, что использовалось в ряде модификаций моделей с фактором миграций [12]. Однако исходные эпидемические SIRS-модели (сокращенно от последовательности состояний: susceptible, infectious, recovered, susceptible) возникли на основе анализа локальных вспышек чумы в Индии и гриппа в частных школах. Классическая SIR-модель Кермана—МакКендрика из трех уравнений не предполагала осцилляционных решений для динамики трех состояний [13]. Для респираторных инфекций в больших популяциях характерно именно образование эффекта эпидемических волн, как пандемических штаммов гриппа [14]. В США были две волны, а в Таиланде прошли три волны эпидемии «свиного» гриппа в 2009—2010 гг. [15]. Для коронавируса в 2020 г. специалистами ожидалась схожая динамика, но развитие пандемии оказалось сложнее. Процесс распространения привел к колебательным формам, не всегда затухающим. Анализ ряда работ по прогнозированию динамики COVID показывает, что пандемия показала ограниченность традиционных математических методов для моделирования экстремального характера развития у трансформирующихся эпидемических процессов, как, например, девять волн заболеваемости в Японии с ростом доли повторных заражений.

Оказалось, что средние оценки величины  $R_0$  — еще не гарантия уверенных прогнозов скорости распространения новой инфекции. Для запуска эпидемии ВИЧ важный фактор — активность суперраспространителя. ВИЧ попадал в США уже в 1950-е годы, первый достоверно подтвержденный случай зарегистрирован в пробе, взятой в 1966 г., но цепочки заражений обрывались до вспышки ВИЧ в Калифорнии в 1980 г. Схожее событие произошло в 2022 г. в Мадриде и привело к вспышке вируса обезьяньей оспы. Значение исходного базового репродуктивного числа этих двух вирусов (усредненный показатель, неприменимый к частным ситуациям в Калифорнии в 1980 г., в Ухане в 2019 г. и в Мадриде в 2022 г.) без явления серийного суперраспространительства было недостаточно для запуска пандемии — большинство инфицированных не заражают никого, но несколько из них заражают многих.

Эффект суперраспространения для запуска эпидемии COVID-19 на юге Европы весной 2020 г. создали футбольные матчи клуба «Аталанта» против «Валенсии». Далек не каждый случай ин-

вазии чужеродного вида или проникновение нового вируса в популяцию приводит к запуску стремительной вспышки их распространения. Опасный для человека коронавирус MERS-CoV (HCoV-EMC/2012) не стал пока пандемическим, хотя этот вирус со времени его обнаружения в 2012 г. регистрировали уже в 20 странах отдельными случаями [16].

### ВЛИЯНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ АНТИГЕННОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИНАМИКИ ЛОКАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЙ

За прошедший 2022 г. произошли важные качественные изменения и в особенностях распространения вируса, и в отношении общественных институтов к этому процессу. В 2020–2021 гг. новые штаммы накатывались почти на все страны (за исключением ряда стран с особенно жесткими изоляционными мерами) лавинообразно с локальным отставанием. Определенные изначально параметры распространения коронавируса (50%-я инфицирующая доза, средний интервал бессимптомного носительства и др.) не оставались постоянными, что не позволяло построить правдивые длительные прогнозы на 2022 г.

В 2020–2021 гг. генерировались отчетливые глобальные пики заболеваемости. Вариант Omicron вырвался из ЮАР, и эта волна закономерно превзошла пик Delta, что уже было предсказуемым эффектом. Именно доминирующий почти везде Omicron стал базовым вариантом для дальнейшей дифференциации и создания текущего разнообразия штаммов в большинстве регионов. Для долгосрочной перспективы важнее, чем локальные проблемы, начавшийся небольшой рост динамики случаев госпитализации в конце декабря 2022 г. в некоторых странах с 90% населения, получивших две дозы мРНК-вакцины. Модификация мРНК-вакцин для разрастающейся ветви Omicron сейчас не будет успевать за появлением новых его вариантов до создания универсальной полиэпитопной вакцины.

Согласно мнению большинства специалистов, в 2023 г. будет распространяться переменный набор штаммов, отличных от вызвавшего первичную вспышку вируса. Вызывать отличающееся уже и по симптомам от исходного «уханьского типа» [17] заболевание будет подмножество штаммов коронавируса, отдаляющихся друг от друга по антигенному составу и с региональной спецификой. Процесс создания антигенного разнообразия теоретически можно считать разновидностью эволюционной дивергенции, стимулированной непрямой конкуренцией. В случае гриппа нас атакуют, последовательно сменяясь, новые штаммы, разные варианты SARS-CoV-2 на данном этапе уже сосуществуют. Дифференцировка

эпидемий в локальных субпопуляциях получит ряд важных практических последствий. Для нас станет важно, с каким именно вариантом вируса мы болели COVID в прошлом, но не количественные показатели наличия антител.

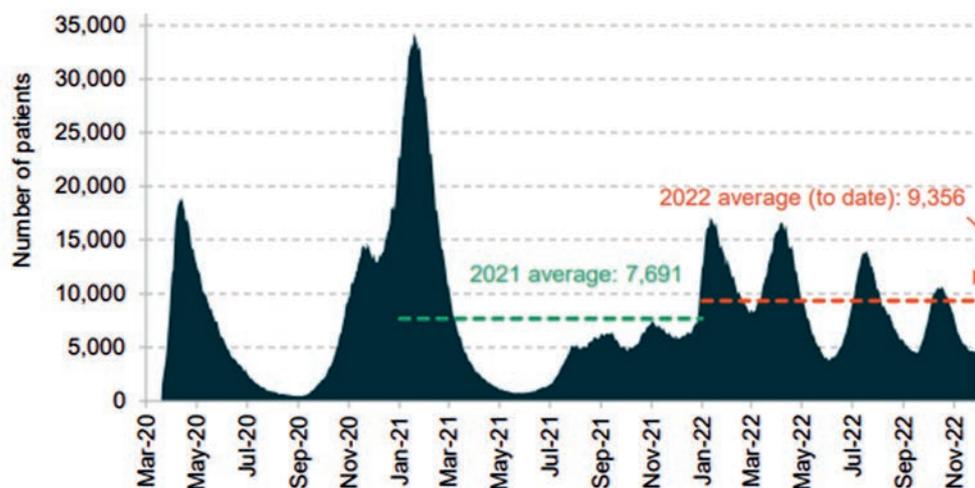
Эволюционирует не только трансмембранный «спайк» «гликопротеин вируса – мишень мРНК-вакцин». Помимо связывающегося непосредственно с клеткой S-белка, медленно мутирует и E-белок оболочки [18], и, возможно, именно удачные изменения в E-белке сделали SARS-CoV-2 пандемическим [19]. Вирусу нужно не только эффективно связаться с клеточным рецептором, но далее слиться с клеткой мембраны и собрать копии.

Специалисты понимали, что новый РНК-вирус будет мутировать, но в 2020 г. нельзя было предсказать пути эволюции SARS-CoV-2 и как на отбор случайных мутаций повлияет вакцинация. Новые варианты в эволюционной ветви Omicron способны с большей вероятностью (выбор эпитопов при презентации антигенов для иммунного ответа не полностью детерминирован) избежать связывания с антителами IgG, выработанными в результате иммунного ответа на заражение исходным штаммом в 2020 г. [20]. В январе 2023 г. в работе [21] было экспериментально показано на лабораторных животных, что варианты Omicron (уже старая линия BA.1), уклоняющиеся от индуцированного вакциной гуморального иммунитета, обладают меньшей патогенностью, что связано, по мнению авторов работы [21], с найденными мутациями во вспомогательном вирусном белке NSP6.

### СРАВНЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛОКАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ТРЕНДАХ ДИНАМИКИ СМЕРТНОСТИ И ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В 2020 И В 2022 гг.

Эпидемические сценарии различались в США и ранее. Так, распространение гриппа «испанки» аналогично существенно отличалось в городах США. Стали хрестоматийными альтернативные типы эпидемических сценариев: быстрое развитие в форме единственного стремительного пика заболеваемости гриппом в Филадельфии и длительного «плато» в Сент-Луисе [22]. Сценарии эпидемий гриппа более не актуальны для сравнений и прогнозов. Динамика развития колебательных режимов – всплесков COVID в регионах – существенно усложнилась и дифференцировалась, что мы рассмотрим на ряде примеров.

Согласно обновляемой статистике, в Великобритании происходит снижение числа случаев заболеваний с диагнозом COVID. Оптимисты в очередной раз пишут о положительном тренде. Подобная динамика снижения была и в 2021 г.



**Рис. 3.** Динамика волн числа госпитализаций в больницах Великобритании в 2020–2022 гг. по базе данных сайта <https://coronavirus.data.gov.uk>.

после спада волны Delta, но это не асимптотически устойчивый тренд. Отметим другую важную особенность локальной эпидемии в 2022 г., так как число требующих госпитализации случаев для экономики важнее, чем просто число положительных ПЦР анализов. В среднем в 2022 г. число госпитализированных в Великобритании (при высокой доле вакцинированного населения) было выше, чем в среднем в 2021 г. В больницах находилось 7600 пациентов, а в 2022 г. — 9300 пациентов в день (рис. 3). Позитивно, что в 2022 г. не было столь существенных пиков поступления больных, как во время мартовской вспышки 2021 г., создавшей существенные проблемы.

Из рис. 3 видно, как резко поменялся характер эпидемических колебаний в 2020–2021 гг. и в 2022 г. Произошла некоторая стабилизация колебаний числа заражений в ноябре–декабре 2021 г., но зимой 2022 г. возобновился новый осциллирующий процесс, что предсказывает наше уравнение (3). При переходе к новой серии колебаний пульсирующая динамика эпидемии выравнивалась, что позитивно с точки зрения распределения нагрузки на систему здравоохранения. Развитие ситуации с COVID в 2022 г. в Великобритании потеряло сходство с динамикой заболеваемости при появлении пандемического штамма гриппа, на рис. 4 видны волны естественным образом завершившейся эпидемии «гонконгского гриппа».

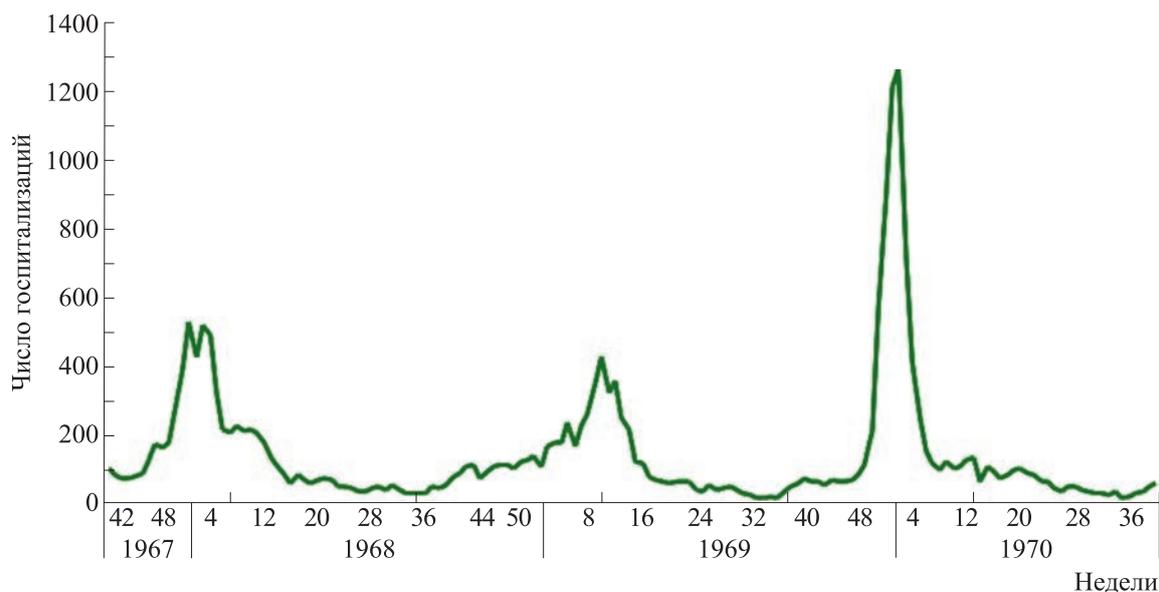
Амплитуда колебаний заболеваемости уменьшалась, но интервалы времени между пиками колебаний стали короче. Средняя дневная нагрузка на систему здравоохранения за 2022 г. в Великобритании неожиданно стала выше, чем предыдущем году, но распределение потока пациентов по времени стало ровнее. Прогнозы максимумов поступления больных важны для задачи организа-

ции лечения из-за фактора переполнения мест в реанимациях больниц.

Обратим внимание, что среди доступной статистики и анализируемых нами графиков позитивной динамики уменьшения пиков случаев госпитализаций выделяется увеличение количество повторных заражений, и требующих даже интенсивной терапии. Нарушает картину прогнозирования дальнейшего позитивного тренда завершения эпидемии в Великобритании именно явление, когда в динамике плавного роста количества повторно инфицированных больных наблюдался выраженный пороговый эффект — рис. 5. Увеличение случаев фиксации реинфекций происходило неожиданно резко и в других регионах Европы, что является скрытой угрозой на фоне утверждений о преодолении странами Европейского союза последствий пандемии. Достигнутый рубеж в 7% повторно госпитализированных из числа поступающих больных не критический, но последующие подобные пороговые явления резкого роста доли повторных заражений поставят под сомнение все базовые концепции создания нужного уровня «коллективного иммунитета».

#### ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВОЛН: ЗАТУХАНИЕ И ВОЗОБНОВЛЕНИЕ В НОВЫХ РЕГИОНАХ

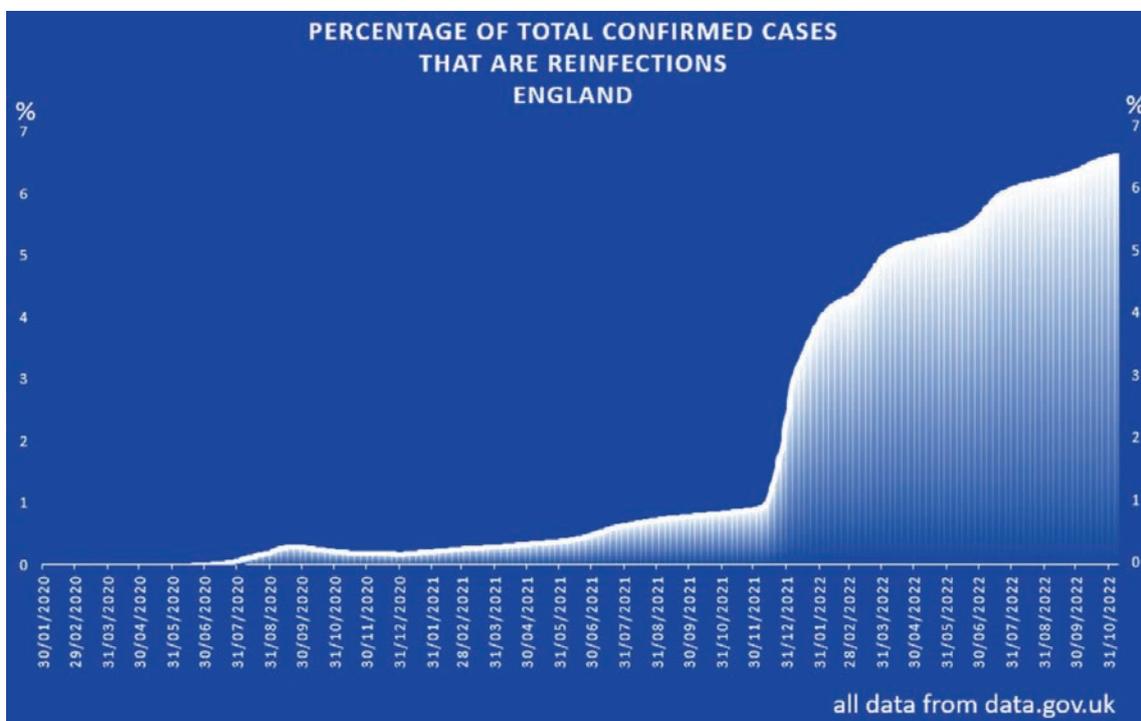
В январе 2023 г. наблюдалось очередное увеличение случаев COVID смертности в Швеции, где исходно была выбрана не стратегия ограничительных мер, а цель достижения естественного коллективного иммунитета. При этом число летальных случаев COVID в Швеции в расчете на 1 млн чел. с самого начала пандемии было явно



**Рис. 4.** Динамика волн заболеваемости ОРВИ в Великобритании во время пандемии гриппа H3N2 «гонконгский грипп» в 1968–1970 гг. по данным архива <https://slideplayer.com/slide/6064028>.

выше, чем в соседней Норвегии [23], но в январе 2023 г. неожиданно для экспертов новая волна заболеваемости именно в Швеции превзошла по показателю числа летальных случаев волну января 2022 г. (рис. 6), эта волна медленно затухла только в июне 2023 г.

В январе 2023 г. выявлялись локально циркулирующие штаммы и регистрируются стремительные, но региональные вспышки заболеваемости вместо глобальных волн. Данная тенденция, на наш взгляд, будет продолжаться и весь 2023 год. При такой «лоскутной» динамике сохра-



**Рис. 5.** Пороговый эффект резкого увеличения повторных случаев заражения коронавирусом в Великобритании по базе данных сайта <https://coronavirus.data.gov.uk>.

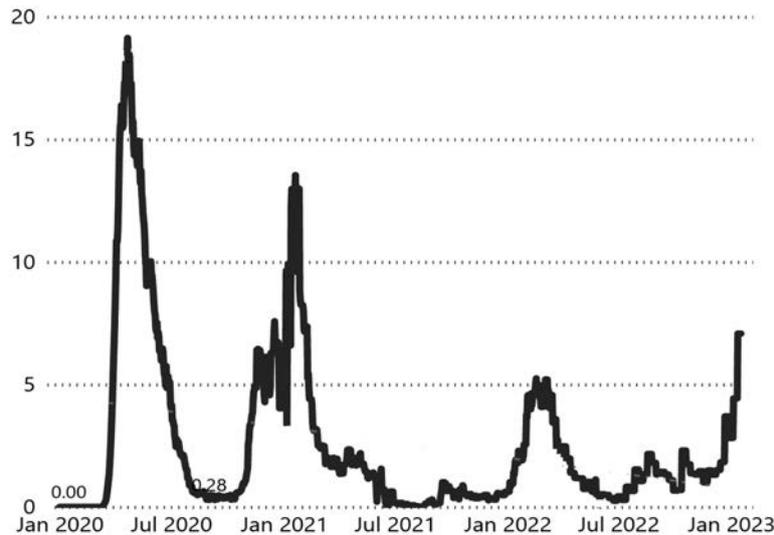


Рис. 6. Динамика летальных случаев COVID в Швеции в расчете на 1 млн населения по сведениям из базы данных <https://ourworldindata.org/coronavirus>.

няется отчетливая колебательная составляющая вспышек в регионах. Графики госпитализаций и смертности не будут снижаться сразу во всех странах одинаково равномерно, также как уровень смертности увеличивался очень неравномерно на Юге и на Севере Европы весной 2020 г.

Рассмотрим интересные примеры локальной эпидемической динамики, которые представляются особенно поучительными и неожиданными. Отметим ряд аспектов нелинейных изменений динамики распространения вируса, в том числе в странах, бывших в 2020 г. эталоном организованной борьбы с распространением коронавируса, которые не позволяют нам прогнозировать завершение роста случаев COVID там весной 2023 г.

Интересно сравнить развитие эпидемической ситуаций в странах, которые изначально оказались в очень различных начальных условиях и придерживались различных противоэпидемических стратегий. В Японии, выбравшей и долго успешно соблюдавшей строгую изоляционную стратегию и административные меры остановки эпидемии (даже при проведении Олимпиады) на основе общественного контроля, отслеживания контактировавших с зараженными и регулярного

ПЦР тестирования, минимизации рискованного поведения, в итоге резко ухудшилась эпидемическая ситуация.

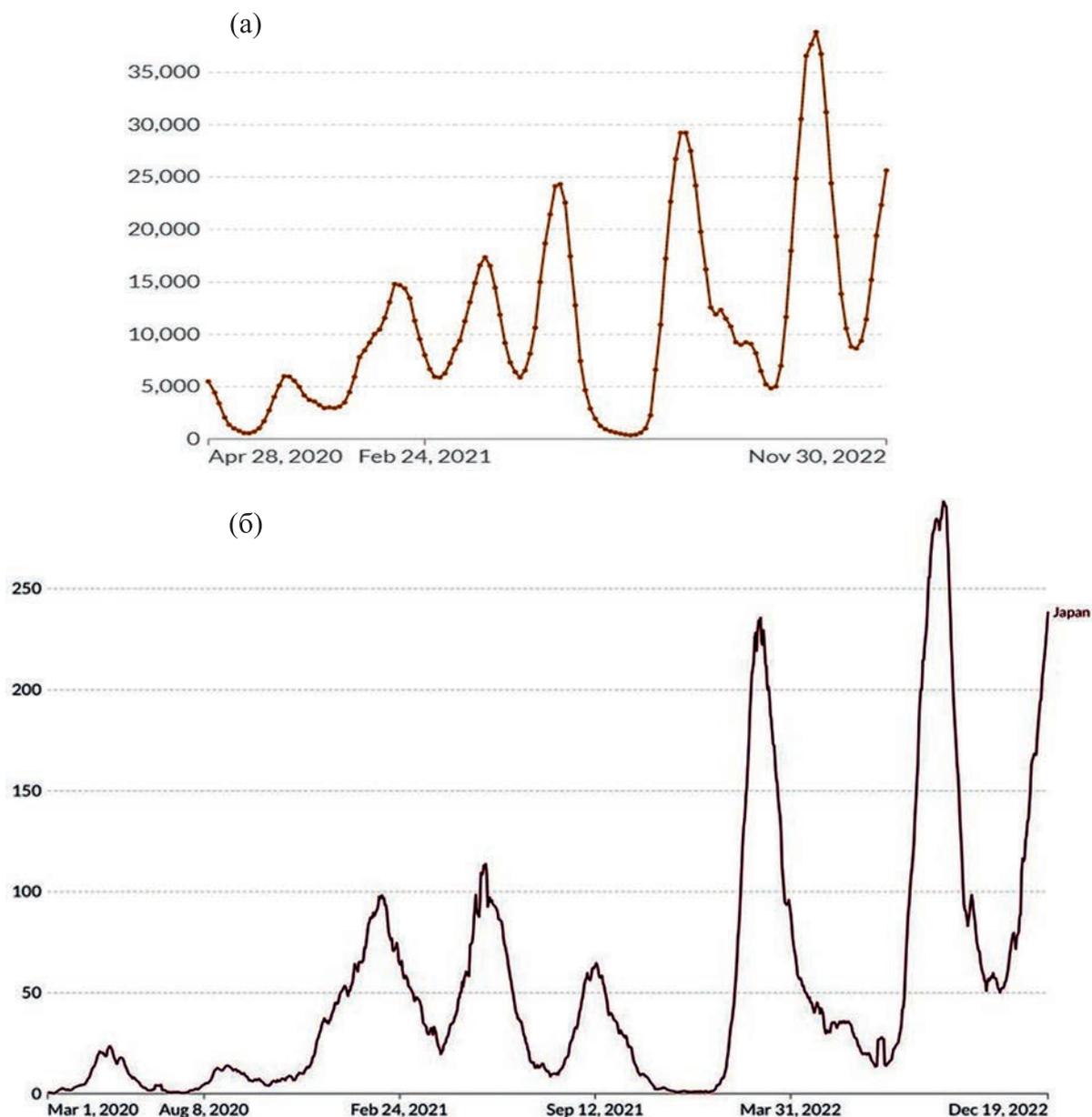
В мае 2022 г. журнал «Nature» опубликовал статью [24] о выводах, которые можно сделать из практики успешной борьбы с распространением коронавируса в Японии, где средний возраст населения был выше, но показатель COVID смертности явно ниже, чем в развитых странах Европейского союза. Один из редких случаев, когда авторы «Nature» с выводами сильно поспешили. Зимой 2022–2023 гг. число требующих госпитализации случаев COVID и смертность от новых штаммов в Японии оказалась выше почти в шесть раз, чем при случаях заражения при проникновении в страну и распространения исходного «уханьского» вируса весной 2020 г. (рис. 7). В Японии в январе 2023 г. не наблюдается тренда снижения числа госпитализаций с COVID и числа летальных случаев, но видим ускорение волн.

Динамику таких осцилляций с возрастанием точек минимумов для серии последовательных колебаний можно отразить следующим уравнением запаздыванием и с двумя уровнями эпидемических порогов  $Z > K$ :

$$\frac{dN}{dt} = R_0 N(t) \left( 1 - \frac{N(t)(Z - \gamma \exp(-bN(t - \tau_1)))}{K + N(t - \tau)} \right) - \Psi(N(t)). \quad (5)$$

На фоне развития новой фазы эпидемического процесса в форме уже восьмой по счету волны премьер-министр Японии Ф. Кисида 20 января 2023 г. заявил, что поручил классифицировать COVID в ту же категорию болезней, что и сезон-

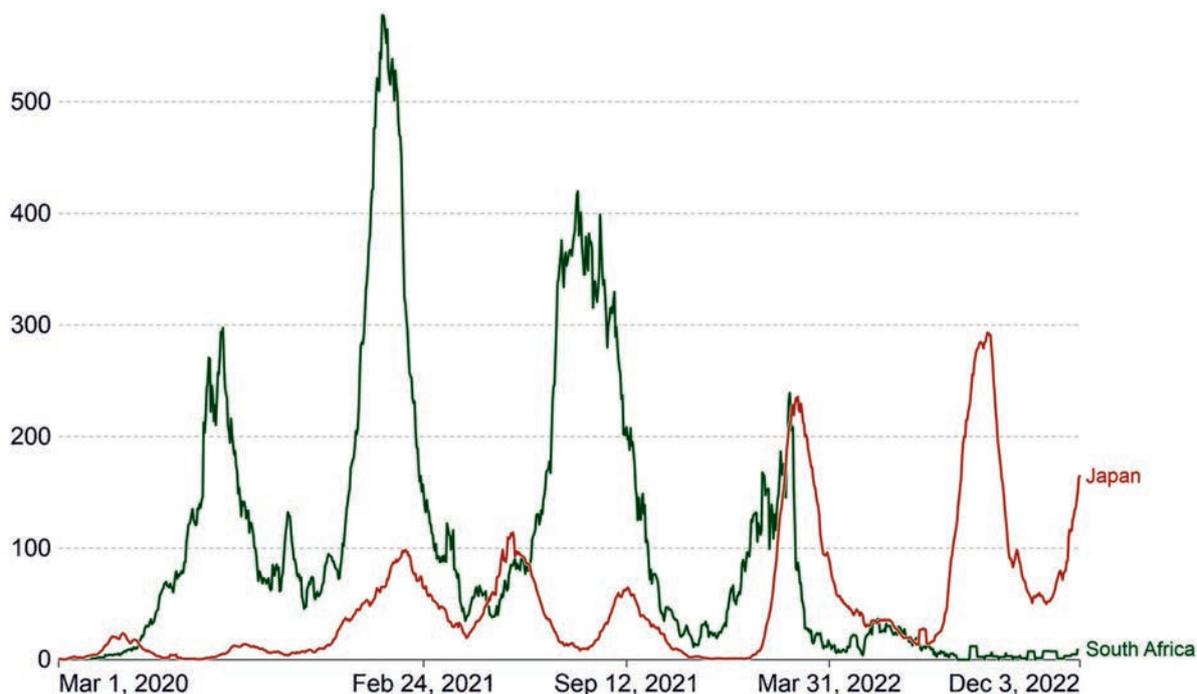
ный грипп, поскольку цель его правительства — сосредоточиться на восстановлении экономики и избежания рецессии [25]. Это решение означает отмену масочного режима в помещениях, более того, контактировавшие с инфицированными



**Рис. 7.** Колебания числа числа госпитализированных (а) и числа летальных случаев (б) при последовательных эпидемических волнах в Японии по сведениям из базы данных <https://ourworldindata.org/coronavirus>.

коронавирусом больше не будут обязаны проходить карантин. Для Японии в среднем каждая последующая волна лишь увеличивала показатели летальности с начала эпидемии (рис. 7) (эти показатели по Японии в январе 2023 г. значительно ниже, чем наблюдалось в итальянском Бергамо весной 2020 г., но сами японцы считают такую летальность экстремально высокой), что сильно отличает вариант развития от ситуации в Великобритании со сглаживанием пиков. Интервалы между пиками волн тоже, как и в Великобрита-

нии стали плотнее, но важно, что их амплитуда не уменьшалась. Автору при написании данной статьи пришлось четыре раза обновлять графики с быстро меняющимися данными о динамике череды волн японской эпидемии. К моменту выхода данной статьи в печать обсуждаемый локальный эпидемический тренд снова изменится, — по нашему прогнозу в сентябре 2023 г. быстрые колебания затухнут, а заболеваемость стабилизируется до зимней вспышки после Рождества, что наблюдалось ранее в Нью-Йорке и Канаде. Отметим,



**Рис. 8.** Сравнение динамики числа летальных исходов COVID с начала пандемии в Японии и в Южной Африке в расчете на 1 млн населения по базе данных <https://ourworldindata.org/coronavirus>.

что в ряде лабораторных экспериментов отмечено снижение патогенности у Omicron по сравнению с Delta [26], и во многих странах увеличение положительных ПЦР-тестов уже не влечет роста летальных случаев.

Важнейший аспект для общества — наблюдаемое изменение доли летальных исходов. Позитивная тенденция снижения летальности COVID очевидна в большинстве стран Европы, даже в тех государствах, которые ранее отличались повышенным по отношению к среднему уровню смертности. Интересный аспект, что в ряде стран, бывших исходно безнадежными аутсайдерами с высокой, более чем 10%-й долей смертности заболевших, эпидемическая обстановка в начале 2023 г. резко улучшилась, что подтверждает мнение о том, что генетические особенности и возрастной состав популяции с большой долей пожилого населения важные, но не главные факторы создавшейся в 2020 г. ситуации.

Из положительных трендов многих стран отметим яркий пример, — как в Южной Африке смертность последовательно снижается в ходе череды эпидемических волн, хотя ЮАР в 2020–2021 гг. считалась инкубатором для нескольких распространявшихся потом повсеместно тревожных штаммов. Вероятная причина активной эволю-

ции вируса в ЮАР — тот факт, что страна является мировым аутсайдером по ежегодной заражаемости ВИЧ и большой доле пациентов с дисфункцией иммунитета и соответственно продолжительным протеканием COVID.

В декабре 2022 г. показатели смертности от COVID в ЮАР в расчете на 1 млн населения были значительно лучше, чем в Японии, где наблюдалась череда осцилляций с возрастающей амплитудой последовательных восьми вспышек заражений (рис. 8). Тренды изменения свойств колебаний в этих двух странах в 2022–2023 гг. противоположные.

На графике видно, как страны, бывшие лидером и аутсайдером, через 2.5 года поменялись местами, хотя ЮАР исходно с весны 2020 г. по высокому показателю COVID смертности была одной из стран-аутсайдеров вплоть до лета 2022 г., но волны эпидемии затухали. Подобные импульсные явления наблюдались в некоторых странах в конце 2020 — весной 2021 г. при появлении первых мутировавших «тревожных» штаммов [27] (британского V.1.1.7 и бразильского BQ.1), вызвавших эффект переполнения ресурсов в региональных системах здравоохранения. Весной 2020 г. жителям Европы ставили в пример дисциплинированные азиатские страны, слаженно выпол-

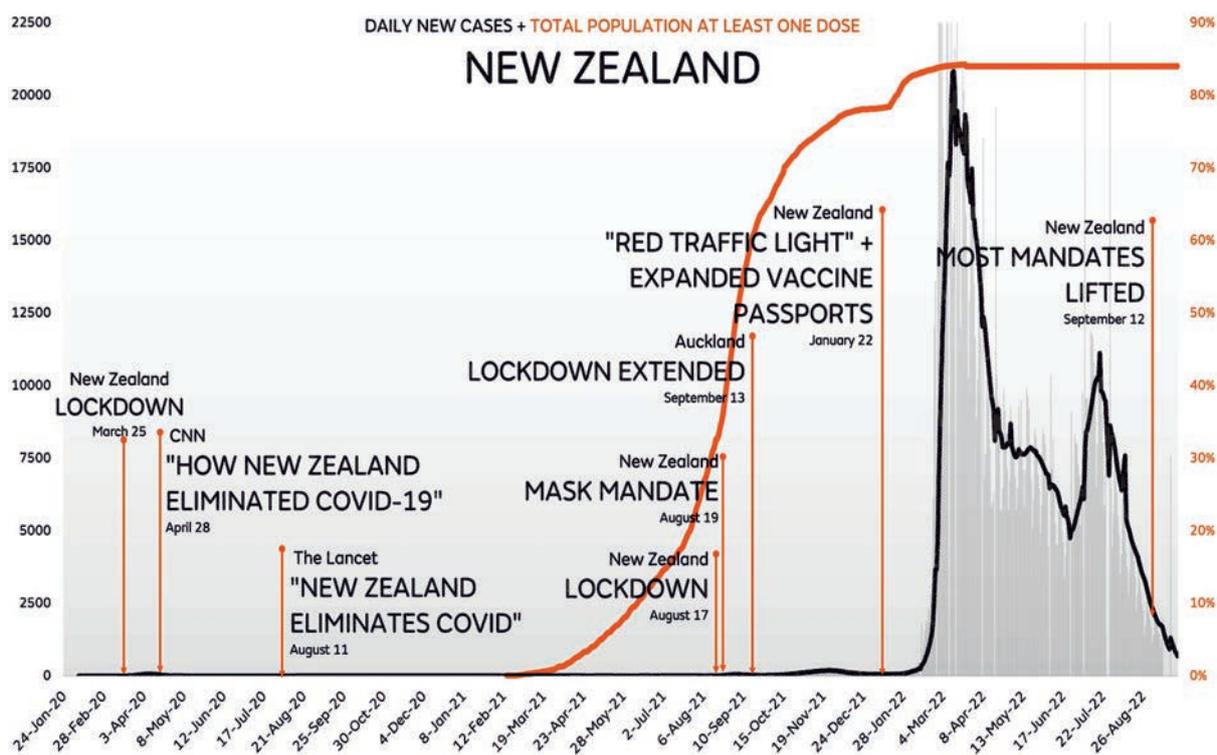


Рис. 9. Динамика развития эпидемии в Новой Зеландии: случаев заражения и доли вакцинированного населения с вводимыми административными мерами по данным из репозитория <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.

няющие все ограничения «локдаунов». В начале 2023 г. именно в этих регионах Азии стали наблюдаться негативные эпидемические тренды. В 2023 г. приходится бороться с разнообразием продолжающих мутировать вариантов вируса, прошедших эволюционный отбор на уклонение от IgG, а очередные ограничения и локдауны становятся тяжелой нагрузкой. В Японии в марте 2023 г. отказались от большинства строгих антиэпидемических мер, таких как обязательный карантин для контактных.

Согласно нашей гипотезе, взрывообразному распространению исходного штамма коронавируса в отдельных регионах препятствовали в большей мере естественные иммунологические факторы резистентности, чем административные меры карантинов.

Особенно интересна для подтверждения гипотезы и для анализа эффективности антиэпидемических мер оценка развития ситуации с «новым началом» локальной эпидемии в Новой Зеландии, — наиболее обособленной индустриально развитой стране с высоким уровнем здравоохранения и социальной ответственностью. В Новой Зеландии не было колебательной динамики зара-

жений — «эпидемических волн». Вплоть до апреля 2022 г. удавалось пресекать цепочки заражений, блокируя запуск «эпидемических волн» [28] (рис. 9). На островах Океании летом 2023 г. тоже регистрируется высокая заболеваемость.

На рис. 9 показан график динамики случаев заражения и рост доли вакцинированного населения, а стрелками отмечены введенные властями дополнительные антиковидные меры и ограничения, которые вводили незамедлительно при первых признаках угрозы начала эпидемии. Как мы видим, эти меры не предотвратили порогового варианта начала развития эпидемического процесса в стране и достаточно редкого  $\Lambda\Lambda$ -образного пика.

Случившийся кризис в 2022 г. в Новой Зеландии — это показательный пример вреда от преждевременных победных реляций. Осенью 2022 г. случаев заражения в расчете на 1 млн населения в Новой Зеландии стало значительно больше, чем в Индии и в ЮАР. Активный эпидемический процесс в Новой Зеландии стартовал в марте 2022 г., на два года позже, чем во всех странах. Два года отдельные случаи проникновения коронавируса не приводили к вспышкам. Цепочки заражений в

2020–2021 гг. эффективно прерывались, незамедлительно вводились «локдауны», что, безусловно, являлось успехом, связанным с особенностями страны. К лету 2022 г. 84% процента населения уже получили как минимум одну дозу вакцины. Дважды правительство Новой Зеландии сообщало о победе над коронавирусом при отсутствии фиксации новых случаев COVID в стране. Вспышка стремительно началась в марте и продемонстрировала экспоненциальный рост заражений, хотя ограничения на массовые мероприятия и масочный режим уже были введены раньше при появлении первых случаев. Динамика заболеваемости сформировала два классических убывающих эпидемических пика в апреле и августе (для Новой Зеландии это зимние месяцы), какие часто наблюдались, например, при распространении сезонного гриппа в декабре и в марте. В сентябре 2022 г. в фазе затухания волны было объявлено об отмене масочного режима, и это решение никак не повлияло на устойчивый позитивный тренд эпидемической динамики с затуханием вспышки в стране. Многие авторы указывали, что ранняя отмена масочного режима в нескольких республиканских штатах США не повлияла на рост заболеваемости. В работе [29] отмечено: «в результате анализа мы не смогли обнаружить снижения количества случаев, уровня госпитализаций или смертности, связанного с выполнением распоряжения, требующего ношения масок в масштабах штата». Однако это ненадежный пример. Вряд ли режим ношения тканевой маски в Техасе строго соблюдали, население штата Техас традиционно воспринимало подобные меры болезненно, воспринимая их как нарушение принципа личных свобод.

#### РОЛЬ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА В СТАБИЛИЗАЦИИ ЛОКАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВОЛН

Рассмотрим иммунологический фактор явной гетерогенности запуска локальных эпидемических процессов. Как мы прогнозировали в работе [2], развитие процесса с постепенным сокращением летальности происходит аналогично пандемии 1889–1892 г., известной как «русский грипп». По современным данным пандемия являлась последствием перехода в 1885 г. к человеку в степях Средней Азии бетакоронавируса HCoV-OC43, выделенного в 1967 г. [30]. Отдельные вспышки заболевания отмечались в 1895 г., в отличие от гриппа «испанки», которая исчезла так же резко, как и появилась.

Предыдущий пандемический коронавирус перестал вызывать вспышки с высокой смертностью, но образовал четыре относительно стабильных подтипа, отличающихся региональной циркуляцией [31]. Отмечались региональные вспышки сезонного коронавируса, как во французских регионах Бретани и в Нормандии в 2003 г. [32], и именно эти регионы менее других пострадали от COVID [33]. Обычно штаммы бетакоронавирусов скрываются за  $\approx 15\text{--}20\%$  в общей статистике диагнозов ОРВИ. SARS-CoV-2 – седьмой по счету выявленный поражающий человека коронавирус. Во время анализа региональных вспышек COVID возникла гипотеза, что именно фактор локальной циркуляции ряда родственных коронавирусов влияет на специфический Т-клеточный иммунитет в субпопуляциях и, следовательно, на отмеченные региональные различия частоты тяжелых случаев заболеваемости при столкновении с новым коронавирусом.

В настоящее время эволюция HCoV-OC43 интересна при исследовании региональных различий заболеваемости COVID-19 за счет эффекта перекрестного иммунитета, который могут обеспечивать долгоживущие Т-клетки с рецептором CD8. Эти Т-киллеры были отобраны ранее в процессе иммунной активации при удачной презентации особых антигенов – идентичных эпитопов белков других коронавирусов, с которыми приходилось сталкиваться нашим клеткам, отвечающим за презентацию антигенов, где все захваченные вирусные белки расщепляются в клетках цитозольными протеазами на пептиды. В работе [34] идентифицировали универсальный иммунодоминантный пептид для коронавирусов – участок в месте слияния двух составляющих их S-белка. Это объясняет, почему недавняя инфекция HCoV-OC43 связана с менее тяжелым течением COVID-19 даже у пожилых. Устойчивость к вирусу со временем ослабевает из-за истощения популяции Т-киллеров.

Проникший в популяцию коронавирус продолжит изменяться, накапливая антигенное разнообразие и адаптироваться, в том числе к популяционному иммунитету, созданному вакцинацией, которая уже стала фактором отбора мутаций. Теоретически накопление изменений при эволюции вируса зависит от частоты его репликаций и, соответственно, от численности его активных носителей, способных передать мутантный вариант РНК далее по цепочке в популяцию. Однако выявленные участки с большой частотой замены нуклеотидов («горячие пятна») говорят о том, что изменения в РНК не стохастичны. Теперь основные исследования со-

средоточены вокруг прогнозирования дальнейшей эволюции штаммов SARS-CoV-2 в ответ на вакцинацию. Так как в ключевых участках трансмембранного S-белка продолжают происходить несинонимичные замены нуклеотидов и делеции, соответственно, выработанные после вакцинации антитела *постепенно* теряют аффинность [35]. Иммунологи ищут методы для нацеливания клеточного иммунитета на консервативные участки других структурных N- и E-белков вируса, исключив при этом эффект антителозависимого усиления ADE [36]. Обнаружен эпитоп вне рецептор-связывающего домена RBD, который может представлять собой альтернативный сайт связывания для нейтрализующих антител и мишень для вакцин.

Выяснилось [37], что прорывная коронавирусная инфекция с высокой начальной дозой заражения у вакцинированных пациентов дополнительно индуцирует субпопуляции вирусоспецифических назальных резидентных CD8+ и CD4+ клеток достаточно широкого спектра выборки эпитопов SARS-CoV-2, обеспечивая эффективный иммунный ответ. С другой стороны, появляются новые сведения, что длительное течение COVID истощает популяцию Т-лимфоцитов с рецептором CD4 и вызывает состояние иммуносупрессии, а опосредованная инфекцией SARS-CoV-2 лимфопения связана с апоптозом Т-клеток [38]. Тогда перенесшие осложненный COVID-19 будут скорее подвержены реинфекции, а из-за снижения уровня лимфоцитов CD4 восприимчивы и для других инфекционных заболеваний. Обзор новых форм клинических проявлений инфекции SARS-CoV-2 очень актуален, но выходит за рамки данной статьи по моделированию повторных волн и анализу вариативности эпидемической динамики.

Вновь открывающиеся факты о сложном взаимодействии вируса с иммунной системой заставляют вновь корректировать оптимистичные прогнозы о завершении локальных эпидемических процессов и окончательном «затухании волн». Проводятся исследования клинических проявлений разных штаммов SARS-CoV-2 из регионов, но их обилие возрастало быстрее, чем успевают изучать их свойства ученые – это особенность современного этапа пандемии. Варианты Omicron продолжают преподносить неприятные сюрпризы из-за расширения клинических проявлений вызываемого ими заболевания.

Отдельной проблемой остается хроническое течение коронавирусной инфекции более восьми недель, известное как «Long COVID». Колебания числа новых случаев заражений в большинстве

стран Европы летом 2023 г. стремится к затуханию, но число больных «Long COVID» остается постоянным и не снижается [39].

Дальнейшее развитие локальных эпидемических сценариев в зависимости от многообразия штаммов и нарастающей вариативности коронавируса вариативно. На основе аналогий можно предположить, что через два года разнообразие штаммов стабилизируется, оставив в итоге активными не более четырех. Эволюция стабилизировавшихся вариантов уже не должна быть стремительной, как это происходило с другими вирусами. Например, эволюция ВИЧ в человеческой популяции резко замедлилась. В 2019 г. был обнаружен новый подтип ВИЧ, получивший обозначение L, но это первое установленное изменение в классификации штаммов ВИЧ с 2000 г. Однако развитие коронавируса в локальных популяциях достаточно необычно. Например, в работе [40] показано, что скорость репликации в легких у варианта вируса BA.2.75.2 (распространяется в Индонезии и Индокитае) выше, чем у BA.5 в США и Европе. В октябре 2022 г. внимание привлек необычный конвергентный мутантный штамм в Европе BQ.1.1, уклоняющийся от антител, выработанных в ответ на прошлогодний штамм BA.1, и этот штамм ответственен за увеличение числа смертельных случаев декабре 2022 г. в Германии. В Восточной Азии в декабре 2022 г. выявлено распространение подварианта Omicron BF.7. По предварительным оценкам базовое репродуктивное число  $R_0$  у этой разновидности  $R_0 > 10$ , по другим сообщениям – достигает антирекорда ( $R_0 = 18$ ) в Юго-Восточной Азии. Заражение BF.7, по новым сведениям, влечет самый короткий инкубационный период среди всех вариантов [41]. В странах Европы и США этот вариант регистрируется, но не обладает столь впечатляющей способностью инфицировать и не смог выиграть конкуренцию у других штаммов. Летом 2023 г. в странах Юго-Восточной Азии и в Австралии отмечались локальные вспышки штаммов Omicron-ветви XBB.x., на острове Окинава продолжается серия эпидемических волн. Эволюция коронавируса в 2023 г. отличается тем, что возникают сразу конкурирующие эволюционные ветви (XBB, XBC, BF) как группы субвариантов, немного отличающиеся набором мутаций S и E-белков. Вспомогательные белки SARS-CoV-2 тоже мутируют. Новые варианты Omicron сильнее подавляют экспрессию главного комплекса гистосовместимости класса I, чем предыдущие версии вируса [42]. Обзор всех актуальных вариантов выходит за рамки нашей работы, тем более, что к моменту публикации статьи сведения о наиболее актив-

ных штаммах уже устареют. К новой глобальной волне будет способен конвергентный штамм, значительно отличающийся от циркулировавших в 2022–23 г. субвариантов Omicron.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В начале 2023 г. пандемия COVID завершается как глобальный процесс, но вызвавший пандемию вирус из человеческой популяции не исчезнет. Согласно проведенным нами сравнительным оценкам данных статистики заражений и госпитализаций в январе 2023 г. эпидемический процесс стал региональным, что было предсказуемо из-за появления большой серии вариаций Omicron. В ноябре 2023 г. развивается ветвь штаммов JN, JQ “Pirola clan”.

Нами предложены уравнения для нескольких вариантов затухающей колебательной динамики локальных эпидемий — феноменологическое описание частных эпидемических ситуаций. Многообразие выделенных нами динамических сценариев распространения штаммов коронавируса не укладывается в существовавшие ранее SIR-модели развития и окончания эпидемий. Для прогнозирования интенсивности распространения инфекции с разнообразием локальных сценариев, связанных с продолжающейся адаптацией в системе «коллективный иммунитет/вирус», влияющей на  $R_0$  и на  $\tau$ , необходимо искать новые сценарные методики моделирования распространения изменчивой болезни в гетерогенной среде и расширять описательные возможности за счет неоднородной плотности восприимчивых, так как набор вариантов поведения решений вариантов SIRS-моделей все равно будет ограничен [43]. Такие решения не отразят спонтанную изменчивость характера колебательных режимов при запуске новой череды эпидемических волн. В случае COVID ситуация с коллективным иммунитетом сложнее, чем просто накопление выживших после болезни, как в классических SIR-моделях, так и в модификациях с запаздывающей регуляцией  $t-\tau$ . В модельных схемах типа SIR для COVID нужно учитывать много специфических состояний, как развития и группы больных постковидного иммунодефицита и хронического рецидивирующего «Long COVID».

Перспективным автору представляется синтетический подход на основе гибридных предикативно переопределяемых структур с анализом формирования цепочек заражений как основных единиц эпидемического процесса. Тогда главным фактором будет не численность носи-

телей (или уже иммунных и не восприимчивых), а плотность в сети контактов потенциального активного распространителя: как случайных, так и детерминированных. Начальные распространители в каждом новом регионе априори непредсказуемо оказываются в гетерогенной среде с разной плотностью своих контактов.

Гибридные модели с переопределяемой вычислительной структурой и событийным временем строились нами для анализа вспышек инвазионных насекомых, но в однородной среде [44]. Расширение методов моделирования ситуаций возможно с использованием формализма контактных графов [45] и адаптации данных мониторинга [46]. В ряде регионов развитие эпидемии коронавируса носило пороговый характер (Новая Зеландия, юг Бразилии). Для описания пороговых эффектов в биосистемах разрабатываются специальные триггерно действующие функционалы включения и выключения факторов в гибридных структурах [47], например, применяемые нами для описания включения эффекта Олли при моделировании разрушительных вспышек насекомых вредителей [48].

На динамику распространяя возбудителя влияет выработанная ранее в популяции иммунная устойчивость, что было отмечено нами ранее [3], и что действительно оказалось связано с особенностями иммунной памяти [49]. Сохранившаяся в локальной группе перекрестная реактивность клеток-киллеров CD8+ важна в начале эпидемии. Сейчас установлена разная степень восприимчивости организмов и способность для дальнейшей передачи коронавируса существенно различается [50]. Найдены факторы, позволяющие объяснить меньшую восприимчивость к новому вирусу в отдельных регионах [51] и связанные прошлыми вспышками родственных вирусов. Память адаптивного иммунитета зависит от строго распознаваемых как чужеродные эпитопов, выбранных из конечной, хотя и огромной библиотеки вариантов рецепторов T- и B-лимфоцитов [52], которая теперь является объектом активных исследований и каталогизации.

Эпидемический процесс развивается со стохастической компонентой, потому трудно игнорировать фактор случайных возмущений в прогнозах роста динамики заражений. Для вариативных биологических процессов автор предлагает использовать известный в теории построения композиций термин «алеаторический» [53], тогда при смене стадий развития происходит выбор из ограниченного набора вариантов [54], но это не приводит к классической стохастичности. Явление неполной (фрагментарной) детерминированно-

сти развития процессов можно реализовать в модификации формализма клеточных автоматов [55] с вероятностным расширением [56] и с учетом агрегированного эффекта запаздывающей регуляции [57], как в работах А.В. Никитиной [58]. В моделях алеаторических процессов биосистем на основе систем дифференциальных уравнений актуально учитывать действие возмущения равномерно распределенной случайной величиной  $\gamma$  [59] именно в функциональной компоненте запаздывания:  $\Psi(N(t - \gamma t))$ . Необходимо точечное введение действия вероятностных факторов в модель [60] для неполностью детерминированного алеаторического процесса [61]. Особенности модели фрагментарно возмущенных вычислительных структур обсудим в следующей работе.

Не все теоретически допустимые пути развития процесса (или наборы эпитопов для формирования Т-клеточного иммунного ответа) на практике одинаково предпочтительны, что показали работы по картированию эпитопов для различных возбудителей с эффектом антигенного дрейфа [62]. По причине неполной детерминированности при презентации антигенов сейчас нельзя уверенно предсказывать развитие инфекции при повторном заражении новыми штаммами. Антитела в популяции однородны, но репертуар активированных Т-лимфоцитов разнообразнее. В работе [63] путем секвенирования Т-клеточного рецептора отмечено большое разнообразие различных популяций циркулирующих клеток CD8<sup>+</sup> у различных людей, появившихся после вакцинации мРНК препаратом BNT162b2. В работе [64] был предложен математический метод, позволяющий оценить вероятность того, что типичный человек будет обладать Т-клетками, реагирующими на определенный эпитоп, и повышение иммунной устойчивости тоже актуально учитывать при последующем прогнозировании развития локальных сценариев инфекционного процесса.

Осциллирующая динамика и явление «эпидемических волн» создает трудности не только для планирования потребностей и резервов системы здравоохранения, ресурсы которой переполняются на их пиках. Острая проблема возникает в психологическом восприятии повторяющейся кризисной ситуации, что влияет на поведение потенциальных распространителей [65]. Неоднократно властями в разных странах сообщалось населению об успешном контроле над эпидемией в результате административных мер и вакцинации, а в некоторых странах даже уверенно не-

сколько раз объявлялось о полной победе над коронавирусом. После оптимистичных заявлений о завершении кризиса следовала очередная волна заболеваемости. В некоторых странах непопулярные административные меры, (ношение маски в помещениях, карантин для контактировавших и обязательное ОТ-ПЦР-тестирование при пересечении границ) отменяли, но эти меры приходилось возвращать, что постепенно приводило к тому, что экономически активным гражданам этих стран все сложнее воспринимать и выполнять эти требования. Меры социальной изоляции были важны на первых этапах в начале пандемии, но с 2023 г. основной определяющий фактор дальнейшего развития эпидемических трендов COVID – иммунологический.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 23-21-00339 в СПб ФИЦ РАН.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ю. Переварюха, Биофизика, **67** (2) 386 (2022).
2. А. Ю. Переварюха, Биофизика, **66** (2), 384 (2021).
3. А. Ю. Переварюха, Биофизика, **66** (6), 1144 (2021).
4. Д. Пал, Д. Гхош, П. К. Сантра и Г. С. Махапатра, Биофизика, **67** (2), 301 (2022).
5. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., Биофизика, **66** (1), 183 (2021).
6. А. Ф. Ванин, Биофизика, **65** (4), 818 (2020).
7. П. В. Ершов, Е. О. Яблоков, Ю. В. Мезенцев и др., Биофизика, **67** (6), 1109 (2022).
8. Ю. Д. Нечипуренко, А. А. Анашкина и О. В. Матвеева, Биофизика, **65** (4), 824 (2020).
9. G. E. Hutchinson, Ann. N. Y. Acad. Sci., **50**, 221 (1948).
10. В. Г. Ильичев, Биофизика, **53** (4), 697 (2008).
11. A. N. Frolov, Entomolog. Rev., **95** (2), 147 (2015).
12. А. В. Шабунин, Изв. вузов. Прикладная нелинейная динамика, **30** (6), 717 (2022).
13. Ф. М. Лосанова и Р. О. Кенетова, Нелинейный мир, **16** (1), 49 (2018).
14. C. Reed and J. M. Katz, Lancet, **375**, 1062 (2010).

15. M. I. Nelson, *J. Virol.*, **85** (2), 828 (2011).
16. A. Donnelly, R. Malik, and A. Elkholy, *Emerging Infect. Dis.*, **25** (9), 143 (2019).
17. R. B. Belshe, *Missouri Med.*, **109** (2), 119 (2012).
18. S. Wang, X. Zou, and Z. Li, *Front. Publ. Health*, **9** (6), 791600 (2021).
19. A. Mehregan, S. Pérez-Conesa, and Y. Zhuang, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1864** (10), 183994 (2022).
20. B. J. Willett, J. Grove, and O. MacLean, *Nature Microbiol.*, **7**, 1161 (2022). DOI: 10.1038/s41564-022-01143-7
21. D. Y. Chen, C. V. Chin, and D. Kenney, *Nature*, **615**, 143 (2023). DOI: 10.1038/s41586-023-05697-2
22. F. De Maio, *Microbes and Infection*, **22** (10), 592 (2020).
23. N. Brusselaers, D. Steadson, and K. Bjorklund, *Nature Human. Soc. Sci. Commun.*, **9**, 91 (2022). DOI: 10.1057/s41599-022-01097-5
24. H. Oshitani, *Nature*, **605**, 589 (2022). DOI: 10.1038/d41586-022-01385-9
25. <https://asia.nikkei.com/Spotlight/Coronavirus/Japan-weighs-downgrading-COVID-19-despite-record-high-deaths>.
26. K. McMahan, V. Giffin, and L. H. Tostanoski, *Med – Clinical and Translational Report*, **3** (4), 262 (2022). DOI: 10.1016/j.medj.2022.03.004
27. S. A. Kemp, D. A. Collier, R. P. Datir, et al., *Nature*, **592**, 277 (2021). DOI: 10.1038/s41586-021-03291-y
28. J. Douglas, D. Winter, and A. McNeill, *Nature Commun.* **13**, 6484 (2022). DOI: 10.1038/s41467-022-34186-9
29. M. D. April, D. P. Jason, and F. Naylor, *Southern Med. J.*, **115** (3), 115 (2022).
30. A. King, *New Science*, **246** (3280), 32 (2020).
31. G. Gerna, G. Campanini, F. Rovida, et al., *J. Med. Virol.*, **78** (7), 938 (2006). DOI: 10.1002/jmv.20645
32. A. Vabret, T. Mourez, S. Gouarin, et al., *Clin. Infect. Dis.*, **36** (8), 985 (2003). DOI: 10.1086/374222
33. <https://ncovtrack.com/country/france/regions>.
34. L. Loyal, J. Braun, and L. Henze, *Science*, **374** (6564), eabh1823 (2021).
35. A. M. Syed, T. Y. Taha, and T. Tabata, *Science*, **374** (6575), 1626 (2021).
36. Т. А. Зайчук, Ю. Д. Нечипуренко, А. А. Аджубей и др., *Молекуляр. биология*, **54** (6), 922 (2020).
37. J. Lim, A. T. Tan, and N. Le Bert, *J. Experim. Med.*, **219** (10), e20220780 (2022).
38. S. André, M. Picard, and R. Cezar, *Cell Death & Differentiation*, **29**, 1486 (2022). DOI: 10.1038/s41418-022-00936-x
39. D. M. Altmann, E. M. Whettlock, and S. Liu, *Nat. Rev. Immunol.*, (2023). DOI: 10.1038/s41577-023-00904-7
40. R. Uraki, S. Iida, P. Halfmann, et al., *BioRxiv*, ID 505450v1 (2022). DOI: 10.1101/2022.08.26.505450v1
41. <https://theconversation.com/covid-what-we-know-about-new-omicron-variant-bf-7-196323>.
42. M. Moriyama, C. Lucas, and V. S. Monteiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120** (16), 18 (2023).
43. П. М. Кравец, *Вестн. Самарского гос. университета. Естественно-научная серия*, **9** (110), 19 (2013).
44. А. У. Perevaryukha, *Biophysics*, **61** (2), 334 (2016).
45. Г. А. Мещеряков, В. А. Зуев, А. А. Иголкина и М. Г. Самсонова, *Биофизика*, **67** (3), 451 (2022).
46. А. Б. Медвинский, Б. В. Адамович, А. В. Русаков и др., *Биофизика*, **64** (6), 1169 (2019).
47. В. А. Дубровская, *Проблемы механики и управления: Нелинейные динамические системы*, **48**, 74 (2016).
48. А. Ю. Переварюха, *Биофизика*, **65** (1), 138 (2020).
49. R. Kundu, J. S. Narean, and L. Wang, *Nature Commun.*, **13**, 80 (2022). DOI: 10.1038/s41467-021-27674-x
50. A. D. Fakhroo, A. Thani, and H. M. Yassine, *Viruses*, **13** (1), 45 (2021). DOI: 10.3390/v13010045
51. S. Chawla and S. Chawla, *Microbiol. Insights*, **14** (4), 2021. doi:10.1177/11786361211041367
52. S. Mahanty, A. Prigent, and O. Garraud, *BMC Immunol.*, **16**, 31 (2015). DOI: 10.1186/s12865-015-0095-y
53. А. Ю. Переварюха, *Информатика и автоматизация*, **21** (3), 604 (2022).
54. А. В. Карпова, *Изв. Самарского научного центра РАН*, **17** (5), 1219 (2015).
55. В. В. Михайлов и Ю. С. Решетников, *Информационно-управляющие системы* **4** (95), 31 (2018).
56. Т. Н. Соловьева, *Информационно-управляющие системы*, **4** (83), 60 (2016).
57. A. V. Nikitina, *Comput. Mathem. Inform. Technol.*, **1** (1), 35 (2019).
58. А. Ю. Переварюха, *Динамические системы*, **7** (2), 157 (2017).
59. А. Ю. Переварюха, *Теория вероятностей и ее применения*, **68** (1), 182 (2023).
60. I. V. Trofimova, A. Yu. Perevaryukha, and A. B. Manvelova, *Techn. Phys. Lett.*, **48** (12), 305 (2022).
61. V. V. Mikhailov and I. V. Trofimova, *Techn. Phys. Lett.*, **48** (12), 301 (2022).
62. D. V. Desai and U. Kulkarni-Kale, *Methods Mol. Biol.*, **1184**, 333 (2014).
63. B. Zhang, R. Upadhyay, Y. Hao, et al., *BioRxiv*, ID 525203 (2023). DOI: 10.1101/2023.01.24.525203
64. Z. Sethna, Y. Elhanati, and C. Callan, *Bioinformatics*, **35** (17), 2974 (2019). DOI: 10.1093/bioinformatics/btz035
65. A. Kalok, S. Sharip, A. Hafizz, et al., *J. Environ. Res. Publ. Health*, **17**, 8522 (2020). DOI: 10.3390/ijerph17228522

## Trend Analysis of the Current Epidemic Situation and Analysis of Factors Underlying Local Uneven Spread of COVID cases

A.Yu. Perevaryukha\*

\*St. Petersburg Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 14-ya Linia 39, St. Petersburg, 199178 Russia

This research has been carried out by analyzing the specific processes of the local epidemic dynamics of COVID by comparing the qualitative differences in fluctuations in 2020 and 2023. Methods of nonlinear dynamics of the development of epidemic processes in a rapidly changing situation were used to identify and qualify trends and unique situations that sometimes changed extremely fast. A distinctive feature of the modern pandemic is a rather sharp change in local trends: the effect of the fading of the primary outbreak of the disease and the sudden sharp onset of a new epidemic wave after a long trend of decreasing daily infections. Minimization of the exposure to viral infections did not prevent spreading the virus but created the illusion of success. The existing experience in generating forecasts of epidemic outbreaks based on models of past epidemic processes could not help when faced with a new evolving virus. The previously obtained understanding of the development and completion of epidemic processes of influenza virus strains more likely hindered the prediction of the scenario for the completion of the spread of a new infection, which is also associated with the eventual nature of the process and a variety of dynamic situations. A victory over COVID in the phase of the minimum after the wave, which was announced by many countries, turned out to be premature. New Zealand and Japan, which opted for a strict lockdown strategy in 2020, had a surge of COVID cases in early 2023 because new strains came into circulation. Outbreaks of respiratory diseases known as the Spanish flu and swine flu pandemics, data from which were used by many countries to make predictions, had run their course naturally in two or three waves of illness. At the beginning of 2023, against the backdrop of a global positive trend, some countries have reported a record rise in both mortality and daily morbidity due to the emergence of locally circulating “alarm” strains. A current stage on isolation of stable regional strains substantiates the classification of a series of differentiated properties of the dynamics of regional epidemic situations. Among the observed epidemic effects, extreme phenomena in the form of instantaneous bifurcation destruction of established regimes such as a sharp transition from long-term damped oscillations to a new exponential outbreak in some infections are separately highlighted. The selected options for the development of epidemic transient oscillatory processes are separately introduced in equation forms with delay for local epidemic trends. Equations are proposed to describe three variants of development of the observed stages of local epidemics. The task of constructing a generalized predictive model of a pandemic to describe interrelated regional processes at this stage seems insoluble.

*Keywords: epidemic waves, features of regional epidemics, oscillation decay scenarios, coronavirus evolution, equations with delay, bifurcations of oscillatory regimes, factors of subpopulation immune resistance to COVID*

УДК 577.3

## ВЫСОКОДОЗОВАЯ ИНГАЛЯЦИЯ ГАЗООБРАЗНОГО ОКСИДА АЗОТА ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

© 2023 г. А.В. Пекшев\*, А.Б. Вагапов\*, Н.А. Шарапов\*, А.Ф. Ванин\*\*.\*#

\*Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,  
2-я Бауманская ул., 5/1, Москва, 105005, Россия

\*\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,  
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

#E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 14.09.2023 г.

После доработки 14.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

На двух ВИЧ-инфицированных пациентах продемонстрировано лечебное действие высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота (при концентрации NO не менее 1000 ppm). Ингаляционная NO-терапия приводила к быстрому снижению вирусной нагрузки до необнаруживаемого уровня, который сохранялся и после периода аналитического прерывания лечения. Делается предположение, что купирование ВИЧ-инфекции осуществляется катионами нитрозония  $\text{NO}^+$ , образующимися в крови из поступающих в нее нейтральных молекул NO. Последующее превращение катионов  $\text{NO}^+$  в их реакции с анионами гидроксила в анионы нитрита предотвращается связыванием катионов  $\text{NO}^+$  с анионами хлора с образованием в крови нитрозохлорида. Поступление этого агента из крови в клетки и ткани обеспечивает перенос в них катионов  $\text{NO}^+$ . Взаимодействие нитрозохлорида с тиолами может приводить к появлению в клетках и тканях как доноров NO соответствующих S-нитрозотиолов.

*Ключевые слова:* ингаляция оксида азота, ВИЧ-инфекция, вирусная нагрузка, резервуары ВИЧ, коронавирус SARS-CoV-2, аппарат «ПЛАЗОН».

DOI: 10.31857/S0006302923050289, EDN: NBAREQ

Инфекционное заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция), является хронической неизлечимой болезнью. За 40 лет, прошедших со времени открытия вируса иммунодефицита человека в 1983 г., так и не было разработано способа лечения этой инфекции, который мог бы устранить вирус из организма. Это является следствием особенностей самого вируса, который формирует в организме резервуары (хранилища) вируса, где происходит репликация ВИЧ на всех стадиях ВИЧ-инфекции — анатомические резервуары (санктuariи), локализованные в основном в тканях центральной нервной системы и в лимфоидной ткани кишечника, и клеточные резервуары, наиболее важной частью которых являются микроглиальные клетки центральной нервной системы [1–4]. Поиски антивирусного агента,

который мог бы быть доставлен к вирусным резервуарам, проникнуть в них и прекратить или затормозить репликацию ВИЧ, пока не увенчались успехом.

Одним из таких потенциально возможных антивирусных агентов, по мнению многих исследователей, является оксид азота (NO), молекулы которого посредством реализации различных механизмов могут оказывать антивирусное действие [5–8], в том числе и на ВИЧ. Проблема «ВИЧ и оксид азота» посвящено значительное число публикаций — медицинская база данных PubMed содержит 651 научную работу за период с 1993 по 2023 год.

Следует отметить, что часто публикации содержат противоречивые данные по влиянию экзогенного оксида азота, выделяющегося из его доноров, на репликацию вируса иммунодефицита человека типа 1. С одной стороны, в работах [9–11] было показано, что *in vitro* экзогенный NO уменьшает репликацию ВИЧ-1 в культуре инфицированных им клеток астроцитомы и в культуре инфицированных периферических мононукле-

*Сокращения:* ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, АРВТ — антиретровирусная терапия, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

арных клеток крови, так что в работе [11] предполагается, что этот факт открывает путь к возможному использованию NO-выделяющих лекарственных средств для уменьшения репликации ВИЧ-1 *in vivo*. С другой стороны, в работе [12] представлены совершенно противоположные данные — экзогенный оксид азота не подавлял, а стимулировал репликацию ВИЧ-1 в культуре инфицированных периферических мононуклеарных клетках крови. В результате в обзорной работе [13] делается вывод, что оксид азота может оказывать на ВИЧ-1 двойственное действие — как ингибирующее, так и стимулирующее его репликацию.

В связи с этим мы решили на практике посмотреть, действительно ли молекулы NO при их введении в организм ВИЧ-инфицированных пациентов в газовой форме (путем ингаляции) могут влиять на течение ВИЧ-инфекционного заболевания.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Пациенты.** Изучение влияния повышения биологической доступности оксида азота в организме человека методом высокодозовой ингаляции газообразного NO на течение ВИЧ-инфекции было проведено в двух наблюдениях ВИЧ-инфицированных пациентов, давших добровольное информированное согласие на участие в исследованиях.

Наблюдение № 1: пациент X., возраст 33 года, инфицирован ВИЧ в 2019 г., получает антиретровирусную терапию (АРВТ) с 25 марта 2019 г. (тенофовир/эфаверенз/эмтрицитабин в дозах 300 мг/600 мг/200 мг один раз в сутки). Исходно определенная вирусная нагрузка при диагностировании заболевания составила ~65000 копий РНК ВИЧ в 1 мл плазмы, через полгода приема АРВТ снизилась до ~500 копий и оставалась практически неизменной до начала высокодозовой NO-ингаляции в июле 2022 г.

Наблюдение № 2: пациент H., возраст 30 лет, инфицирован ВИЧ в январе 2023 г., антиретровирусная терапия не назначена, через 8 недель после обнаружения антител к ВИЧ вирусная нагрузка составила 1300 копий РНК ВИЧ в 1 мл плазмы. Ингаляционная NO-терапия начата через 11 недель с момента диагностирования заболевания.

**Техническое обеспечение.** Высокодозовую ингаляцию газообразного оксида азота осуществляли с использованием аппарата «ПЛАЗОН» (ТУ 9444-001-96571701-2007, зав. № 382, произведен ООО «ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана» (Москва) в 2014 г., регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00583 от 21 марта 2012 г.), снабженного специально разработанным для лечения COVID-19 ингаляционным манипулятором —

плазмохимическим генератором газообразного оксида азота из атмосферного воздуха. Описание конструкции манипулятора и основные физико-химические параметры формируемого им NO-содержащего газового потока приведены в работе [14].

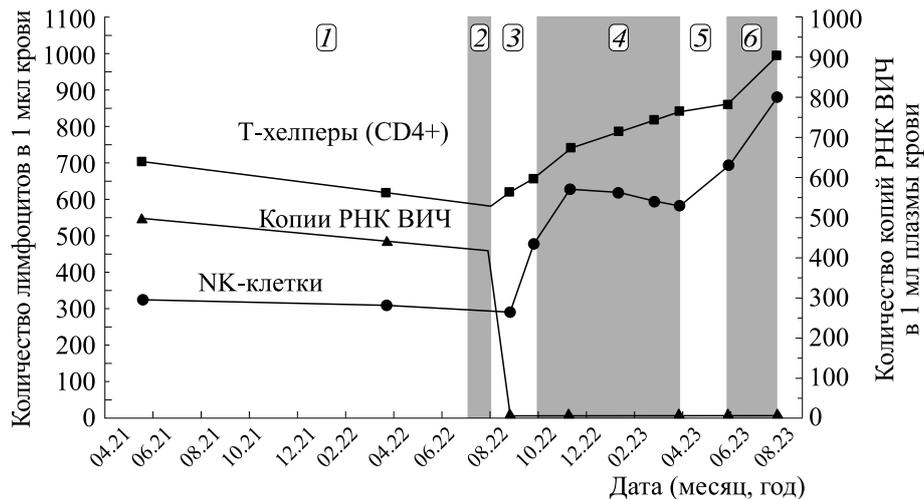
**Методика использования высокодозовой ингаляции газообразного NO.** Ингаляционное введение газообразного оксида азота в организм является простейшей неинвазивной процедурой и осуществлялось пациентами при спокойном спонтанном вдыхании воздушной смеси, содержащей оксид азота, через рот или нос ежедневно по 5–6 мин два раза в день (утром и вечером) при расстоянии между концом манипулятора и областью вдоха ~8 см (обеспечивается длиной дистанционатора), при этом концентрация оксида азота во вдыхаемом воздухе составляла 1000–1100 ppm. Вопросы безопасности применения такой NO-ингаляции обсуждались нами ранее в работах [14–16].

**Методы контроля.** Вирусологический контроль за течением ВИЧ-инфекции при высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота осуществлялся обнаружением РНК ВИЧ количественным (диапазон измерения 40–10<sup>7</sup>, аналитическая чувствительность 25 копий/мл) и качественным ультрачувствительным (аналитическая чувствительность 20 копий/мл) исследованием методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также качественным обнаружением ПЦР-исследованием провирусной ДНК ВИЧ. Дополнительно в наблюдении № 1 проводили периодическое исследование иммунного статуса пациента (в основном для контроля абсолютного количества CD4+ лимфоцитов – Т-хелперов).

Все анализы выполняли в лаборатории Центрального НИИ эпидемиологии (сертификат ответственности № RU.097A.00402).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

**Наблюдение № 1** проводилось в течении 13 месяцев – с июля 2022 г. по август 2023 г., результаты этого наблюдения приведены на рис. 1. Оказалось, что уже после первого трехнедельного курса ингаляционной NO-терапии по данным количественного ПЦР-исследования вирусная нагрузка с 438 копий РНК ВИЧ в 1 мл плазмы, зафиксированных при приеме только АРВТ в апреле 2022 г., снизилась до необнаруживаемого уровня и стабильно оставалась таковой в течении последующих 11 месяцев наблюдения при разных схемах лечения, но без отказа от АРВТ. Вместе с тем в феврале 2023 г. ультрачувствительным качественным ПЦР-исследованием РНК ВИЧ в плазме крови обнаруживалась, равно как и качествен-



**Рис. 1.** Результаты наблюдения пациента № 1. Лечение: 1 – 40 месяцев АРВТ, 2 – 3 недели АРВТ + ингаляция NO, 3 – 2 месяца АРВТ, 4 – 6 месяцев АРВТ + ингаляция NO, 5 – 2 месяца АРВТ, 6 – 2 месяца АРВТ + ингаляция NO.

ным ПЦР-исследованием в образцах крови пациента обнаруживалась провирусная ДНК ВИЧ. Однако такие же исследования, выполненные в августе 2023 г., показали полное отсутствие в плазме РНК ВИЧ, хотя провирусная ДНК ВИЧ была обнаружена (табл. 1).

Исследования иммунного статуса пациента показывают, что абсолютные значения количества субпопуляционных лимфоцитов в крови – Т-лимфоцитов, Т-киллеров, В-лимфоцитов – в период наблюдения практически не меняются (данные в настоящей статье не приводятся), однако после достижения необнаруживаемого уровня вирусной нагрузки происходит постепенное повышение абсолютного количества Т-хелперов и резкий рост абсолютного количества NK-клеток (рис. 1), более чем в два раза превышаю-

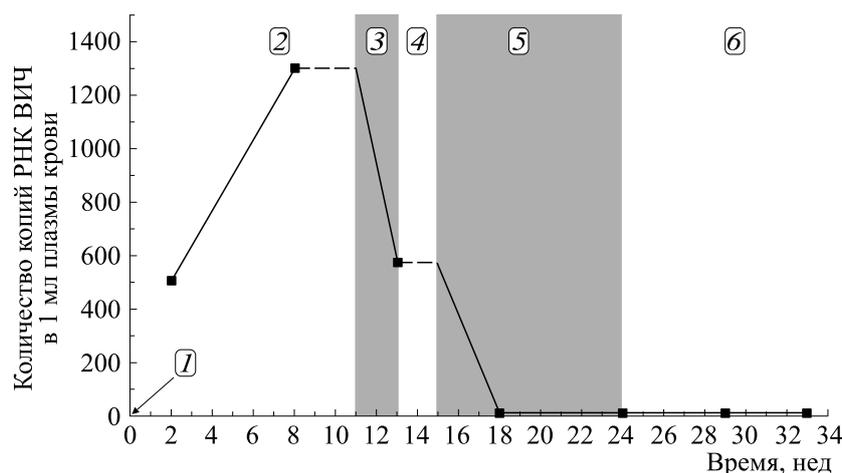
щего верхнее значение референсного диапазона (123–369 клеток/мкл).

**Наблюдение № 2** проводилось в течении 33 недель с января по сентябрь 2023 года, результаты определения вирусной нагрузки количественным ПЦР-исследованием пациента без лечения АРВТ представлены на рис. 2. Получено, что после первого двухнедельного курса ингаляционной NO-терапии произошло ее снижение с зафиксированных до начала лечения 1300 копий РНК ВИЧ в 1 мл плазмы практически в 2.3 раза – до 576 копий/мл, а после последующего трехнедельного лечения NO-ингаляцией вирусная нагрузка упала до необнаруживаемого уровня, что сравнимо с результатами NO-ингаляции в наблюдении № 1. После девятинедельного аналитического прерывания лечения ингаляционной NO-терапией ро-

**Таблица 1.** Результаты вирусологических исследований в конце периода наблюдений

Наблюдение		№ 1. Пациент X.	№ 2. Пациент H.*
Лечение		АРВТ + ингаляция NO	Ингаляция NO
ПЦР-исследование	РНК ВИЧ количественное	Не обнаружена	Не обнаружена
	РНК ВИЧ качественное ультрачувствительное	Не обнаружена	Обнаружена
	ДНК ВИЧ качественное	Обнаружена	Обнаружена
Возможное излечение		Функциональное	Функциональное

Примечание. \* – Пациент после 9 недель аналитического прерывания лечения.



**Рис. 2.** Результаты наблюдения пациента № 2: 1 – методом ИФА 18.01.2023 обнаружены антитела к ВИЧ, 2 – 11 недель без лечения, 3 – 2 недели ингаляция NO, 4 – 2 недели без лечения, 5 – 9 недель ингаляция NO, 6 – 9 недель без лечения (период аналитического прерывания ингаляции NO).

ста вирусной нагрузки не произошло, она осталась на необнаруживаемом количественным ПЦР-исследованием уровне. Вместе с тем ультрачувствительным качественным ПЦР-исследованием РНК ВИЧ в плазме крови обнаружена, равно как и качественным ПЦР исследованием в образцах крови пациента обнаружена провирусная ДНК ВИЧ (табл. 1).

Полученные вирусологические данные наблюдений о быстром достижении необнаруживаемого уровня вирусной нагрузки и отсутствии ее роста после аналитического прерывания лечения высокодозовой ингаляцией газообразного оксида азота свидетельствуют либо о существенном уменьшении объемов резервуаров ВИЧ, либо об их полном уничтожении. Вместе с тем не удается полностью устранить из организма латентно инфицированные клетки, содержащие провирусную ДНК ВИЧ.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что высокодозовая NO-ингаляция ВИЧ-инфицированных пациентов при концентрации этого агента во вдыхаемом воздухе 1000–1100 ppm если и не может обеспечить их полное излечение (эрадикацию), то демонстрирует результаты, недостижимые при использовании традиционного метода антиретровирусной терапии. Это различие определяется главным образом тем, что антивирусное действие АРВТ осуществляется в основном в кровеносной системе и практически не оказывает влияния на резервуары ВИЧ, тогда как

антивирусное действие ингаляционной NO-терапии осуществляется также и в этих резервуарах. Об этом свидетельствует как быстрое по сравнению с АРВТ (в течение ~3 недель) снижение вирусной нагрузки до необнаруживаемого уровня, так и отсутствие роста вирусной нагрузки после девятинедельного аналитического прерывания лечения NO-ингаляцией, что может говорить либо о полном уничтожении резервуаров ВИЧ, либо о существенном снижении их вирусной активности. Что касается АРВТ, то из работы [17] следует, что после аналитического прерывания лечения этим методом у большинства пациентов рост вирусной нагрузки наблюдается в течение первых четырех недель отсутствия лечения.

В соответствии с современными представлениями оксид азота сам по себе не оказывает токсического действия на биообъекты, оно появляется лишь после превращения NO в реакции с супероксидом в пероксинитрит, распадающийся при физиологических значениях pH на диоксид азота и чрезвычайно токсические гидроксильные радикалы. Наряду с этим существует и другое представление о природе агента, ответственного за токсический эффект, обнаруживаемый в живых организмах при появлении в них оксида азота. В качестве такого агента может выступать катион нитрозония NO<sup>+</sup>, образующийся в живых организмах при одноэлектронном окислении NO.

Какой же из этих агентов – пероксинитрит или катион нитрозония – мог быть ответственным за обнаруженное нами лечебное действие высокодозовой NO-ингаляции у ВИЧ-инфици-

рованных пациентов? Есть основание утверждать, что в качестве такого агента (или агентов) могли выступать катионы нитрозония!

Уже первые исследования биологического действия газообразного NO, вводимого в организм животных по дыхательному пути (путем его ингаляции), дали неожиданный результат. Оказалось, что молекулы NO, попадая через легкие в кровь, абсолютно не влияют на артериальное давление в большом круге кровообращения, снижая его только в малом круге – в легких [18]. Этот результат можно было объяснить тем, что, связываясь в форме нитрозильных гем-содержащих комплексов с гемоглобином, молекулы NO окислялись до нитрита/нитрата и полностью «выходили из игры» с одновременным «выходом из игры» соответствующей части гемовых групп в результате их окисления до метгемоглобина. Как нами было показано, таким образом можно было объяснить сохранение системного артериального давления у добровольцев при ингаляции им потока газообразного NO с концентрацией не более 200 ppm [15]. Однако при более высоких концентрациях NO в этом потоке, доходивших до 1000–2000 ppm, такое объяснение сохранения системного артериального давления оказалось неправомочным. Дело в том, что при такой высокодозовой ингаляции NO значительная часть этого агента оказывалась не связанной с гемоглобином, превращаясь в некое соединение, неспособное улетучиваться из организма добровольцев вместе с выдыхаемым воздухом [15]. В последующих аналогичных экспериментах на крысах было показано, что таким соединением вероятнее всего является именно катион нитрозония  $\text{NO}^+$ . Этот вывод был сделан исходя из того, что при одновременной ингаляции крысам газообразного NO и внутривенного введения им раствора тиолов, например глутатиона, сразу же после его введения начиналось резкое снижение системного артериального давления [19]. Очевидной причиной этого могло быть связывание тиолов с катионами нитрозония с образованием соответствующих S-нитрозотиолов (RS-NO), способных в качестве доноров NO инициировать вазодилатацию и тем самым гипотензию. Другие возможные доноры NO – динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, которые могли бы возникнуть в организме животных в присутствии экзогенного NO и тиолов, в работе [19] обнаружены не были, так что единственными возникающими в этих условиях соединениями, которые способны инициировать обнаруженную гипотензию, могли быть только RS-NO.

Таким образом, исходя из этих данных, есть основание предполагать, что поступающие в кровь ВИЧ-инфицированных пациентов молекулы NO при их высокодозовой (не менее 1000 ppm) ингаляции практически полностью превращаются в катионы нитрозония, и именно они, а не нейтральные молекулы NO, подавляют репликацию ВИЧ, причем как в крови, так и в резервуарах (хранилищах) этого вируса.

В связи с этим встает вопрос – каким образом может обеспечиваться сохранение в крови катионов нитрозония, т. е. предотвращаться их превращение при нейтральных значениях pH в анионы нитрита в результате реакции катионов нитрозония с анионами гидроксила? Не исключено, что в качестве конкурентов этих анионов в крови могут выступать анионы хлора, связывание которых с катионами нитрозония должно приводить к образованию сравнительно стабильных молекул нитрозохлорида  $\text{NO}^+-\text{Cl}^-$  [19]. В силу своей нейтральности эти молекулы, проникая через клеточные мембраны, могут во внутриклеточном пространстве как доноры  $\text{NO}^+$  S-нитрозировать тиолы. В результате клетки и ткани могут подвергаться действию как катионов  $\text{NO}^+$ , высвобождающихся из нитрозохлорида, так и молекул NO, высвобождающихся из образующихся S-нитрозотиолов RS-NO. Таким образом может обеспечиваться разнообразное биологическое действие исходно газообразного NO при его ингаляционном введении в организм человека и животных – как положительное, регуляторное, так и негативное, токсическое. О проявлении такого действия газообразного NO, превращающегося в крови в катионы нитрозония, свидетельствуют результаты наших публикаций [14, 16], в которых сообщается о подавлении у пациентов вирусной инфекции SARS-CoV-2 и купировании постковидного синдрома.

Насколько нам известно, предположение о роли нитрозохлорида в качестве соединения, обеспечивающего функционирование катионов нитрозония как биологически активных агентов, до сих пор не исследовалось.

Как показано в работах [20–22], в качестве доноров  $\text{NO}^+$  в живых организмах могут выступать и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, железо-динитрозильные фрагменты которых характеризуются резонансной структурой  $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)]$  и в силу этого могут высвобождать как катионы нитрозония, так и нейтральные молекулы NO. В экспериментах на сирийских хомячках, инфицированных

SARS-CoV-2, было продемонстрировано ослабление этой инфекции при ингаляции животным распыленного раствора биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом, которое резко усиливалось при последующей ингаляции этим животным распыленного раствора диэтилдитиокарбамата, вызывавшего распад этих комплексов с высвобождением из них катионов нитрозония [20]. Такой же результат был получен в аналогичных опытах на культуре опухолевых клеток MCF-7 и Jurkat [21, 22].

В заключении, суммируя (обобщая) полученные нами результаты наблюдений, можно отметить четыре существенных (если не принципиальных) отличия традиционной антиретровирусной терапии от терапии высокодозовой ингаляцией газообразного оксида азота, которая, видимо, позволяет:

– осуществлять антивирусное действие катионами нитрозония в резервуарах ВИЧ, приводящее к существенному уменьшению их объемов или к их полной ликвидации;

– осуществлять перевод ВИЧ-инфекции из хронической формы заболевания в форму латентной инфекции, которая при условии восстановления иммунной системы может не требовать дальнейшего лечения;

– осуществлять антивирусное действие катионами нитрозония вне зависимости от разновидностей штаммов и мутаций вируса иммунодефицита человека;

– осуществлять лечение без риска возникновения побочных эффектов.

Публикуя эту статью и понимая, что полученные нами результаты являются даже не первым, а нулевым шагом в изучении возможности излечения ВИЧ-инфекции новым методом – высокодозовой ингаляцией газообразного оксида азота – мы надеемся привлечь к этой теме внимание и интерес ученых, специализирующихся на проблеме вируса иммунодефицита человека.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в инициативном порядке. Стоимость лабораторных исследований оплачивалась личными средствами наблюдаемых пациентов и авторов статьи.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедуры, выполненные в работе с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Р. Бобкова, ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии, **12** (1), 22 (2020).
2. S. Kramer-Hämmerle, I. Rothenaigner, H. Wolff, et al., *Virus Res.*, **111**, 194 (2005).
3. T.-W. Chun, D. C. Nickle, J. S. Justement, et al., *J. Infect. Dis.*, **197** (5), 714 (2008).
4. S. Castro-Gonzalez, M. Colomer-Lluch, and R. Serra-Moreno, *AIDS Res. Human Retroviruses*, **34** (9), 739 (2018).
5. C. S. Reiss and T. Komatsu, *J. Virol.*, **72** (6), 4547 (1998).
6. M. R. Garren, M. Ashcraft, Y. Qian, et al., *Appl. Mater. Today*, **22**, 100887 (2021).
7. F. Lisi, A. N. Zelikin, and R. Chandrawati, *Adv. Sci.*, **8** (7), 2003895 (2021).
8. F. Sodano, E. Gazzano, R. Fruttero, et al., *Molecules*, **27**, 2337 (2022).
9. T. Persichini, M. Colasanti, M. Fraziano, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 200 (1999).
10. J. B. Mannick, J. S. Stampler, E. Teng, et al., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **22** (1), 1 (1999).
11. T. Persichini, P. Ascenzi, V. Colizzi, et al., *Int. J. Mol. Med.*, **4**, 365 (1999).
12. J. L. Jimenez, J. Gonzalez-Nicolas, S. Alvarez, et al., *J. Virol.*, **75** (10), 4655 (2001).
13. D. Torre, A. Pugliese, and F. Speranza, *Lancet Infect. Dis.*, **2**, 273 (2002).
14. Е. В. Печёнкин, А. В. Коврижкин, А. В. Пекшев и др., *Биофизика*, **67** (6), 1251 (2022).
15. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., *Биофизика*, **66** (1), 183 (2021).
16. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, Е. В. Печёнкин и др., *Биофизика*, **68** (1), 142 (2023).
17. J. Z. Li, B. Etemad, H. Ahmed, et al., *AIDS*, **30** (3), 343 (2016).
18. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.*, **110**, 2315 (1997).
19. А. Ф. Ванин, А. А. Абрамов, А. Б. Вагапов и др., *Биофизика*, **68** (6) (2023) (в печати).
20. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др., *Биофизика*, **67** (5), 969 (2022).
21. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 93 (2021).
22. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **40**, 1340 (2006).

## High- Dose Nitric Oxide Gas Inhalation for HIV Infection

A.V. Pekshev\*, A.B. Vagapov\*, N.A. Sharapov\*, and A.F. Vanin\*\*

\*N.E. Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia

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

Therapeutic effect of high-dose nitric oxide gas inhalation (NO concentration was not less than than 1000 ppm) on two patients with HIV infection was shown. Inhaled NO therapy led to a rapid decrease in viral load to an undetectable level which was persistent even after analytical treatment interruption. It is suggested that HIV infection is controlled by nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) cations, the oxidized form of neutral NO molecules that enter the blood. Subsequent conversion of  $\text{NO}^+$  cations into nitrite anions due to a reaction with hydroxyl ions is inhibited by the binding of  $\text{NO}^+$  cations and chloride anions leading to the formation of nitrosyl chloride in the blood. Further entry of nitrosyl chloride into cells and tissues ensures  $\text{NO}^+$  transfer to them. Interaction between nitrosyl chloride and thiols requires the appearance of relevant S-nitrosothiols as NO donors in cells and tissues.

*Keywords: nitric oxide inhalation, HIV infection, viral load, HIV reservoir, SARS-CoV-2, PLASON device*

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ РАНЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ СВЧ-ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ И ЛАЗЕРНОЙ ДОПЛЕРОМЕТРИИ

© 2023 г. © 2023 г. А.К. Мартусевич\*, \*\*, #, А.В. Суrowегина\*, \*\*, В.В. Назаров\*, А.С. Федотова\*

\*Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, 603005, Россия

\*\*Нижегородский государственный агротехнологический университет, просп. Гагарина, 97, Нижний Новгород, 603107, Россия

# E-mail: [cryst-mart@yandex.ru](mailto:cryst-mart@yandex.ru)

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 06.05.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Целью работы служила разработка и апробация комбинированного метода оценки структурно-функциональных особенностей ожоговой раны и околораневой зоны, включавшей СВЧ-диэлектрoметрию и доплерометрию. Исследование выполнено на двадцати крысах линии Вистар, которым моделировали контактную термическую травму, и десяти здоровых животных. Оценку состояния раны выполняли через 24 и 72 ч после нанесения травмы. Изучение диэлектрических свойств тканей осуществляли с помощью программно-аппаратного комплекса для ближнепольного резонансного СВЧ-зондирования. Проведенные исследования позволяют заключить, что в ранний послеожоговый период (первые сутки) в тканях раны наблюдается резкое согласованное снижение интенсивности микроциркуляции и диэлектрической проницаемости, постепенно и частично восстанавливаемое к завершению трех суток после нанесения ожога. В околораневой зоне регистрируется компенсаторная активация кровотока, приводящая к увеличению степени гидратации тканей, что проявляется повышением обоих указанных показателей. Кроме того, показано, что при термической травме формируется регуляторный дисбаланс факторов, обеспечивающих капиллярный кровоток в зоне ожога и окружающих ее тканях, носящий компенсаторный характер и, в отсутствие адекватной коррекции, способствующий угнетению процессов регенерации. Таким образом, сочетание применения рассматриваемых методов позволяет полноценно охарактеризовать структурно-функциональные особенности анализируемой ткани и их динамику. Это отчетливо проявляется на примере экспериментальной ожоговой раны.

*Ключевые слова:* рана, диэлектрические свойства, микроциркуляция, ближнепольное СВЧ-зондирование, лазерная доплеровская флоуметрия.

DOI: 10.31857/S0006302923050290, EDN: NBBWQP

В экспериментальных исследованиях и клинической практике важным критерием состояния раны и околораневой зоны является сохранность анатомических структур и адекватности их кровоснабжения [1–4]. Общеизвестным диагностическим методом верификации этих параметров служит гистологическое исследование [5–7], однако в большинстве случаев реализовать его прижизненно крайне затруднительно. В связи с этим представляет интерес раскрытие возможностей современных неинвазивных технологий

оценки структурно-функциональных особенностей тканей [1, 8]. В то же время такие высокоинформативные методы как ультразвуковое исследование и компьютерная и магнитно-резонансная томография применимы не для всех тканей и имеют целый ряд физических и биомедицинских ограничений (например, невозможность проведения исследования через раневые покрытия или при обилии экссудата, в условиях продолжающегося умеренного кровотечения) [1, 8, 9].

На этом основании представляется перспективным изучение диагностического потенциала инновационных неинвазивных универсальных технологий. К ним, в частности, могут быть отне-

*Сокращения:* СВЧ – сверхвысокочастотный, ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия.

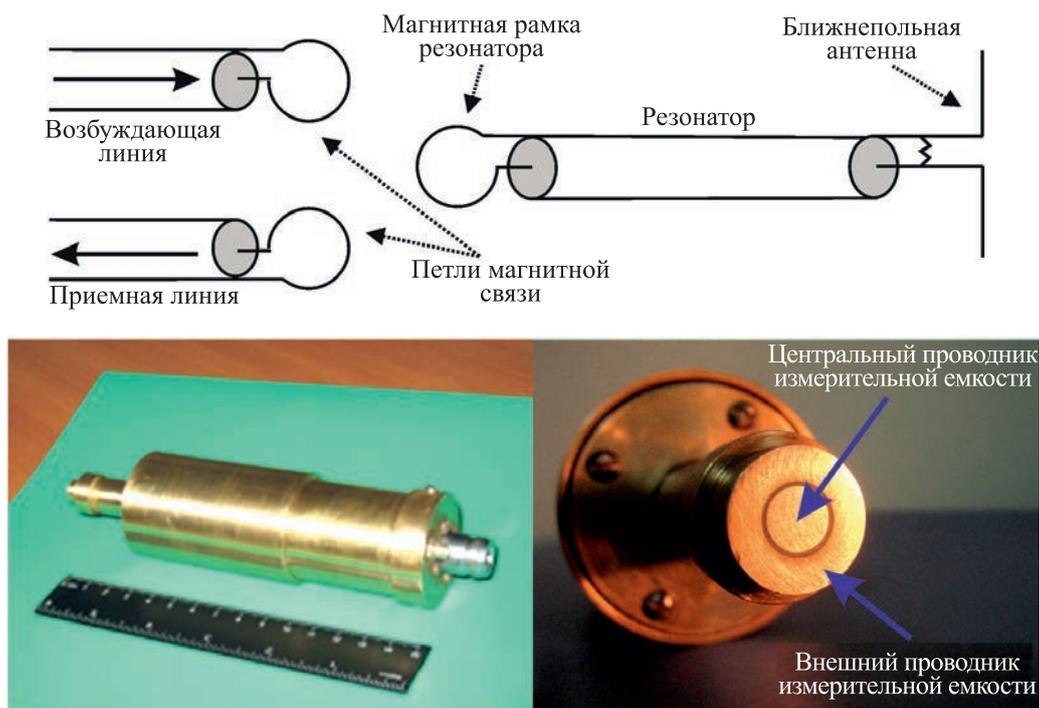


Рис. 1. Характерная схема и внешний вид резонансной ближнепольной измерительной системы.

сены ближнепольное резонансное сверхвысокочастотное (СВЧ) зондирование биологических тканей [8–12] и лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) [13, 14].

Цель работы – разработка и апробация комбинированного метода оценки структурно-функциональных особенностей ожоговой раны и околораневой зоны, включавшей СВЧ-диэлектрometriю и доплерометрию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 30 белых крысах-самцах линии Wistar (возраст – 2.5–3.0 месяца, масса – 200–250 г.), полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России (Москва). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Работа с животными соответствовала правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986.

Исследование выполнено на 20 крысах, которым моделировали контактную термическую травму, и 10 здоровых животных. Моделирование травмы проводили с использованием устройства собственной конструкции по ранее описанному нами методу [9, 16, 17].

Оценку состояния раны выполняли через 24 и 72 ч после нанесения травмы. Использовали по три точки на поверхности раны и околораневой зоны. По каждой из этих групп точек проводили усреднение.

Изучение диэлектрических свойств тканей осуществляли с помощью программно-аппаратного комплекса для ближнепольного резонансного СВЧ-зондирования. Основными оцениваемыми показателями при этом служили электрическая проницаемость и проводимость биообъекта [15–17].

Измерение импеданса антенн было реализовано с помощью специального резонансного датчика, схематически изображенного на рис. 1. Датчик представляет собой СВЧ-резонатор в виде отрезка линии передачи (коаксиальной) [17–19]. На одном конце этого отрезка находится зондирующая ближнепольная антенна (измерительная емкость), на противоположном конце расположена магнитная рамка. Возбуждение резонатора и прием его отклика осуществляются при помощи петель магнитной связи, расположенных вблизи магнитной рамки резонатора. Все элементы резонансной системы за исключением измерительной емкости располагаются в металлическом цилиндрическом корпусе. Используемая в данном эксперименте собственная резонансная частота датчика составляла 797 МГц, характерная добротность – 150.

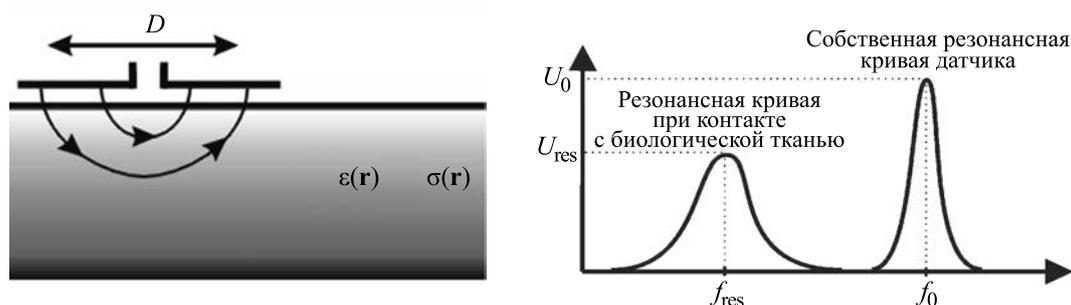


Рис. 2. Поведение резонансной характеристики датчика при контакте с биообъектом.

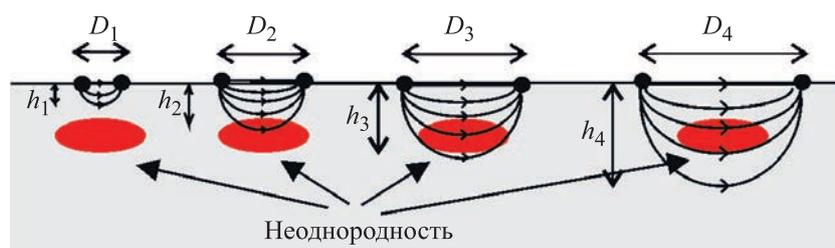


Рис. 3. Иллюстрация глубинного зондирования неоднородных сред методом резонансной ближнепольной СВЧ-томографии.

При контакте ближнепольной антенны с поверхностью биообъекта происходят изменения резонансной частоты датчика и амплитуды сигнала на резонансе (рис. 2), по значениям которых находится импеданс антенны.

Схема, иллюстрирующая глубинное зондирование биологической ткани в рамках ближнепольной СВЧ-томографии, представлена на рис. 3. Ближнепольная антенна находится на поверхности изучаемого объекта, ее квазистатическое электрическое поле проникает внутрь среды на глубину, определяющуюся конструкцией антенны и размером ее апертуры ( $D$ ). При увеличении апертуры  $D$  будет увеличиваться глубина проникновения электрического поля в среду [18, 19].

У разработанных в настоящее время ближнепольных диагностических систем ключевое соотношение «размер апертуры зонда ( $D$ )/длина волны зондирующего СВЧ-сигнала ( $\lambda$ )» доходит до уровня  $10^5$ – $10^6$ , что по сравнению с волновыми методиками дает возможность изучать состояние и структурные особенности тканей по их электродинамическим свойствам с субволновым пространственным разрешением (существенно меньшим длины волны  $\lambda$ ).

Применительно к ближнепольной СВЧ-томографии кожи в качестве зондирующего элемента (измерительной емкости) используется краевая емкость цилиндрического конденсатора, внешняя обкладка которого оканчивается металличе-

ским фланцем (рис. 4). Именно такая конфигурация антенны позволяет реализовать глубины зондирования, необходимые для исследования структурных слоев кожи. Согласно рис. 3, в такой антенне присутствуют три главных элемента, расположенных concentrically изнутри кнаружи: центральный проводник, фторопластовый изолятор и внешняя обкладка конденсатора с круглым металлическим фланцем. На рис. 4 представлено качественное распределение зондирующего электрического поля.

Таким образом, ближнепольное резонансное СВЧ-зондирование, благодаря заложенным в него физическим принципам, дает возможность варьировать глубину и поверхностную площадь исследования биологических объектов, используя в качестве диагностических критериев электродинамические характеристики среды – ее диэлектрическую проницаемость и проводимость.

Исследование состояния микроциркуляции в тканях раны и окolorаневой зоны осуществляли методом ЛДФ с использованием аппарата «ЛАКК-02» (ООО «ЛАЗМА», Москва) [13]. Для диагностики применяется зондирование ткани лазерным излучением. Согласно данным разработчиков метода А.И. Крупаткина и В.В. Сидорова, обработка отраженного от ткани излучения основана на выделении из зарегистрированного сигнала доплеровского сдвига частоты отраженного сигнала, пропорционального скорости движения частиц в микроциркуляторном русле. В хо-

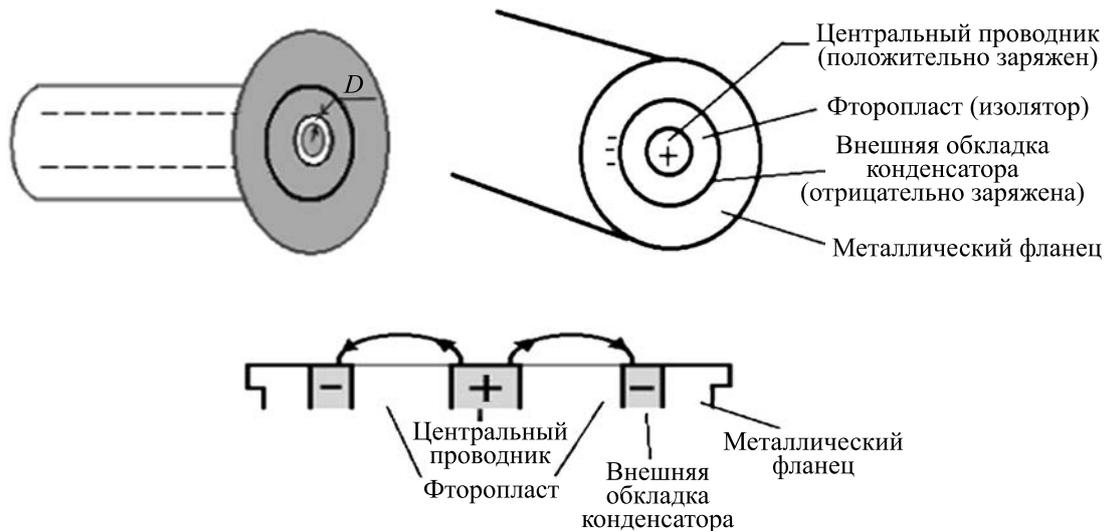


Рис. 4. Схема измерительного датчика.

для проводимых исследований обеспечивается регистрация изменения потока крови или лимфы в микроциркуляторном русле — флоуметрия. Мониторинг интенсивности кровотока по микрососудам выполняли по показателю микроциркуляции, а его регуляторное обеспечение — по амплитуде внешних и внутренних факторов на основании амплитудно-частотного анализа [13]. Все частотные диапазоны были скорректированы для тканей крыс.

Результат флоуметрии может быть представлен выражением:

$$ПМ = K \cdot N \cdot V_{cp},$$

где  $ПМ$  — показатель микроциркуляции (амплитуда сигнала в вольтах),  $K$  — коэффициент пропорциональности ( $K = 1$ ),  $N_{эр}$  — число рассеивателей (эритроцитов) в зондируемом объеме ткани,  $V_{cp}$  — средняя скорость рассеивателей в зондируемом объеме. Основные рассеивающие частицы в микрососудах крови — эритроциты, в микролимфососудах — рассеиватели из интерстиции, попадающие в лимфатические микрососуды в процессе лимфообразования.

Показатель микроциркуляции дает общую оценку состояния микроциркуляции крови, а более детальный анализ функционирования микроциркуляторного русла проводится на втором этапе обработки ЛДФ-грамм, когда анализируется амплитудно-частотный спектр колебаний перфузии. По величинам амплитуд колебаний микрокровотока в конкретных частотных диапазонах возможно оценивать функциональное состояние определенных механизмов контроля перфузии. Для расчета амплитудно-частотного спектра применяется несколько способов математической обработки: быстрое преобразование Фурье, мате-

матические узкополосные фильтры Butterworth и вейвлет-преобразование, которое наилучшим образом выявляет периодичность процессов физиологической природы. Для эндотелиального компонента оценивали амплитуду колебаний в диапазоне частот 0.005–0.0095 Гц, а для сердечного — в диапазоне 0.8–1.6 Гц. Амплитуду колебаний представляли в условных единицах.

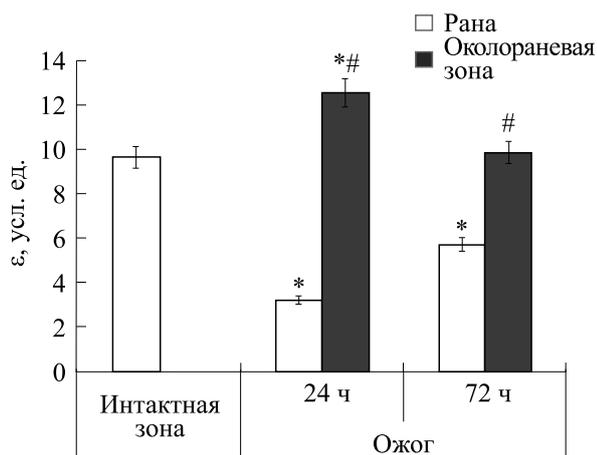
Результаты обрабатывали с использованием пакета программ Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки статистической значимости различий применяли  $H$ -критерий Краскала–Уоллеса. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что диэлектрические свойства раны и ожоговой зоны существенно изменяются в динамике раневого процесса и значительно отличаются от соответствующего участка кожи здоровых животных (рис. 5).

По основному оценочному параметру — диэлектрической проницаемости — выявлена отчетливая динамика. Так, в тканях раны наибольшее отклонение от контрольного уровня характерного для здоровых животных, обнаружено через 24 ч после нанесения ожога (–66.7%,  $p < 0.01$ ). В дальнейшем показатели возрастают в 1.78 раза ( $p < 0.05$ ), однако не достигают физиологических значений (–40.6%,  $p < 0.05$ ). Подобные изменения связаны с резким изменением степени гидратации тканей раны [20].

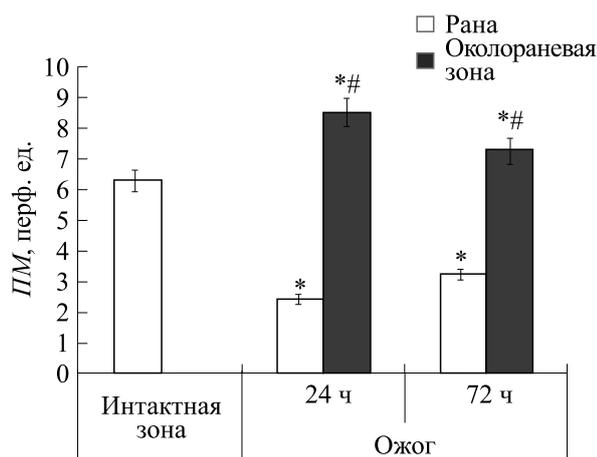
В околораневой зоне наблюдали иные сдвиги (рис. 5). Через 24 ч после нанесения травмы ди-



**Рис. 5.** Уровень диэлектрической проницаемости раны и околораневой зоны в динамике экспериментального ожога; \* – различия со значением, характерным для интактной зоны, статистически значимы,  $p < 0.05$ ; # – различия со значением, характерным для раны, статистически значимы,  $p < 0.05$ .

электрическая проницаемость была зафиксирована на более высоком уровне по сравнению с кожей интактных животных (+30.2%,  $p < 0.05$ ), снижаясь практически до физиологического уровня к завершению третьих суток эксперимента. По нашему мнению, это обусловлено реактивной компенсаторной гиперемией данной зоны.

Аналогичные изменения регистрировали при лазерной доплерометрии тканей раны и околораневой зоны (рис. 6). Так, через сутки после нанесения ожога в поверхностных слоях имело



**Рис. 6.** Показатель микроциркуляции (в перфузионных единицах) в тканях раны и околораневой зоны в динамике экспериментального ожога; \* – различия со значением, характерным для интактной зоны, статистически значимы,  $p < 0.05$ ; # – различия со значением, характерным для раны, статистически значимы,  $p < 0.05$ .

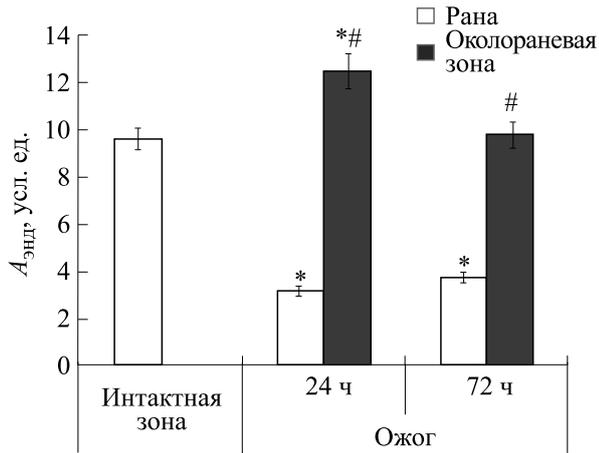
место значительное угнетение интенсивности кровотока по микрососудам, о чем свидетельствовало снижение показателя микроциркуляции в 2.63 раза ( $p < 0.01$ ). Эта тенденция обусловлена формирующимся в рассматриваемый период вазоспазмом [5–7]. На третьи сутки после ожога активность микроциркуляции умеренно возрастает (в 1.33 раза относительно первых суток,  $p < 0.05$ ), однако составляет лишь 50.8% от интактного уровня ( $p < 0.01$ ).

В околораневой зоне фиксировали компенсаторную реакцию микроциркуляторного русла, проявляющуюся в увеличении показателя микроциркуляции по завершении первых суток после ожогового периода (+34.9%,  $p < 0.05$ ). В то же время ко второй точке наблюдения данный эффект почти нивелируется, но остается значимым (+15.9%,  $p < 0.05$ ).

Проведенный корреляционный анализ двух вышеуказанных показателей (диэлектрическая проницаемость и показатель микроциркуляции) позволил установить их статистически значимое сопряжение на уровне положительной связи средней силы ( $r = +0.738$ ,  $p < 0.05$ ). Наличие данной корреляции обуславливалось регистрацией жидкостной ее составляющей для тканей, однако физическая сущность и диагностическая информативность ближнеполюсного СВЧ-зондирования и ЛДФ дифференцирует результат их измерений. В частности, СВЧ-диэлектрометрия в большей степени свидетельствует о структуре ткани (сохранности и динамике состояния морфологического субстрата) [8, 9, 15–17, 20, 21]. Напротив, ЛДФ преимущественно характеризует функциональное состояние биообъекта [13, 22].

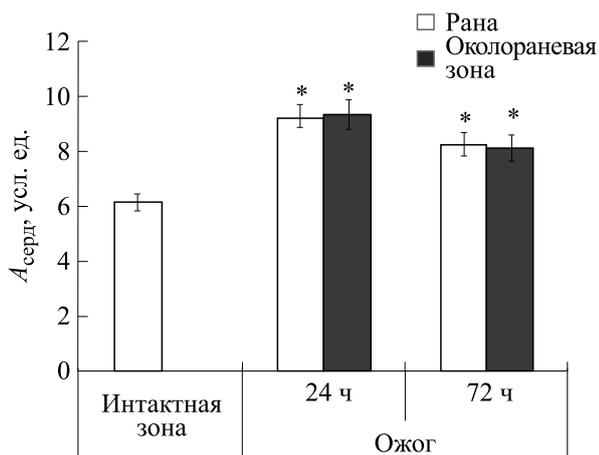
Сдвиги интегрального критерия интенсивности кровотока по сосудам малого диаметра – показателя микроциркуляции – были обеспечены перестройкой его регуляторных механизмов. Так, угнетение микроциркуляции в зоне ожога происходило в первую очередь за счет вазоспазма, формируемого вследствие высвобождения сосудистой стенкой молекулярных вазоактивных агентов, преимущественно – монооксида азота [14, 22, 23]. Об этом свидетельствует динамика эндотелиального компонента (рис. 7), который через сутки после нанесения ожога снижается более чем в два раза относительно неповрежденной кожи ( $p < 0.01$ ). В дальнейшем на четвертые сутки послеожогового периода он умеренно повышается, составляя лишь 70.9% от физиологического уровня ( $p < 0.05$ ), что указывает на недостаточную скорость протекания регенеративных процессов.

Напротив, в околораневой зоне через сутки после моделирования термической травмы наблюдали увеличение амплитуды эндотелиального компонента регуляции микроциркуляции (на 33.1%,  $p < 0.05$ ; рис. 7), что может рассматривать-



**Рис. 7.** Амплитуда эндотелиального компонента микроциркуляции в тканях раны и околограневой зоны в динамике экспериментального ожога; \* – различия со значением, характерным для интактной зоны, статистически значимы,  $p < 0.05$ ; # – различия со значением, характерным для раны, статистически значимы,  $p < 0.05$ ).

ся, с одной стороны, как компенсаторная реакция, но с другой стороны – как следствие вазоспазма в зоне ожога (проявление острой артериальной гиперемии) [5, 10, 15]. Транзиторный характер этих сдвигов (подтверждается возвращением эндотелиального компонента к физиологическому уровню через 24 ч после нанесения ожога) позволяет в большей степени говорить о компенсаторной природе выявленной сосудистой реакции. В то же время состояние внешних регуляторных факторов, в частности сердечного, де-



**Рис. 8.** Амплитуда сердечного компонента микроциркуляции в тканях раны и околограневой зоны в динамике экспериментального ожога (\* – различия со значением, характерным для интактной зоны, статистически значимы,  $p < 0.05$ ; # – различия со значением, характерным для раны, статистически значимы,  $p < 0.05$ ).

монстрировало монотонную динамику как в ожоговой ране, так и в околограневой зоне (рис. 8). Так, в раннем послеожоговом периоде фиксировали существенное повышение оцениваемого показателя (на 48.4 и 46.8% относительно интактных животных соответственно,  $p < 0.05$  для обоих случаев), что обусловлено централизацией кровообращения как универсальным ответом на тяжелую травму. Через 72 ч после моделирования ожога регистрировали умеренное снижение значения параметра, не достигавшее уровня здоровых крыс ( $p < 0.05$  для обеих точек измерения). Это свидетельствует о сохранении негативного влияния термической травмы на состояние системной и локальной гемодинамики и на четвертые сутки после травмы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют заключить, что в ранний послеожоговый период (первые сутки) в тканях раны наблюдается резкое согласованное снижение интенсивности микроциркуляции и диэлектрической проницаемости, постепенно и частично восстанавливаемое к завершению третьих суток после нанесения ожога. В околограневой зоне регистрируется компенсаторная активация кровотока, приводящая к увеличению степени гидратации тканей, что проявляется повышением обоих указанных показателей. Кроме того, показано, что при термической травме формируется регуляторный дисбаланс факторов, обеспечивающих капиллярный кровоток в зоне ожога и окружающих ее тканях, носящий компенсаторный характер и, в отсутствие адекватной коррекции, способствующий угнетению процессов регенерации.

Таким образом, сочетанное применение рассматриваемых методов позволяет полноценно охарактеризовать структурно-функциональные особенности анализируемой ткани и их динамику. Это отчетливо проявляется на примере экспериментальной ожоговой раны.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00652).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, ис-

пользуемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург) и были одобрены Локальным этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. А. Паршикова и В. В. Паршиков, *Соврем. проблемы науки и образования*, № 2, 64 (2012).
2. F. C. Kao, H. H. Ho, P. Y. Chiu, et al., *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **23** (1), 1 (2022).
3. M. Shafiq, Y. Chen, R. Hashim, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 821288 (2021).
4. H.N. Wilkinson, M.J. Hardman. *Open Biol.* **10** (9), 200223 (2020).
5. Г. М. Кавалерский, А. Д. Ченский, А. В. Уездовский и др., *Анналы хирургии*, № 6, 37 (2012).
6. М. Б. Петрова, Е. М. Мохов, А. Н. Сергеев и Е. В. Серов, *Соврем. проблемы науки и образования*, № 6 (2015).
7. С. Я. Ивануса, Б. В. Рисман и Г. Г. Иванов. *Вестн. росс. воен.-мед. академии*, **2**, 190 (2016).
8. Е. Б. Богомолова, А. К. Мартусевич, И. А. Клеменова и др., *Медицина*, **5** (3), 58 (2017).
9. А. К. Мартусевич, Д. В. Янин, Е. Б. Богомолова и др., *Биомед. радиоэлектроника*, **12**, 3 (2017).
10. S. Li, A. H. Mohamedi, J. Senkowsky, et al., *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, **9** (5), 245 (2020).
11. С. Н. Колесов и М. Г. Воловик. *Оптич. журн.*, **86** (6), 59 (2013).
12. И. В. Турчин. *Усп. физич. наук*, **186** (5), 550 (2016).
13. A. K. Martusevich, S. Yu. Krasnova, A. G. Galka, et al., *Biophysics*, **64** (4), 610 (2019).
14. J. Liu, L. Xu, D. Hu, et al., *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, **30** (2), 175 (2014).
15. A. G. Galka, A. K. Martusevich, D. V. Yanin, and A. V. Kostrov, *J. Commun. Technol. Electronics*, **65** (9), 1038 (2020).
16. А. К. Мартусевич, А. А. Епишкина, Е. С. Гольгина и др., *Соврем. технологии в медицине*, **12** (5), 57 (2020).
17. A. V. Kostrov, A. I. Smirnov, D. V. Yanin, et al., *Bull. Rus. Acad. Sci.: Physics*, **69** (12), 1911 (2005).
18. Д. В. Янин, А. Г. Галка, А. И. Смирнов и др., *Журн. радиоэлектроники*, № 1, 20 (2015).
19. Д. В. Янин, А. Г. Галка, А. И. Смирнов и др., *Усп. прикл. физики*, **6** (2), 555 (2014).
20. Y. Hayashi, N. Miura, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Phys. Med. Biol.*, **50** (4), 599 (2005).
21. A. N. Reznik and N. V. Yurasova, *Tech. Phys.*, **49** (4), 485 (2004).
22. А. И. Крупаткин и В. В. Сидоров, *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови* (Медицина, М., 2005).
23. A. A. Kouadio, F. Jordana, N. J. Koffi, et al., *Arch. Oral Biol.*, **86**, 58 (2018).

## Structural and Functional Assessment of the Condition of Wound Bed Using Microwave Dielectrometry and Laser Doppler Flowmetry

A.K. Martusevich<sup>\*,\*\*</sup>, A.V. Surovegina<sup>\*,\*\*</sup>, V.V. Nazarov<sup>\*</sup>, and A.S. Fedotova

*\*Privolzhskiy Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, pl. Minina i Pojarskogo, 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

*\*\*Nizhny Novgorod State Agrotechnological University, prosp. Gagarina 97, Nizhny Novgorod, 603107 Russia*

The aim of the work was to develop and test a combined method for assessing the structural and functional features of the burn wound and periwound area with the use of microwave dielectrometry and Dopplerometry. The study was performed on twenty Wistar rats, thermal injuries from contact were created on each rat, and ten healthy animals. The assessment of the wound condition was performed 24 and 72 hours after burn injury. The study of the dielectric properties of tissues was carried out using a hardware and software complex for near-field resonant microwave sensing. From the results of our studies, it can be concluded that in the early post-injury period (within the first days), a sharp coordinated decrease in the intensity of microcirculation and dielectric permittivity is observed in the wound tissues, gradually and partially restored by the end of the third day after burning. The increased microcirculatory blood flow to the periwound area, leading to an increase in the degree of tissue hydration was observed, and as a consequence, the values of these two indices became higher. In addition, it has been shown that during thermal trauma, a regulatory imbalance of factors providing capillary blood flow around a burn wound area and surrounding tissues is formed, which is compensatory in nature and, in the absence of adequate correction, contributes to the inhibition of regeneration processes. Thus, the combination of the methods used in this study may potentially provide more specific information for a description of the structural and functional features of the analyzed tissue and their dynamics. This is clearly shown by the example of an experimental burn wound.

*Keywords: wound, dielectric properties, microcirculation, near-field microwave sensing, laser Doppler flowmetry*

## К ВОПРОСУ ОБ ИЛЛЮЗИИ ПОЛЕТОВ ВО СНЕ. МЕХАНИЗМ ИХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ

© 2023 г. Г.Р. Иваницкий\*, #

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

*\*E-mail: ivanitsky@iteb.ru*

Поступила в редакцию 03.07.2023 г.

После доработки 20.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Показано, что для объяснения полетов во сне нет необходимости прибегать к экзотерическим гипотезам. С позиций биофизики феномен «полета во сне» основан на уже изученных адаптационных механизмах и суточных ритмах организма человека. Во время сна пороги возбуждения мозга изменяются, что облегчает в некоторых его областях возбуждение слабыми сигналами. Рассмотрен один из механизмов такого возбуждения при изменении позы человеком во время сна, воспринимаемый мозгом в быстрой фазе сна как уменьшение веса тела. Это при определенных условиях может способствовать в мозгу возникновению иллюзии полета.

*Ключевые слова: самоорганизующаяся устойчивость биосистем далеких от равновесия, циркадные ритмы организма, чередование фаз сна со сновидениями и без них, понижение порогов возбуждения мозга в ночное время.*

DOI: 10.31857/S0006302923050307, EDN: NBGZRJ

*Всякому, на первый взгляд, мистическому  
явлению со временем найдется вполне  
земное, биофизическое объяснение*

### ЦИРКАДНЫЕ РИТМЫ И ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

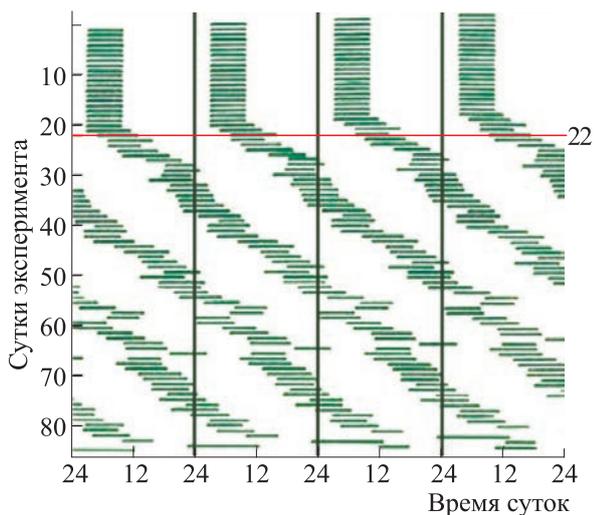
На протяжении нескольких столетий исследователи пытались объяснить: почему в быстрой фазе сна у людей иногда возникает ощущение полета. Было выдвинуто много гипотез в попытках объяснить этот феномен. Можно с уверенностью утверждать, что все эти гипотезы основаны на предположениях, экспериментальные доказательства которых отсутствуют. Интернет сегодня засорен спекуляциями на эту тему [1–4]:

- наличием астральной души;
- генетической памяти о далеких предках, живших на деревьях и летающих с ветки на ветку подобно обезьянам;
- проявлением скрытых комплексов человека, т.е. тайных желаний властвовать и подавлять конкурентов;
- попытками выйти за рамки социальных ограничений и условностей, связанных с возникновением сексуальных проблем и т.п.

*Сокращения: ЭЭГ – электроэнцефалограмма.*

Нейрофизиологические исследования показывают, что кора нашего мозга и структуры подкорки – это органы, обрабатывающие информацию, поступившую по рецепторным каналам извне. С помощью нейронной активности они за счет роста дендритных связей формируют паттерны в нейронных сетях, и создает из них внутри мозга виртуальную модель внешней среды [5]. Фронтальная кора мозга и подкорковые структуры, прежде всего, гиппокамп и гипоталамус, участвуют в распознавании картин внешнего мира, выделяют их существенные признаки, обобщают полученную информацию путем ее сжатия, а результат обобщения запоминают. Работа мозга с этой виртуальной моделью позволяет обеспечить динамическую устойчивость организма в целом [6].

С позиции биофизики феномен «полета во сне» можно объяснить, опираясь при этом на экспериментально изученные циркадные ритмы нашего организма. Человек, как все живое, – это самоорганизующаяся система, далекая от равновесия, которая адаптирована к суточным изменениям параметров внешней среды (колебаниям температуры, давления и гравитационного поля Земли) [7]. Сегодня механизм появления циркадных ритмов в значительной степени изучен. Более того, в 2017 г. за открытие молекулярных ме-



**Рис. 1.** Диаграмма суточной активности здоровых людей, изолированных от внешней среды. Диаграмма демонстрирует смещение длительности сна–бодрствования: темные полосы — это сон; светлое поле между ними — бодрствование. Смещение положения на шкале времени суток показаны сплошными линиями. Отклонение от суточного времени внешней среды начинает проявляться, усиливаясь, с 22 суток нахождения в бункере [7].

ханизмов, контролирующих циркадный ритм, трем исследователям — Джеффри Холлу (J. Hall), Майклу Росбаху (M. Rosbach) и Майклу Янгу (M. Young) — была присуждена Нобелевская премия [8].

Циркадные ритмы каждого человека индивидуальны и несколько отличаются от 24-часового

суточного ритма. Внешние условия (например, длительность дня и ночи) синхронизируют циркадный индивидуальный ритм человека с суточным 24-часовым ритмом внешней среды [9]. Диаграмма суточной активности человека в отсутствие внешних сигналов показана на рис. 1. Как только человек оказывается в темноте и изоляции, приблизительно на 22-е сутки эксперимента его часы перестают подстраиваться под внешний 24-часовой ритм. При этом выявляется собственный внутренний циркадный ритм человека, который немного отличается от 24 часов. Периоды сна (засыпание и пробуждение) приобретают характер свободного смещения, и каждый день, сдвигаясь, колеблются [7].

Изучение длительности колебаний ритма в группе из 157 человек показало, что:

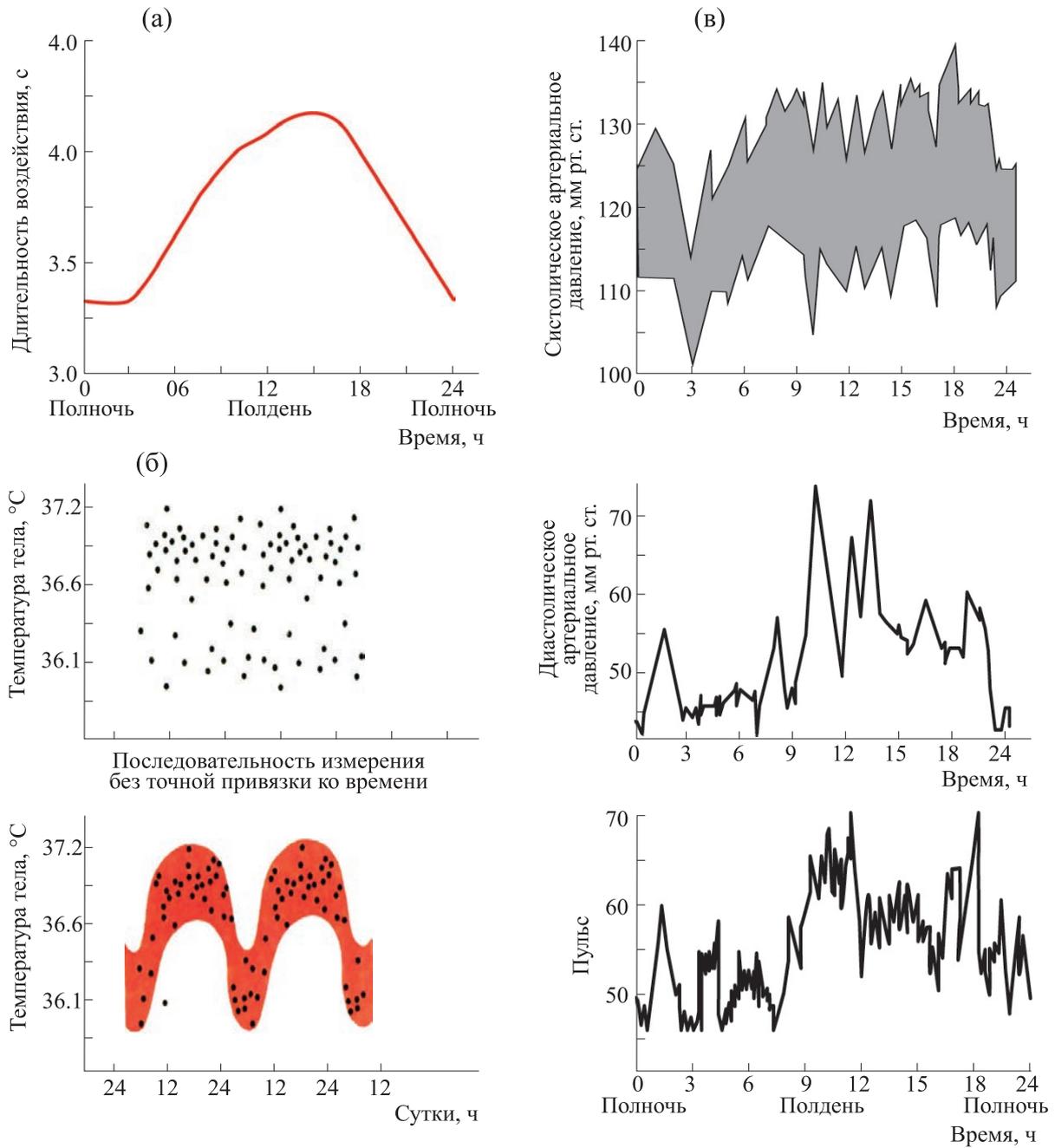
- для всей группы их средняя длительность  $24.15 \pm 0.2$  ч (24 ч 9 мин  $\pm$  12 мин);
- для женщин средняя длительность  $24.09 \pm 0.2$  ч (24 ч 5 мин 12 мин);
- для мужчин средняя длительность  $24.19 \pm 0.2$  ч (24 ч 11 мин  $\pm$  12 мин).

При этом период меньше 24 часов наблюдался у 35% женщин и у 14% мужчин. Однако не вся длительность сна сопровождается сновидениями.

Исследователи ритмов давно пришли к выводу о существенной роли в проявлении суточной ритмики не только нервной системы, но и эндокринной системы человека, т.е. изменения активности синтеза разного набора гормонов в течение суток (табл. 1)

**Таблица 1.** Изменение физико-химических параметров организма человека в течение суток

Часы суток	Показания физиологической и гормональной активности
7,5	Прекращение синтеза гормонов сна, прежде всего мелатонина
9	Наибольший синтез половых гормонов, прежде всего тестостерона
10	Наибольшая активность организма
14–15	Повышение реакции организма и координации движений
17	Наивысший мышечный тонус
18,5	Наивысшее кровяное давление
17–19	Наивысшая температура тела
21	Начало секреции гормонов сна, прежде всего мелатонина
22,5	Торможение работы кишечника
23	Максимальный синтез мелатонина
24	Секреция гормонов роста
2	Наиболее глубокий медленный сон
2–5	Наиболее низкая температура тела
6	Увеличение синтеза кортизола — гормона, который образуется в коре надпочечников. Этот гормон вызывает «стресс», эмоционально и интеллектуально мобилизуя организм на предотвращение чего-либо (дефицита пищи, финансов и т.п.). Порождает неприятные сны, проигрывая разные опасные ситуации и повышая энергетическую активность организма. Он связан с начальным этапом повышения температуры.



**Рис. 2.** Примеры влияния циркадного ритма на значение физиологических параметров человека: (а) – суточные изменения порогов чувствительности холодного воздействия; (б) – учет циркадного ритма при измерениях разбросов, на примере измерения температуры тела [7]; (в) – изменение величины артериального давления и пульса в течение суток здорового человека в зрелом возрасте.

Итак, интенсивность физиологических функций колеблется в течении суток. Если мы при измерениях не учитываем наличие циркадных ритмов, то получим в последовательности замеров почти хаотическую картину, в которой прослеживаются лишь верхние и нижние пределы. Например, во второй половине дня порог болевой чувствительности возрастает. В качестве примера на графике (рис. 2а) показано изменение порога бо-

левой чувствительности для холодного стимула [7]. Как видно из графика, самый большой порог приходится на день в 15 часов, а минимальный – на полночь. В дневное время необходим более продолжительный стимул, чтобы человек почувствовал воздействие.

Если температуру тела человека измерять без привязки ко времени суток, то мы получим близкое к нормальному распределение значений тем-

ператур (верхний график на рис. 2б). Если учитывать в процессе измерения фазу циркадного ритма, то значения температур расположатся в рамках этого ритма (нижний график на рис. 2б). Другой пример: самые низкие величины артериального давления находятся в пределах 3–5 часов ночи. В предутренние часы начинается подъем артериального давления и увеличение частоты пульса (рис. 2в).

Следует отметить, что в зрелом возрасте в памяти любого человека содержатся картины окружающего мира, воспринятые с высоты. Появление подобных картин связано с впечатлениями, полученными ранее, начиная с детского возраста. Эти картины человек мог наблюдать, находясь на горе, в кабине самолета, на воздушном шаре, через окно небоскреба или на фотографиях и в сюжетах кинофильмов. Запомнив эти картины, человек может многократно в течение жизни вызывать их из памяти (если они произвели на него сильное впечатление) и во снах воспроизводить их, пока к старости эти сюжеты не будут вытеснены из его памяти другими, более актуальными для его возраста картинами поздних впечатлений [10, 11]. Как происходит подобный процесс?

В быстрой фазе сна со сновидениями сюжет подобных картин может быть воспроизведен не только самовозбуждением структур мозга, но и спровоцирован внешними стимулами, похожими на те стимулы, которые в прошлом сопровождали запоминание этих картин. Такими стимулами могут быть звук, похожий на рев моторов самолета; запах травы, похожий для человека на тот запах, который он воспринимал, находясь на вершине горы; ощущение сквозняка, напомнившее порывы ветра на воздушном шаре; скачок давления после остановки скоростного лифта гостиницы-небоскреба, через окна которого человеку довелось в прошлом видеть заинтересовавшие его сюжеты жизни улиц города, наблюдаемые через окно с верхних этажей и т.д. В основе иллюзии полета во сне лежит совпадение фаз случайного внешнего раздражителя с фазой понижения порога возбуждения систем мозга, содержащих память о прошлых впечатлениях от картин, наблюдаемых с высоты.

Во сне все системы человека, включая мозг, работают с понижением порогов возбуждения. Исключение составляет зрение. В сновидениях канал зрения отключен от внешней среды, поскольку глаза закрыты веками. Однако при сновидениях глазные яблоки под закрытыми веками двигаются. Через зрительный канал человек в быстрой фазе сна наблюдает картины сюжетов, извлекаемые из своей памяти. Наводит порядок в своей памяти [12].

В силу понижения порогов для возбуждения сигналов в рецепторных каналах и в мозге ночью,

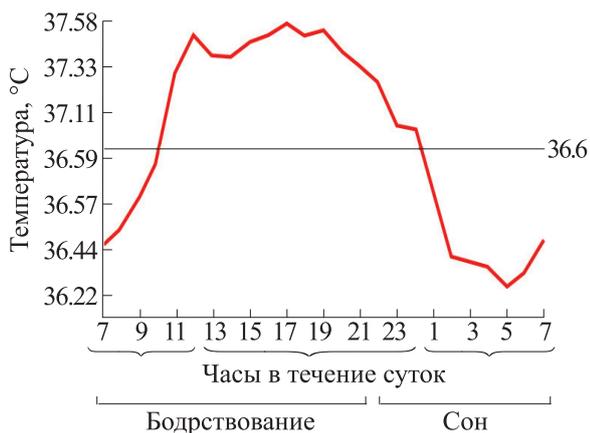
в быстрой фазе сна для возбуждения мозга достаточно слабые стимулы. Слабый внешний раздражитель может вызвать сильные последствия. Он может спровоцировать возникновение потенциала действия, который в свою очередь спровоцирует перенос медиатора от нейрона к нейрону. Достаточно возбудить по одному из каналов рецепции первичный нейрон сети памяти, а далее через него возбудится вся сеть ассоциативной памяти (Напомним, что ассоциативное обучение основывается на образовании связи (ассоциации) между двумя или более стимулами. В этом процессе существенная роль принадлежит гипоталамусу.). Если при этом возбуждающий стимул не прерывается некоторое время, то приходящие потенциалы действия будут продолжать запускать воспоминания. Если же сделать паузу в стимуляции, то катион  $Ca^{2+}$  затормозит возбуждение, сюжет сновидения прервется. При этом человек проснется, иногда сожалея (если сновидение имело позитивное содержание) о прерванном сне.

Поскольку вызвать иллюзию полета могут разные рецепторные системы – слух, обоняние, тактильность, сигналы вестибулярного аппарата, – далее мы для более детального объяснения этого процесса ограничимся лишь одним примером из области осязания – чувством барометрического изменения. Надеюсь, что из этого примера читателю станет ясен общий механизм возникновения иллюзии полета и при других стимулах.

Сосредоточимся на температурной суточной ритмике, поскольку она, с нашей точки зрения, наиболее полно отражает суточные изменения энергетике организма, легко регистрируется в эксперименте, которые часто определяют позу сна. Будет показано, что, например, динамика смены позы сна может спровоцировать иллюзию полета во сне. Здесь последовательно будут даны ответы на следующие семь вопросов.

1. Почему во сне температура тела снижается?
2. Почему человек засыпает чаще всего в позе «эмбриона»?
3. Как меняются фазы сна?
4. Как меняется давление опоры на тело человека при изменении позы во сне?
5. Какова во сне продолжительность сюжетов сновидения?
6. Как динамика смены поз провоцирует во сне иллюзию полета?
7. Какова роль зрения и осязания в полетах во сне?

Надеюсь, что после ответов на эти вопросы, читателю станет ясно, из чего и как складывается механизм, вызывающий виртуальное, т. е. иллюзорное, чувство полета во сне.



**Рис. 3.** Пример изменения в течение суток температуры тела одного из взрослых мужчины в зрелом возрасте [13.]

### ПОЧЕМУ ВО СНЕ ТЕМПЕРАТУРА ТЕЛА СНИЖАЕТСЯ?

Из экспериментов известно, что средняя температура здорового взрослого человека в состоянии бодрствования наиболее часто равна в подмышечной впадине  $36.6^{\circ}\text{C}$ , внутри тела — около  $37^{\circ}\text{C}$ . Однако в течение суток возникают отклонения в ту или иную сторону, нормальным для здорового тела в состоянии средней активности можно считать температуру под мышкой от  $36.2^{\circ}\text{C}$  до  $37.3^{\circ}\text{C}$ . Это зависит от индивидуальных особенностей организма. На температуру влияют пол и возраст. У девочек температура тела стабилизируется к 13–14 годам, а у мальчиков — примерно к 18 годам. Средняя температура тела мужчин примерно на  $0.5\text{--}0.7^{\circ}\text{C}$  ниже, чем у женщин. К вечеру температура понижается, к утру повышается. Разница между утренней и вечерней температурой достигает  $0.5\text{--}1.4^{\circ}\text{C}$  (рис. 3).

Н. Клейтман (N. Kleitman) в своей известной в XX веке книге «Сон и бодрствование» [14] отмечает: «...влияние сна на снижение температуры тела уже давно было предметом дискуссий. Никто не сомневается в том, что ночью температура тела уменьшается, и легко представить себе, что это результат отдыха в горизонтальном положении при расслаблении мышц. Однако тот факт, что температура начинает снижаться задолго до сна и совершает свой обычный суточный цикл, даже если человек бодрствует всю ночь, расценивали как указание на то, что сон — не прямая причина низкой ночной температуры».

Клейтман прав, отмечая, что «сон — не прямая причина низкой ночной температуры». Скорее наоборот, снижение температуры есть причина, провоцирующая человека занять горизонтальное положение и погрузиться в сон. Суточный ритм изменения температуры тела человека (как и других

физико-химических показателей организма) — это генетически зафиксированное естественным отбором явление в виде циркадного ритма [9]. Следуя суточному ритму, наиболее низкая температура тела (как показано на этом графике) отмечается утром, около 5–6 часов, а максимальное значение достигается вечером в 18–19 часов. Ритм изменения температуры следует суточному циклу вращения Земли, т.е. смены дня и ночи [15].

В ночное время суток биоритмы замедляются, во сне тело расслабляется и теряет активность. Сердце сокращается с частотой порядка 1 Гц (пульсация сердца 60–70 сокращений в минуту), иногда и с меньшей частотой, а частота дыхания у людей в возрасте 25–30 лет — в среднем 16 вдохов/выдохов в минуту, т.е. 0.06 Гц. Во время сна температура поверхности человеческого тела у женщин снижается до  $35.7^{\circ}\text{C}$ , у мужчин — до  $35.1^{\circ}\text{C}$ . Температурные различия между внутренними органами могут достигать нескольких десятых градуса. Разброс температуры внутренних органов, мышц и кожи может составлять до  $5\text{--}10^{\circ}\text{C}$  [16].

### ПОЧЕМУ ЧЕЛОВЕК ЗАСЫПАЕТ ЧАЩЕ ВСЕГО В ПОЗЕ «ЭМБРИОНА»?

В начале XXI века было выяснено в какой позе люди проводят большую часть сна. Оказалось, что в изученной выборке людей 54% спят, лежа на боку, 37% предпочитают лежать на спине, а 7% — лежать на животе [17].

Человек не может спать стоя. Такая поза сна возможна лишь в условиях невесомости, например, на космической станции. На Земле вертикальное состояние требует постоянной поддержки устойчивости тела и является активным процессом. При этом задействованы мышцы ног, спинной и головной мозг и вестибулярный аппарат [18]. В вертикальном положении тела центр тяжести человека лежит на пересечении трех плоскостей, расположенных под прямым углом друг к другу: сагитальной, фронтальной и горизонтальной. Установлено, что центр тяжести при этих пересечениях, как правило, находится на 4–5 см выше поперечной оси тазобедренного сустава. В динамике при движениях и наклонах тела центр тяжести смещается. Если он выйдет за пределы вертикальной оси тела, а человек не успеет выдвинуть ногу, чтобы вернуть центр тяжести на вертикальную ось тела, то он упадет. Во сне мышечный аппарат расслабляется. Если человек уснет стоя, то при расслабленных мышцах под действием гравитационного поля Земли он начнет оседать и проснется.

Человек может спать сидя, но это не лучшая поза для сна. В этом случае туловище имеет опо-

**Таблица 2.** Площадь поверхности частей тела взрослого человека

Наименование частей тела	Показатель
Диапазон изменения суммарной площади поверхности кожи	1.5–2.4 м <sup>2</sup>
Средняя суммарная (100%) площадь поверхности кожи	1.8 м <sup>2</sup>
Средняя доля поверхности каждой ноги в суммарной площади поверхности кожи	18%
Средняя доля поверхности каждой руки в суммарной площади поверхности кожи	9%
Средняя доля поверхности головы в суммарной площади поверхности кожи	9%
Средняя доля поверхности туловища в суммарной площади поверхности кожи	37%

ру, но опора требуется и для головы. В отсутствие опоры ее наклоны из-за расслабления мышц шеи будут постоянно прерывать сон. Поэтому человек спит лежа, когда размер опоры определяется существенной частью поверхности тела, соприкасающегося с постелью. Величины поверхностей частей тела взрослого человека представлены в табл. 2.

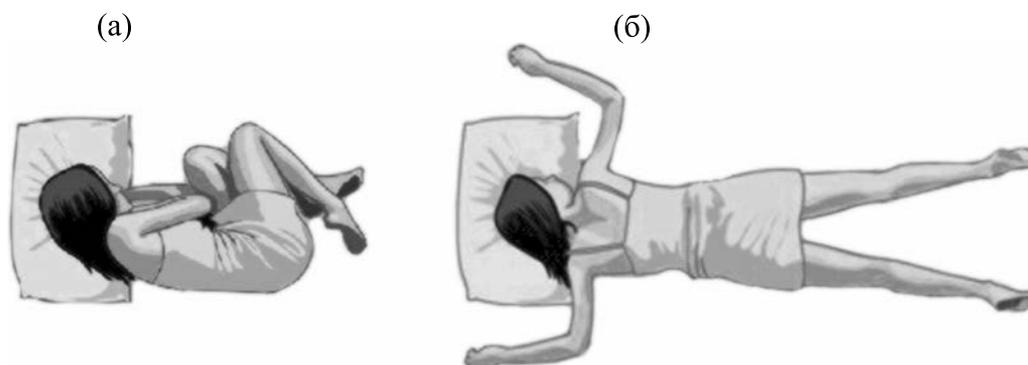
Если температура окружающей среды выходит из зоны комфорта температуры тела, например, не превышает 20°C, то человек, раздеваясь, ложится, по сравнению с температурой своего тела, в холодную постель. Температура постели в силу термодинамического равновесия со средой равна температуре в комнате, например, 20°C. Чтобы согреться под одеялом, он автоматически принимает позу «эмбриона», при которой поверхность его тела, контактирующая с внешней средой, минимальна (рис. 4а).

По мере нагрева воздуха под одеялом спящий человек через несколько часов автоматически принимает другую позу. Если он предпочитает спать на животе, то это будет, например, поза «креста» (рис. 4б). Приращение поверхности контакта с постелью при переходе от позы «эмбриона» к позе «креста» у разных людей в зависимости от длины рук и ног может доходить до 55–57%.

Любого человека можно рассматривать как термодинамическую систему, которая получает энергию из продуктов питания, выполняет разную механическую работу и выделяет тепло во внешнюю среду. Если обратиться к первому закону термодинамики, то для поверхности кожи человека можно записать тепловой баланс в стандартной форме [19]:

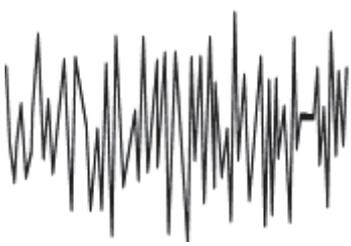
$$M - W_{\min} = h_{CR}(T_0 - T_a) + h_E(e_0 - e_a)/g - R_{ni}, \quad (1)$$

где  $M$  – величина получаемой энергии с пищей,  $W_{\min}$  – величина расхода энергии за счет механической работы организма,  $h_{CR}$  – объединенный коэффициент передачи потери температуры от тела путем конвекции воздуха и теплового излучения,  $T_0$  – температура тела,  $T_a$  – температура воздуха,  $h_E$  – коэффициент потерь энергии телом за счет испарения воды (пота),  $e_0$  – среднее давление пара на поверхности кожи,  $e_a$  – давление пара во внешней среде,  $g$  – психрометрический коэффициент, необходимый для того, чтобы размерности для  $h_E$  и  $h_{CR}$  были одинаковыми, т.е. [Вт·м<sup>-2</sup>(°C)<sup>-1</sup>] [20],  $R_{ni}$  – радиационная энергия, которую поверхность тела поглотила дополнительно к энергии, излученной воздухом при определенной температуре, например, при засветке



**Рис. 4.** Вид сверху на позу спящего человека: (а) – поза «эмбриона», (б) – поза «креста». Одеяло на рисунке не показано.

**Таблица 3.** Частота и форма ритмов электроэнцефалограммы человека и их отнесение к состояниям «бодрствование → сон»

Наименование биоритмов мозговых структур (колебаний/с)	Форма ритмов	Состояния мозга, отражаемые ритмом
D(дельта)-волны 0.5–3.5 Гц 40–300 мкВ		При бодрствовании до 15% таких ритмов, также они имеются в фазе медленного сна.
Q(тета)-волны 4–7 Гц 40–300 мкВ		Естественный сон и начальная стадия фазы медленного сна
A(альфа)-волны 8–13 Гц 50–100 мкВ		Бодрствование в состоянии покоя
B(бета)-волны 13–30 Гц 5–20 мкВ		Бодрствование в состоянии тревожности при активной работе мозга, а также во сне на границе перехода от быстрого сна к медленному сну: при A→B, когда возникают сновидения

Примечание. B(бета)-волна по частоте больше D(дельта)-волны в 13–28 раз, а по амплитуде — меньше в 8–15 раз, что связано с ускоренным перебором паттернов памяти во сне с небольшой затратой энергии при поиске решений задач, которые возникают в состоянии бодрствования.

части тела светом, Солнцем в утренние часы летом [21].

Короче, ложась вечером в холодную постель, человек автоматически принимает позу «эмбриона» и лежит неподвижно, пытаясь согреться. Ближе к утру, в 3–6 часов, он также автоматически, бессознательно, начинает ворочаться, сбрасывать одеяло, оголяя части тела, чтобы избежать перегрева и достичь комфортных для себя условий дальнейшего сна.

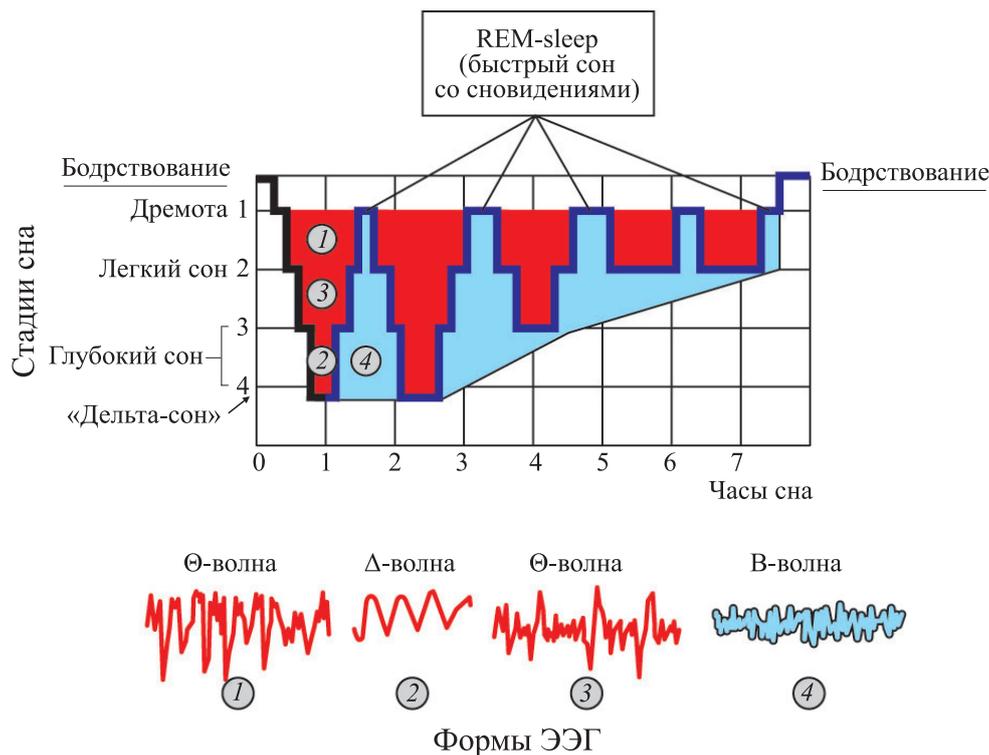
### КАК МЕНЯЮТСЯ ФАЗЫ СНА?

Когда мы бодрствуем, происходит активное взаимодействие между одновременно активными нейронными группами рецепторов. При этом связи между ними усиливаются. Спящий мозг перебирает и комбинирует образы, которые содержатся в его памяти. Эти образы есть отображение существенных и несущественных образов внешней среды, которые воспринял и за-

помнил мозг ранее в состоянии бодрствования. Электроэнцефалограмма (ЭЭГ) отражает ритм этого перебора [12].

На вопрос, почему это происходит, ответ простой. За счет понижения во сне активности мышечных структур тела происходит уменьшение затрат энергии на подвижность организма, что приводит к перераспределению энергии в пользу мозга [22, 23]. По изменению ритмов ЭЭГ было замечено, что сон представляет собой чередование двух фаз — медленного и быстрого сна. Еще в первой половине XX века была создана классификация ритмов ЭЭГ человека и найдена корреляция ритмов ЭЭГ с разными стадиями бодрствования и сна [24] (табл. 3).

Анализ ЭЭГ демонстрирует взаимодействие нейронных кластеров. У здорового человека сон начинается с первой стадии медленного сна (Non-REM-sleep), т.е. сна без сновидений. Последовательность смены стадий и их длительность в физиологии обычно отображают графи-



**Рис. 5.** Пример усредненной гипнограммы повторяющихся временных циклов фаз сна человека: медленный (красный) сон и быстрый (голубой) сон. Быстрый сон — это сон со сновидениями. ЭЭГ при быстром сне напоминает ЭЭГ бодрствования человека (бета-волны ЭЭГ), поскольку мозг активно работает [22].

чески в виде так называемой гипнограммы (диаграммы, содержащей информацию о структуре сна, качестве и количестве его стадий) [22] (рис. 5).

В стадии медленного сна существенно понижена мышечная активность и имеют место сравнительно постоянные и небольшие частоты дыхания и ритма сокращений сердца. Первый цикл медленного и быстрого сна имеет длительность порядка одного-трех часов. Затем циклы повторяются. При этом уменьшается доля медленного сна и постепенно нарастает доля быстрого сна (REM-sleep), т.е. сна со сновидениями. В среднем при полноценном здоровом сне отмечают порядка двух-пяти повторов двух фаз цикла.

Во время быстрого сна в мозгу человека нейроны продолжают работать, под закрытыми веками регистрируются движения глазных яблок. В фазе быстрого сна нейроны взаимодействуют почти также активно, как в состоянии бодрствования, хотя зрительные рецепторы под закрытыми веками отключены от внешней среды, мышечные системы тела практически обездвижены. В этой фазе сна телу трудно проявлять активность движения. Перед началом быстрой фазы сна мышечная активность возрастает, что позволяет человеку неосознанно менять позу тела.

### КАК МЕНЯЕТСЯ ДАВЛЕНИЕ ОПОРЫ НА ТЕЛО ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ПОЗЫ СНА?

В позе «эмбриона» поверхность контакта тела непосредственно с постелью минимальна, а в позе «креста» — максимальна (рис. 4). В общем случае статическое давление постели на тело  $p$  равно пределу отношения нормальной составляющей силы  $F_n$  к площади опоры  $s$ , на которую действует сила:

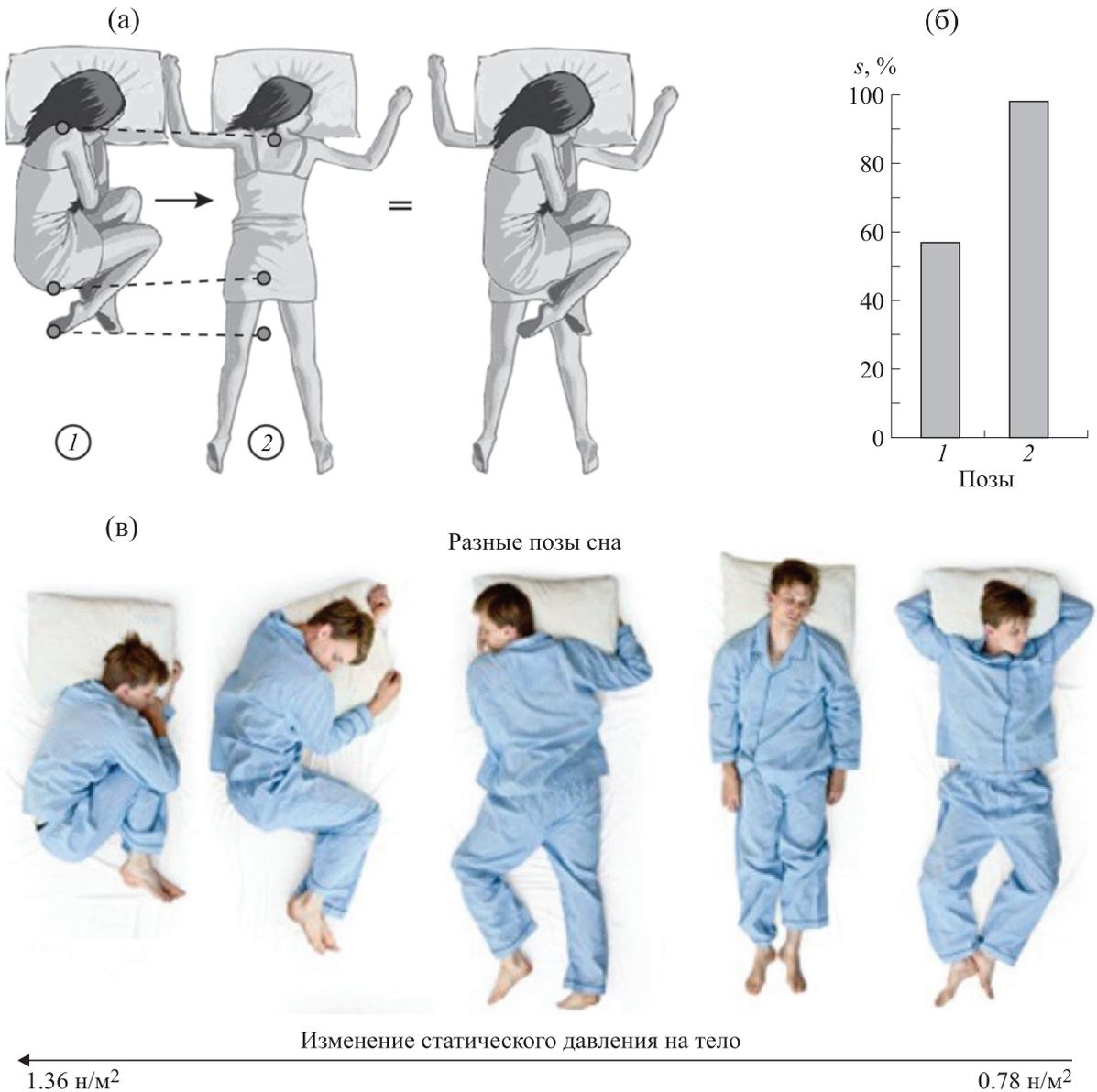
$$p = \frac{F_n}{s}. \tag{2}$$

При горизонтальном расположении постели нормальной составляющей силы является вес спящего человека  $G$ :

$$G = mg, \tag{3}$$

где  $m$  — масса человека,  $g$  — ускорение свободного падения. Подставим выражение (3) в выражение (2), получим величину статического давления:

$$p = \frac{G}{s} = \frac{mg}{s}. \tag{4}$$



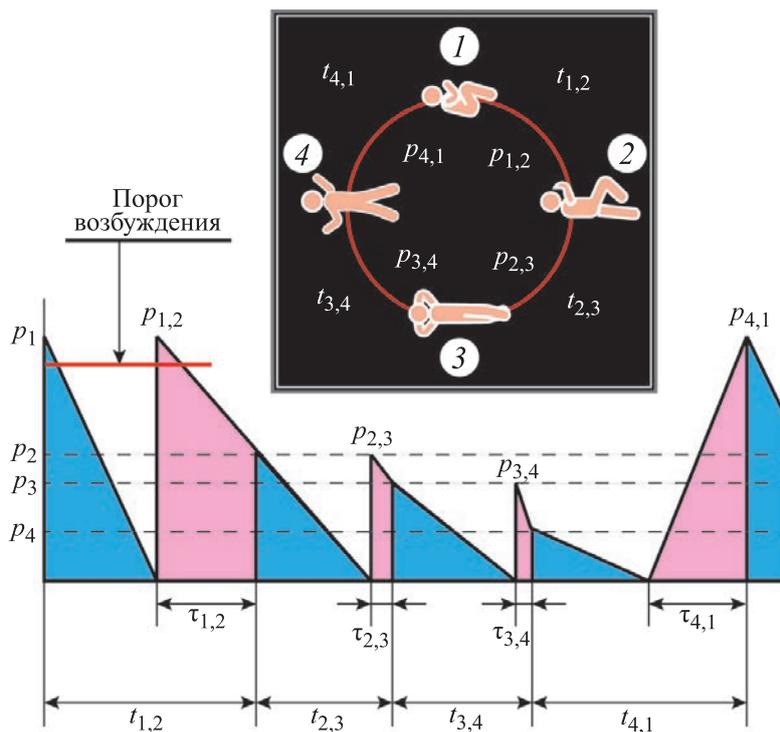
**Рис. 6.** Изменение поверхности тела, опирающейся на поверхность постели при разных позах сна: (а) – переход от позы «эмбриона» к позе «креста», (б) – этот переход может увеличить поверхность контакта с постелью до 55–57%. Очевидно, что может быть большое разнообразие поз, которые принимают спящие. На рис. (в) приведены лишь некоторые из них. Все они укладываются в указанный диапазон изменения статического давления на тело, если человек не страдает ожирением.

Из выражения (4) видно, что при увеличении площади опоры  $s$ , например, на 43% при переходе от позы «эмбриона» к позе «креста», статическое давление уменьшается. Примем массу человека 70 кг, поверхность его тела в среднем  $1.8 \text{ м}^2$ . В позе «креста» половина (или более) поверхности тела человека контактирует с поверхностью постели, примем  $s = 0.9 \text{ м}^2$ . При этом поверхность тела, контактирующая с постелью в позе «эмбриона», будет равна  $0.513 \text{ м}^2$ . Подставим эти значения в выражение (4), получим: диапазон изменения

статического давления составляет от  $1.36$  до  $0.78 \text{ н/м}^2$ . В этом диапазоне находятся все позы сна (рис. 6).

Примечание: тот же самый результат уменьшения давления можно получить, если уменьшать ускорение  $g$ , например, приложив к системе всего организма ускорение  $a$ , направленное против вектора ускорения свободного падения, т.е.:

$$p = \frac{m(g - a)}{s} \tag{5}$$



**Рис. 7.** Переходные режимы давлений и их характерные времена при последовательной смене поз спящим человеком. Синим цветом отмечены интервалы, соответствующие стационарным позам, красным цветом – интервалы, в которых с помощью мышечных усилий осуществляются повороты и смещения тела человека, меняющего позу. Если при смене позы изменение давление превысит порог возбуждения, регистрируемый тактильными (барометрическими) рецепторами кожи, то в затылочной области мозга, куда придет сигнал, начнется процесс распространения возбуждения по нейронным сетям.

Если ускорение  $a$  взять со знаком минус (т.е. торможение) и сделать его равным  $g$ , то давление на опору будет равным нулю, т.е. тело станет невесомым. В реальности в состоянии бодрствования на этом принципе основаны некоторые аттракционы, например, «американские горки» или «летающие люди в аэродинамической трубе». Возможно создание невесомости в самолете, который движется по параболе. Когда самолет пикирует вниз, то на 30–40 секунд в его салоне у пассажиров возникает невесомость, поскольку  $a = g$ . Такие полеты используются при тренировках космонавтов. Левитация<sup>1</sup> во сне человека невозможна, поскольку она возникает лишь при наличии внешней силы, компенсирующей вес.

Отличие потери веса, описываемой выражениями (4) и (5), состоит в том, что в первом случае

<sup>1</sup> Левитация (от лат. *levitas* — «легкость, легковесность») — преодоление гравитации, при котором субъект или объект летает в пространстве, не касаясь поверхности твердой или жидкой опоры. Левитация у людей как во сне, так и наяву невозможна. Демонстрация левитации человека в XVIII и в XIX веках в цирках — это один из фокусов, основанный на иллюзии, когда от зрителей маскируются веревки, компенсирующие вес тела человека.

мы описываем изменение статического давления путем изменения поверхности контакта, во втором случае мы описываем динамическое изменение давления, компенсируя силу гравитации. Во сне в неизменной позе давление — статическое, при изменении позы во время поворотов тела оно становится динамическим.

### КАКОВА ВО СНЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ СЮЖЕТОВ СНОВИДЕНИЯ?

При смене позы «эмбриона», например, на позу «креста» центр тяжести человека описывает траекторию, определяемую поворотами тела. На рис. 7 показаны продолжительности переходных режимов  $t$  и изменения давления  $p$  при переходе из одной позы в другую позу. Если поза длительное время не меняется, то происходит адаптация организма к позе. Мозг человека перестает реагировать на статическое давление.

При смене позы ситуация меняется. Движущей силой человека при изменении положения его тела является мышечная ткань. Для мужчин нормальное значение мышечной массы — около

45% от всей массы тела, для женщин — около 35% [25].<sup>2</sup>

Чтобы осуществить смену позы, часто необходимо повернуть тело на угол, равный в радианах  $\pi/2$ , а иногда требуется сделать и более существенный поворот — на  $2\pi/3$ . На повороты требуется затратить дополнительную энергию — сокращение мышц. При этом в мышцах используется энергия гидролиза АТФ. На аннотометрическое сокращение, когда некоторые мышцы удлиняются, а другие сокращаются при повороте тела, требуется наряду с энергией и затрата времени. При одиночном сокращении у медленных мышц время укорочения лежит в диапазоне 40–50 мс, а у быстрых — в диапазоне 2.5–10 мс. На простую двигательную реакцию у молодого человека затрачивается порядка 150–200 мс. Чем большую массу требуется повернуть, тем больше затраты времени. В результате динамический переход может занять время не менее 2–8 с.

Что касается зрения, то анализатор сетчатки глаза может распознавать движение в картинах сюжета за время смены четырех-пяти картин. Например, частота смены кадров, принятых в современном кинематографе, в телевидении и в компьютерной анимации равна 24 кадра в секунду или 0.042 Гц, т.е. кадр занимает время 42 мс. Следовательно, времени 170–210 мс достаточно для восприятия сюжета как в состоянии бодрствования, так, по-видимому, и в сновидениях. Отсюда имеем, что за 2–8 с в сновидениях можно увидеть более 12 смен картин с разными сюжетами. Короче, сновидение может продолжаться недолго, а наше субъективное восприятие создает иллюзию его большой продолжительности.

### КАК ДИНАМИКА СМЕНЫ ПОЗ ПРОВОЦИРУЕТ ВО СНЕ ИЛЛЮЗИЮ ПОЛЕТА?

Время вращения  $\tau$  при смене поз зависит от шести параметров:

$$\tau = f(m, F_{\text{тр}}, \alpha, \mu, k, x), \quad (6)$$

где  $m$  — масса тела,  $F_{\text{тр}}$  — сила вязкого трения,  $\alpha$  — коэффициент, определяющий величину мышечной массы рук и ног в общей массе тела  $m$ ,  $\mu$  — коэффициент вязкого трения,  $k$  — коэффициент сокращения мышц рук ( $k = ES$ ,  $E$  — модуль Юнга,

<sup>2</sup> Для мышечной массы имеется два понятия: первое — просто мышечная масса тела (Lean Body Mass), второе — масса скелетных мышц (Skeletal Muscle Mass). Первое — это искусственное наращивание мышц с целью формирования «красивой» конструкции тела. Так, весьма распространенное явление в XX веке, получившее название Bodybuilding, — вид спорта, включающий интенсивные физические упражнения, направленные на увеличение мышц тела. Второе — необходимая и достаточная для жизни мышечная масса, позволяющая эффективно осуществлять разные типы движения.

$S$  — площадь поперечного сечения укорачивающихся мышц),  $x$  — длина пути смещения центра тяжести. Если человек спит на досках без матраца, то трение будет близким к сухому трению. Если он спит на мягкой постели, то трение близко к вязкому трению.

Важно отметить, что для вращения верхней части массы тела задействованы в основном мышцы рук, а нижней части — мышцы ног. По высоте спинного мозга и в моторных их представителях в коре головного мозга местоположения управления конечностями (руками и ногами) различаются. Поэтому условно туловище можно разделить на две отличающихся характером движения части — верхнюю и нижнюю, и рассмотреть их движение отдельно. Однако для человека (в отличие, например, от кошки) такое разделение теряет смысл [6]. При смене позы руки и ноги задействованы одновременно. Показателем эффективности движения является количество мышечной массы. Как уже отмечалось, для мужчин она составляет около 45% от всей массы тела  $m$ , для женщин — около 35%, т.е. коэффициент  $\alpha$  находится в диапазоне от 0.35 до 0.45.

При этом сила трения равна:

$$F_{\text{тр}} = -\mu v = -\mu x', \quad (7)$$

где  $\mu$  — коэффициент трения,  $x'$  — производная пути по времени, т.е. скорость  $v$ . Уравнение силы сокращения мышц будет выглядеть следующим образом:

$$F = -kx, \quad (8)$$

где  $k$  — коэффициент сокращения мышц,  $x$  — суммарная длина смещения центра тяжести тела при укорочении мышц. При этом уравнение движения примет вид:

$$\alpha m x'' = -\mu x' - kx, \quad (9)$$

где  $\alpha m$  — задействованная для поворота мышечная масса. Разделив левую и правую часть на  $\alpha m$  и произведя замену переменных:

$$\omega_{0, \text{рук}}^2 = \frac{k}{\alpha m} \quad \text{и} \quad 2\beta_{\text{рук}} = \frac{\mu}{\alpha m}, \quad (10)$$

получим уравнение для движения центра тяжести тела под действием сокращения мышц тела с вязким трением:

$$x'' + 2\beta x' + \omega_0^2 x = 0. \quad (11)$$

Его решение с произвольными начальными условиями известно [26]. Это — экспоненциально затухающие колебания (рис. 8):

$$x(t) = x_1 e^{-\beta t} \cos(\omega_1 t + \varphi) \quad (12)$$

с частотой

$$\omega_1 = \sqrt{\omega_0^2 - \beta^2}. \quad (13)$$

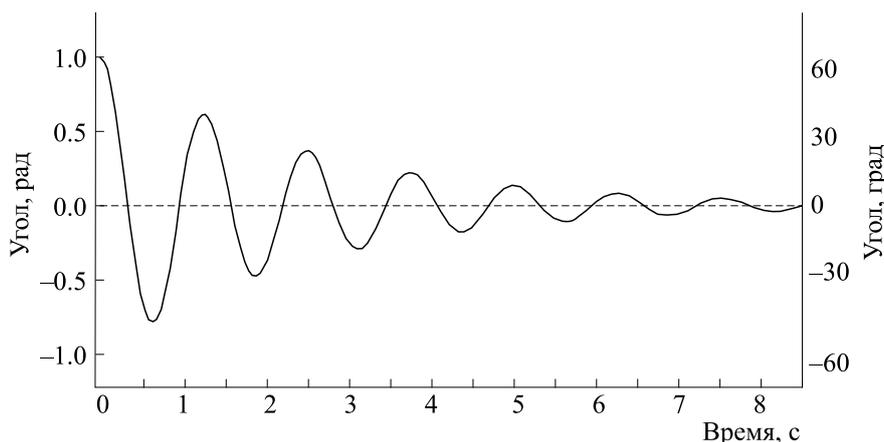


Рис. 8. Колебания тела, возникающие в переходном режиме при изменении позы.

Значения  $x$  и  $\varphi$  определяются из начальных условий:

$$x(0) = x_0 \text{ и } dx/dt(0) = \varphi_0. \quad (14)$$

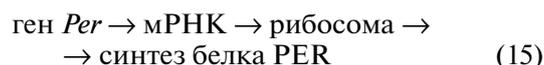
Из выражений (12) и (13) видно что, чем больше коэффициент вязкого трения  $b$ , тем быстрее затухают колебания. Кроме того, чем больше  $\beta$ , тем меньше частота  $\omega$  свободных затухающих колебаний. Лежа на досках, менять позы легче, а спать сложнее из-за сильного давления опоры. Если величина  $\beta = \omega_0$ , то колебания исчезают. Такое затухание движения будет аperiодическим, т.е. без колебаний.

В связи с наличием колебания при смене позы в моторную зону коры мозга по проводящим путям пойдет, хотя и слабый, но продолжительный сигнал длительностью до 8 с, который может превысить порог возбуждения нейронной сети и в быстрой фазе сна вызвать иллюзию полета.

### КАКОВА РОЛЬ ЗРЕНИЯ И ОСЯЗАНИЯ В ПОЛЕТАХ ВО СНЕ?

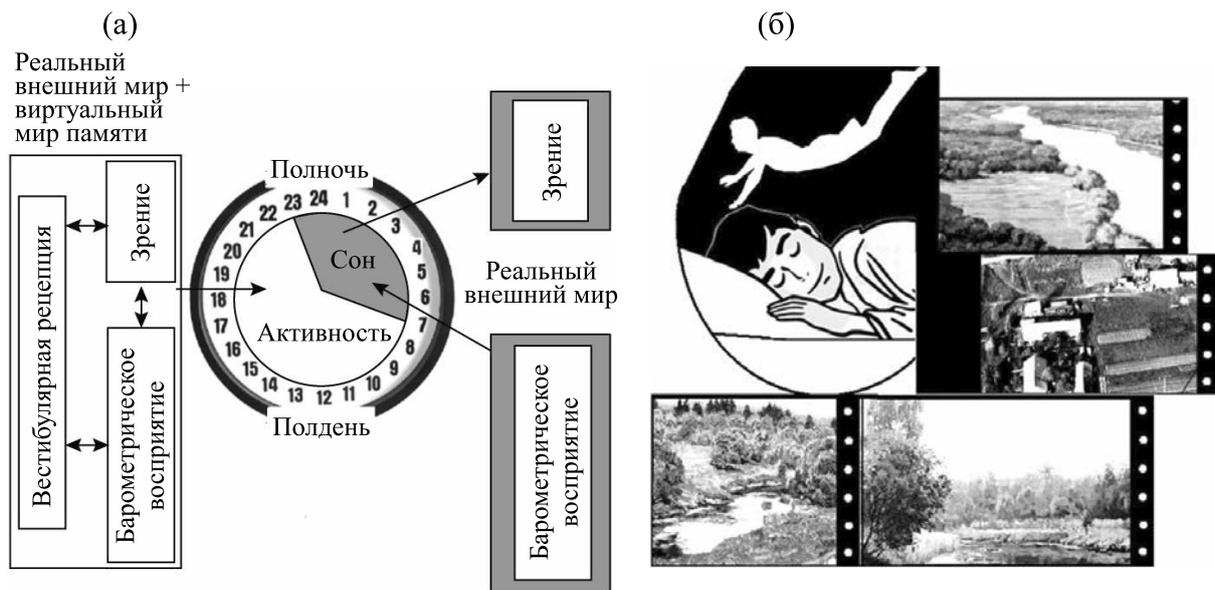
Очевидно, что зрение играет особую роль в распознавании образов [27]. Другая из основных функций зрительной нейронной сети коры мозга в состоянии бодрствования наряду с вестибулярным аппаратом есть ориентационная избирательность наблюдаемых сюжетов (верх – низ, право – лево, ближе – дальше, наклоны) [28]. Большую часть информации из внешней среды наш мозг получает через зрительный канал. Зрение участвует также в обработке информации, получаемой по другим каналам рецепции. Оно распознает источник этой информации. Короче, зрение основной переносчик информации у человека, не случайно в нашем языке есть такое понятие, как *мировоззрение*. (Для собак, например, следовало бы его заменить термином *мирообоняние*.)

Важно также отметить, что зрение связано с циркадными ритмами человека. Еще в последней четверти XX века был обнаружен ген на одном участке X-хромосомы у мушки дрозофилы, который получил название *Period* или сокращенно *Per* [8]. Все отклонения мушек от правильного циркадного поведения были обусловлены различными дефектами этого гена. Это был первый в мире часовой ген, который стал известен биологам. После его клонирования удалось синтезировать белковую молекулу, за производство которой отвечает этот ген. Белок был назван, как и ген, PER (пишется заглавными буквами). Дальнейшие исследования показали, что ген *Per* активен в основном в зрительных клетках дрозофилы, что неудивительно. Он пульсирует в суточном ритме. Пик его активности приходится на вечернее время, на 6 часов раньше, чем синтез белковой молекулы PER. На операцию по цепи:



уходит 6 часов, поэтому максимальная концентрация белка PER регистрируется поздней ночью.

Теперь несколько слов об осязании. Нервные окончания, воспринимающие прикосновения, рассеяны по всей поверхности нашего тела. Осязание — это пример общего (интегрального типа) ощущения. Их показатели позволяют различать лишь динамику прикосновения, т.е. изменение давления во времени. В XXI веке удалось уточнить и составить карту областей мозга, участвующих в хранении тактильных воспоминаний. Было показано, что в обработке и запоминании тактильной информации задействована первичная соматосенсорная кора головного мозга. [29]. Кроме того, ранее удалось выяснить, что хранилище тактильной памяти находится вблизи с хранилищем зрительной памяти [30]



**Рис. 9.** Взаимодействия зрительной рецепции и барометрического восприятия раздражителя в состоянии дневной активности и в состоянии быстрого сна: (а) — схема взаимодействия, (б) — смена картин в процессе сновидения при виртуальном полете.

Что произойдет, если у человека все рецепторные системы отключить от внешней среды, включая зрение, а оставить лишь одно тактильное восприятие? В этом случае изменение давления от поверхности контакта его тела с постелью и изменение ускорения в гравитационном поле станут неразличимы. Причина простая. В состоянии бодрствования в отличие от состояния сна тактильные рецепторы, взаимодействуют с другими рецепторными системами человека, и, прежде всего, со зрением. В состоянии бодрствования наш мозг связывает всю поступившую информацию от рецепторов с уже существующей информацией в памяти, т.е. с виртуальной моделью внешней среды, и распознает возникшую ситуацию [12]. При этом производится оценка ситуации, а результат оценки через мозжечок и спинной мозг формирует движения тела с целью сохранить жизнеспособность организма. При таком режиме обработки информации неопределенность решения задачи сводится к минимуму [6].

Во сне тактильные рецепторы кожи, т.е. барометрическое восприятие внешнего мира, реагируют на сам факт уменьшения давления, а зрительный канал при закрытых глазах отключен от внешней среды и не связан с каналом осознания. Поэтому в состоянии сна наш мозг не может распознать, за счет чего уменьшилось или увеличилось давление на тело. Следовательно, взаимодействие барометрического восприятия и зрения во сне и наяву различаются (рис. 9а). Поэтому тактильное восприятие приводит при отключении зрительного канала к ошибкам, т.е. уменьшение давления воспринимается как изменение ве-

са тела, иначе говоря, полет. Фигурально выражаясь, во сне: *мозг обмануть совсем не сложно, он сам обманывается рад.*

Иллюзия полета длится недолго, поскольку память при давлении на кожу сохраняется примерно в течение времени до 5–8 с после прекращения раздражения. После этой задержки информация о давлении на кожу становится уязвимой для забывания, т.е. исчезает из хранилища тактильной кратковременной памяти.

Заказчиком картин сновидения становится барометрическое восприятие. Источник картин — это наша ассоциативная память, наши прошлые наблюдения с высоты на окружающий внешний мир. Эти картины наряду иллюзией уменьшения веса воспринимаются двигательными отделами нашего мозга как эффект полета (рис. 9б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из своего опыта, все люди, опрошенные мною, говорят, что иллюзия полетов в сновидениях не столь частое явление, а изменение позы во сне как поиск комфортных условий сна происходит часто. Возникает сомнение, что изменение позы является источником появления иллюзии полетов.

Однако есть причины, которые позволяют объяснить, что эти сомнения ошибочны.

Напомним, что необходимым и достаточным условием полета во сне является возбуждение мозга слабым сигналом, возникающим от поворота тела. Чтобы возбуждение произошло, долж-

ны быть выполнены одновременно два условия. Порог возбуждения мозга должен быть понижен до такого уровня, чтобы амплитуда даже слабого сигнала, исходящего от рецептора, например, рассмотренного выше рецептора барометрического давления, превысила этот порог. Появление сигнала и снижения порога не зависят друг от друга. Покажем, чем ограничено изменение каждого из них.

В-первых, поясним, когда иллюзия полета во сне невозможна. Во время сна мозг занят весьма важным для него самым делом: очисткой своих нейронных сетей от метаболических и информационных «шлаков», накопившихся в состоянии бодрствования. На быструю фазу сна приходится именно информационная очистка. Сюжеты снов – это побочный эффект работы мозга с переработкой плохо упорядоченной информации. Главную роль в этом случае играет важность решения задачи, которая возникла у человека в состоянии бодрствования. В быстрой фазе сна он не только работает с памятью, но и перебирает разные варианты, которые помогли бы решить задачу, и нередко находит решение. Неслучайно говорят, что *утро вечера мудренее* [12].

Когда мозг во сне активно занят работой, то пороги его возбуждения для слабых внешних сигналов достаточно высоки. Следовательно, слабый сигнал от изменения позы не может оторвать его от этой важной для него работы. Это ограничивает частое возникновение полетов во сне.

Во-вторых, поясним, когда иллюзия полета во сне возможна. Низкий порог возбуждения спящему мозгу свойственен, когда он свободен от проблем. Поэтому у счастливых людей, особенно в детском и юношеском возрасте, явление полетов во сне наблюдается чаще.

В-третьих, ответим на вопрос: почему люди сами преуменьшают количество своих полетов во сне? Допустим, что сон длится 9 часов. Из них быстрая фаза сна со сновидениями возникает три раза по одному часу. Хотя сны имеют место в каждой фазе быстрого сна, человек запоминает лишь сюжет последнего сна перед пробуждением. Два других сюжета он не помнит, даже если сюжеты полетов были во всех трех фазах быстрого сна.

В-четвертых, не всякое изменение позы может сформировать сигнал, который может превзойти даже низкий порог возбуждения мозга. Если позу менять очень медленно, то это равносильно высокой вязкости в системе. В таком варианте изменения позы возникновение колебаний вообще невозможно. Этим объясняется то, что в старческом возрасте, при ослаблении мышц рук и ног, поворот в кровати становится проблемой. Следовательно, иллюзия полетов во сне уже невозможна.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что для объяснения полетов во сне нет необходимости прибегать к экзотерическим гипотезам. Иллюзия полетов происходит внутри нашего мозга. Она связана с появлением от рецепторов сигналов, которые превышают порог возбуждения ассоциативной памяти мозга, содержащей сюжеты картин, наблюдаемых с высоты.

2. Иллюзию полетов во сне чаще обнаруживают у себя люди в детском и юношеском возрасте. Однако здоровый человек нередко сохраняет возможность появления таких иллюзий до 50–70-летнего возраста.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-01025-23-01.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. A. Powell, *The Astral Body and other Astral Phenomena* (The Theosophical House, Lond., 1927).
2. S. Freud, *Die Traumdeutung* (Franz Deuticke, Leipzig und Wien, 1900).
3. Альфред Адлер. *Большая советская энциклопедия* (в 30 т.) (под ред. А. М. Прохорова), 3-е изд. (Советская энциклопедия, М., 1969).
4. Юнг Карл Густав. *Большая советская энциклопедия* (в 30 т.) (под ред. А. М. Прохорова). 3-е изд. М.: Советская энциклопедия (1969).
5. V. S. Ramachandran, *The tell-tale Brain. A Neuroscientist's Quest for What Makes Us Human* (W.W. Norton & Company, New York, London, 2011).
6. G. R. Ivanitskii, *Phys. Usp.*, **60**, 705 (2017). DOI: 10.3367/UFNe.2016.08.037871
7. А.Т. Уинфри, *Время по биологическим часам* (Мир, М., 1990).
8. *The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine* – Press release – NobelPrize.org.
9. Ch. A. Czeisler, J. F. Duffy, Th. L. Shanaban, et al., *Science*, **284** (5423), 2177 (1999).
10. П. Линдсей и Д. Норман, в кн. *Психология памяти*, под ред. Ю. Б. Гиппенрейтер и В. Я. Романова, 3-е изд., перераб. и доп. (АСТ:Астрель, М., 2008).

11. В. М. Ковальзон, *Основы сомнологии: физиология и нейрохимия цикла «бодрствование–сон»* (Бином, М., 2012).
12. G. R. Ivanitskii and A. A. Morozov, *Phys. Usp.*, **63**, 1092 (2020). DOI: 10.3367/UFNe.2020.06.038791
13. Ph. A. Mackowiak, S. S. Wasserman, and M. M. Levine, *J Am. Med. Assoc.*, **268** (12), 1578 (1992). DOI: 10.1001/jama.1992.03490120092034
14. N. Kleitman, *Sleep and Wakefulness* (University of Chicago Press, Chicago, 1936).
15. *Biological Rhythms*, Ed. by J. Aschoff (Plenum Press, New York, London, 1981).
16. Температура тела, в кн. *Популярная медицинская энциклопедия*, под ред. Б. В. Петровского (Советская энциклопедия, М., 1980), с. 601.
17. Ch. Mogo, *What position should I sleep in, and is there a 'right' way to sleep?*, <https://modernsciences.org/what-position-should-i-sleep-in-and-is-there-a-right-way-to-sleep>.
18. В. С. Гурфинкель, Я. М. Коц и М. Л. Шук, *Регуляция позы человека* (Наука, М., 1965).
19. J. L. Monteith, In *Heat Loss from Animals and Man*, ed. by J. L. Monteith and L. E. Mount (Butterworths, London, 1974).
20. A. P. Gagge, In *Physiological and Behavioural Temperature Regulation*, ed. by J. D. Hardy, et al. (Thomas, Springfield, 1970).
21. G. R. Ivanitskii, *Phys. Usp.* **49**, 1263 (2006). DOI: 10.1070/PU2006v049n12ABEH006163
22. D. Bushey, G. Tononi, and C. Cirelli, *Science*, **332**, 1576 (2011). DOI: 10.1126/science.1202839
23. S. Diekelmann and J. Born, *Nature Rev. Neurosci.*, **11** (2), 114 (2010). DOI: 10.1038/nrn2762
24. W. G. Walter, *The living brain* (Pelican Books, Lond., 1963).
25. C. Damiano, D. De Santis, F. Rivocecchi, et al., *BioMed Res. Int.*, 8521893 (2018). DOI: 10.1155/2018/8521893
26. А. А. Андронов, А. А. Витт и С. Э. Хайкин, *Теория колебаний* (Наука, М., 1981).
27. М. М. Бонгард, *Проблема узнавания* (Физматгиз, М., 1967).
28. Д. Хьюбел, *Глаз, мозг, зрение* (Мир, М., 1990).
29. J. A. Harris, C. Miniussi, I. M. Harris, and M. E. Diamond, *J. Neurosci.*, **22** (19) 8720 (2002).
30. G. Sperling, *Psychol. Monogr.*, general and applied, **74**, 1 (1960).

## On Illusion of Flying Dreams. The Mechanism of Their Occurrence

G.R. Ivanitskii\*

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

It is shown that there is no need to resort to exoteric hypotheses to explain flying in a dream. From a biophysical point of view, the phenomenon of "flying in a dream" is based on the already studied adaptive mechanisms and daily rhythms of the human body. During sleep, the brain's arousal thresholds are lowered, making it easier to arouse the brain with weak signals. This study considers one of the mechanisms of such excitation with a change in body position, which is perceived by the brain in the rapid eye movement sleep phase as a decrease in body weight, which, under certain conditions, can cause the illusion of flying in the brain.

*Keywords: self-organizing stability of biosystems far from equilibrium, circadian rhythms in the body, alternation of sleep phases with and without dreams, lowering of brain excitation thresholds at night*