

ISSN 0006-3029

Том 68, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



БИОФИЗИКА

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 6, 2023

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Взаимодействие ионов магния с семихиноновыми радикалами тайрона — индикатора активных форм кислорода

Л.Ю. Устынюк, В.А. Медведева, С.О. Любимовский, Э.К. Рууге, А.Н. Тихонов 1107

О методических ошибках оценивания начальных скоростей ферментативных реакций и способах их коррекции (на примере лактатдегидрогеназы)

А.Ю. Лянгузов, Н.М. Малыгина, Т.А. Петрова 1117

Пространственная структура молекулы сойморфина-6

Л.Н. Агаева, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова, Н.Ф. Ахмедов, Н.А. Ахмедов 1122

Термодинамическая модель образования белковых линейных агрегатов на матрице

Е.О. Василенко, С.А. Козин, В.А. Митькевич, А.С. Бучельников, Ю.Д. Нечипуренко 1128

Уточнение параметров β -изгибов по данным нейтронографии

А.А. Коробков, А.А. Хурмузакий, Н.Г. Есипова, В.Г. Туманян, А.А. Анашкина 1141

Анализ геномных ассоциаций местных и селекционных сортов культурного нута

*М.А. Дук, А.А. Кананин, М.П. Банкин, М.А. Вишнякова,
С.В. Булынецов, М.Г. Самсонова* 1149

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Исследование флуоресценции спектра действия фотосинтеза

С.И. Зиенко, В.Л. Жбанова 1164

Физико-химические свойства и состав липидов липосом из лецитина в зависимости от условий их формирования

Л.Н. Шишкина, Д.В. Парамонов, М.А. Климович, М.В. Козлов 1172

Снижение фоновой продукции активных форм кислорода нейтрофилами после действия гипомангнитного поля не сопровождается нарушением их хемилюми несцентного ответа на активаторы респираторного взрыва

В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Н.И. Новикова, Е.Е. Фесенко 1180

Механизм цитотоксического действия полиакрилатов благородных металлов на опухолевые клетки

А.К. Чигасова, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова 1187

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Липазная и эстеразная активность в грунтах из древних погребальных сосудов

Н.Н. Каширская, Е.В. Чернышева, С.Н. Удальцов, Л.Н. Плеханова 1200

Зависимость интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов от степени их кластеризации в сладжи

И.А. Пономарев, Г.Т. Гурия 1210

Анализ взаимосвязи активности ретикулярной формации продолговатого мозга, дыхательной и сердечно-сосудистой систем у крыс при болевом воздействии	1220
<i>О.Е. Дик</i>	
Сравнительный анализ степени гидролиза биополимеров в гомогенатах гиалиновых хрящей под действием протеолитических ферментов	1229
<i>Т.И. Николаева, Д.А. Барсук, М.В. Молчанов, Д.А. Прохоров, В.И. Емельяненко, П.В. Шеховцов</i>	
Биосенсорные системы: определение оптимальных временных параметров ольфакторной стимуляции	1237
<i>А.Е. Матухно, М.В. Петрушан, Л.В. Лысенко, В.Н. Кирой</i>	
Метод краткосрочного прогноза ультрадианных и инфрадианных ритмов на основе регистрации флуктуаций радиоактивности калия-40	1251
<i>М.Е. Диатроптов, М.А. Диатроптова, С.М. Слесарев</i>	

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Почему вдыхание газообразного оксида азота не влияет на системное артериальное давление у человека и животных?	1259
<i>А.Ф. Ванин, А.А. Абрамов, А.Б. Ваганов, А.А. Тимошин, А.В. Пекшеев, В.Л. Лакомкин, Э.К. Рууге</i>	
Метаанализ рандомизированных клинических исследований по скорости распространения пульсовой волны	1265
<i>Б.Г. Гарамян</i>	
Пьезопульсометрический анализ функционального состояния сердечно-сосудистой системы у человека	1280
<i>В.П. Нестеров, А.И. Бурдыгин, К.Б. Иванов, К.В. Соболев, И.В. Шемарова</i>	
Анализ колебательных процессов в сердечно-сосудистой системе в ответ на локальный нагрев у больных сахарным диабетом 2-го типа	1292
<i>И.В. Тихонова, А.В. Танканаг, И.Е. Гусева, А.А. Гриневич</i>	

ДИСКУССИИ

К вопросу о пути амилоидной агрегации титина	1303
<i>Л.Г. Бобылёва, Т.А. Урюпина, М.А. Тимченко, С.Н. Удальцов, И.М. Вихлянцева, А.Г. Бобылёв</i>	

Contents

Vol. 68, No. 6, 2023

Molecular Biophysics

Interaction of Magnesium Ions with Semiquinone Radicals of Tiron Used as an Indicator of Reactive Oxygen Species

L. Yu. Ustynuyk, V.A. Medvedeva, S.O. Liubimovskii, E.K. Ruuge, and A.N. Tikhonov 1107

On Methodological Errors in Estimating the Initial Velocities of Enzyme-Catalyzed Reactions and on Approaches to Their Correction (A Case Study with Lactate Dehydrogenase)

A. Yu. Lianguzov, N.M. Malygina, and T.A. Petrova 1117

Spatial Structure of Soymorphin-6 Molecule

L.N. Agaeva, A.A. Abdinova, S.R. Akhmedova, N.F. Akhmedov, and N.A. Akhmedov 1122

A Thermodynamic Model for the Formation of Protein Aggregates on a Matrix

E.O. Vasilenko, S.A. Kozin, V.A. Mitkevich, A.S. Buchelnikov, and Yu.D. Nechipurenko 1128

The Refinement of the Parameters of β -Turns Using Neutron Diffraction Data

A.A. Korobkov, A.A. Khurmuzakiy, N.G. Esipova, V.G. Tymanyan, and A.A. Anashkina 1141

Genome-Wide Association Analysis in Chickpea Landraces and Cultivars

*M.A. Duk, A.A. Kanapin, M.P. Bankin, M.A. Vishnyakova,
S.V. Bulyntsev, and M.G. Samsonova* 1149

Cell Biophysics

Exploring the Fluorescence Action Spectrum of Photosynthesis

S.I. Zienko and V.L. Zhbanova 1164

Physicochemical Properties and Composition of the Liposome Lipids from Lecithin Depending on Conditions that Lead to the Formation of Liposome Lipids

L.N. Shishkina, D.V. Paramonov, M.A. Klimovich, and M.V. Kozlov 1172

Background Formation of Lower Levels of Reactive Oxygen Species by Neutrophils after Hypomagnetic Field Exposure Is Not Accompanied by the Impairment of Chemiluminescence Response of Neutrophils to Respiratory-Burst Stimuli

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, N.I. Novikova, and E.E. Fesenko 1180

Mechanism of the Cytotoxic Effect of Noble Metal Polyacrylates on Tumor Cells

A.K. Chigasova, L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, and N.V. Bluhterova 1187

Complex Systems Biophysics

Lipase and Esterase Activity in Soils from Ancient Burial Vessels

N.N. Kashirskaya, E.V. Chernysheva, S.N. Udaltsov, and L.N. Plekhanov 1200

Dependence of the Oxygen Release Intensity from Red Cells on the Degree of Their Clustering in Sludges	
<i>I.A. Ponomarev and G.Th. Guria</i>	1210
Analysis of the Relationship Between the Activity of the Reticular Formation of the Medulla Oblongata, Respiratory and Cardiovascular Systems in Rats under Painful Stimulation	
<i>O.E. Dick</i>	1220
Comparative Analysis of the Degree of Hydrolysis of Biopolymers in Hyaline Cartilage Homogenates in the Presence of Proteolytic Enzymes	
<i>T.I. Nikolaeva, D.A. Barsuk, M.V. Molchanov, D.A. Prokhorov, V. I. Emelyanenko, and P.V. Shekhovtsov</i>	1229
Biosensor Systems: Determination of Optimal Time Parameters of Olfactory Stimulation	
<i>A.E. Matukhno, M.V. Petrushan, L.V. Lysenko, and V.N. Kiroy</i>	1237
Method for Short-Term Prediction of Ultradian and Infradian Rhythms Based on the Registration of Fluctuations in the Rates of Radioactive Decay of Potassium-40	
<i>M.E. Diatropov, M.A. Diatropova, and S.M. Slesarev</i>	1251

Medical Biophysics

Why Gaseous Nitric Oxide Inhalation Does Not Influence on Systemic Arterial Pressure in Human and Animal Organisms?	
<i>A.F. Vanin, A.A. Abramov, A.B. Vagapov, A.A. Timoshin, A.V. Pekshev, V.L. Lakomkin, and E.K. Ruuge</i>	1259
Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials on the Speed of Pulse Wave Propagation	
<i>B.G. Gharamyan</i>	1265
Piezopulsometric Analysis of the Functional State of Human Cardiovascular System	
<i>V.P. Nesterov, A.I. Burdygin, K.B. Ivanov, K.V. Sobol, and I.V. Shemarova</i>	1280
Analysis of Oscillatory Processes in the Cardiovascular System in Response to Local Heating in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus	
<i>I.V. Tikhonova, A.V. Tankanag, I.E. Guseva, and A.A. Grinevich</i>	1292

Discussion

About the Pathway of Amyloid Aggregation of Titin	
<i>L.G. Bobyleva, T.A. Uryupina, M.A. Timchenko, S.N. Udaltsov, I.M. Vikhlyantsev, and A.G. Bobylev</i>	1303

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МАГНИЯ С СЕМИХИНОНОВЫМИ РАДИКАЛАМИ ТАЙРОНА – ИНДИКАТОРА АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2023 г. Л.Ю. Устынюк*, В.А. Медведева*, **, С.О. Любимовский***, Э.К. Рууге*, **, А.Н. Тихонов*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Россия
E-mail: #leila_ust@mail.ru, ##an_tikhonov@mail.ru

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, ул. Академика Чазова, 15а, Москва, 121552, Россия

***Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, ул. Вавилова, 38, Москва, 119991, Россия

Поступила в редакцию 17.09.23 г.

После доработки 17.09.23 г.

Принята к публикации 04.10.23 г.

С использованием экспериментальных (ЭПР) и квантово-химических (теория функционала плотности) методов исследования показано, что наблюдавшиеся нами ранее изменения в спектре ЭПР семихинонового радикала тайрона в морской воде обусловлены его взаимодействием с ионами Mg^{2+} . Образование комплекса между Mg^{2+} и радикалом тайрона обусловлено электростатическим притяжением ионов, несущих на себе большие заряды противоположного знака (+2 и -3), с одной стороны, и способностью ионов Mg^{2+} эффективно связываться с бидентатными кислородсодержащими лигандами, с другой стороны. Образование тесных контактных ионных пар приводит к перераспределению электронной и спиновой плотности в радикале тайрона, о чем можно судить по наблюдаемым изменениям в спектре ЭПР этого радикала.

Ключевые слова: свободные радикалы, активные формы кислорода, тайрон, вода, хлорид магния, семихинон, ЭПР, теория функционала плотности.

DOI: 10.31857/S0006302923060017, EDN: ROAOII

Активные формы кислорода (АФК), такие как супероксидный анион-радикал $O_2^{\bullet-}$, гидроксильный радикал $HO^{\bullet}$, пероксид водорода H_2O_2 и синглетный кислород 1O_2 , образуются в разных молекулярных системах. В биологических системах АФК были обнаружены в середине XX века, когда появились сообщения, что АФК могут образовываться в качестве побочных продуктов ферментативных реакций *in vivo* [1]. Установлено, что АФК могут приводить к повреждению клеточных структур [2], вызывая различные патологии, среди которых ишемия, атеросклероз и т.д.

При изучении биологических процессов, протекающих с участием свободных радикалов, важную роль играет метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), позволяющий обнаруживать

АФК с помощью так называемых спиновых ловушек или специальных молекул-индикаторов, взаимодействующих с короткоживущими АФК [3]. Спектры ЭПР парамагнитных соединений, образующихся при взаимодействии индикаторов с АФК, позволяют следить за образованием АФК. В биофизических и биохимических исследованиях в качестве одного из таких индикаторов часто используется 4,5-дигидроксibenзол-1,3-дисульфат натрия (тайрон, TIRON). Структурной особенностью тайрона (рис. 1) является наличие циклической системы сопряженных двойных связей $C=C$ и включение атомов кислорода в положения 4- и 5- кольца C_6 в систему сопряженных связей [3]. Тайрон существует в восстановленной (хинольной, TN_2), окисленной (хиноновой, T) и промежуточной (семихиноновой, $T^{\bullet-}$ или $TN^{\bullet}$) формах, взаимные превращения между которыми сопровождаются перестройкой системы двойных связей.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, тайрон – 4,5-дигидроксibenзол-1,3-дисульфат, СТВ – сверхтонкое взаимодействие, СТС – сверхтонкая структура, КЧ – координационное число.

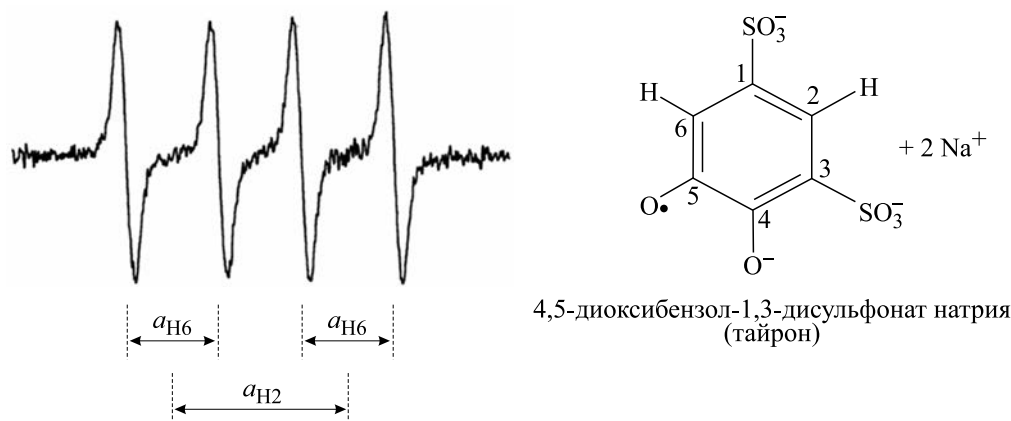


Рис. 1. Спектр ЭПР радикала семихиноновой формы тайрона в воде и структура этого радикала. Сверхтонкая структура спектра ЭПР обусловлена взаимодействием неспаренного электрона с атомами водорода в положениях 2 и 6 бензольного кольца. Величины констант СТВ, обозначенных как a_{H2} и a_{H6} , определяются по соответствующим расстояниям между линиями СТС.

Тайрон является «многоцелевым» реагентом. Он может служить не только индикатором образования АФК [4], но также использоваться в качестве хелатирующего агента при определении и детоксикации следовых количеств некоторых катионов металлов [5] и применяться в качестве субстрата в реакциях с переносом электрона [6]. Тайрон в форме TN_2 , применяемый в качестве индикатора АФК, действует как реагент, окисляемый супероксидным радикалом $O_2^{\bullet-}$ [7–9]. В результате окисления восстановленной формы TN_2 супероксидным радикалом возникают характерные сигналы ЭПР семихиноновой формы индикатора, по интенсивности которых можно судить о генерации $O_2^{\bullet-}$ [8]. В стационарных условиях квадрат концентрации радикалов, измеряемой по их спектрам ЭПР, пропорционален скорости образованию $O_2^{\bullet-}$ [9, 10].

Параметры спектров ЭПР радикалов тайрона зависят от физико-химических свойств среды, окружающей радикалы. Изменение pH раствора влияет на зарядовое состояние радикалов тайрона за счет их протонирования/депротонирования ($TN^{\bullet} \rightleftharpoons T^{\bullet-} + H^+$, где $TN^{\bullet}$ – протонированная форма, $T^{\bullet-}$ – депротонированная форма). Депротонированные радикалы имеют большее время жизни по сравнению с протонированной формой, поскольку для них медленнее протекает реакция диспропорционирования, приводящая к потере парамагнетизма ($2TN^{\bullet} \rightleftharpoons T + TN_2$) [11].

Одной из характерных особенностей тайрона является его способность образовывать комплексы с катионами двухвалентных металлов. Образование комплексов может влиять на распределение электронной плотности в молекулах индикатора,

о чем можно судить по их спектрам ЭПР [11, 12]. В биологических системах присутствуют различные катионы; во всех случаях в них имеются ионы Mg^{2+} , которые играют важную функциональную роль и участвуют в формировании молекулярных структур клетки. Поэтому изучение электронной структуры молекулы тайрона и влияния ионов Mg^{2+} на спектры ЭПР его радикалов остается актуальной задачей физико-химической биологии, связанной с диагностикой АФК. Для решения этой задачи в настоящей работе изучено влияние ионов Mg^{2+} на спектры ЭПР радикалов тайрона в водных растворах и проведен квантово-химический анализ того, как образование комплекса между тайроном и ионами Mg^{2+} в воде влияет на величину спиновой плотности на атомах H2 и H6 в молекуле радикала (рис. 1), что приводит к изменению величин констант сверхтонкого взаимодействия (СТВ) с ядрами этих атомов, определяемых из эксперимента методом ЭПР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЭПР-исследования. Для оценки влияния ионов Mg^{2+} на спектры ЭПР радикалов тайрона были изучены растворы, приготовленные с использованием трис-HCl-буфера (pH варьировали от 6 до 9). В качестве АФК-генерирующей системы использовали модельную систему «ксантин–ксантиноксидаза». Подробности опытов по генерации супероксидных радикалов и регистрации сигналов ЭПР тайрона были подробно описаны в работах [9, 10].

Спектры ЭПР регистрировали с помощью спектрометров ЭПР модели E-109E (Varian, США) и малогабаритного автоматизированного

спектрометра ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Республика Беларусь). Реакционная смесь, в которой генерировались супероксидные радикалы, содержала ксантин (0.2 мМ), ксантинооксидазу (200 мкг/мл), тайрон (10 мМ), трис-НCl (1 М, рН = 6–9), а также $MgCl_2$ в концентрации от 10 мМ до 1 М. Реакционную смесь вводили в газопроницаемую капиллярную трубку PTFE Sub-Lite-Wall (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Капилляр с образцом вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, открытую с обоих концов. Это обеспечивало доступ воздуха (21% O_2) к образцу во время регистрации спектра ЭПР. Условия записи спектров ЭПР тайрона: СВЧ мощность — 10 мВт, амплитуда ВЧ-модуляции — 0.05 мТл.

Для каждой концентрации исследуемых веществ измерения проводили в трех-пяти повторях. Значения констант СТВ определяли из спектров ЭПР так, как это показано на рис. 1 и 2. Для каждой из экспериментальных групп данных вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для сравнения средних значений констант СТВ использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для оценки достоверности отличий между группами, различия между группами считали значимыми при $P < 0.05$. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), ICN (США), Serva (Германия), Aldrich (США).

Квантово-химическое моделирование. Для проведения квантово-химических расчетов использовали некоммерческую программу «ПРИРОДА» [13, 14] и функционал обобщенного градиентного типа PBE [15], хорошо зарекомендовавшие себя при моделировании спектров ЭПР семихинонового радикала тайрона [12] в воде и спектров ЭПР других радикалов, в частности нитроксильного типа [16, 17]. Для решения уравнений Кона–Шэма использованы трехэкспонентные базисные наборы (3z), представляющие собой сжатые наборы функций гауссова типа. Для разложения электронной плотности использованы вспомогательные базисы, представляющие собой несжатые наборы гауссовых функций [13, 14]. Схемы построения данных базисных наборов для атомов элементов, присутствующих в исследуемых молекулярных системах: 1) орбитальные базисы — (5s1p)/[3s1p] для Н, (11s6p2d)/[6s3p2d] для С и О, (14s10p)/[9s5p] для Mg, (15s11p2d)/[10s6p2d] для S; 2) вспомогательные базисы — (5s2p) для Н, (10s3p3d1f) для С и О, (14s3p2d) для Mg, (14s3p3d1f) для S.

Оптимизацию геометрических параметров во всех случаях выполняли без ограничений на симметрию молекулы. Для изолированных (приближение газовой фазы) структур оптимизацию за-

канчивали расчетом вторых производных энергии по координатам атомных ядер (гесссиана). Это позволило доказать, что все полученные структуры соответствуют минимумам на поверхности потенциальной энергии рассматриваемых молекулярных систем. Для семихинонового радикала тайрона в воде и газовой фазе в приближении PBE/3z («ПРИРОДА») рассчитывали величину $\langle S^2 \rangle$, характеризующую чистоту спинового состояния. Во всех случаях — как в газовой фазе, так и в воде — было получено значение $\langle S^2 \rangle = 0.752$, очень близкое к значению $\langle S^2 \rangle = 0.750$ для чистого спинового состояния электрона (спин $S = 1/2$).

Рассчитывали значение спиновой плотности $\rho(r_n)$ на ядрах в атомных единицах. Зная коэффициент пропорциональности между константой изотропного СТВ и спиновой плотностью на ядре, вычисляли значения констант СТВ и сравнивали их с экспериментальными данными. Для ядра 1H константа изотропного СТВ равна:

$$a = \frac{8}{3} \cdot \pi g_e \beta_e g_n \beta_n \rho(r_n), \quad (1)$$

где g_e — g-фактор свободного электрона, β_e — магнетон Бора, g_n и β_n — ядерный g-фактор и ядерный магнетон соответственно, $\rho(r_n)$ — спиновая плотность на ядре [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭПР. Спектр ЭПР семихиноновой формы тайрона в водном растворе, не содержащем $MgCl_2$, представляет собой квартет линий сверхтонкой структуры (СТС) (рис. 1), возникающий в результате взаимодействия неспаренного электрона с двумя неэквивалентными протонами. Четыре линии близкой интенсивности (дублет дублетов) обусловлены изотропным взаимодействием неспаренного электрона, делокализованного в сопряженной π -системе, с ядрами 1H двух атомов водорода бензольного кольца (H2 и H6). Константы сверхтонкого взаимодействия этого радикала в водном растворе в отсутствие $MgCl_2$, измеренные в настоящей работе, равны $a_{H2} = 0.36$ мТл и $a_{H6} = 0.19$ мТл, что совпадает со средними значениями, полученными разными авторами ($a_{H2} = 0.36 \pm 0.03$ мТл и $a_{H6} = 0.18 \pm 0.01$ мТл) и приведенными ранее в нашей работе [12].

Помимо окисления тайрона супероксидом, который в нашей системе генерировался за счет ксантин-ксантинооксидазной системы, тайрон может быть окислен до семихинонового радикала гидроксильным радикалом $HO^\bullet$, а также алкоксильными радикалами [7]. Кроме этого, в щелочной среде (рН ≥ 8.0) наблюдается появление сигнала ЭПР семихинонового радикала за счет окис-

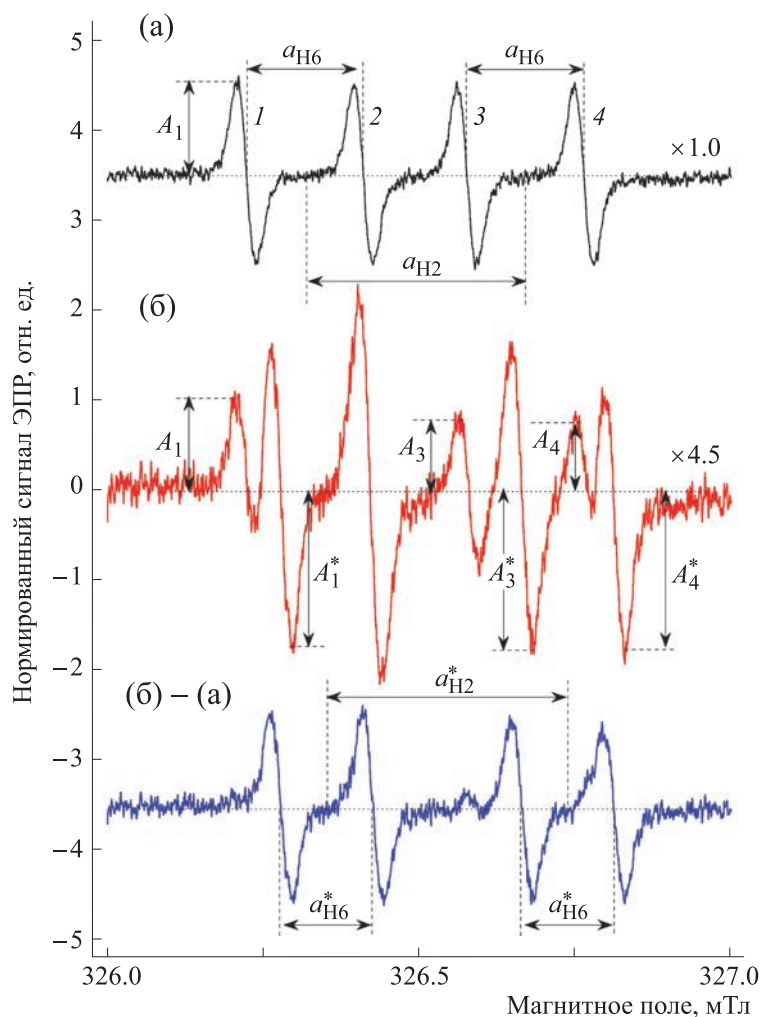


Рис. 2. Влияние MgCl_2 на спектры ЭПР радикала тайрона. Спектр (а) — в отсутствие MgCl_2 , спектр (б) — в присутствии 40 мМ MgCl_2 . В нижней части рисунка показана разность сигналов (б) и (а), нормированных на амплитуду линии A_1 .

ления тайрона молекулярным кислородом O_2 . Сигнал ЭПР радикала тайрона в кислой среде ($\text{pH} < 6$), как правило, не наблюдается [10–12]. Это происходит, вероятнее всего, вследствие реакции дисмутации протонированных форм этого радикала.

Влияние MgCl_2 на спектры ЭПР семихиноновой формы тайрона. На рис. 2 показаны спектры ЭПР радикалов тайрона, измеренные в исходном растворе без MgCl_2 (спектр на рис. 2а) и в присутствии 40 мМ MgCl_2 в среде инкубации при pH 7.4 (спектр на рис. 2б). Видно, что в присутствии MgCl_2 в спектре ЭПР появляются дополнительные линии, смещенные относительно линий исходного спектра, измеренного в отсутствие MgCl_2 . При этом положение второй линии СТС практически совпадает для сигналов ЭПР в контрольном образце (без MgCl_2) и в присутствии 40 мМ MgCl_2 . Как будет показано далее, наблю-

даемое явление — появление новых линий СТС — связано с возникновением комплексов $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, которые дают сигналы ЭПР с измененными константами СТВ. В присутствии MgCl_2 наблюдается некоторое уменьшение амплитуд всех линий сигнала ЭПР; это обусловлено тем, что в этом случае спектр ЭПР — суть суперпозиция спектров от двух фракций радикалов (свободного и связанного с Mg^{2+}).

Приведенные на рис. 2 спектры ЭПР были получены с помощью спектрометра Е–109Е, снабженного системой для точного определения g -фактора (field frequency lock), которая позволяет фиксировать положения спектров ЭПР относительно их g -факторов и корректно находить разностные спектры ЭПР. Это позволило корректно разделить сигналы ЭПР двух фракций радикалов и выделить сигнал ЭПР от комплексов $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$. Для получения разностного сигнала, принадле-

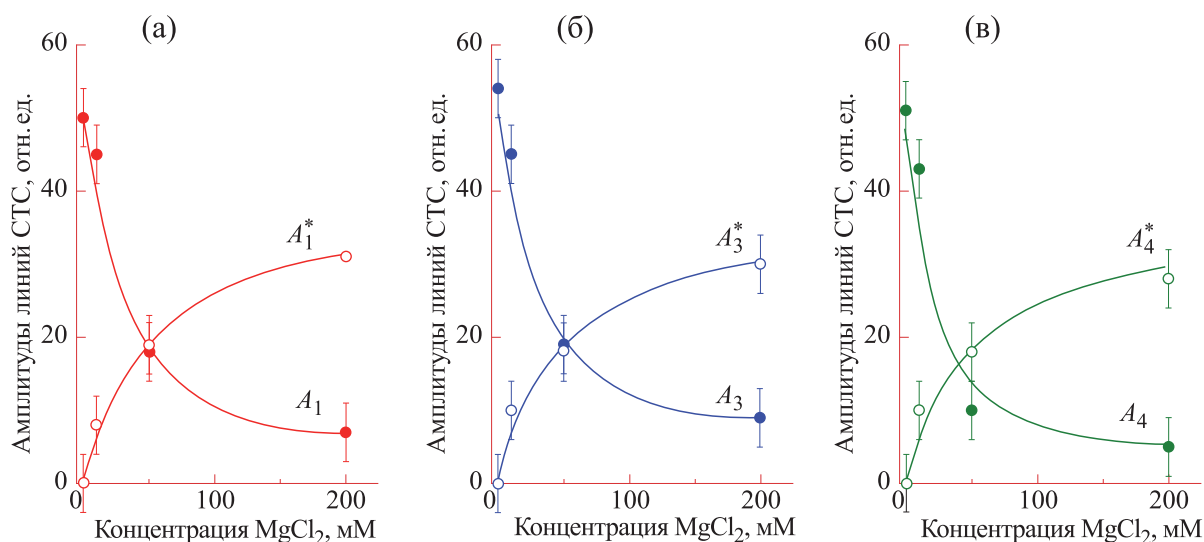


Рис. 3. Влияние MgCl_2 на амплитуды различных линий спектра ЭПР радикала тайрона (см. маркировку линий на рис. 2).

жащего комплексам $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, исходные спектры ЭПР были нормированы таким образом, чтобы амплитуды первой линии контрольного сигнала и первой компоненты сигнала ЭПР, записанного в присутствии MgCl_2 , которые обозначены символами A_1 , были выровнены по величине. В этом случае разностный спектр ЭПР на рис. 2 ((б) — (а)) с определенностью можно отнести к фракции радикалов, образующих комплексы с ионами Mg^{2+} .

Из рис. 2 видно, что константы СТБ $a_{\text{H}6}$ и $a_{\text{H}2}$ для двух фракций заметно различаются. В отсутствие MgCl_2 эти константы составляют $a_{\text{H}2} = 0.36$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.19$ мТл. Фракция радикала, образующего комплекс с Mg^{2+} , характеризуется значениями $a_{\text{H}2}^* = 0.39$ мТл и $a_{\text{H}6}^* = 0.15$ мТл (определены для раствора, содержащего 40 мМ MgCl_2). Второе различие спектров связано с тем, что образование комплекса $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$ приводит к уменьшению g -фактора сигнала ЭПР, о чем свидетельствует заметное смещение спектра в сторону более высокого магнитного поля.

В дополнение к сказанному выше можно привести данные о зависимости интенсивностей компонент спектра от концентрации MgCl_2 в растворе. Из рис. 3 видно, что с ростом концентрации MgCl_2 возрастают амплитуды линий с измененными значениями СТБ, в то время как линии исходного спектра (в растворе без MgCl_2) уменьшаются. Такая картина отражает перераспределение радикалов между свободной и связанной с Mg^{2+} формами ($\text{T}^{\bullet-}$ без Mg^{2+} и комплексы $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$): с увеличением концентрации

ионов Mg^{2+} возрастает число комплексов $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, дающих сигнал ЭПР с измененными константами СТБ (рис. 3).

Для сравнения аналогичное исследование было выполнено с растворами NaCl . Добавление NaCl в тех же концентрациях, что и MgCl_2 , практически не влияло на значения констант СТБ семихинонового радикала тайрона в диапазоне от 0 до 200 мМ NaCl (данные не приведены). Это наблюдение показывает, что именно ионы магния отвечают за описываемый эффект.

Заметим, что при значительном увеличении концентрации MgCl_2 (≥ 20 мМ) наблюдается небольшое уменьшение всех компонент СТБ сигнала ЭПР. Это может быть обусловлено (по крайней мере частично) уменьшением добротности резонатора спектрометра при высоких концентрациях ионов. В пользу этого свидетельствует тот факт, что при высоких концентрациях MgCl_2 (> 50 мМ) мы наблюдали некоторое падение амплитуды сигнала ЭПР спиновой метки ТЕМРО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила), помещенной в запаянную кварцевую ампулу (данные не приведены). Нельзя также исключить, что при высоких концентрациях добавленных солей изменяется активность ксантиноксидазы, что может уменьшать скорость генерации супероксидных радикалов.

Эксперименты с растворами тайрона при постоянной концентрации MgCl_2 , но при различных значениях pH (в диапазоне от 6.2 до 9.0) показали, что при этом сохраняется положение всех четырех линий сигнала ЭПР. Значения констант СТБ остаются постоянными (данные не приведены), что свидетельствует о том, что они обуслов-

лены непосредственным влиянием иона Mg^{2+} , входящего в состав комплекса $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$. Однако амплитуда сигнала уменьшается по мере закисления среды инкубации. Это может быть связано с ускорением реакции дисмутации в результате протонирования радикала.

Квантово-химическое моделирование влияния ионов Mg^{2+} на параметры сверхтонкой структуры спектра ЭПР семихинонового радикала тайрона. Экспериментальные данные о влиянии ионов Mg^{2+} на значения констант СТВ тайрона согласуются с результатами квантово-химических расчетов методом функционала плотности. Ранее [12] нами было показано, что такие расчеты достаточно точно предсказывают значения констант СТВ радикала тайрона в водной среде. Для моделирования водного окружения радикалов были построены оболочки, состоящие из 40 молекул воды. Молекулы воды взаимодействуют как с радикалом, так и между собой. Полученные данные свидетельствуют, что наблюдаемый сигнал ЭПР принадлежит депротонированному радикалу семихинонового типа (рис. 1), несущему на себе большой отрицательный заряд ($Z = -3$), что затрудняет реакцию диспропорционирования (дисмутации) радикалов. Протонированные формы радикала в спектре ЭПР не наблюдаются, что объясняется ускоренной гибелью этих форм за счет процессов диспропорционирования [10–12].

В данной работе такой подход был использован для моделирования влияния ионов Mg^{2+} на параметры спектров ЭПР радикалов тайрона, образующих контактные ионные пары $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$. В работах [11, 12] семихиноновые радикалы тайрона регистрировали в морской воде, где основным растворенным веществом был NaCl , а MgCl_2 содержался в концентрации, на порядок меньшей, чем NaCl . В спектре ЭПР наблюдалось расщепление линий и снижение интенсивности исходного сигнала, наблюдаемого в дистиллированной воде. Очевидно, что этот эффект связан с влиянием именно ионов Mg^{2+} , присутствующих в морской воде в меньших концентрациях, чем ионы Na^+ . Приведенные ниже данные квантово-химического расчета хорошо согласуются с таким выводом.

Моделирование водной оболочки радикалов тайрона, не связанных и связанных с ионами Mg^{2+} , проводили методом, подробно описанным в работе [12]. Оно включало построение первичной оболочки из 40 молекул растворителя вокруг радикала путем последовательного добавления молекул H_2O (по 2–4 молекулы) с последующей оптимизацией структуры после каждого добавления. Полученная таким образом оптимизированная структура затем подвергалась полной перестройке системы водородных связей в водной

оболочке путем дезориентации молекул воды в ней с последующей полной оптимизацией геометрических параметров, приводившей к новой структуре такого же состава, которая, в свою очередь, подвергалась такой же перестройке. В результате таких многократных перестроек сетки водородных связей был получен набор структур ($\text{T}^{\bullet-}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ в работе [12] и $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ в настоящей работе), различающихся полными электронными энергиями, количеством водородных связей в оболочке, распределением электронной, в частности спиновой, плотности внутри радикала.

Для оценок усредненных констант СТВ использовали распределение Больцмана:

$$\langle a(H, j) \rangle = Z^{-1} \sum_i a^{(i)}(H, j) \exp\left(-\frac{\Delta E_i}{k_B T}\right), \quad (2)$$

где индекс j соответствует обозначению ядра рассматриваемого атома водорода (H), индекс i соответствует номеру рассматриваемой структуры, $Z = \sum_i \exp(-\Delta E_i / (k_B T))$ – статистическая сумма, ΔE_i – относительная энергия структуры, k_B – постоянная Больцмана, $T = 298.15$ К.

Рассчитанные по формуле (2) значения констант СТВ хорошо соответствуют экспериментальным данным [12]. Для радикала тайрона, не связанного с Mg^{2+} , усредненные константы СТВ структур состава $\text{T}^{\bullet-}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ (PBE/3z) составляют $a_{\text{H}2} = 0.37$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.18$ мТл, а для самой устойчивой из найденных структур – $a_{\text{H}2} = 0.37$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.17$ мТл. Это означает, что определяющий вклад в величину константы СТВ вносит именно самая устойчивая структура. Экспериментальные значения, измеренные в настоящей работе, составляют $a_{\text{H}2} = 0.36$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.19$ мТл и совпадают с рассчитанными в пределах точности измерения этих констант (0.01 мТл).

В настоящей работе для моделирования спектров ЭПР структур состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ мы применили подход, использованный нами ранее в работе [12]. Получена 21 структура такого состава, относительные энергии которых и рассчитанные константы СТВ приведены в табл. 1 в порядке возрастания их относительной энергии ΔE . Эти структуры соответствуют контактным ионным парам $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, которые полностью окружены 40 молекулами воды. В таких комплексах ион Mg^{2+} может быть связан с радикалом $\text{T}^{\bullet-}$ двумя способами. Первый способ (I), структуры 1 и 2 (рис. 4а и 4б соответственно): ион металла координирован по двум атомам кислорода в положениях 4 и 5 бензольного кольца. Второй тип (II), структуры 5 и 14 (рис. 4в и 4г соответственно): ион металла координирован по атому кислорода в

Таблица 1. Относительные энергии, координационные числа иона Mg^{2+} и константы СТВ для ионных пар состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ (PBE/3z)

№ структуры	$a_{\text{H}_2}^*$, мТл	$a_{\text{H}_6}^*$, мТл	Координационное число	ΔE , кДж/моль	Способ координации
1	0.40	0.16	5	0	I
2	0.44	0.22	6	13	I
3	0.27	0.15	6	19	I
4	0.36	0.13	6	20	I
5	0.46	0.18	6	32	II
6	0.40	0.17	5	33	I
7	0.40	0.19	6	41	II
8	0.27	0.14	6	45	I
9	0.38	0.13	6	49	I
10	0.41	0.14	5	50	I
11	0.37	0.09	6	77	II
12	0.32	0.13	6	95	I
13	0.44	0.17	6	99	II
14	0.54	0.30	5	104	II
15	0.31	0.17	6	104	I
16	0.34	0.12	6	109	II
17	0.33	0.13	6	113	II
18	0.37	0.09	6	114	I
19	0.41	0.15	5	114	I
20	0.51	0.24	6	136	II
21	0.39	0.20	5	143	I
Средние значения	0.40	0.16	—	—	—
Экспериментальные значения (40 мМ MgCl_2)	0.39	0.15	—	—	—

положении 4 бензольного кольца и одному из атомов кислорода ближайшей сульфогруппы (в положении 3 бензольного кольца).

Как уже было сказано выше, необходимо учитывать влияние способа формирования сетки водородных связей на константы СТВ радикала тайрона в контактных ионных парах типов I и II. Кроме того, в ионных парах $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ обоих типов меняется координационное число (КЧ) иона магния. Это связано с тем, что в первой

координационной сфере Mg^{2+} могут находиться 3 или 4 молекулы воды и КЧ с учетом двух атомов кислорода радикала составляет 5 (структуры 1 и 14 на рис. 4а и 4г соответственно) или 6 (структуры 2 и 5 на рис. 4б и 4в соответственно). Соответствующие расстояния $\text{Mg}-\text{O}$ не превышают 2.3 Å. В табл. 1 приведены относительные энергии, КЧ иона магния в оптимизированных структурах состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ и константы изотропного СТВ, рассчитанные из величин спиновой плот-

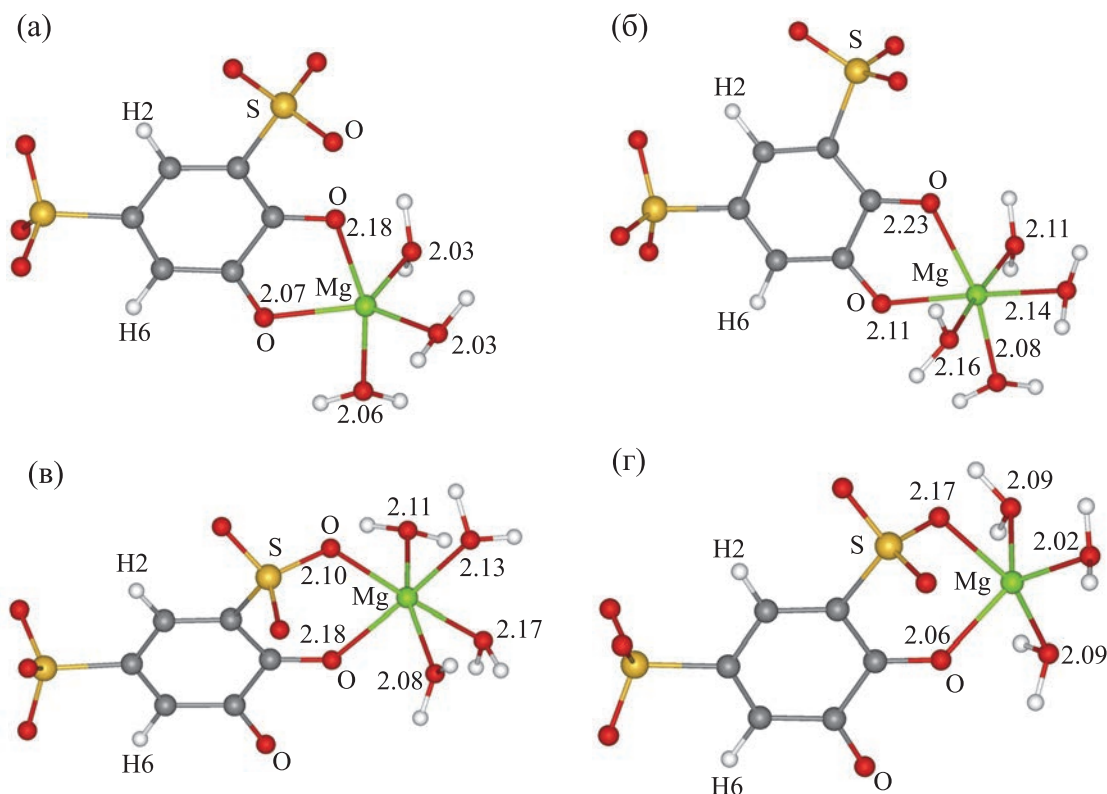


Рис. 4. Связывание семихинонового радикала тайрона с ионом Mg^{2+} . Представлены фрагменты оптимизированных структур состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$: (а) – структура 1 (I, КЧ = 5), (б) – структура 2 (I, КЧ = 6), (в) – структура 5 (II, КЧ = 6), (г) – структура 14 (II, КЧ = 5), где римскими цифрами указаны два возможных способа связывания иона Mg^{2+} (см. текст), а КЧ – координационное число иона Mg^{2+} , определяемое числом атомов кислорода, расстояние до которых от ядра атома магния не превышает 2.3 Å. Соответствующие расстояния в Å представлены на рисунке цифрами у каждого из атомов О. Молекулы воды оболочки, не связанные напрямую с ионом магния, на данном рисунке не показаны, общее число молекул воды в системе составляло 40.

ности на ядрах атомов водорода H2 и H6. Усредненные значения констант a_{H2}^* и a_{H6}^* получены с использованием выражения (2).

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы.

1) В структуре 1 (рис. 4а) с минимальной полной электронной энергией ион Mg^{2+} окружен пятью атомами кислорода, включая два атома кислорода радикала тайрона и три атома кислорода молекул водной оболочки (КЧ = 5).

2) Ион Mg^{2+} в структуре 1 и следующих за ней по энергии структурах 2–4 связан с двумя атомами кислорода бензольного кольца, то есть способ координации I соответствует структурам с более низкой энергией.

3) Усредненные значения констант СТВ очень хорошо соответствуют экспериментальным данным, полученным при регистрации спектра ЭПР в присутствии MgCl_2 (в пределах точности изме-

рений, ± 0.01 мТл), и совпадают с рассчитанными значениями констант СТВ для ионной пары I.

Поскольку спин ядра наиболее распространенного изотопа ^{24}Mg равен нулю, наблюдаемые изменения в спектре ЭПР радикала тайрона в присутствии ионов магния могут быть связаны с перераспределением электронной (в частности, спиновой) плотности в этом радикале.

При концентрации $\text{MgCl}_2 \geq 40$ мМ в спектре ЭПР наблюдается появление новых линий СТС, что можно трактовать как суперпозицию двух сигналов, каждый из которых состоит из четырех линий СТС (рис. 2), различающихся значениями констант СТС и g -факторами. Это позволяет предположить, что при данной концентрации MgCl_2 не все радикалы $\text{T}^{\bullet-}$ связаны с ионами Mg^{2+} . Основываясь на концентрации ионов магния 50 мМ и зная объем системы состава $\text{T}^{\bullet-}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ (для оценок была взята структура 1 с наименьшей полной электронной энергией сре-

ди структур 1-2I), можно оценить вероятность присутствия катиона магния в водной оболочке анион-радикала тайрона. Если предположить, что ионы Mg^{2+} распределены равномерно по всему объему водного раствора, вероятность образования комплекса за счет случайного столкновения ионов Mg^{2+} с радикалами составляет около 3%, что значительно меньше вклада структуры с измененными характеристиками СТС в суммарный спектр ЭПР. Однако поскольку между противоположно заряженными частицами с зарядами -3 и +2 действует электростатическое притяжение, локальная концентрация ионных пар должна быть значительно больше. За счет этого в спектре ЭПР возникает комбинация двух сигналов приблизительно одинаковой интенсивности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что изменения в спектре ЭПР водных растворов семихинонового радикала тайрона в присутствии $MgCl_2$, наблюдавшиеся ранее [11, 12], обусловлены взаимодействием ионов Mg^{2+} с семихиноновым радикалом тайрона, приводящим к образованию прочных комплексов, которые также можно рассматривать как контактные ионные пары. Они образуются благодаря электростатическому притяжению ионов, несущих заряды противоположного знака (-3 и +2), и способности ионов Mg^{2+} эффективно связываться с бидентатными кислородсодержащими лигандами. Образование тесных контактных ионных пар приводит к перераспределению электронной, в частности спиновой, плотности в радикале, о чем свидетельствуют наблюдаемые в присутствии $MgCl_2$ изменения в спектре ЭПР этого радикала.

Результаты квантово-химических расчетов в рамках метода функционала плотности, выполненных для дискретных моделей водного окружения радикала тайрона, содержащих 40 молекул воды, хорошо согласуются с выводом об образовании комплексов между ионами Mg^{2+} и этими радикалами [12]. Используемый нами подход позволяет с высокой точностью воспроизводить значения констант СТВ в семихиноновом радикале тайрона. Об этом наглядно свидетельствует сравнение экспериментальных и теоретических значений констант СТВ в дистиллированной воде и в присутствии ионов магния. В отсутствие ионов Mg^{2+} нами были получены экспериментальные значения констант: $a_{H2} = 0.36 \pm 0.01$ мТл и $a_{H6} = 0.19 \pm 0.01$ мТл, которым соответствуют теоретические константы $a_{H2} = 0.37$ мТл и $a_{H6} = 0.18$ мТл. В присутствии 40 мМ $MgCl_2$ значения СТВ равны $a_{H2}^* = 0.39 \pm 0.01$ мТл и $a_{H6}^* = 0.15 \pm$

± 0.01 мТл, им соответствуют теоретические значения $a_{H2}^* = 0.40$ мТл и $a_{H6}^* = 0.16$ мТл.

Учитывая практическую значимость исследуемой системы для обнаружения активных форм кислорода в биологических системах, мы планируем в дальнейшем распространить этот подход на другие ионы металлов, которые в таких системах могут присутствовать в заметных концентрациях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные исследования, представленные в публикации, выполнены в рамках темы «Свободные радикалы кислорода, оксид азота, индукторы гибели кардиомиоцитов и кардиопротекторные соединения при развитии патологии сердечно-сосудистой системы» (Госрегистрация № 121031300182-4) научно-исследовательских работ Кардиологического научного центра имени академика Е.И. Чазова. Квантово-химические расчеты проводились в рамках темы «Строение и динамика атомно-молекулярных систем» (№ 121031300176-3) научно-исследовательских работ МГУ имени М.В. Ломоносова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Commoner, J. Townsend, and G. E. Pake, *Nature*, **174** (4432), 689 (1954).
2. D. Harman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (11), 7124 (1981).
3. A. N. Ledenev, A. A. Konstantinov, E. Popova, and E. K. Ruuge, *Biochem. Int.*, **13** (2), 391 (1986).
4. M. A. Hemminga, *Chem. Phys. Lipids*, **32** (3–4), 323 (1983).
5. M. Otto, J. Stach, R. Kirmse, and G. Werner, *Talanta*, **28** (5), 345 (1981).
6. F. A. Taiwo, *Spectroscopy*, **22** (6), 491 (2008).
7. R. W. Miller and F. D. H. Macdowall, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 176 (1975).
8. И. В. Григолава, М. Ю. Ксензенко, А. А. Константинов и др., *Биохимия*, **45** (1), 75 (1980).
9. О. В. Коркина и Э. К. Рууге, *Биофизика*, **45** (4), 695 (2000).

10. A. L. Dudylyna, M. V. Ivanova, K. B. Shumaev, and E. K. Ruuge, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 99 (2019).
11. A. V. Peskin, Yu. A. Labas, and A. N. Tikhonov, *FEBS Lett.*, **434** (1–2), 201 (1998).
12. S. O. Liubimovskii, L. Yu. Ustynyuk, and A. N. Tikhonov, *J. Mol. Liq.*, **333**, 115810 (2021).
13. D. N. Laikov, *Chem. Phys. Lett.*, **281** (1–3), 151 (1997).
14. Д. Н. Лайков, Дисс. ... канд. физ.-мат. наук (МГУ имени М.В. Ломоносова, М., 2000).
15. J. P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.*, **77** (18), 3865 (1996).
16. L. N. Ikryannikova, L. Yu. Ustynyuk, and A. N. Tikhonov, *J. Phys. Chem. A*, **108** (21), 4759 (2004).
17. L. N. Ikryannikova, L. Yu. Ustynyuk, and A. N. Tikhonov, *Magn. Reson. Chem.*, **48** (5), 337 (2010).
18. Дж. Вертц и Дж. Болтон, *Теория и практические приложения метода ЭПР* (Мир, М., 1975).

Interaction of Magnesium Ions with Semiquinone Radicals of Tiron Used as an Indicator of Reactive Oxygen Species

L.Yu. Ustynyuk*, V.A. Medvedeva*, **, S.O. Liubimovskii*, E.K. Ruuge*, **, and A.N. Tikhonov***

**M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

***E.I. Chazov National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia*

****A.M. Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia*

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) and quantum chemical calculations based on density functional theory were used to demonstrate that the earlier observed changes in the EPR spectra of Tiron semiquinone radical dissolved in sea water solution occur due to interaction of Mg^{2+} ions with Tiron radical. This interaction is caused by electrostatic attraction between Mg^{2+} ions and Tiron radicals, which bears great charges of opposite sign (+2 and –3), on the one hand, and due to the ability of Mg^{2+} ion to bind to bidentate oxygen-containing ligands efficiently, on the other hand. The formation of tight contact ion pairs leads to electron and spin density redistribution in the Tiron radical, as can be seen by the observed changes in the EPR spectra of the radical.

Keywords: free radicals, reactive oxygen species, Tiron, water, magnesium chloride, semiquinone, EPR, density functional theory

О МЕТОДИЧЕСКИХ ОШИБКАХ ОЦЕНИВАНИЯ НАЧАЛЬНЫХ СКОРОСТЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ И СПОСОБАХ ИХ КОРРЕКЦИИ (НА ПРИМЕРЕ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ)

© 2023 г. А.Ю. Лянгузов*, #, Н.М. Малыгина*, **, Т.А. Петрова*

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

**Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, ул. Академика Лебедева, 6, Санкт-Петербург, 194044, Россия

#E-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Представлен универсальный алгоритм расчета начальных скоростей ферментативных реакций в «нулевой» момент времени по кинетической кривой расхода субстрата или накопления продукта при проведении прямых кинетических измерений активности ферментов. Исследование выполнено на примере коммерческого препарата лактатдегидрогеназы и стандартного биохимического набора реагентов. Предлагаемый подход позволяет практически исключить систематическую ошибку измерений, с одинаковой точностью определять начальную скорость реакции независимо от уровня активности ферментов, сократить до одной минуты время выполнения анализов, а также расширить сферу применения стандартных наборов реагентов для исследования образцов ферментов разного происхождения при решении широкого круга задач. Алгоритм не может применяться при использовании в аналитической процедуре систем сопряженных ферментов, поскольку на кинетических кривых в этом случае имеется длительная начальная лаг-фаза.

Ключевые слова: стационарная ферментативная кинетика, начальная скорость реакции, «нулевой» момент времени, лактатдегидрогеназа.

DOI: 10.31857/S0006302923060029, EDN: ROBOAV

Проблема определения начальной скорости ферментативной реакции в момент, максимально близкий к точке перехода в стационарный режим, была сформулирована достаточно давно, но до сих пор не нашла адекватного решения. В практической энзимологии принято считать, что условия выполнения анализов подобраны так, что измерения проводятся на так называемом «линейном» участке кинетической кривой, обычно удаленном от момента запуска реакции на 30–60 с и продолжающемся не менее трех минут [1]. В реальности же ни один из участков кинетической кривой никогда не является линейным, и чем шире временной интервал наблюдений и выше концентрация или молекулярная активность фермента, тем больше отклонение от линейности.

Современная тенденция к автоматизации и стандартизации биохимических методов анализа

привела к массовому появлению на рынке готовых наборов реагентов для исследования ферментов и метаболитов. Поскольку основными потребителями таких наборов являются клинические диагностические лаборатории, то протоколы их использования и расчета показателей разрабатывались главным образом для клинической лабораторной практики. Тем не менее, в биологии, экологии, биотехнологии, пищевой промышленности, экспериментальной медицине, ветеринарии регулярно возникает необходимость определения активности ферментов для решения самых разных задач.

Цель настоящей работы – на примере лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) и стандартного набора реагентов для определения ее активности показать, как рутинные методы анализа вносят систематическую ошибку в результаты измерений и как можно ее скорректировать.

Сокращения: ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован коммерческий препарат лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из мышц кролика: тип II, 800–1200 ед/мг (Sigma-Aldrich, США) в разных разведениях и стандартный набор реагентов для определения активности ЛДГ кинетическим фотометрическим методом (LDH. Pyruvate. Kinetic UV. DGKC. Liquid; Spinreact, Испания) [1, 2].

ЛДГ катализирует реакцию превращения пирувата в лактат с NADH в качестве кофермента:

ЛДГ



Прямой фотометрический метод определения скорости ЛДГ-реакции основан на измерении убыли поглощения инкубационной смеси при 340 нм за счет уменьшения концентрации NADH в ходе ферментативного процесса.

Согласно стандартному протоколу, к 3 мл рабочего реагента при 37°C добавляют 50 мкл образца фермента, перемешивают и через 1 мин регистрируют значение поглощения инкубационной смеси. Затем поглощение измеряют еще трижды, т.е. всего четыре значения поглощения для каждой анализируемой пробы. В пределах второй-четвертой минут рассчитывают среднее значение изменения поглощения за одну минуту, которое затем используют для расчета активности фермента по приведенной в протоколе формуле.

Протокол использования клинического набора реагентов для определения активности ЛДГ отличается от общепринятого метода при решении других задач лишь значением коэффициента пересчета на 1 литр сыворотки крови.

Далее в разделе «Результаты и обсуждение» будет описан оптимизированный нами протокол определения максимальной начальной стационарной скорости ЛДГ-реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оксидоредуктазы являются самым многочисленным из семи классов ферментов, в котором NAD(P)H-зависимые ферменты представлены несколькими сотнями наименований, относящихся к разным подклассам [3–5].

Несмотря на кажущуюся простоту стандартных прямых кинетических фотометрических определений скоростей реакций этих ферментов с регистрацией уменьшения поглощения при 340 нм за счет окисления NAD(P)H, остается методическая проблема точности оценивания начальной стационарной скорости, от которой зависит и правильность расчета активности ферментов.

Длительность эксперимента, исчисляемая минутами, особенно при высоких концентрациях или высокой молекулярной активности фермента, обязательно приводит к появлению систематической ошибки измерений. Скорость ферментативного процесса во времени постоянно снижается вследствие истощения субстрата, и, кроме того, может дополнительно тормозиться за счет накопления продукта реакции или изменения состава и pH инкубационной среды в ходе эксперимента. Все перечисленные обстоятельства приводят к занижению средней расчетной скорости реакции, а в итоге — недооценке реальной активности.

Как правило, эта проблема решается подбором оптимальной концентрации фермента в специальной серии экспериментов, когда отклонение от так называемой «линейности» накопления продукта или расхода субстрата во времени не слишком выражено — режим квазилинейности. Однако даже при такой стратегии систематическая ошибка измерений все равно остается, и скорректировать ее практически невозможно.

Лактатдегидрогеназа, использованная в настоящем исследовании как модельный объект, является одним из наиболее хорошо изученных из группы NAD(P)H-зависимых ферментов.

В нашей работе эксперименты проводили на спектрофотометре Lambda 35 (PerkinElmer, США) в кювете с перемешиванием и термостатированием. На рис. 1 представлены типичные кинетические кривые ЛДГ-реакции с разным количеством фермента в анализируемых образцах (рис. 1а) и соответствующие им кривые скорости реакции, которые являются первыми производными кинетических кривых по времени, рассчитанными методом численного дифференцирования (рис. 1б). Совершенно очевидно, что, даже при разумных пределах варьирования концентраций фермента, систематическая ошибка очень быстро может стать критической. Иногда достаточно нескольких секунд от начала реакции, чтобы при высокой активности фермента усредненная оценка скорости уже в первом минутном интервале существенно отклонилась от реальной начальной скорости (рис. 1б).

В отличие от стандартного протокола, рекомендуемого производителями наборов реагентов для определения активности ЛДГ, измерение поглощения инкубационной среды проводили ежесекундно через модуль TimeDrive компьютерной программы UV WinLab Software 6.0.4, предназначенной для выполнения кинетических экспериментов на спектрофотометре Lambda 35 [6]. Для этого субстратную смесь помещали в термостатируемую кювету с перемешиванием и выдерживали в течение 3 мин до достижения стабильной температуры 37°C. Регистрацию поглощения на-

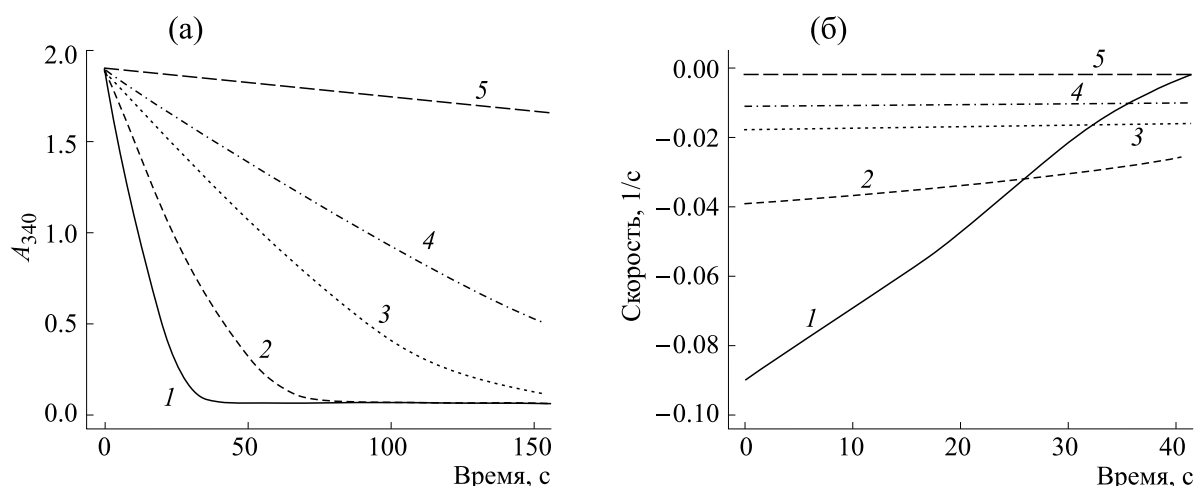


Рис. 1. Кинетические кривые ЛДГ-реакции с разным количеством фермента в образце (а) и соответствующие им кривые скорости реакции (б). Количество единиц активности ЛДГ в пробах: 1 – 5.74, 2 – 2.29, 3 – 1.15, 4 – 0.46, 5 – 0.12.

чинали за 15–20 с до момента внесения исследуемого образца фермента и не прерывали при добавлении анализируемой пробы. Результирующий график процесса имел сложную форму и состоял из трех областей (рис. 2): *a* – базовая линия (примерно 15–20 с), *б* – резкое падение поглощения в момент добавления образца фермента из-за открытой крышки кюветного отсека спектрофотометра (примерно 5–8 с) и *в* – собственно кинетическая кривая реакции.

Основная проблема заключается в том, что исследователя в первую очередь должна интересовать начальная стационарная скорость реакции в

максимально близкий к нулевому момент времени (назовем его «нулевое» время), который приходится на второй интервал (зона *б*, рис. 2), но по первичным данным установить точное время начала реакции практически невозможно. Именно задачу нахождения максимальной начальной скорости реакции в «нулевой» момент времени и решает предлагаемый нами метод. Следует особо отметить, что о предстационарной кинетике в настоящей работе речь не идет.

Результаты экспериментов сохраняли в формате ASCII и далее анализировали с использованием разработанного нами оригинального скрипта на открытом языке программирования R [7].

Алгоритм обработки данных рассматривает базовую линию (зона *a*, рис. 2) как прямую, а начальный участок реальной кинетической кривой (зона *в*, рис. 2) как ветвь параболы – кривую второй степени вида $y = a + bx + cx^2$, где x – регистрируемое время. Для аппроксимации квадратным уравнением использовали отрезок кинетической кривой в диапазоне примерно с десятой по тридцатую-сороковую секунды от момента добавления образца фермента. Точное «нулевое» время начала реакции устанавливали по пересечению аппроксимированной кинетической кривой с базовой линией (зона *б*, рис. 2).

Скорость реакции определяется уравнением $y' = b + 2cx$ как первая производная аппроксимированной кривой по времени. Экстраполяция значения скорости на момент старта реакции (скорректированное значение x) представляет собой искомую начальную скорость реакции в «нулевой» момент времени, точнее всего характеризующую активность фермента в пробе. На графиче-

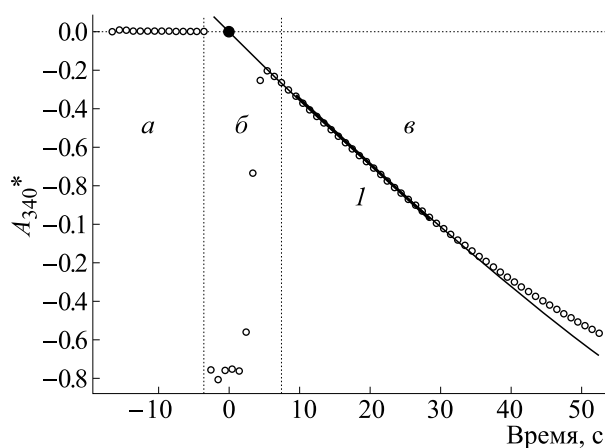


Рис. 2. Расчет координат точки начала реакции: аппроксимация полиномом второй степени начального участка кинетической кривой: зона *a* – базовая линия, зона *б* – резкое падение поглощения в момент добавления образца фермента, зона *в* – кинетическая кривая реакции. A_{340}^* – поглощение инкубационной среды за вычетом поглощения базовой линии, 1 – аппроксимированный участок кинетической кривой.

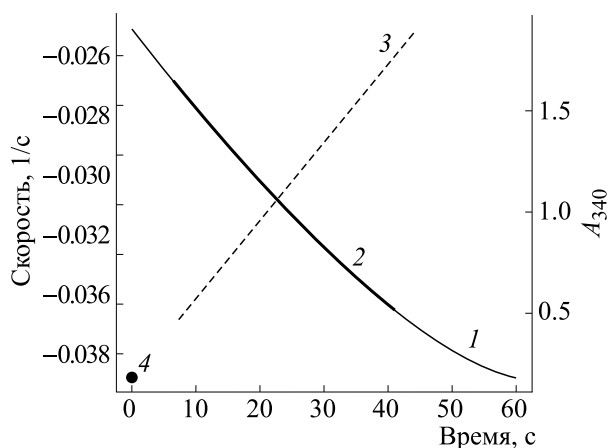


Рис. 3. Расчет начальной скорости ЛДГ-реакции в «нулевой» момент времени: 1 — изменение поглощения в ходе реакции, 2 — аппроксимированный квадратным уравнением участок кинетической кривой, 3 — скорость реакции в этом интервале (первая производная скорректированной кинетической кривой), 4 — оценка значения начальной стационарной скорости реакции в «нулевой» момент времени.

ке это — жирная точка в левом нижнем углу (рис. 3).

При высоких уровнях активности фермента стандартные интервальные оценки скорости реакции могут отличаться от максимальной начальной скорости в «нулевой» момент времени практически на порядок. В табл. 1 приведены значения скоростей ЛДГ-реакции в «нулевой» момент времени и значения скоростей, измеренные стандартным методом.

Описываемый подход в отличие от стандартного протокола позволяет оценить «истинную» максимальную начальную стационарную скорость реакции в «нулевой» момент времени, что

практически исключает систематическую ошибку измерений.

В ЛДГ-реакции кофермент NADH фактически исполняет роль второго субстрата, и наблюдения ведутся по убыли его концентрации. Ранее на примере альфа-амилазы слюны аналогичным образом нами была исследована кинетика накопления продукта реакции [8]. Как и в случае ЛДГ, значения усредненной скорости амилазной реакции могли отличаться от максимальной начальной скорости в «нулевой» момент времени почти на порядок.

Для обработки экспериментальных данных для обоих вариантов нами разработан оригинальный текст скрипта на открытом языке программирования R. Скрипт решает следующие задачи: считывает полученные в экспериментах значения поглощения реакционной смеси во времени, устанавливает момент начала реакции («нулевое» время), оценивает скорректированные значения поглощения и значения скорости реакции в начале ферментативного процесса, вычисляет начальную скорость реакции в «нулевой» момент времени и представляет результаты в графическом формате.

Код скрипта для расчета максимальной начальной скорости реакции не включен в текст статьи и может быть выслан по запросу.

Таким образом, представленная нами новая стратегия расчета начальной скорости ферментативной реакции в «нулевой» момент времени по кинетической кривой расхода субстрата или накопления продукта является практически универсальной и пригодна для анализа кинетики разных ферментов при прямых измерениях их активности (например, кислой и щелочной фосфатаз, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, γ -глутамилтрансферазы и др.) [9].

Таблица 1. Значения скоростей ЛДГ-реакции в «нулевой» момент времени и значения, измеренные стандартным методом, и их соотношения в зависимости от уровня активности фермента в пробе

Уровень активности ЛДГ в пробе	Скорость, 100 с^{-1}		Соотношение скоростей «начальная/средняя»
	Максимальная начальная	*Средняя в пределах 60–240 с	
Высокий	–9.55	–1.00	9.6
Средний	–3.90	–0.99	3.9
Малый	–0.61	–0.52	1.2

Примечание. * — По стандартному протоколу измерения начинают через 60 с после запуска реакции.

В результате предлагаемый нами новый подход к расчету начальных скоростей ферментативных реакций в «нулевой» момент времени позволяет практически исключить систематическую ошибку измерений, с одинаковой точностью определять начальную скорость реакции независимо от уровня активности ферментов, сократить до одной минуты время выполнения анализов, а также расширить сферу применения стандартных наборов реагентов для исследования образцов ферментов разного происхождения при решении широкого круга задач.

Предлагаемый алгоритм нельзя использовать, если в аналитическую систему включены сопряженные системы ферментов, поскольку на кинетических кривых наблюдается длительная начальная лаг-фаза [10, 11].

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования и расходных материалов Ресурсно-го центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка СПбГУ.

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. *Spinreact*, <https://www.spinreact.com>. Дата обращения: 10.05.2023.
2. M. Meerkin, in *Tietz clinical guide to laboratory tests*, Ed. by A. H. B. Wu (W.B. Saunders Company, Danvers, 2006), pp. 648–650.
3. A. Chang, L. Jeske, S. Ulbrich, et al., *Nucl. Acids Res.*, **49**, D498 (2021).
4. *Enzyme Nomenclature*, <http://www.enzyme-database.org/contents.php>. Дата обращения: 10.05.2023.
5. L. S. Vidal, C. L. Kelly, P. M. Mordaka, and J. T. Heap, *Biochim. Biophys. Acta: Proteins Proteomics*, **1866**, 327 (2018).
6. *UV WinLab Software 6.0.4 (PerkinElmer Lambda 35)*, <http://www.perkinelmer.com>. Дата обращения: 10.05.2023.
7. *R Project*, <https://www.r-project.org>. Дата обращения: 10.05.2023.
8. N. M. Malygina, T. A. Petrova, A. Yu. Lianguzov, and A. M. Ivanov, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **488**, 311 (2019).
9. Products/Clinical Biochemistry/Enzymes, <https://www.spinreact.com/en/products-list/clinical-biochemistry/enzymes.html>. Дата обращения: 10.05.2023.
10. W. W. Cleland, *Anal. Biochem.*, **99**, 142 (1979).
11. A. Yu. Lianguzov, T. A. Petrova, and V. E. Stefanov, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **424**, 49 (2009).

On Methodological Errors in Estimating the Initial Velocities of Enzyme-Catalyzed Reactions and on Approaches to Their Correction (A Case Study with Lactate Dehydrogenase)

A.Yu. Lianguzov*, N.M. Malygina*, **, and T.A. Petrova*

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

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

A universal algorithm is proposed to compute the initial velocities of enzyme-catalyzed reactions at “zero time” from the kinetic curve for substrate consumption or product accumulation determined by direct measurements of changes in enzyme activities. The research is illustrated with a commercial lactate dehydrogenase sample and a standard biochemical test kit. The proposed approach makes it possible to virtually eliminate systematic errors in measurements, determine the initial velocity with the same accuracy regardless of the levels of enzyme activities, reduce time spent on analysis to one minute, and expand the scope of application of standard test kits for studying enzymes isolated from different sources when solving a wide range of problems. The algorithm cannot be applied to analyses of coupled enzyme reactions because there is a long initial lag phase in respective kinetic curves.

Key words: steady-state enzyme kinetics, initial reaction velocity, “zero time”, lactate dehydrogenase

УДК 577.3

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ СОЙМОРФИНА-6

© 2023 г. Л.Н. Агаева*, А.А. Абдинова**, С.Р. Ахмедова***, Н.Ф. Ахмедов*, Н.А. Ахмедов*

*Бакинский государственный университет, ул. 3. Халилова, 23, Баку, AZ-1148, Азербайджан

**Азербайджанский государственный педагогический университет,
ул. Узеира Гаджибекова, 68, Баку, AZ-1000, Азербайджан

***Азербайджанский технический университет, просп. Гусейна Джавида, 25, Баку

E-mail: leylanamig@mail.ru

Поступила в редакцию 21.12.2022 г.

После доработки 03.07.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы сойморфина-6 (Tyr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-Asn6-NH₂). Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы сойморфина-6, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекулы, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы сойморфина-6 представляется конформациями восьми шейпов пептидного скелета. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул сойморфинов.

Ключевые слова: экзорфин, сойморфин, опиоид, структура, конформация.

DOI: 10.31857/S0006302923060030, EDN: ROCVSW

Регуляторные пептиды, впервые обнаруженные во второй половине XX века, активно изучаются как физиологами, так и фармакологами, поскольку область биологической активности пептидов чрезвычайно широка. Они являются одним из главных звеньев, объединяющие три регуляторные системы организма — нервную, эндокринную и иммунную в единое целое. В настоящее время у разных видов животных и у человека характеризуется уже более 9000 физиологически активных пептидов. Это короткие цепочки аминокислот (2–70 аминокислотных остатков), выполняющие функцию сигнальных молекул. Большинство таких пептидов нельзя с уверенностью относить ни к нейромедиаторам, ни к гормонам, поскольку они синтезируются как нейронами (передавая сигнал на уровне синапса), так и клетками периферических тканей (передавая сигнал на более дальние расстояния подобно гормонам). Для регуляторных пептидов характерно воздействие сразу на многие системы организма. Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Опиоидные пептиды бывают животного и

растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоидоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Экзорфины выделены из различных видов растений. Сойморфины-5, -6 и -7 (производные β-коглицинина сои) были обнаружены сравнительно недавно. Эти сойморфины в заметных количествах образуются при переваривании сои: при расщеплении β-субъединицы β-коглицинина сои панкреатической эластазой *in vitro* сойморфин-5 составляет 9.1% всех образующихся продуктов. По структуре сойморфины более всего сходны с человеческим β-казоморфином-4. Интересно, что сойморфины — первые известные экзорфины растительного происхождения, являющиеся селективными лигандами μ-рецепторов. Для других опиоидоподобных растительных пептидов характерно сродство к β-рецепторам. Опыты на препаратах подвздошной кишки морской свинки показали, что сойморфины даже в большей степени μ-селективны, чем β-казоморфины. Возможное нейротропное действие сойморфинов важно ис-

Таблица 1. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных ($U_{\text{нев}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы сойморфина-5

№	Шейп	Конформация	Энергетический вклад			$U_{\text{отн}}$
			$U_{\text{нев}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$	
1	efef	$B_3RB_1R_2R_2$	–87.8	4.6	9.7	0
2	efee	$B_3RB_3B_2B_2$	–83.6	3.8	10.1	3.4
3	efff	$B_3RR_1R_2R_2$	–87.8	7.1	13.4	5.9
4	effe	$B_3RR_3B_2B_2$	–76.9	4.6	6.3	7.1
5	eeee	$B_2BB_2B_2B_2$	–80.6	5.5	13.0	10.5
6	eeef	$B_1BB_1R_2R_2$	–76.9	6.7	8.4	11.3
7	eeefe	$B_1BR_1B_2B_2$	–74.3	5.0	9.7	13.4
8	eeff	$B_2BR_2R_2R_2$	–80.6	10.1	11.8	14.3

следовать в связи с тем, что соевый белок широко используется в пищевой промышленности [1–6].

Нами была исследована структурно-функциональная организация опиоидных пептидов энкефалинов, эндорфинов, эндоморфинов, динарфинов, неондорфинов, адренорфина, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований [7–16].

МЕТОДЫ

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда–Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы сойморфина-6 изучены в условиях водного окружения, в связи с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергию водородных связей оценивали с помощью потенциала Морзе. В наших вышеупомянутых работах подробно описаны используемые потенциальные функции.

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех

аминокислотных остатков, входящих в данную молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R, B, L и P остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа X_{ij} , где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты $\phi - \psi$: R($\phi, \psi = -180^\circ - 0^\circ$), B($\phi = -180^\circ - 0^\circ$, $\psi = 0^\circ - 180^\circ$), L($\phi, \psi = 0^\circ - 180^\circ$) и P($\phi = 0^\circ - 180^\circ$, $\psi = -180^\circ - 0^\circ$), $ij... = 11..., 12..., 13..., 21...$ определяет положение боковой цепи (χ_1, χ_2), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до 120° , индекс 2 – от 120° до -120° и индекс 3 – от -120° до 0° . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная структура молекулы сойморфина-6 рассчитана на основе низкоэнергетических конформаций сойморфина-5 и метиламида N-ацетил-L-аспарагина. Низкоэнергетические конформации молекулы сойморфина-5 представлены в табл. 1. Результаты расчета молекулы сойморфина-6 показали, что происходит энергетическая дифференциация между формами основной цепи и конформациями. В энергетический интервал 0–30 кДж/моль попадают конформации восьми шейпов. Самая низкоэнергетическая конформация каждого шейпа, энергетические вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и относи-

Таблица 2. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных ($U_{\text{нев}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$), торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы сойморфина-6

№	Шейп	Конформация	Энергетический вклад			$U_{\text{отн}}$
			$U_{\text{нев}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$	
1	effff	$B_3RR_1R_2R_2R_{11}$	–127.3	10.5	16.8	0
2	efeff	$B_3RB_1R_2R_2B_{31}$	–118.0	5.8	12.7	0.8
3	efffe	$B_3RR_1R_2B_2R_{21}$	–113.0	9.2	14.7	11.3
4	effee	$B_3RR_3B_2B_2B_{31}$	–102.1	7.0	10.1	15.0
5	eeeeee	$B_2BB_2B_2B_2B_{31}$	–102.1	6.3	14.7	19.3
6	efeee	$B_3RB_3B_2B_2B_{31}$	–98.3	5.8	13.1	20.5
7	eeeff	$B_1BB_2R_2R_2R_{33}$	–95.3	9.2	13.0	27.3
8	eefee	$B_1BR_2B_2B_2B_{31}$	–90.3	6.7	11.8	28.6

тельная энергия показаны в табл. 2. В низкоэнергетических конформациях энергия невалентных взаимодействий изменяется в интервале –127.3 – –90.3 кДж/моль, электростатических взаимодействий – в интервале 6.3–10.5) кДж/моль, торсионных взаимодействий – в интервале 10.1–16.8) кДж/моль. Для первых четырех низкоэнергетических конформаций энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (в кДж/моль) показаны в табл. 3, а геометрические параметры (в градусах) – в табл. 4. На рис. 1 показаны расположение атомов в пространстве в этих конформациях.

Глобальной конформацией молекулы сойморфина-6 является конформация $B_3RR_1R_2R_2R_{11}$ шейпа effff. В этой конформации только первый остаток Tyr1 находится в В-форме основной цепи, остальные остатки находятся в R-форме основной цепи и образуют спиральную структуру. Боковые цепи аминокислотных остатков направлены так, что возникают эффективные взаимодействия между атомами основной цепи между собой и атомами основной и боковых цепей (рис. 1). Образуются водородные связи между атомами C=O Pro2 и N–H Val5, между атомами C=O Phe3 и N–H C-концевой группы NH_2 .

Взаимодействия Tyr1 с другими остатками составляют –52.0 кДж/моль, Pro2 – –42.6 кДж/моль, Phe3 – –23.9 кДж/моль, Val4 – –12.6 кДж/моль и стабилизируют данную конформацию (табл. 3). Поэтому в этой конформации вклад невалентных взаимодействий составляет –127.3 кДж/моль и она, благодаря невалентным взаимодействиям, является глобальной. Она невыгодна по электростатическим взаимодействиям, вклад электростатических отталкиваний наибольший и равен 10.5 кДж/моль (табл. 2).

Конформация $B_3RB_1R_2R_2B_{31}$ шейпа efeff с относительной энергией 0.8 кДж/моль от глобальной конформации отличается формой основной цепи Pro2 и расположением баковых цепей Tyr1 и Phe3 в пространстве (рис. 1). Она выгодна по электростатическим взаимодействиям, электростатические отталкивания составляют 5.9 кДж/моль, что на 4.6 кДж/моль меньше, чем в глобальной конформации, по невалентным взаимодействиям (9.3 кДж/моль) она уступает глобальной конформации (табл. 2). Взаимодействия Tyr1 с другими аминокислотными остатками составляют –52.1 кДж/моль; Pro2 – –13.1 кДж/моль, Phe3 – –35.7 кДж/моль, Val4 – –12.6 кДж/моль (табл. 3).

Конформация $B_3RR_1R_2B_2R_{21}$ шейпа efffe имеет относительную энергию 11.3 кДж/моль. Здесь первый остаток Tyr1 и Val5 находятся в В-форме основной цепи, остальные аминокислотные остатки находятся в R-форме основной цепи и образуют полусвернутую структуру (рис. 1). По невалентным взаимодействиям она проигрывает 14.3 кДж/моль глобальной конформации, по электростатическим и торсионным взаимодействиям – соответственно выигрывает 1.3 кДж/моль и 2.1 кДж/моль (табл. 2). В этой конформации взаимодействия Tyr1 с другими остатками вносят вклад –59.2 кДж/моль; Pro2 – –28.5 кДж/моль, Phe3 – –21.4 кДж/моль, Val4 – –16.4 кДж/моль, поэтому она становится низкоэнергетической (табл. 3). В этой конформации образуется водородная связь между атомами C=O основной цепи Tyr1 и между атомами N–H основной цепи Val5 (табл. 2).

В конформации $B_3RR_3B_2B_2B_{31}$ шейпа effee N-концевой дипептидный фрагмент Tyr1-Pro2 и C-концевой трипептидный фрагмент Val4-Val5-Asn6 находятся в развернутой форме основной цепи, Pro2-Phe3 образует изгиб, что между этими

Таблица 3. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (кДж/моль) в конформациях молекулы сойморфина-6: B₃RB₁R₂R₂ ($U_{\text{отн}} = 0$ кДж/моль, 1-я строка), B₃RB₃B₂B₂ ($U_{\text{отн}} = 3.4$ кДж/моль, 2-я строка), B₃RR₁R₂R₂ ($U_{\text{отн}} = 5.9$ кДж/моль, 3-я строка), B₃RR₃B₂B₂ (7.1 кДж/моль, 4-я строка)

Tyr1	Pro2	Phe3	Val4	Val5	Asn6	
20.2	−15.5	−15.5	−12.2	−8.8	0.4	Tyr1
14.7	−18.5	−31.1	−2.5	0.8	0.0	
19.7	−16.4	−16.0	−15.5	−11.3	0.0	
19.7	−15.5	−7.1	−21.4	−6.3	−5.5	
	−2.5	−8.1	−5.5	−8.4	−18.1	Pro2
	−1.7	−9.7	−1.7	0.0	0.0	
	−2.5	−8.8	−5.5	−6.7	−5.0	
	−2.5	−10.5	−3.4	−3.8	0.0	
		1.7	−10.5	−4.2	−9.2	Phe3
		4.2	−10.1	−8.8	−16.8	
		1.7	−9.2	−4.2	−8.0	
		0.4	−7.1	−5.5	0.0	
			4.6	−7.6	−5.0	Val4
			2.1	−10.1	−2.5	
			4.4	−10.5	−5.9	
			2.5	−7.1	−10.9	
				4.6	−13.0	Val5
				2.1	−15.5	
				8.8	−6.3	
				2.5	−10.1	
					−3.8	Asn6
					−4.6	
					−6.3	
					−3.4	

Таблица 4. Геометрические параметры (в градусах) оптимальных конформаций молекулы сойморфина-6

Остаток	Конформации			
	B ₃ RR ₁ R ₂ R ₂ R ₁₁	B ₃ RB ₁ R ₂ R ₂ B ₃₁	B ₃ RR ₁ R ₂ B ₂ R ₂₁	B ₃ RR ₃ B ₂ B ₂ B ₃₁
Tyr1	−110 151 −176 −69 101 0	−90 155 168 −72 108 0	−109 152 180 −70 103 0	−110 155 178 −68 107 0
Pro2	−60 −48 −171	−60 −41 176	−60 −49 −173	−60 −41 −179
Phe3	−65 −28 180 70 85	−86 167 179 62 80	−72 −30 173 72 88	−86 −54 179 −57 97
Val4	−65 −40 −170 172 178 178	−95 −63 −178 −179 −179 180	−68 −56 179 170 179 178	−94 99 −173 −178 −179
Val5	−62 −47 −177 172 180 178	−102 −69 −175 −178 −177 179	−94 63 −179 −172 −179 172	−90 105 −178 179 179 179
Asn6	−87 −44 −177 61 94	−100 114 179 −61 91	−92 −59 180 179 87	−88 119 180 −60 95
ΔU , кДж/моль	0	0.8	11.3	15.1

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

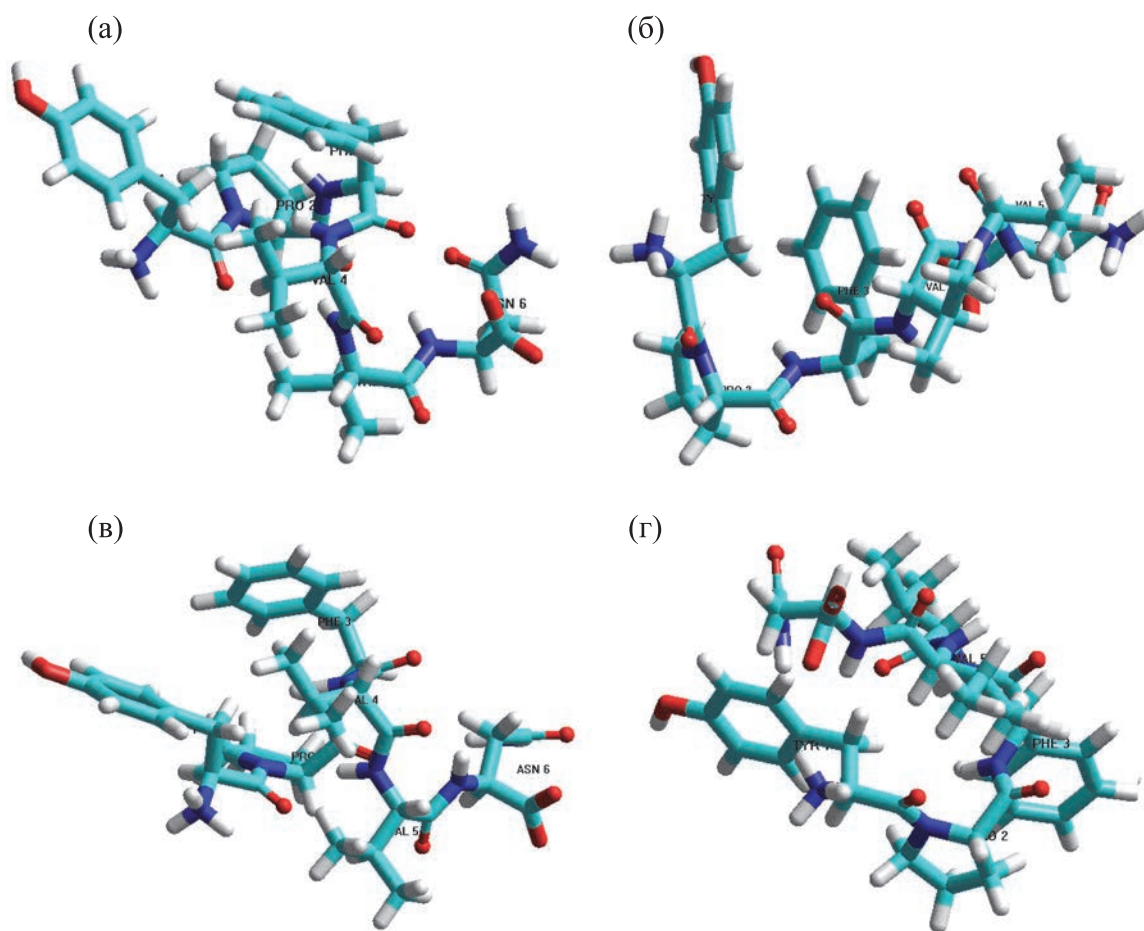


Рис. 1. Пространственное расположение аминокислотных остатков в низкоэнергетических конформациях $B_3RB_1R_2R_{11}$ (а), $B_3RB_1R_2R_{11}$ (б), $B_3RR_1R_2B_2R_{21}$ (в) и $B_3RR_3B_2B_2B_{31}$ (г),

участками создает эффективные взаимодействия. Взаимодействия Tyr1 с С-концевым трипептидным участком составляют -33.2 кДж/моль, с Pro2 — -7.2) кДж/моль (табл. 4).

В конформации $B_2BB_2B_2B_{31}$ все аминокислотные остатки находятся в развернутой форме, боковые цепи всех аминокислотных остатков, кроме Asn6, ориентированы в одном направлении. Конформация выгодна по электростатическим взаимодействиям, имеет относительную энергию 19.3 кДж/моль. Конформация $B_3RB_3B_2B_2B_{31}$ шейпа efee от предыдущей отличается формой основной цепи Pro2 и положением боковых цепей Tyr1 и Phe3, поэтому ее относительная энергия всего на 1.2 кДж/моль больше, чем у полностью развернутой формы (табл. 2).

В конформации $B_1BB_2R_2R_2R_{33}$ шейпа eeff с относительной энергией 27.3 кДж/моль первые три аминокислотных остатка Tyr1-Pro2-Phe3 находятся в полностью развернутой форме, а следующие три аминокислотных остатка — в полностью свернутой форме основной цепи. Конфор-

мация $B_1BR_2B_2B_2B_{31}$ шейпа eefee имеет относительную энергию 28.6 кДж/моль и от конформации с полностью развернутой формой отличается формой основной цепи Phe3. N-концевой дипептидный фрагмент и С-концевой трипептидный участок находятся в полностью развернутой форме, их друг от друга отделяет третий аминокислотный остаток фенилаланина.

ВЫВОДЫ

Пространную структуру молекулы сойморфина-5 и сойморфина-6 можно представить восьмью структурными типами. Можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет в этих структурах. На основе этих структур можно предложить ее синтетические аналоги и рассчитывать пространственную структуру молекулы сойморфина-7. Теоретический конформационный анализ гексапептидной молекулы сойморфина-6 привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда

функцией, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. А. Чеснокова, Н. Ю. Сарычева, В. А. Дубынин и А. А. Каменский, Успехи физиол. наук, **46** (1), 22 (2015).
2. E. De Azevedo, Rev. Saude Publica, **45** (4), 1 (2011).
3. K. Kaneko, M. Iwaski, M. Yoshikawa, and K. Ohinata, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **299** (3), G799 (2010).
4. K. Ohinata, S. Agui, and M. Yoshikawa, Biosci. Biotechnol. Biochem., **71** (10), 2618 (2007).
5. S. Yang, S. Sonoda, L. Chen, and M. Yoshikawa, Peptides, **24** (4), 503 (2003).
6. S. Yang, J. Yunden, S. Sonoda, et al., FEBS Lett., **509**, 213 (2001).
7. Н. А. Ахмедов, Н. М. Годжаев, Е. В. Сулейманова и Е. М. Попов, Биоорганич. химия, **16** (5), 661 (1990).
8. Н. А. Ахмедов, Молекуляр. биология, **23**, 240 (1989).
9. N. A. Akhmedov, Z. H. Tagiyev, E. M. Hasanov, and G. A. Akhverdieva, J. Mol. Structure, **646**, 75 (2003).
10. N. A. Akhmedov, L. I. Ismailova, R. M. Abbasli, et al., IOSR J. Appl. Phys. (IOSR-JAP), **8**, 66 (2016).
11. N. A. Akhmedov, R. M. Abbasli, L. N. Agayeva, and L. I. Ismailova, In *Modern Trends In Physics* (Conf. Proceed., 2019), V. II, p. 201.
12. N. A. Akhmedov, L. N. Agayeva, G. A. Akhverdieva, et al., J. Chem. Soc. Pak., **43** (5), 500 (2021).
13. N. A. Akhmedov, L. N. Agayeva, S. R. Akhmedova, et al., IOSR J. Appl. Phys. (IOSR-JAP), **13** (5), 62 (2021).
14. Л. Н. Агаева, А. А. Абдинова, С. Р. Ахмедова и Н. А. Ахмедов, Биофизика, **66** (4), 629 (2021).
15. Н. А. Ахмедов, Л. Н. Агаева, Ш. Н. Гаджиева и др., Актуальные вопросы биологич. физики и химии, **4** (1) 63 (2019).
16. L. I. Ismailova, R. M. Abbasli, and N. A. Akhmedov, In *Proc. Int. Conf. COIA* (2020), V. I, p. 218.
17. *IUPAC-IUB. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry* (Blackwell Scientific, Oxford, 1993).

Spatial Structure of Soymorphin-6 Molecule

L.N. Agaeva, A.A. Abdinova, S.R. Akhmedova, N.F. Akhmedov, and N.A. Akhmedov

Baku State University, Z. Khalilov st. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan

Azerbaijan State Pedagogical University, Uzeyir Hajibeyli, 68, Sabail District, Baku, AZ-1000 Azerbaijan

Azerbaijan Technical University, H. Cavid prosp. 25, Baki, Azerbaijan AZ 1073 Azerbaijan

By the method of the theoretic conformational analysis the conformational capabilities of the soymorphin-6 (Tyr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-Asn6-NH2) molecule were studied. The potential energy of this molecule is given as the sum of nonvalent, electrostatic and torsional interactions and the energy of hydrogen bonds. Low-energy conformations of the soymorphin-6 molecule, the values of the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues that make up the molecules are found, the energy of intra- and inter-residual interactions is estimated. It is shown that the spatial structure of the soymorphin-6 molecule can be represented by eight conformations. The results obtained can be used to study the structure and structural-functional organization of the soymorphin molecules.

Keywords: exorphin, soymorphin, opioid, structure, conformation

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ЛИНЕЙНЫХ АГРЕГАТОВ НА МАТРИЦЕ

© 2023 г. Е.О. Василенко*, **, ##, С.А. Козин*, В.А. Митькевич*,
А.С. Бучельников***, ###, Ю.Д. Нечипуренко*, ***, #

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

#E-mail: nech99@mail.ru

**Московский физико-технический институт, 117303, Москва, ул. Керченская, 1а, корп. 1

##E-mail: vasilenko.eo@phystech.edu

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

###E-mail: tolybas@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Развитие многих нейродегенеративных заболеваний связано с образованием патологических белковых агрегатов. В ряде случаев эти агрегаты могут быть образованы посредством многослойной адсорбции лигандов на матрице, в роли которой выступают рецепторы мембранных белков. В работе предложена термодинамическая модель, описывающая формирование линейных агрегатов, в которых лиганды могут складываться в стопки. Рассматриваются случаи, когда эти стопки состоят из комплексов одного или двух разных типов. Областью использования разработанной модели является исследование патологической агрегации белков разной природы, в первую очередь, бета-амилоида и его изоформ. Рассчитаны среднее, дисперсия и энтропия теоретических распределений размеров агрегатов. Проводится сравнение с другими теоретическими моделями образования амилоидных агрегатов.

Ключевые слова: амилоидные агрегаты, математическое моделирование агрегации, самоассоциация, статистическая термодинамика, энергии связывания, бета-амилоид.

DOI: 10.31857/S0006302923060042, EDN: RVOCJF

Прионные заболевания и амилоидоз становятся все более социально значимыми в связи со старением населения Земли, существенно влияя на качество жизни лиц пожилого возраста. Считается, что амилоидоз и прионные патологии развиваются из-за образования агрегатов из пептидов или белков. Известно [1], что если даже небольшая часть пептидов или белков, которые в норме выполняют свои функции, приобретает патологическую конформацию, они могут индуцировать патологическую агрегацию, в которую вовлекаются другие белки или пептиды. Для физико-химического описания таких процессов используются два подхода: термодинамический, позволяющий оценивать энергии равновесного связывания молекул между собой и с поверхностями, и кинетический, позволяющий описывать формирование молекулярных агрегатов во времени. Исследования в обоих направлениях осложняются наличием на молекулах нескольких сайтов связывания и различных их конформаций [2], что увеличивает число параметров моделей. На

сегодняшний день предложен ряд моделей, описывающих агрегацию белков и пептидов (см., например, работу [1]). Подобные модели развиты для описания ассоциации лигандов [3–5]. Т. Хилл [6] применял для описания агрегации метод статистических сумм (см. также работы [7–9]) и представления физической адсорбции, которые позволяют рассматривать образование линейных агрегатов как простейший пример многослойной адсорбции (теория Брунауэра–Эммета–Теллера [10]).

К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных об агрегации пептидов и белков с использованием методов флуоресценции [11], атомно-силовой микроскопии [12], иммуноферментного анализа [13], анализа кинетических кривых [14] и метода молекулярной динамики [2]. Можно выделить группы биомолекул, агрегация которых происходит по схожим механизмам. Для их описания можно применять единый математический аппарат.

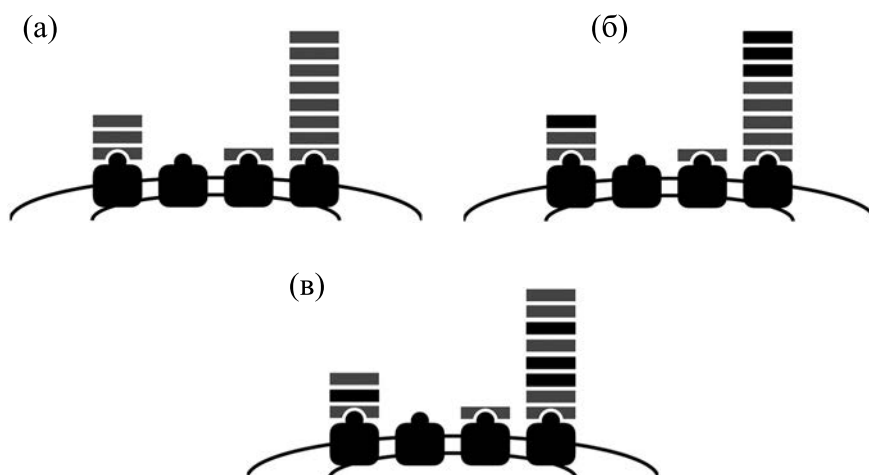


Рис. 1. Схематические изображения, соответствующие трем моделям многослойной адсорбции на матрице: (а) — однородной, (б) — двухфрагментной, (в) — произвольного порядка типов связей.

Большая часть работ на тему образования патологических белковых агрегатов развивает кинетический подход (см., например, [12, 15]). Для описания образования агрегатов можно применить количественную теорию полимеризации, в которой агрегаты считаются линейными цепочками; ключевые результаты в этом направлении получил в своих классических работах П. Флори [16]. В работах [2, 13, 17, 18] по установлению механизмов агрегации бета-2-микроглобулина показано, что связи между мономерами в его агрегатах могут быть разными. Поэтому возникает задача о построении неоднородных моделей.

В данной работе представлены и исследованы термодинамические модели линейного роста по прионному механизму агрегатов, состоящих из одного или двух однородных фрагментов. Предполагается, что агрегаты растут на матрице, например, белковом рецепторе внешней стороны клеточной мембраны. Модели учитывают энтропийные и энергетические факторы агрегации и будут востребованы для интерпретации экспериментальных распределений размеров белковых агрегатов, в частности, для оценки энергий ассоциации и их сравнения с экспериментом (см., например, работу [19]).

Особенность предлагаемого подхода — ориентационная асимметрия: агрегат не формируется в изотропном растворе, а растет в направлении от сайта связывания на некоторой матрице, образуя «стопку», а для роста агрегата необходимо образование первичного комплекса лиганда с рецептором [20]. Рассматриваются теоретические распределения размеров агрегатов в качестве ключевой характеристики моделей для сравнения их с экспериментом.

МОДЕЛЬ ОДНОРОДНОЙ АГРЕГАЦИИ

Рассмотрим термодинамическую систему, в которой на матрицу из раствора могут адсорбироваться лиганды в мономерной форме. В растворе при постоянных давлении, температуре и химическом потенциале свободных мономеров в равновесии находятся мономеры и агрегаты, связанные с матрицей. Линейные агрегаты разных размеров образуются посредством присоединения мономеров к уже образованным на матрице первичным комплексам [21]. В качестве матрицы могут выступать сайты связывания белков с рецепторами на поверхности мембраны нервной клетки, как это происходит при многих нейродегенеративных заболеваниях [22]. В частности, подобный механизм реализуется в случае агрегации бета-амилоида при взаимодействии с никотиновым ацетилхолиновым рецептором на поверхности клеток [20]. Агрегаты в простейшем приближении можно считать однородными линейными цепями, состоящими из одинаковых мономеров, соединенных одинаковыми связями (см. рис. 1). При этом первая связь может быть особой и соответствовать образованию первичного комплекса «сайт–лиганд» [20]. Заметим, что в качестве мономеров при образовании агрегатов может выступать не только бета-амилоид, но и его комплекс с ионом цинка [23].

Обозначим константу связывания мономера L с матрицей S (реакция $S + L \rightleftharpoons SL$) через K , константу ассоциации мономеров, которые формируют агрегаты (реакция $SL_n + L \rightleftharpoons SL_{n+1}$) через a , концентрацию свободных лигандов в объеме раствора — через c . Все связи, кроме первой, в агрегатах одинаковы. Такой линейной однородной модели агрегации соответствует большая статистическая сумма системы, представляющая собой сумму геометрической прогрессии:

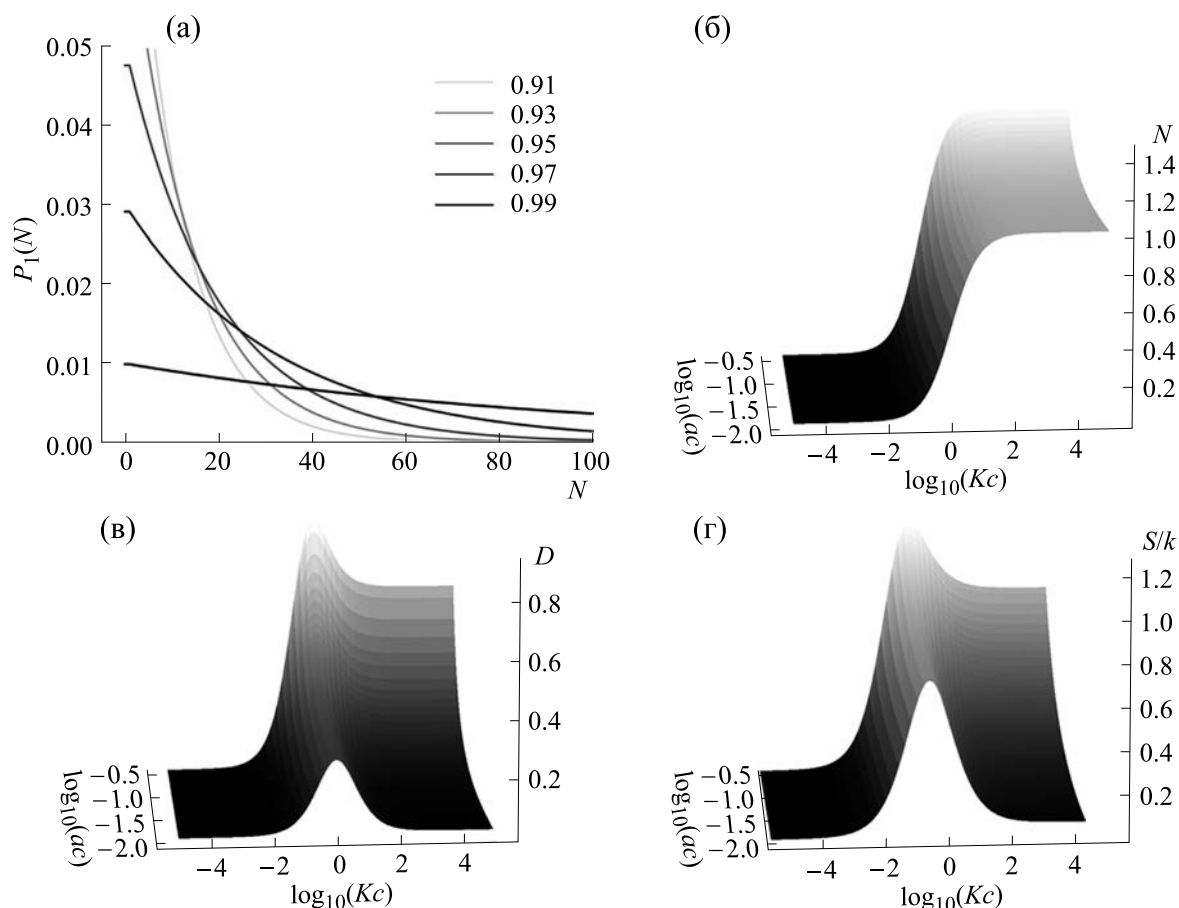


Рис. 2. Теоретические распределения размеров агрегатов $P_1(N)$ для однородной модели агрегации, где N — число мономеров, и их статистические характеристики: (а) — распределения размеров агрегатов при $Kc = 1$ и разных значениях параметра ac , (б) — средний размер агрегата, (в) — дисперсия, (г) — энтропия.

$$\Upsilon_1 = 1 + Kc \sum_{N=0}^{\infty} (ac)^N = 1 + \frac{Kc}{1 - ac}, 0 < ac < 1.$$

Введем в рассмотрение $P_1(N \in N_0)$ — вероятность обнаружить на сайте связывания агрегат,

состоящий из N мономеров. В однородной модели распределение агрегатов такое:

$$P_1(0) = \frac{1}{\Upsilon_1}, P_1(N \geq 1) = \frac{1}{\Upsilon_1} Kc(ac)^{N-1}.$$

На рис. 2а показаны распределения размеров агрегатов, соответствующие однородной модели; они соответствуют классическому распределению Шульца—Флори из теории полимеризации [16], то есть доля агрегатов или полимеров экспоненциально падает при увеличении длины из-за энергетических затрат на образование связей между мономерами. Распределения длин многих органических полимеров действительно имеют такой вид [16]. Заметна чувствительность распре-

деления к малым изменениям ac при значениях, близких к единице.

Однако распределения длин агрегатов многих важных для медицины биомолекул, например, фибрилл из молекул бета-амилоида, ассоциированных с болезнью Альцгеймера, имеют характерный пик [12], то есть не убывают монотонно, а сначала возрастают и затем убывают. Качественно это можно объяснить полиморфизмом агрегатов, а именно, можно предположить, что агрегаты из одного и того же числа мономеров могут об-

разовываться разными способами из-за наличия на мономере разных сайтов связывания. В результате доля длинных агрегатов увеличивается. Именно этот эффект призвана учесть предлагаемая далее двухфрагментная модель.

Статистический подход удобен тем, что по известным выражениям статистических сумм можно вычислять статистические характеристики термодинамических систем (см., например, работу [24]). Из рис. 2б видно, что среднее заполнение сайта матрицы лигандами монотонно возрастает при увеличении Kc , при этом для каждого фиксированного значения ac зависимость математического ожидания от Kc выглядит как сигмоида — для каждого $ac > 0$ существует довольно узкий интервал значений Kc , на котором происходит резкий переход от почти полного отсутствия лигандов на матрице до насыщения. Заполнение при фиксированном значении ac стремится к насыщению, потому что при устремлении Kc к бесконечности на каждом сайте адсорбируется «первичный» лиганд, дальнейший же рост цепи регулируется только фиксированным ac . Также на рис. 2в заметна корреляция между дисперсией распределения размеров агрегатов и энтропией ансамбля агрегатов, которая объясняется тем, что соответствующее энтропии разнообразие в однородной модели агрегации достигается только за счет разнообразия размеров агрегатов. В следующей, двухфрагментной, модели присутствует еще один фактор разнообразия — соотношение между количествами комплексов двух типов в агрегате.

МОДЕЛЬ ДВУХФРАГМЕНТНОЙ АГРЕГАЦИИ

Пусть, как и в предыдущей модели, в растворе при постоянной температуре и постоянном давлении находятся одинаковые свободные лиганды и адсорбированные молекулы лигандов, формирующие агрегаты на матрице. Дополнительно предположим также, что связывание соседних лигандов возможно не по единственному, а по одному из двух механизмов, которые соответствуют образованию двух типов комплекса; об этом свидетельствуют результаты молекулярно-динамического моделирования [2] и исследования механизмов образования амилоидных агрегатов [25]. В любом агрегате по направлению его роста от матрицы лиганды сначала связываются между собой по первому механизму, образуя первый тип комплекса. На одном из лигандов может происходить «переключение», начиная с которого об-

разуются комплексы только второго типа. Этот тип комплекса далее индуцирует по прионному механизму образование таких же комплексов при адсорбции следующих лигандов. В результате агрегат, который формируется на матрице, может состоять из двух различных последовательных однородных фрагментов.

На рис. 1б схематически показаны примеры таких агрегатов. Ранее были получены и подробно исследованы статистические суммы для различных гетерогенных моделей агрегатов [4, 5, 26], однако в предлагаемой двухфрагментной модели играет роль асимметрия: ориентация каждого агрегата задана однозначно, а именно, в направлении от матрицы, через первичный комплекс, рост идет в следующем порядке: изначально образуется первичный комплекс с константой связывания K , который продолжается формированием цепочки комплексов первого типа с константой ассоциации a , затем — второго типа с константой ассоциации b . Эта асимметрия, как будет показано далее, наделяет модель важными для объяснения экспериментальных распределений размеров агрегатов свойствами.

Пусть c , как и ранее, — равновесная концентрация свободных мономеров в растворе, a и b — константы ассоциации для двух механизмов связывания мономеров между собой, K — константа связывания мономера с сайтом матрицы, т.е. инициации роста агрегата на сайте матрицы (образования первичного комплекса). Все величины в данной теоретической работе безразмерны. Предполагается, что $0 < ac, bc < 1$; эти ограничения, с одной стороны, естественны, потому что концентрация свободного лиганда обычно очень низкая, а константы ассоциации также не очень велики, иначе наблюдалась бы очень быстрая агрегация почти всех мономеров. С другой стороны, эти ограничения позволяют вычислять суммы геометрических прогрессий. А именно, при данных ограничениях выполняются условия теоремы Мертенса:

$$\sum_{i,j \geq 0} (ac)^i (bc)^j = \sum_{i=0}^{\infty} (ac)^i \sum_{j=0}^{\infty} (bc)^j.$$

Это тождество сводит задачу вычисления рассматриваемой ниже статистической суммы к вычислению сумм двух бесконечных геометрических прогрессий, в результате получается конечное выражение:

$$\Upsilon_2 = 1 + Kc \left\{ 1 + ac \sum_{i,j \geq 0} (ac)^i (bc)^j \right\} = 1 + Kc \left\{ 1 + \frac{ac}{(1-ac)(1-bc)} \right\}.$$

Двухфрагментная модель — в некотором смысле простейшая после однородной, потому что получена добавлением к ней лишь одного дополнительного параметра b , порождающего один дополнительный однородный фрагмент, а Υ_2

сводится к произведению двух статистических сумм вида Υ_1 , причем во второй из них ac играет для bc ту же роль, что и Kc для ac в первой — это и есть двухфрагментность. Соответствующее распределение размеров агрегатов при $b < a$:

$$P_2(0) = \frac{1}{\Upsilon_2}, P_2(1) = \frac{1}{\Upsilon_2} Kc, P_2(N \geq 2) = \frac{1}{\Upsilon_2} Kac^2 \sum_{j=0}^{N-2} (ac)^{N-2-j} (bc)^j = \frac{1}{\Upsilon_2} Kac^2 (ac)^{N-2} \frac{1 - r^{N-1}}{1 - r}.$$

при $b > a$:

$$\frac{1}{\Upsilon_2} Kac^2 (bc)^{N-2} \frac{1 - r^{N-1}}{1 - r},$$

при $a = b$:

$$P_2(N \geq 2) = \frac{N-2}{\Upsilon_2} Kc(ac)^{N-1}.$$

Такое выражение может описывать почти однородные агрегаты, в каждом из которых есть единственная неоднородность (ядро) (см., например, работу [13]).

Выражение $r = \min\{a, b\}/\max\{a, b\}$ можно называть параметром разнообразия, эта величина характеризует степень равноправия механизмов. Если, например, $b < a$, то по мере увеличения b от 0 до a разнообразие растет.

$P_2(N)$ представляется в виде произведения убывающей и возрастающей функций. При $a = 0.9$, $b = 0.9$ подавляющая часть агрегатов состоит не более чем из 40 мономеров (см. рис. 3), а наиболее частый размер агрегата не превышает 10 мономеров, далее плотность вероятности убывает. Это говорит о том, что взаимодействия между энергетическими и энтропийными факторами проявляют себя для не очень больших агрегатов, заметную часть каждого из которых может составлять ядро, отличное от остальной части агрегата, что является одним из характерных свойств двухфрагментной модели.

При заданной температуре распределение размеров агрегатов в двухфрагментной модели однозначно задается всего двумя параметрами: приведенным химическим потенциалом $\mu_{\text{прив}} = \mu - \epsilon$ мономера (энергетическим параметром) и параметром разнообразия r (энтропийным параметром). Необходимое условие сходимости статистической суммы дает ограничение $\mu_{\text{прив}} < 0$, а предположение о преобладании связывания по первому механизму — $0 \leq r \leq 1$.

Видно, что пик распределения изменяется при варьировании энтропийного параметра намного

заметнее, чем при варьировании энергетического параметра. Это связано с тем, что пик у кривой существует только в достаточно узком диапазоне значений приведенного химического потенциала, то есть при разложении в ряд Маклорена $P(N) \sim \{1 + N(\mu - \epsilon)/RT\}\{1 + \beta + \dots + \beta^{N-1}\}$, где $(\mu - \epsilon)/RT$ — небольшое отрицательное число, поэтому поведение функции распределения при не слишком больших N определяется в основном энтропийным множителем. Другое объяснение приведено на последней странице Приложения, оно использует явное выражение для положения пика теоретического распределения.

Как и в однородной модели, существует корреляция между дисперсией и энтропией ансамбля агрегатов. «Хребет» максимумов остается при $Kc = 1$. И дисперсия, и энтропия ансамбля при увеличении bc увеличиваются. Важное изменение при росте bc — увеличение среднего размера агрегата при увеличении ac , что связано с индукцией: даже при небольших значениях ac (порядка 0.2) индуцируется рост второго фрагмента. В этом состоит одно из существенных отличий двухфрагментной модели от однородной.

СВОЙСТВА ФРАГМЕНТОВ АГРЕГАТОВ

В двухфрагментной модели можно выделить два режима агрегации. При $b \ll a$ целесообразно назвать режим «кэпированием», потому что если у агрегата и есть второй фрагмент, то, в среднем, не очень большой, то есть он напоминает «шапочку» (англ. cap) на первом фрагменте. При $b \gg a$ можно считать конформацию лигандов первого типа индуцирующей быстрый рост агрегатов по второму механизму и, соответственно, такой режим можно назвать «индукцией». Минимумы при $N = 1$ объясняются отсутствием энтропийного эффекта из-за возможности связывания непосредственно с сайтом только лиганда первого типа. Это можно понимать как нестабильность состояния инициации: если на сайте адсорбировался первый лиганд, он вряд ли останется на нем единственным, скорее он либо вернется в раствор, либо положит начало агрегату. Таким образом, в двухфрагментной модели можно выделить

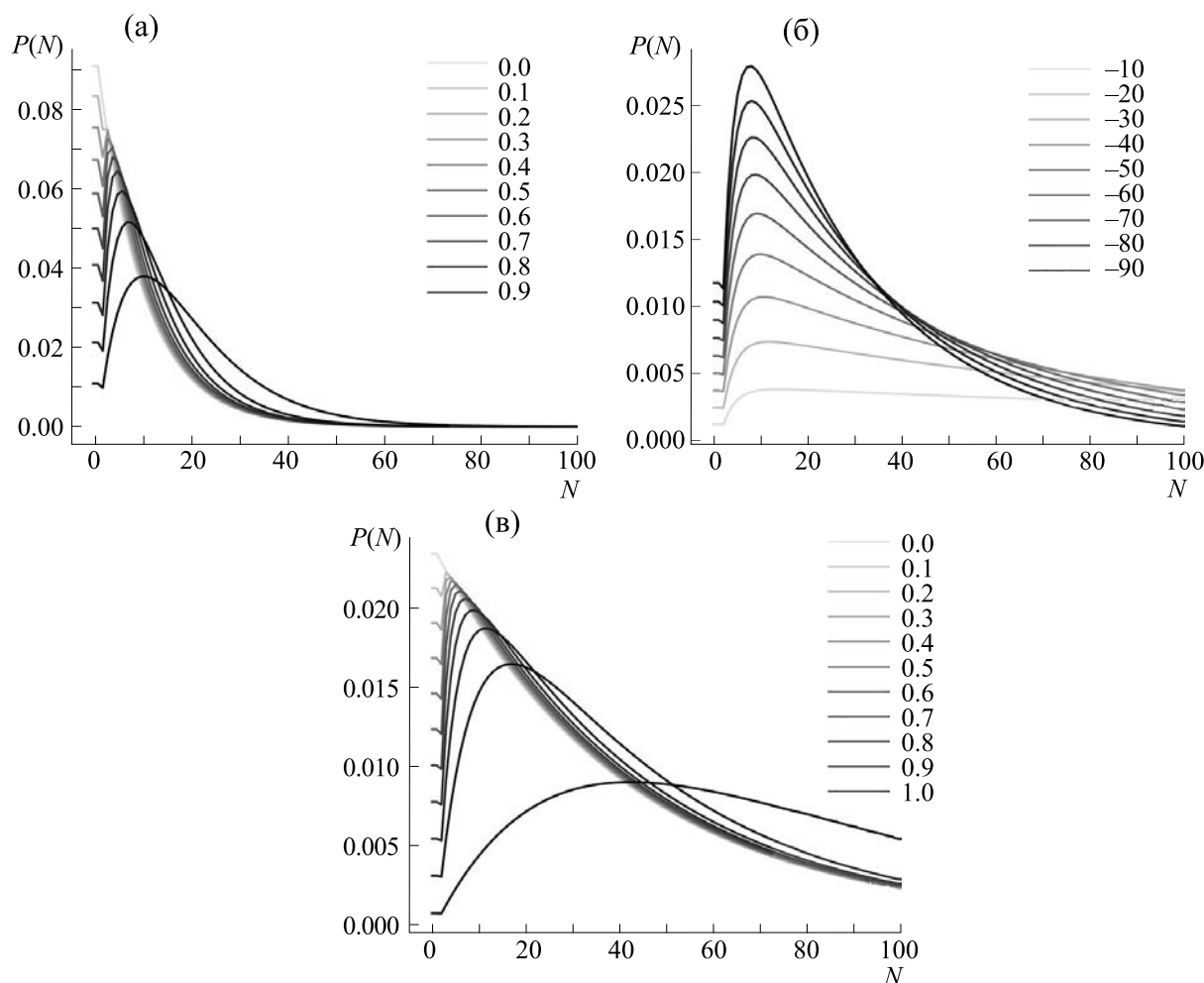


Рис. 3. Теоретические распределения размеров двухфрагментных агрегатов при различных значениях параметров: (а) – варьируется величина bc ($ac = 0.9$, $Kc = 1$), (б) варьируется величина энергетического параметра $\mu_{\text{прив}} = \mu - \epsilon$ (Дж/моль) ($r = 0.7$), (в) варьируется величина энтропийного параметра $r = b/a$ ($\mu_{\text{прив}} = -60$ Дж/моль).

два режима агрегации: «фундамент–наращивание» при $a \ll b$ и «наращивание–кэпирование» при $b \ll a$. Из рис. 6 можно заметить, что при больших значениях Kc , но малых значениях ac вторые фрагменты почти не формируются.

На рис. 5а прослеживается близкая к линейной зависимость $\langle N_b \rangle$ от a . На рис. 5б при малых значениях ac и при $bc = 0.9$ первый (индуцирующий) фрагмент значительно меньше второго фрагмента, что можно понимать как индукцию второго механизма первым, которая происходит при $b \gg a$. Это может быть важным для понимания развития болезней, а именно: константа b изначально большая, однако рост патологических агрегатов возможен только при росте ac , например, при появлении индуцирующих агрегацию прионов. При увеличении r средняя длина верхнего фрагмента растет много быстрее средней длины нижнего фрагмента, что позволяет интерпретировать при таких соотношениях констант

ассоциации эту модель как модель с индукцией, а именно: относительно небольшое число лигандов первого типа формирует «фундамент» агрегата, далее растет длинный агрегат по второму механизму.

МОДЕЛЬ ПРОИЗВОЛЬНОГО ПОРЯДКА ТИПОВ СВЯЗЕЙ В АГРЕГАТАХ

Предположим, что к первичному комплексу мономеры двух типов могут присоединяться в произвольном порядке. Тогда на первичном комплексе агрегат с i связями первого типа и j связями второго типа может образоваться C_{i+j}^i способами, то есть энергетические состояния вырождены. Статистическая сумма для ансамбля таких агрегатов:

$$Y_{\infty} = 1 + Kc \sum_{i,j \geq 0} C_{i+j}^i (ac)^i (bc)^j.$$

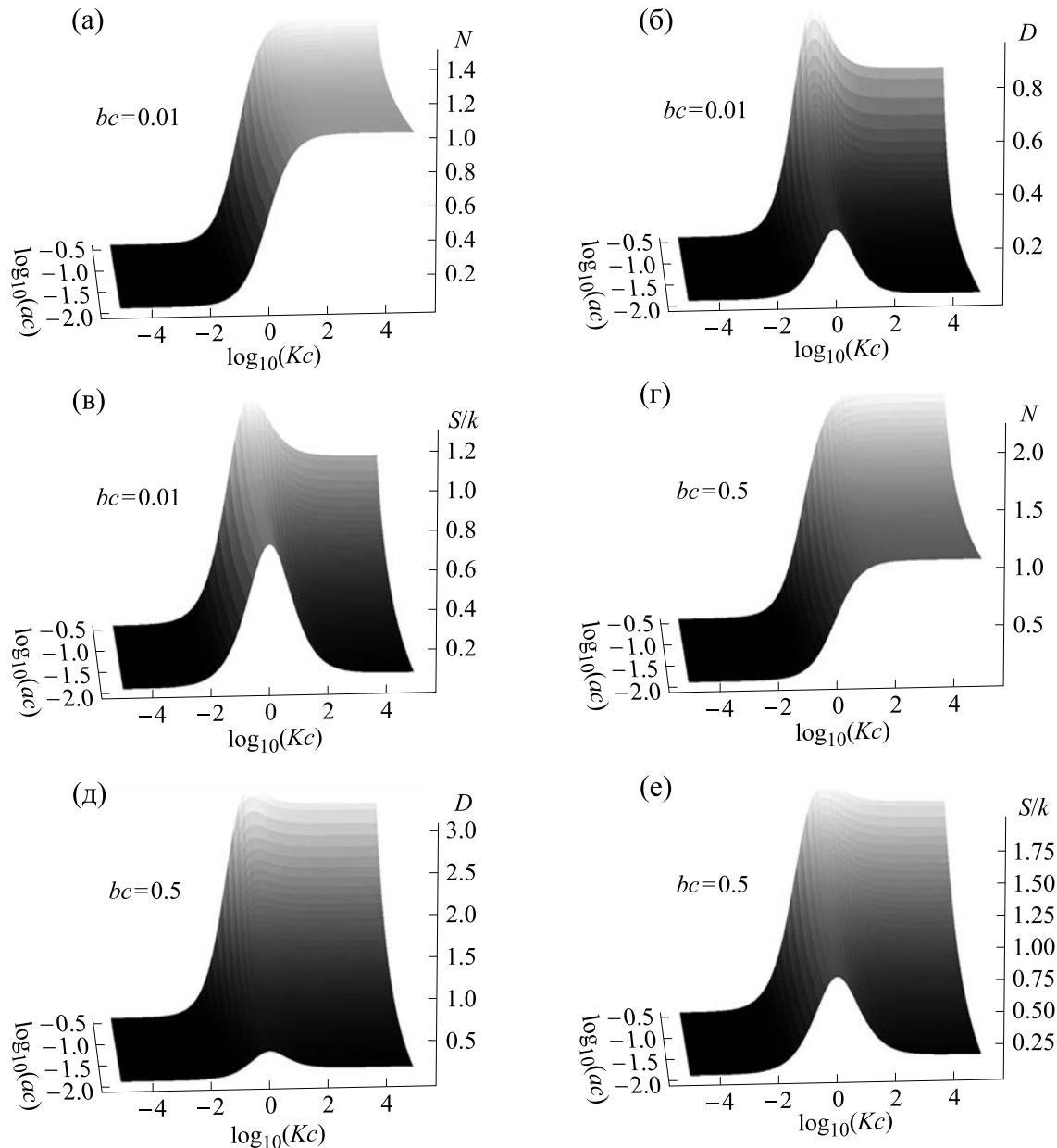


Рис. 4. Зависимости статистических характеристик ансамбля двухфрагментных агрегатов от Kc и ac : (а), (б), (в) — соответственно среднее, дисперсия и энтропия при $bc = 0.1$; (г), (д), (е) — соответственно среднее, дисперсия и энтропия при $bc = 0.5$.

Обозначения Υ_1 , Υ_2 и Υ_∞ соответствуют наличию всего одного фрагмента в однородной модели, двух фрагментов в двухфрагментной и бесконечного количества возможных фрагментов в последней рассматриваемой здесь модели.

Вычисление такой статистической суммы уже не сводится напрямую к вычислению двух геометрических прогрессий, однако сводится к биному Ньютона:

$$P_\infty(0) = \frac{1}{\Upsilon_\infty}, P_\infty(N \geq 1) = \frac{1}{\Upsilon_\infty} Kc \sum_{i=0}^{N-1} C_{N-1}^i (ac)^i (bc)^{N-1-i} = \frac{1}{\Upsilon_\infty} Kc (ac + bc)^{N-1}.$$

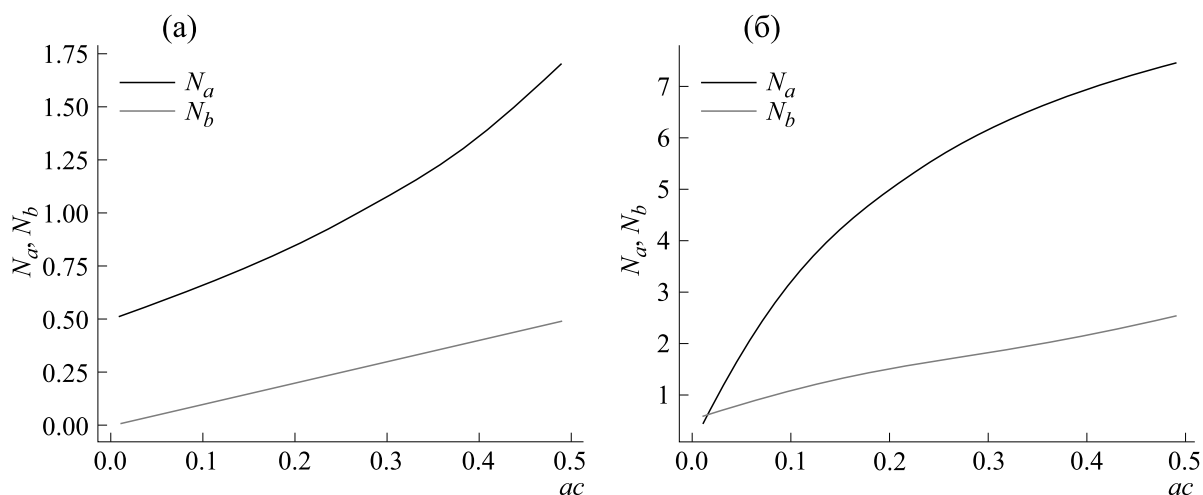


Рис. 5. Зависимости средних размеров каждого из двух фрагментов от ac при $Kc = 1$: (а) – $bc = 0.5$ (кэпирование), (б) – $bc = 0.9$ (индукция).

следовательно, при произвольном порядке типов связей в агрегатах функция распределения обязательно либо при $ac + bc \geq 1$ строго возрастает или постоянна (статистическая сумма не сходит-

ся), что противоречит конечности количества мономеров в растворе, либо строго убывает при $ac + bc < 1$. Следовательно, произвольный порядок типов связей в агрегатах рассматриваемых

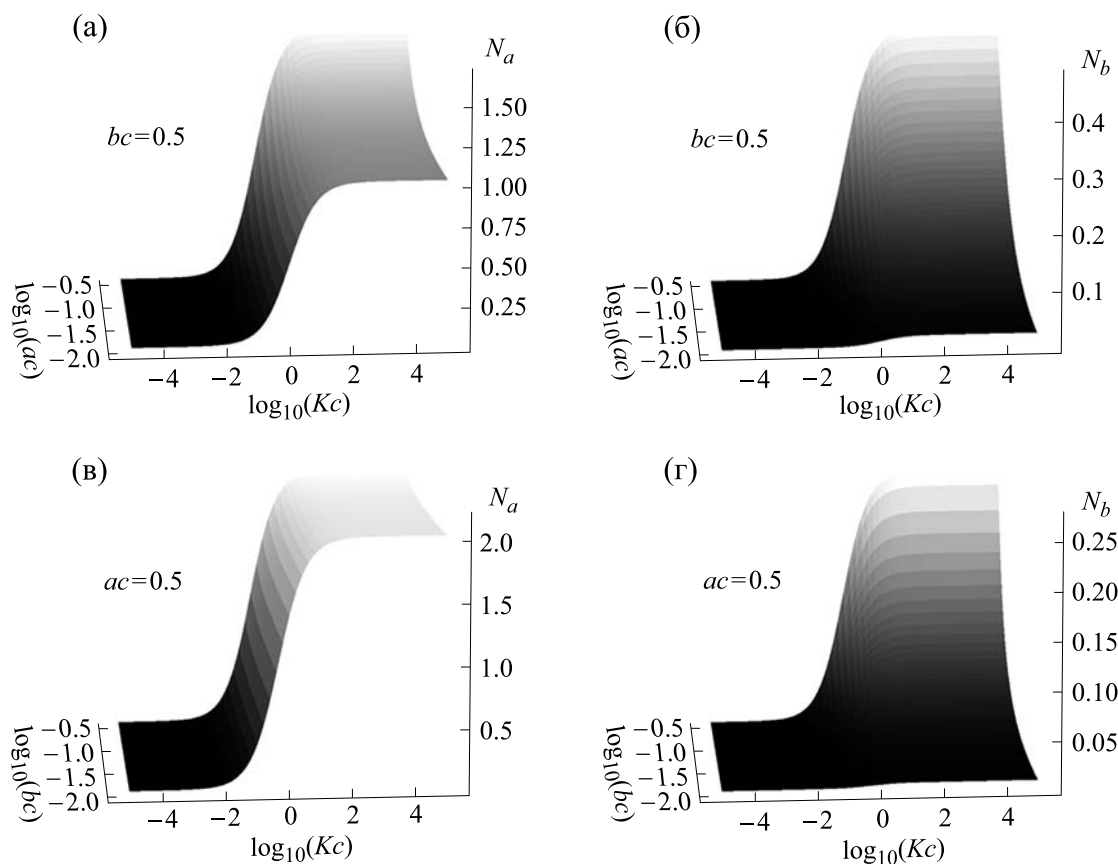


Рис. 6. Средние размеры фрагментов при фиксированном bc (верхний ряд) и фиксированном ac (нижний ряд).

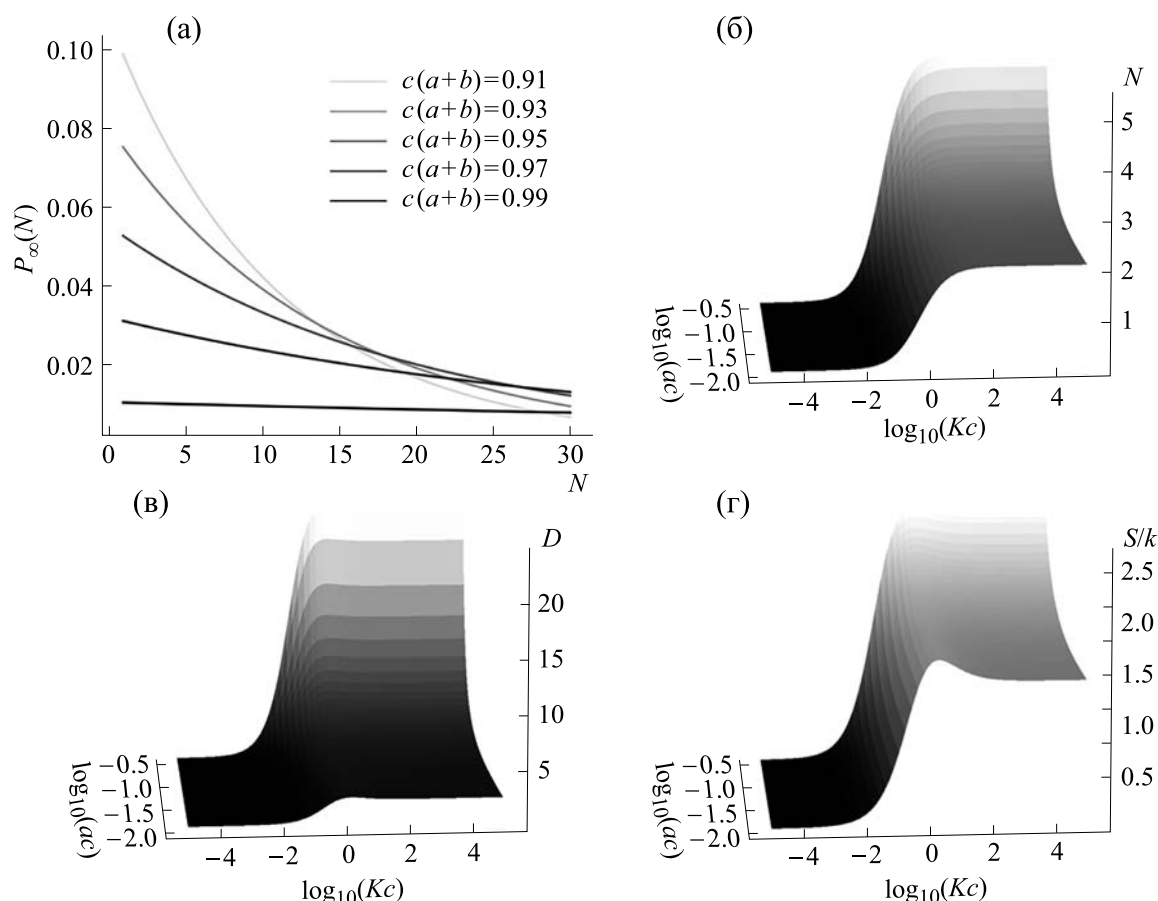


Рис. 7. Свойства распределения размеров агрегатов для модели произвольного порядка типов связей. (а) — Распределения, даваемые моделью с произвольным порядком связей. Зависимость статистических характеристик модели произвольного порядка лигандов двух типов от $\ln(Kc)$ и $\ln(ac)$ при $bc = 0.5$: (б) — среднее, (в) — дисперсия, (г) — энтропия.

биомолекул запрещен. Те же рассуждения показывают невозможность произвольного порядка различных мономеров в агрегатах.

Запрет на образование произвольного порядка связей в агрегатах может говорить о наличии кооперативных эффектов, которые делают некоторые подпоследовательности связей в агрегатах очень энергетически невыгодными, ограничивая тем самым разнообразие агрегатов.

Модель произвольного порядка лигандов математически идентична однородной модели, хотя они и могут изначально показаться противоположными, ведь однородная модель предполагает лишь один тип структуры агрегата, а модель произвольного порядка — бесконечно много. Однако модель Y_1 переходит в модель Y_∞ при замене a на $a_{\text{эфф}} = a + b$. Статистический смысл этой похожести состоит в том, что любые два макроскопических фрагмента модели произвольного порядка связей будут неотличимы друг от друга, в отличие от двухфрагментной модели, которая разбивается на два макроскопически различных фрагмента.

Выражения для среднего размера агрегата, дисперсии и энтропии ансамбля совпадают с таковыми для однородной модели при замене ac на $a_{\text{эфф}}c$.

Таким образом, если зафиксировать bc и построить графики статистических характеристик в координатах (Kc, ac) , то получатся сдвинутые в сторону больших значений ac соответствующие графики для однородной модели (ср. с рис. 2б–г). Соответственно, задание bc в такой модели — это, по сути, задание минимального значения константы ассоциации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следуя подходу, разработанному в работах Т. Хилла [6], мы применили для описания образования амилоидных агрегатов теорию многослойной адсорбции. Однородная модель агрегации (аналогичная классической теории Брунауэра–Эммета–Теллера) и модель произвольного порядка связей в агрегатах дают кривые, качественно противоречащие экспериментальным

распределениям размеров агрегатов [12]. Предложенная в нашей работе двухфрагментная модель агрегации позволяет получать распределения размеров агрегатов, близкие к экспериментальным. Физические свойства этой модели включают в себя рост энтропии ансамбля агрегатов при увеличении как энергетического, так и энтропийного параметра. Распределение размеров агрегатов имеют пик только при значениях ac , немного меньших единицы.

По аналогии с двухфрагментной моделью агрегации можно предложить модели с любым количеством фрагментов. Ключевая задача при разработке таких моделей – оценка количества однородных фрагментов, из которых может состоять агрегат, например, из данных о механизмах образования агрегатов. Предложенный подход может помочь оценить количество допустимых механизмов связывания. Помимо энтропийных эффектов, смещающих максимум распределения размеров агрегатов в сторону более длинных, можно рассмотреть и энергетические кооперативные эффекты [27], также потен-

циально благоприятствующие образованию длинных агрегатов.

Областью использования разработанной нами двухфрагментной термодинамической модели является анализ распределений длин агрегатов, образующихся из адсорбированных на матрице лигандов при амилоидозе и других заболеваниях, в которых конформации пептидов и белков меняются по прионному механизму.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Вывод выражений для энтропий ансамблей агрегатов. Исходя из формулы, известной из статистической механики и применимой ко всем моделям, можно найти значение конфигурационной энтропии, приходящейся на один сайт связывания матрицы:

$$S = k \left(\frac{\partial \ln \Upsilon}{\partial \ln T} + \ln \Upsilon \right). \quad (\text{П1})$$

В это выражение входит производная:

$$\frac{\partial \ln \Upsilon_1}{\partial \ln T} = \frac{1}{(1 + Kc - ac)(1 - ac)} \left\{ c(1 - ac) \frac{\partial K}{\partial \ln T} + Kc^2 \frac{\partial a}{\partial \ln T} + K \frac{\partial c}{\partial \ln T} \right\} \quad (\text{П2})$$

Пусть ΔG_K и ΔG_a – изменения энергии Гиббса связывании лигандов с сайтами и между собой соответственно, $\Delta \mu$ – изменение химического потенциала лиганда при связывании. Тогда константы равновесия выражаются через температуру (раствор мономеров считается идеальным):

$$K = e^{-\frac{\Delta G_K}{kT}}, \quad a = e^{-\frac{\Delta G_a}{kT}} \quad \text{и} \quad c = e^{\frac{\Delta \mu}{kT}}$$

а искомые производные:

$$\frac{\partial K}{\partial \ln T} = T \frac{\partial}{\partial T} e^{-\frac{\Delta G_K}{kT}} = \frac{\Delta G_K}{kT} e^{-\frac{\Delta G_K}{kT}} = -K \ln K,$$

$$\frac{\partial a}{\partial \ln T} = T \frac{\partial}{\partial T} e^{-\frac{\Delta G_a}{kT}} = \frac{\Delta G_a}{kT} e^{-\frac{\Delta G_a}{kT}} = -a \ln a,$$

$$\frac{\partial c}{\partial \ln T} = T \frac{\partial}{\partial T} e^{\frac{\Delta \mu}{kT}} = -\frac{\Delta \mu}{kT} e^{\frac{\Delta \mu}{kT}} = -c \ln c.$$

Подставляя найденные производные в выражение (2), получим:

$$\frac{\partial \ln \Upsilon_1}{\partial \ln T} = -\frac{Kc}{1 + Kc - ac} \left\{ \ln(Kc) + \frac{ac}{1 - ac} \ln(ac) \right\}$$

Подстановка этой производной и статистической суммы (1) в (A1) дает энтропию ансамбля однородных агрегатов:

$$\frac{S_1}{k} = \ln \left(1 + \frac{Kc}{1 - ac} \right) - \frac{Kc}{1 + Kc - ac} \left\{ \ln(Kc) + \frac{ac}{1 - ac} \ln(ac) \right\} \quad (\text{П3})$$

Аналогично получаются выражение для энтропии ансамбля двухфрагментных агрегатов

$$\frac{S_2}{k} = \ln \{\Upsilon_2\} + \frac{Kc \{ac[bc^2(ac-1) + ac(bc-1)] - Kc(ac-1)(bc-1)(abc^2 - bc + 1)\}}{T\Upsilon_2(1-ac)^2(1-bc)^2}$$

и ансамбля агрегатов с произвольным порядком типов связей

$$\frac{S_\infty}{k} = \ln \left\{ 1 + \frac{Kc}{1 - c(a+b)} \right\} - \frac{Kc}{1 + c(K - a - b)} \left\{ \ln(Kc) + \frac{c(a+b)}{1 - c(a+b)} \ln[c(a+b)] \right\}.$$

Вывод средних и дисперсий распределений размеров агрегатов. Из статистической механики известно, что среднее число частиц может быть най-

дено, если задана большая статистическая сумма системы:

$$\Upsilon = \sum_{N=0}^{\infty} Q(N, P, T) \exp \left(\frac{\mu N}{kT} \right) = \sum_{N=0}^{\infty} \sum_i \exp \left(\frac{-E_i + \mu N}{kT} \right). \quad (\text{П4})$$

Здесь i соответствуют возможным состояниям агрегата из N мономеров следующим образом:

$$\langle N \rangle = \frac{1}{\Upsilon} \sum_{N=0}^{\infty} \sum_i N \exp \left(\frac{\mu N - E_i}{kT} \right) = \frac{1}{\Upsilon} \frac{\partial \Upsilon}{\partial \left(\frac{\mu}{kT} \right)} = \frac{\partial \ln \Upsilon}{\partial \ln c} \quad (\text{П5})$$

где $c = e^{\frac{\mu}{kT}}$ — концентрация частиц.

Дисперсия числа частиц равна, по определению:

$$D = \langle N^2 \rangle - \langle N \rangle^2 = \frac{1}{\Upsilon} \frac{\partial^2 \Upsilon}{\partial (\ln c)^2} - \left(\frac{\partial \ln \Upsilon}{\partial \ln c} \right)^2 = \frac{\partial^2 \ln \Upsilon}{\partial (\ln c)^2} \quad (\text{П6})$$

Заметим, что выражения для среднего и дисперсии распределения размеров агрегатов применимы к любой модели, в которой энергия агрегации не зависит от химического потенциала свободного лиганда. Действительно, если в статистической сумме

E_i не зависит от μ , то при дифференцировании по μ/kT каждое из слагаемых домножится на N . Так могут быть получены, в том числе, статистические характеристики двухфрагментной модели. Средние размеры агрегатов в двухфрагментной модели:

$$\langle N \rangle_2 = \frac{1}{\Upsilon_2} \frac{Kc}{(1-ac)^2(1-bc)^2} \left\{ 1 + bc(-2 + 3ac - 2(ac)^2) + (bc)^2(1-ac)^2 \right\}. \quad (\text{П7})$$

Для модели с произвольным порядком типов связей средний размер равен

$$\langle N \rangle_{\infty} = \frac{Kc}{(1 + Kc - ac - bc)(1 - ac - bc)}. \quad (\text{П8})$$

Вторая производная статистической суммы двухфрагментной модели описывается слишком громоздким выражением, поэтому выражение

для дисперсии размеров двухфрагментных агрегатов удобнее получить прямым суммированием ряда, которое дает

$$D_2 = \begin{cases} \frac{1}{T_2} \left\{ Kc + \frac{Kac^2}{1-b/a} \left[\frac{4-3ac+(ac)^2}{(1-ac)^3} - \frac{b}{a} \frac{4-3bc+(bc)^2}{(1-bc)^3} \right] \right\} - \langle N \rangle_2^2, & a \neq b \\ \frac{1}{T_2} \left\{ Kc + \frac{Kac^2(4+2ac)}{(1-ac)^4} \right\} - \langle N \rangle_2^2, & a = b. \end{cases} \quad (\text{П9})$$

Для модели с произвольным порядком типов связей имеем

$$D_{\infty} = \frac{Kc\{1 + (ac + bc)(Kc - ac - bc)\}}{(1 + Kc - ac - bc)^2(1 - ac - bc)^2}. \quad (\text{П10})$$

Так как у распределений размеров, даваемых двухфрагментной моделью, в отличие от двух других рассмотренных в этой работе моделей, есть

еще и пики, их положения тоже характеризуют кривые распределений и находятся приравнением к нулю производной:

$$0 = \frac{dP_2}{dN}(N_{\max}) = \frac{(ac)^{N-2} \{ (r - r^N) \ln(ac) - r^N \ln(r) \}}{r} \Rightarrow N_{\max} = 1 - \frac{\ln \{ \ln(acr) / \ln(ac) \}}{\ln(r)} \\ = 1 - \frac{\ln \left\{ 1 + \frac{\ln(r)}{\ln(ac)} \right\}}{\ln(r)}$$

Отсюда понятно, почему на рис. 3в параметр разнообразия влияет на положение значительнее, чем энергетический параметр: ac стоит в логарифме от логарифма, а r — в логарифме, скорость же изменения логарифма много больше, чем логарифма от логарифма.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30007).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. M. Morris, M. A. Watzky, and R. G. Finke, *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, **1794** (3), 375 (2009).
2. R. J. Loureiro, et al., In *Proc. of Int. Conf. on Multidisciplinary Sciences MOL2NET 2018*, 4th edition (MD-PI, 2018), p. 1.
3. R. B. Martin, *Chem. Rev.*, **96** (8), 3043 (1996).
4. V. P. Evstigneev, et al., *J. Chem. Phys.*, **134** (19) (2011).
5. A. S. Buchelnikov, V. P. Evstigneev, and M. P. Evstigneev, *Chem. Phys.*, **421**, 77 (2013).
6. T. L. Hill, *Thermodynamics of Small Systems* (Courier Corp., 1994).
7. S. Lifson, *J. Chem. Phys.*, **40** (12), 3705 (1964).
8. M. P. Heyn and R. Bretz, *Biophys. Chem.*, **3** (1), 35 (1975).
9. J. Spouge, *Macromolecules*, **16** (1), 121 (1983). DOI: 10.1021/ma00235a024
10. S. Brunauer, P. H. Emmett, and E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **60** (2), 309 (1938).

11. Z. L. Almeida, R. M. M. Brito, *Molecules*, **25** (5), 1195 (2020).
12. W. F. Xue, S. W. Homans, and S. E. Radford, *Prot. Engineering, Design & Selection*, **22** (8), 489 (2009). DOI: 10.1093/protein/gzp026
13. J. Hinz, L. M. Gierasch, and Z. Ignatova, *Biochemistry*, **47** (14), 4196 (2008).
14. W. F. Xue, S. W. Homans, and S. E. Radford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** (26), 8926 (2008).
15. W. F. Xue and S. E. Radford, *Biophys. J.*, **105** (12), 2811 (2013).
16. P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.*, **58** (10), 1877 (1936).
17. G. W. Platt, et al., *J. Mol. Biol.*, **378** (1), 251 (2008).
18. M. I. Ivanova, et al., *Biophys. Chem.*, **269**, 106507 (2021).
19. W. Zheng, M. Y. Tsai, and P. G. Wolynes, *J. Am. Chem. Soc.*, **139** (46), 16666 (2017).
20. S. A. Kozin, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1057 (2018).
21. В. В. Аристов и др., *Применение понятий энтропии и информации для исследования биосистем: от молекул до организмов* (2023).
22. L. M. Smith and S. M. Strittmatter, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **7** (5), a024075 (2017).
23. V. A. Mitkevich, et al., *Aging and Disease*, **14** (2), 309 (2023).
24. V. V. Aristov, A. S. Buchelnikov, and Y. D. Nechipurenko, *Entropy*, **24** (2), 172 (2022).
25. S. A. Kozin, *Biochemistry (Moscow)*, **88** (Suppl. 1), S75 (2023). DOI: 10.1134/S0006297923140055
26. Y. Kong, *J. Chem. Phys.*, **135** (15) (2011).
27. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т компл. исслед., Москва - Ижевск, 2015).

A Thermodynamic Model for the Formation of Protein Aggregates on a Matrix

E.O. Vasilenko*, **, S.A. Kozin*, V.A. Mitkevich*,
A.S. Buchelnikov***, and Yu.D. Nechipurenko*, ***

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

***Moscow Institute of Physics and Technology, Kerchenskaya ul. 1a/1, Moscow, 117303 Russia*

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

The development of many neurodegenerative diseases is associated with the formation of pathological protein aggregates. In some cases, these aggregates can be formed by multilayer adsorption of ligands on a matrix, for example, the set of membrane protein receptors. The paper proposes a thermodynamic model describing the formation of linear aggregates in which ligands can be stacked. The cases when these stacks consist of complexes of one or two different types are considered. The developed model can be applied to the study of pathological aggregation of proteins of different nature, primarily beta-amyloid and its isoforms. The mean, variance and entropy of the theoretical distributions of aggregate sizes are calculated. A comparison with other theoretical models of the formation of amyloid aggregates is made.

Keywords: amyloid aggregates, mathematical modeling of aggregation, self-association, statistical thermodynamics, binding energies, beta-amyloid

УТОЧНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ β -ИЗГИБОВ ПО ДАННЫМ НЕЙТРОНОГРАФИИ

© 2023 г. А.А. Коробков*, А.А. Хурмузакый**, Н.Г. Есипова*, В.Г. Туманян*, А.А. Анашкина*.*

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

**Первый медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8, Москва, 119991, Россия

*E-mail: anastasia.a.anashkina@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.23 г.

После доработки 04.12.23 г.

Принята к публикации 06.12.23 г.

β -Изгибы относятся к трудно интерпретируемому типу структуры остова полипептидной цепи глобулярных белков. До сих пор непонятен механизм стабилизации их часто энергетически невыгодных конформаций. Классификацию β -изгибов принято проводить по двугранным углам ϕ и ψ аминокислотных остатков $i+1$ и $i+2$ в β -изгибах. Однако анализ карты Рамачандрана аминокислотных остатков $i+1$ и $i+2$ указывает на возникающее в изгибе конформационное напряжение. Такого рода конформационные напряжения могут быть скомпенсированы, скорее всего, дополнительными взаимодействиями, такими как дополнительные водородные связи, геометрия и энергия которых и компенсирует напряжение β -изгиба. Нейтронография является прямым методом определения положения атомов водорода в структурах химических соединений, включая белки. В данной работе изучено 176 структур белков из PDB, установленных с помощью метода нейтронографии. В этих структурах по критерию замыкающей псевдоцикл водородной связи $i \rightarrow i+3$ было найдено 3733 β -изгиба. Определены величины конформационных углов для каждого типа изгиба. Гипотеза о наличии дополнительной водородной связи для стабилизации изгиба статистически удовлетворительного подтверждения не нашла.

Ключевые слова: β -поворот, конформация, полипептидная цепь, β -шпилька.

DOI: 10.31857/S0006302923060054, EDN: ROCZDC

β -Изгибы, как правило, присутствуют в белковых структурах. Именно такого рода структурные элементы обеспечивают резкий поворот полипептидной цепи назад. В 1968 г. Венкатачалам предложил обратить внимание на водородные связи, стабилизирующие такую конформацию. Он нашел, что расположение атомов между кислородом карбонильной группы основной цепи i -го остатка и атомом азота амидной группы остатка $i+3$ основной цепи следует назвать водородной связью. Венкатачалам выделил шесть подклассов β -изгибов [1].

П. Льюис в своей работе 1973 г. отметил, что сближение двух C_{α} -атомов основной цепи, разделенных двумя аминокислотными остатками, на расстояние меньше 7 Å, может рассматриваться как критерий для возникновения β -изгиба. Это позволило расширить классификацию изгибов до десяти типов [2].

В 1981 году Дж. Ричардсон [3], основываясь на трудах П. Чоу и Г. Фасмана [4], которые смогли рассчитать и наглядно визуализировать значения

углов ϕ и ψ , сделал вывод о том, что тип III β -поворотов можно исключить из классификации, так как он вместе с типом I формирует один очень плотный кластер. Помимо этого, предложенный Льюисом тип V не образовывал четкого и определенного кластера и по таким же соображениям тоже был удален из финальной классификации поворотов. Тип VI, образованный цис-пролиновыми поворотами, был разделен на две группы — VIa и VIb. Тип VIa содержит повороты со значениями углов пролина, характерными для α -спирали, имеет вогнутую ориентацию пептида и кольцо пролина следует общей кривой изгиба; такой изгиб обычно содержит водородную связь. Вторая группа — тип VIb — состоит из β -поворотов с характерными для β -структуры углами пролина, имеет выпуклую ориентацию пептида и пролина; водородная связь часто отсутствует. Тип VII характеризовался всего лишь двумя углами, поворот, относящийся к этому типу, принимает один из двух крайних вариантов, что делает этот класс неоднозначным. Поэтому Ричардсон ввел

Таблица 1. Восемь кластеров β -изгибов, полученных при кластеризации по конформационным углам β -изгибов из нейтронографических структур

	$i + 1$		$i + 2$	Число случаев	Доля, %
	ϕ	ψ	ϕ		
I	$-66 \pm 20^\circ$	$-22 \pm 25^\circ$	$-99 \pm 15^\circ$	948	27.0
II	$-58 \pm 20^\circ$	$132 \pm 20^\circ$	$85 \pm 30^\circ$	257	7.3
III	$-61 \pm 20^\circ$	$-33 \pm 30^\circ$	$-69 \pm 10^\circ$	2143	61.1
I'	$54 \pm 10^\circ$	$38 \pm 15^\circ$	$78 \pm 25^\circ$	89	2.5
II'	$54 \pm 10^\circ$	$-133 \pm 15^\circ$	$-92 \pm 15^\circ$	16	0.5
VI _a	$-61 \pm 20^\circ$	$139 \pm 18^\circ$	$-94 \pm 20^\circ$	17	0.5
VI _c	$-51 \pm 20^\circ$	$140 \pm 15^\circ$	$-77 \pm 15^\circ$	10	0.3
IV	$54 \pm 10^\circ$	$-133 \pm 15^\circ$	$-71 \pm 10^\circ$	25	0.7

тип IV, который включает в себя все повороты, не подходящие по критериям ни к одному из вышеупомянутых шести типов [3].

Следующий шаг в изучении β -изгибов заключался в анализе большего количества данных ради улучшения существующей классификации. Уилмот и Торнтон в 1988 г. выделили изгибы в 59 неидентичных белковых структурах [5]. Они использовали тот же метод предсказания β -изгибов, что и П. Льюис в своей работе 1973 г. Повороты разделили по определенному типу с допустимой вариацией величины углов ϕ , ψ : 30° для трех углов и 45° для четвертого угла в повороте. Результаты классификации показали, что тип I образует основной кластер. Авторы также предложили добавить в классификацию тип VIII. Он описывает повороты с углами закручивания, характерными для структур α -спирального типа в положении $i + 1$, и углами закручивания, характерными для β -структур в положении $i + 2$.

В 1990 г. Уилмот и Торнтон, продолжая свои исследования [6], заметили, что примерно 42% β -изгибов не попадают ни в один из восьми общепринятых типов. Они также предложили новую номенклатуру для β -поворотов, основанную на участках с допустимыми значениями торсионных углов на диаграмме Рамачандрана.

Спустя четыре года Торнтон вместе с Хатчинсоном [7] провели идентификацию и классификацию еще более крупной выборки β -поворотов, почти в четыре раза превышающей предыдущую. Эта работа показывает, насколько важно пересматривать общепринятое разделение изгибов, так как с увеличением опорной базы данных можно получать более реалистичную и осмысленную классификацию. В этих трудах было также отмечено, что примерно 42% β -поворотов встречаются в белке изолированно, многие же изгибы образуют множественные повороты, в которых как минимум один остаток является общим для этих β -поворотов.

В дальнейших исследованиях были продолжены попытки введения новой классификации и номенклатуры β -поворотов [8–10]. Так, результаты А. де Бреверна [10], опубликованные в 2016 г., вновь показали, что наиболее часто встречающимся является β -изгиб I типа. В эту категорию попало 38.2% от всех исследованных поворотов. Вторым по встречаемости стал тип IV, включающий в себя все конформации, не подошедшие по критериям ни к одному из стандартных типов. На эту группу приходится 31.7% β -поворотов. Так как примерно треть всех исследуемых поворотов не была отнесена ни к одному типу, де Бреверн предложил разделение этого сборного кластера на четыре группы. Он проводил кластеризацию несколько раз с разными входными наборами поворотов. Сходный подход использовался в работе К. Мишлетти [11]. Он с коллегами кластеризовал свои данные несколько раз, при этом каждый раз выделялся наибольший из всех кластеров с его дальнейшим удалением из последующих кластеризаций. Новые четыре подтипа включали в себя примерно половину изначальных представителей типа IV, вторая половина была отнесена к типу IV — *miscellaneus*. Следующие величины описывают распределение поворотов в новых подтипах: 16.1%, 12.4%, 11.2% и 8.5%. В табл. 1 приведены значения торсионных углов новых подтипов, они обозначаются как IV с индексом.

В 2019 г. М. Шаповалов [8] провел анализ β -изгибов на основе 1074 белковых структур с очень высоким разрешением ($< 1.2 \text{ \AA}$), в них было найдено 13030 β -поворотов. β -Изгиб определялся согласно следующим критериям: сегмент должен состоять из четырех аминокислотных остатков, расстояние между C_α -атомом первого и четвертого остатка должно быть менее $7 \text{ \AA}$. Первая кластеризация была проведена по методу k -средних. В основе этого метода лежит изначальный выбор k произвольных центров, после чего данные разбиваются на k групп, наиболее близких к выбран-

ным центрам. Однако этот метод не позволил провести качественную кластеризацию, так как либо получалось выделить наиболее встречающиеся классические классы, но не было возможности разделить повороты типа I и типа VIII, либо эти два типа попадали в разные классы, но последствием такого разбиения было наличие огромного количества маленьких кластеров и шума. В результате был выбран метод DBSCAN (Density Based Spatial Clustering of Application with Noise), с последующим применением нескольких циклов кластеризации методом k -средних. В методе DBSCAN используется предположение, что элементы одного кластера формируют область с более высокой плотностью, нежели окружение этого кластера [12, 13]. После проведения первой кластеризации Шаповалов получил 11 кластеров, при более детальном изучении которых стало понятно, что 4 из них могут быть разделены. Он выделил 18 типов поворотов вместо классических 8 типов и ввел новую двухбуквенную номенклатуру. В новой классификации типов β -поворотов совершенно новые восемь типов были получены в результате разделения некоторых классических типов (тип II был разделен на два, тип VIII – на четыре типа, и тип VIb был тоже разделен на два новых типа) и оставшиеся четыре типа являются обновленными кластерами классических типов I, I', II' и VIa. Полная информация по кластерам со значениями торсионных углов и сравнением с классической кластеризацией β -изгибов представлена в табл. 1. По сравнению с классическими восемью типами (тип I, I', II, II', VIa1, VIa2, VIb, VIII), Шаповалов ввел 12 совершенно новых типов, в том числе семь существующих типов и пять подтипов [8].

Все эти работы были сделаны на основании анализа структур, установленных методом рентгеноструктурного анализа. В таких структурах положения атомов водорода определены непрямым методом. Экспериментально устанавливается распределение электронной плотности в анализируемом объекте [14], а не координаты ядер атомов. Координаты ядер атомов водорода рассчитываются на основе простых геометрических соображений. Нейтронографические методы, в отличие от рентгенографических, позволяют экспериментально определить расположение ядер атомов водорода в молекуле. Поток нейтронов рассеивается ядрами атомов. При этом, амплитуда рассеяния легких атомов сравнима с амплитудой рассеяния тяжелых атомов, что позволяет определить координаты атомов водорода, чего невозможно достичь в рентгеноструктурном анализе [14].

В данной работе, используя экспериментально определенные координаты атомов водорода, мы проанализировали двугранные (конформационные) углы β -поворотов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изученные структуры белков. Из базы данных PDB были отобраны все белковые структуры, полученные с помощью нейтронографии (данные на ноябрь 2020 г.):

3TMJ, 3U2J, 3RZ6, 3RYG, 3RZT, 3SS2, 3VXF, 3X2O, 3X2P, 4FC1, 4G0C, 4N3M, 4N9M, 3QBA, 3QF6, 3R98, 3R99, 3QZA, 4K9F, 4JEC, 3CWH, 2VS2, 2YZ4, 2ZOI, 2ZPP, 3A1R, 2ZWB, 2ZYE, 2WYX, 2XQZ, 3HGN, 3BYC, 4ZZ4, 5A90, 5A93, 5AI2, 5DPN, 5E5J, 5E5K, 5EBJ, 3KCL, 3KCO, 3KKX, 3KMF, 3L45, 5C6E, 5C8I, 5CCE, 5CCD, 5CE4, 5CG6, 5CG5, 5D97, 4DVO, 4S2D, 4S2F, 4S2G, 4S2H, 4RSG, 3FHP, 3KYY, 3KYX, 4Q49, 4PVM, 4PVN, 4QCD, 4QDW, 4QDP, 5GX9, 3Q3L, 2R24, 3INS, 3KCJ, 4AR3, 4AR4, 4BD1, 4C3Q, 5K1Z, 5JPR, 5JPC, 4CVI, 4CVJ, 4PDJ, 6E2I, 6K8G, 6L9C, 5MO0, 5MO2, 5MO1, 5MOP, 5MOO, 5MOR, 5MOQ, 5MOS, 5MON, 5MNY, 5MNX, 5MNZ, 4GPG, 5PTI, 4Y0J, 4XPV, 5T8H, 5TKI, 4LNC, 5WEY, 5KSC, 5KWF, 6D54, 6D4L, 6NAF, 6NTI, 6NTJ, 6FJJ, 6FJI, 6RSA, 6F2Q, 6EXY, 6EYM, 6FFT, 6BQ8, 6C78, 5VG1, 5VJZ, 5VNQ, 5XPE, 5TY5, 6AJZ, 6BBS, 6BBR, 5ZN0, 5ZO0, 5RSA, 3OTJ, 5NFE, 5NFW, 5NKU, 4QXK, 6KK8, 6L26, 6L46, 6PTP, 7A0L, 6TAE, 6U58, 6XV4, 1GKT, 1L2K, 2MB5, 1LZN, 1CQ2, 6H1M, 6GTJ, 6GCY, 6U0B, 6U0C, 6U0F, 6U0E, 1NTP, 7JUN, 1IO5, 1IU6, 1WQ2, 1WQZ, 1XQN, 2INQ, 4NY6, 1VCX, 6BCC, 6BC9, 6BBZ, 1C57, 2GVE, 2DXM, 2EFA, 1V9G.

Вычисление параметров водородных связей и поиск стабилизирующей водородной связи. Расчет водородных связей проводился с использованием программного обеспечения HBPlus [7]. Далее с помощью специального скрипта на языке Python все водородные связи были автоматически проанализированы.

Критерий определения изгиба. После расчета всех водородных связей в нейтронографических структурах белков, определенных нейтронографическим методом с использованием программы HBPLUS и с использованием специального скрипта были отобраны фрагменты структур белков, содержащие водородные связи, удовлетворяющие критериям Венкатачала для β -изгибов (наличие водородной связи между карбонильным кислородом основной цепи остатка i и атомом азота основной цепи остатка $i + 3$) [1]. Каждый фрагмент структуры содержал по четыре аминокислотных остатка собственно β -изгиба и по два фланкирующих аминокислотных остатка с N- и C-конца, т.е. всего восемь аминокислотных остатков. Всего было найдено 3733 таких фрагмента.

Вычисление двугранных конформационных углов. Для вычисления торсионных углов аминокислотных остатков фрагмента структуры белка,

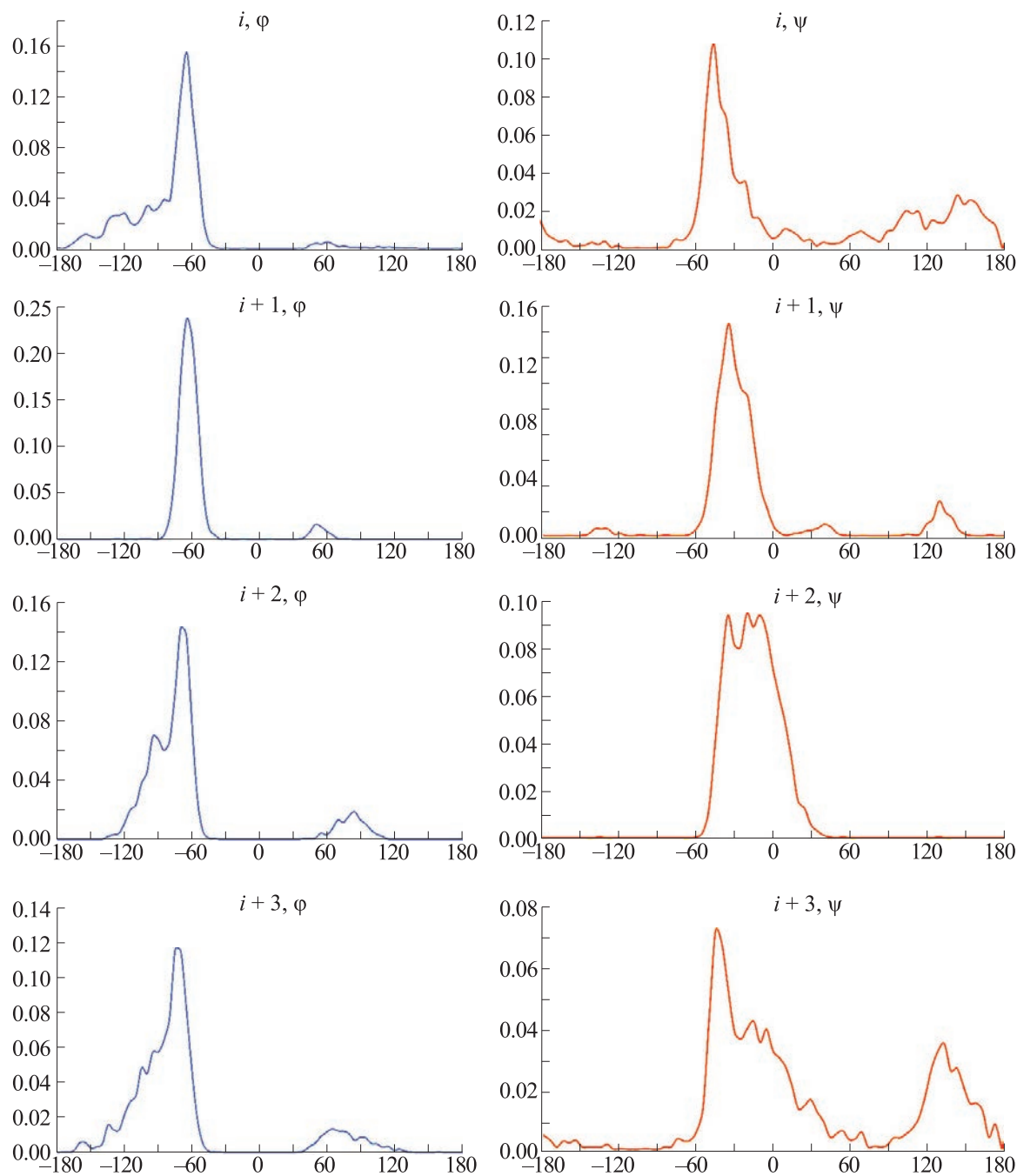


Рис. 1. Распределение величин торсионных углов в изученных 3733 структурах β -изгибов, найденных с помощью программы HBPlus [7] в 179 нейтронографических структурах белков. По оси X приведена величина конформационного угла. Суммарная площадь под каждым графиком равна 1. Характерные значения максимумов распределения величин конформационных углов ϕ и ψ четырех аминокислотных остатков изгиба и доля изгибов с аминокислотным остатком в такой конформации приведены в табл. 2.

содержащего β -изгиб, нами была написана программа на языке С. Программа доступна по запросу. Для визуализации распределений величин торсионных углов были построены гистограммы (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В большинстве структур был найден как минимум один β -изгиб, и лишь пять из 176 структур не содержали ни одного изгиба. В среднем на одну структуру белка пришлось 23 β -изгиба. На рис. 1

Таблица 2. Характерные значения максимумов распределения конформационных углов ϕ и ψ четырех аминокислотных остатков изгиба и доля изгибов с аминокислотным остатком в такой конформации

	i		$i + 1$		$i + 2$		$i + 3$
ϕ	$-129 \pm 25^\circ$ $-70 \pm 25^\circ$ $73 \pm 30^\circ$	22.58% 73.75% 3.67%	$-64 \pm 15^\circ$ $53 \pm 10^\circ$	95.0% 5.0%	$-98 \pm 15^\circ$ $-69 \pm 12^\circ$ $81 \pm 20^\circ$	34.05% 55.21% 10.74%	$-87 \pm 25^\circ$ $78 \pm 30^\circ$
ψ	$-162 \pm 20^\circ$ $-35 \pm 30^\circ$ $99 \pm 30^\circ$ $154 \pm 15^\circ$	4.82% 59.98% 17.57% 17.63%	$-135 \pm 10^\circ$ $-31 \pm 13^\circ$ $37 \pm 12^\circ$ $131 \pm 15^\circ$	1.96% 86.42% 3.3% 8.32%	$-15 \pm 30^\circ$	100.0%	$-161 \pm 20^\circ$ $-41 \pm 15^\circ$ $7 \pm 25^\circ$ $137 \pm 30^\circ$

приведены распределения величин двугранных углов ϕ и ψ , а в табл. 2 приведены характерные значения максимумов распределения конформационных углов ϕ и ψ четырех аминокислотных остатков изгиба и доля изгибов с аминокислотным остатком в такой конформации.

Результаты анализа распределения конформационных углов двух центральных аминокислотных остатков β -изгиба стали основными данными при формировании границ значений углов кластеров β -поворотов. С учетом комбинаторно возможных вариантов углов ϕ и ψ остатка $i - 1$ и угла ϕ остатка $i + 2$ предварительно были оценены границы 24 потенциально возможных кластеров.

В результате проведения кластеризации оказалось, что далеко не все комбинаторные варианты встречаются в белках. Количество ненулевых кластеров составило десять вариантов — из них два кластера содержали всего по одному β -изгибу и в последующем анализе не участвовали. Далее был определен центральный элемент каждого кластера и вычислена дисперсия. Параметры центрального элемента кластера приведены в табл. 1.

Для предварительной классификации границы кластеров были выбраны приблизительно. Однако в процессе отнесения изгибов к тому или иному кластеру только 5% структур остались в фоновом классе. Описание выявленных восьми кластеров дано в табл. 1. Максимально полным образом материал по конформационному анализу β -изгибов представлен в табл. 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы проанализировано 176 структур, полученных методом нейтронографии. По критерию замыкающей водородной связи, предложенному Венкатачаламом в 1968 г. [1], выявлено 3733 фрагмента, содержащих β -изгиб. Распределение величин двугранных углов ϕ и ψ остатков i , $i + 1$, $i + 2$ и $i + 3$ позволило выявить характерные значения углов для остатков $i + 1$ и $i + 2$. Кластеризация изгибов по комбинаторно возможным

24 классам показала, что только 8 классов изгибов содержат более одного элемента. Для каждого класса изгибов был определен центральный элемент кластера и вычислена дисперсия. Четыре из восьми полученных классов соотносятся с классическими типами β -изгибов [1, 2, 6], поэтому центральные значения конформационных углов изгибов типа I, типа I', типа II и типа II' были уточнены (табл. 3). Из полученных данных видно, что как углы Венкатачалама [1], так и углы Льюиса [2] и Торнтонна [5], были рассчитаны умозрительно, на основе геометрических моделей, без учета квантово-механических свойств полипептидной цепи и взаимного влияния электронных облаков. Особенно интересны данные по ψ для $i + 2$, ведь это — запрещенные области.

Поиск дополнительной стабилизирующей бифуркатной водородной связи, которая могла бы образоваться между атомом кислорода СО-группы i -го остатка и атомом азота $i + 2$, не выявил ни одной искомой связи в исследованных β -изгибах. Данные результаты говорят об отсутствии дополнительной стабилизации напряженной конформации β -изгиба на уровне вторичной структуры белка бифуркатной водородной связью. Наиболее близка к искомой конформации конформация II'. Возможно, что неудача в поиске стабилизирующей водородной связи связана либо с точностью определения координат атомов существующими методами, либо принятыми представлениями о геометрии водородной связи. Можно полагать в этой связи, что определенную роль в организации изгибов играет поле ядер водородов, образующееся в районах изгибов полипептидных цепей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Ю.Д. Нечипуренко за ценные советы при написании статьи.

Таблица 3. Восемь кластеров β -изгибов, полученных при кластеризации по конформационным углам β -изгибов из нейтронографических структур

Ссылка на источник														
[1]					[2]					[5]				
	$i + 1$		$i + 2$			$i + 1$		$i + 2$			$i + 1$		$i + 2$	
	фи	пси	фи	пси		фи	пси	фи	пси		фи	пси	фи	пси
I	-60°	-30°	-90°	0°	I	-60°	-30°	-90°	0°	I	-60°	-30°	-90°	0°
II	-60°	120°	80°	0°	II	-60°	120°	80°	0°	II	-60°	120°	80°	0°
III	-60°	-30°	-60°	-30°	III	-60°	-30°	-60°	-30°					
I'	60	30	90	0	I'	60	30	90	0	I'	60	30	90	0
II'	60	-120	-80	0	II'	60	-120	-80	0	II'	60	-120	-80	0
III'	60	30	60	30	III'	60	30	60	30					
										VIa	-60	120	-60	-30
										VIb	-120	120	-60	130
										VIII	-60	-30	-120	120
										IV				
					IV	± 40	± 40	± 40	± 40					
					V	-80	80	80	-80					
					VI			Cis-Pro						
					VII	180		60						

Таблица 3. Продолжение

Ссылка на источник															
[8]						Наши данные					[10]				
		$i + 1$		$i + 2$			$i + 1$		$i + 2$			$i + 1$		$i + 1$	
		фи	пси	фи	пси		фи	пси	фи	пси		фи	пси	фи	пси
AD	I	−62	−23	−96	−2	I	−66±20°	−22±25°	−99±15°						
Pd	II	−55	133	91	−6	II	−58±20°	132±20°	85±30°						
AG	new (prev. VIII)	−66	−19	−82	63	III	−61±20°	−33±30°	−69±10°						
ad	I'	47	45	83	1	I'	54±10°	38±15°	78±25°						
pD	II'	57	−130	−95	11	II'	54±10°	−133±15°	−92±15°						
PcisD	VIa1	−60	144	−93	8	VIa	−61±20°	139±18°	−94±20°						
BcisP	VIb	−138	119	−66	164						I VIV ₁ 1	−120.0	130.0	−120.0	130.0
PcisP	new (prev VIb)	−66	148	−76	142	VIc	−51±20°	140±15°	−77±15°						
AB2	VIII	−69	−30	−120	128										
AB1	new (prev. VIII)	−67	−31	−136	162										
AZ	new (prev. VIII)	−74	−28	−140	75										
											I VIV ₃ 3	−71.0	−30.0	−71.0	−30.0
dD	new	94	−1	−128	15										
cisDA	new	−94	8	−61	−38						I VIV ₄ 4	−97.0	−2.0	−97.0	−2.0
pG	new	74	−162	−79	77										
cisDP	new	−86	4	−71	158						I VIV ₂ 2	−85.0	−15.0	−85.0	−15.0
dN	new	69	9	−132	−63										
Dd	new	−115	16	101	−12										
Other	IV					IV	54±10°	−133±15°	−71±10°						
Pa	new (prev. II)	−60	135	59	28										

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00936 на тему «Характерные свойства конформационно-устойчивых структур в генезисе специфических дальнедействующих взаимодействий в процессах различной природы»).

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. C. M. Venkatachalam, *Biopolymers*, **6**, 1425 (1968). DOI: 10.1002/bip.1968.360061006
2. P. N. Lewis, F. A. Momany, and H. A. Scheraga, *Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct.*, **303**, 211 (1973). DOI: 10.1016/0005-2795(73)90350-4
3. J. S. Richardson, In *Advances in Protein Chemistry*, Ed. by C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, and F. M. Richards, (Acad. Press, 1981), V. 34, pp. 167–339.
4. P. Y. Chou and G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.*, **115**, 135 (1977). DOI: 10.1016/0022-2836(77)90094-8
5. C. M. Wilmot and J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.*, **203**, 221 (1988). DOI: 10.1016/0022-2836(88)90103-9
6. C. M. Wilmot and J. M. Thornton, *Prot. Engineer., Design and Selection*, **3** (6), 479 (1990). DOI: 10.1093/protein/3.6.479
7. E. G. Hutchinson and J. M. Thornton, *Prot. Sci.*, **3**, 2207 (1994).
8. M. Shapovalov, S. Vucetic, and R. L. Dunbrack, *PLoS Comput. Biol.*, **15** (3), e1006844 (2019). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006844
9. O. Koch and G. Klebe, *Proteins*, **74**, 353 (2009). DOI: 10.1002/prot.22185
10. A. G. de Brevern, *Sci. Rep.*, **6**, 33191 (2016). DOI: 10.1038/srep33191
11. C. Micheletti, F. Seno, and A. Maritan, *Proteins*, **40**, 662 (2000). DOI: 10.1002/1097-0134(20000901)40:4<662::aid-prot90>3.0.co;2-f
12. Y. Liu, Z. Li, H. Xiong, et al., In *Proc. IEEE Int. Conf. on Data Mining* (2010), ISBN 978-1-4244-9131-5.
13. D. Moulavi, P. A. Jaskowiak, R. Campello, et al., In *Proc. SIAM Int. Conf. on Data Mining* (2014). DOI: 10.1137/1.9781611973440.96
14. E. Oksanen, J. C.-H. Chen, and S. Z. Fisher, *Molecules*, **22**, 596 (2017). DOI: 10.3390/molecules22040596

The Refinement of the Parameters of β -Turns Using Neutron Diffraction Data

A.A. Korobkov*, A.A. Khurmuzakiy**, N.G. Esipova*, V.G. Tymanyan*, and A.A. Anashkina*

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

**I.M. Sechenov First Medical University (Sechenov University), ul. Trubetskaya 8, Moscow, 119991 Russia

Beta-bends are a difficult to interpret type of polypeptide chain backbone structure of globular proteins. Beta-bends are usually classified according to the dihedral angles ϕ and ψ of amino acid residues $i + 1$ and $i + 2$. Ramachandran map analysis of amino acid residues $i + 1$ and $i + 2$ indicates the resulting conformational stresses in bending. The mechanism of stabilization of their energetically disadvantageous conformations is still unclear. This kind of conformation stresses can only be compensated by additional interactions, such as additional hydrogen bonds, whose geometry and energy compensates for the beta-bending stress. Neutronography is the only available direct method for determining the position of hydrogen atoms in the structures of chemical compounds, including proteins. In this work, beta-bends from 176 protein structures from PDB established by neutronography are studied. In these structures, 3733 beta-bends were found using the $i \rightarrow i + 3$ hydrogen bonding criterion. Using clustering by the magnitude of conformational angles, eight types of bends were newly identified. The magnitudes of conformational angles for each type of bend were determined. The hypothesis of additional hydrogen bonding to stabilize the bend was not confirmed, suggesting that the bending stress is compensated by other factors.

Keywords: β -turn, conformation, polypeptide chain, β -hairpin

АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ АССОЦИАЦИЙ МЕСТНЫХ И СЕЛЕКЦИОННЫХ СОРТОВ КУЛЬТУРНОГО НУТА

© 2023 г. М.А. Дук*, **, #, А.А. Канапин*, М.П. Банкин*, М.А. Вишнякова***, С.В. Булынецв***, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Политехническая ул., 29, Санкт-Петербург, 195251, Россия

#E-mail: duk@mail.ioffe.ru

**Физико-Технический институт им. А.Ф. Иоффе, Политехническая ул., 26, Санкт-Петербург, 194021, Россия

***Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Большая Морская ул., 42-44, Санкт-Петербург, 190000, Россия

Поступила в редакцию 26.09.2023 г.

После доработки 0264.09.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Нут (*Cicer arietinum*) является важной зернобобовой культурой, особо распространенной на Ближнем Востоке. Из-за сильной подверженности нута при влажной погоде таким грибковым заболеваниям, как аскохитоз и фузариоз, важна селекция устойчивых, а также скороспелых сортов. В данной работе мы исследуем геномные ассоциации для 171 образца нута, выращенных на двух опытных станциях — в Краснодарском крае (Кубанская опытная станция) и Астрахани (Астраханская опытная станция), их связь с двенадцатью фенотипическими признаками, а также с тремя признаками устойчивости к трем патогенам: фузариозу, аскохитозу и совке. При исследовании методами полногеномного анализа ассоциаций были выявлены варианты, ассоциированные с различными фенотипическими признаками.

Ключевые слова: геномные ассоциации, нут, устойчивость к патогенам, GWAS.

DOI: 10.31857/S0006302923060066, **EDN:** RNBACN

Нут бараний (*Cicer arietinum*) является важной пищевой зернобобовой культурой, применяемой во множестве традиционных блюд, особенно распространенных на Ближнем Востоке и в Индии [1]. Предок культурного нута (*Cicer reticulatum*) произрастает на территории современной Турции и Сирии [2]. Это однолетнее самоопыляющееся теплолюбивое растение, являющееся культурой длинного дня.

Сорта нута сильно отличаются по времени созревания и семенной продуктивности и массе бобов. Существует межсортная и внутрисортная изменчивость по числу семян в бобе (от одного до четырех) и внутривидовая изменчивость по типу семян, определяющая дифференциацию генофонда вида на два типа. Образцы со светлыми крупными округлыми семенами преимущественно продовольственного назначения относят к типу кабули, с темноокрашенными угловатыми мелкими семенами — к типу дези, используемому для кормов [3]. Также нут очень сильно подвер-

жен грибковым заболеваниям — аскохитозу и фузариозу [4], особенно при влажной погоде.

В связи с этими особенностями при селекции обращают внимание на скороспелость, массу всего растения и семян с одного растения, число ветвей и листьев, длину периода цветения [5] а также на устойчивость к абиотическим [6] и биотическим стрессам: грибковым заболеваниям и вредителям.

При доместикации значительно уменьшилось генетическое разнообразие вида, что затрудняет создание новых сортов [7], тем не менее, поскольку выращивание нута имеет огромное значение для экономики стран Азии, ведутся обширные исследования по селекционному улучшению культуры [8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генотипические и фенотипические данные. Использовали генетические данные, фильтрованные по MAF 0.05, для 171 образца нута, из которых 147 местных сортов, 23 селекционных сорта и

Сокращение: SNP — однонуклеотидные замены.

1 образец неопределенного типа. Образцы относились к разным группам по окраске семени: 89 образцов — к типу дези, 81 — к типу кабули, 1 образец неопределенного типа. Фенотипические данные были получены за 2022 г. с двух опытных станций ВИР, расположенных в Краснодарском крае (Кубанская ОС) и Астрахани (Астраханская ОС). Данные Кубанской ОС станции также содержали оценки устойчивости к грибковым заболеваниям (фузариозу и аскохитозу) и вредителям (совке и минирующей мухе).

Подготовка данных. Фенотипические данные с двух опытных станций были квантильно нормированы. Для перевода в формат HarMap использовали программу TASSEL5 [9], для перевода в BED-формат — программу PLINK [10].

Анализ принципиальных компонент и популяционной структуры. Для анализа принципиальных компонент был использован пакет SNPRelate для R [11], графики строились в R. Для анализа популяционной структуры использовали программу ADMIXTURE [12] для $N = 2, 3, 4, 5$.

Анализ геномных ассоциаций. Для анализа геномных ассоциаций использовали пакет GAPIT3 для R [13], модели: FarmCPU, Blink, MLM, GLM, SUPER. В качестве ковариатов была взята популяционная структура (Q-матрица) для пяти популяций из ADMIXTURE. Порог MAF был взят равным 0.05.

Подтверждение аллельного эффекта найденных ассоциаций. Для подтверждения аллельного эффекта рассматривали фенотипические признаки в группах растений, содержащих (генотип 0/1 или 1/1) и не содержащих альтернативный аллель (генотип 0/0); в случаях, когда все растения содержали альтернативный аллель, рассматривались фенотипические признаки в группах гетерозигот (генотип 0/1) и гомозигот (генотип 1/1) по альтернативному аллелю; для варианта, предполагающего два альтернативных аллеля, растения, содержащие альтернативные аллели объединяли в одну группу и сравнивали с группой растений, содержащих только референсный аллель; p -value критерия Манна–Уитни и графики получены с помощью соответствующих функций в R.

Нуклеотидное разнообразие, индекс фиксации, D-статистика Таджимы. Для вычисления π -разнообразия, F_{st} , $TajimaD$ была использована программа vcftools [14]. Данные величины вычислялись в окнах, равных 10000 п.н.

Убывание неравновесия по сцеплению. Для расчета убывания неравновесия по сцеплению (LD) была использована программа PopLDDecay [15], для построения рисунка использовали скрипт в R.

Пересечения с генами. Корреляцию признаков, графики и попадания в гены исследовали с помощью программы, написанной в R, данные о координатах генов были взяты из GFF-файла версии 1 Cicer_arietinum_GA_v1.0.gene.gff, функциональное описание генов нута было получено из базы данных (<https://www.pulsedb.org/Analysis/1869759>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данном исследовании мы рассмотрели геномные ассоциации для 171 образца нута (147 местных сортов и 23 селекционных сорта) относящихся к разным группам по окраске семени (89 образцов относятся к типу дези, 81 к типу кабули, 1 образец неопределенного типа), выращенных на двух опытных станциях в Краснодарском крае (Кубанская ОС ВИР) и в Астрахани (Астраханская ОС ВИР).

Все признаки показали значительную вариабельность среди 171 образца нута (см. табл. 1), что подтверждает возможность применения метода полногеномного анализа ассоциаций (Genome-wide association analysis, GWAS) для обнаружения значимых вариаций.

Применение методов уменьшения размерности — метода принципиальных компонент (рис. 1а), tSNE, UMAP (здесь не приведены) — выявило, что образцы генетически не показывают значительного разделения на группы ни по типу окраски (дези/кабули), ни по селекционному статусу (местные и селекционные), ни по странам происхождения (результаты не показаны). На графиках принципиальных компонент можно увидеть слаборазличимое разделение на группы по первой, второй и четвертой компоненте, не связанное, однако, ни с одним из признаков. На рис. 1б показаны результаты применения программы ADMIXTURE к данным. Можно видеть, что большая часть сортов трактуется как смесь нескольких популяций, и среди образцов невозможно выделить достаточно замкнутые группы, обладающие одним происхождением. Все это указывает на активное генетическое смешение и дрейф генов даже между местными сортами, несмотря на то что растение является самоопыляемым. Это, вероятно, связано с активными попытками селекции на протяжении истории культивации нута.

Для поиска геномных ассоциаций были отдельно использованы фенотипические данные, полученные на разных опытных станциях. Среди признаков, для которых проводился поиск ассоциаций, были следующие: продолжительность периодов всходы-созревание, всходы-цветение, цветения, а также высота растения, размер листа,

Таблица 1. Статистические характеристики рассматриваемых фенотипических признаков

Признак	Среднее		Стандартное отклонение		Коэффициент вариации, %	
	К	А	К	А	К	А
Опытная станция*	К	А	К	А	К	А
Высота растения, см	44.33	51.57	8.4	12.2	18.95	23.66
Высота прикрепления первого боба, см	19.5	19.92	4.95	4.26	25.38	21.39
Число ветвей 1-го порядка	1.26	3.4	0.37	0.56	29.37	16.47
Число ветвей 2-го порядка	10.87	10.37	2.85	2.88	26.22	27.77
Масса растения с бобами, г	67.86	60.83	34.25	26.43	50.47	43.45
Масса бобов, г	24.4	29.22	10.98	11.89	45	40.69
Масса семян с растения, г	14.78	20.84	6.76	8.32	45.74	39.92
Размер листа, баллы	4.99	4.25	1.33	1.83	26.65	43.06
Период: всходы-созревание, дни	96.4	72.67	12.32	6.78	12.78	9.33
Период: всходы-цветение, дни	30.94	31.74	7.58	4.08	24.5	12.85
Период цветения, дни	26.8	33.6	7.31	6.57	27.28	19.55
Устойчивость к аскохитозу, баллы	8.12	–	1.3	–	16.01	–
Устойчивость к фузариозу, баллы	7.32	–	1.51	–	20.63	–
Устойчивость к совке, баллы	4.25	–	1.34	–	31.53	–

Примечание. * – К – Кубанская опытная станция, А – Астраханская опытная станция.

число ветвей первого и второго порядка, высота прикрепления первого боба, вес растения с бобами, масса бобов с одного растения, число бобов, масса семян с одного растения, число семян, а также устойчивость к аскохитозу, фузариозу, совке и минирующей мухе.

Данные для всех признаков, кроме различной устойчивости, были получены на обеих опытных станциях, данные по устойчивости получены на Кубанской ОС. Из всех признаков не были найдены только ассоциации, связанные с числом семян в бобе, числом бобов и с устойчивостью к минирующей мухе.

Большинство одинаковых признаков для данных с разных опытных станций показывают относительную корреляцию друг с другом, например, длина периода «всходы–цветение» для данных Кубанской и Астраханской ОС, а также высота растения, размер листа, высота прикрепления первого боба (см. рис. 2), что говорит о том, что данные признаки с большей вероятностью

связаны с генотипом растения, а не с условиями выращивания.

Лишь немногие различные признаки показывают некоторую корреляцию друг с другом, например, высота растения и высота прикрепления первого боба, масса семян и масса бобов, что кажется очевидным. Однако некоторые одинаковые признаки, рассчитанные на разных опытных станциях, не показывают корреляции друг с другом, например, период цветения, число ветвей первого и второго порядка, вес семян и число бобов, что указывает на то, что эти признаки значительно связаны с условиями выращивания, имеющимися на разных опытных станциях. В таком случае геномные ассоциации, полученные на основе фенотипических данных с разных опытных станций, тоже могут быть различны, так как будут связаны с некоторыми внутренними биологическими процессами, запустившимися при разных условиях выращивания.

Для поиска геномных ассоциаций (GWAS) были использованы различные модели: GLM,

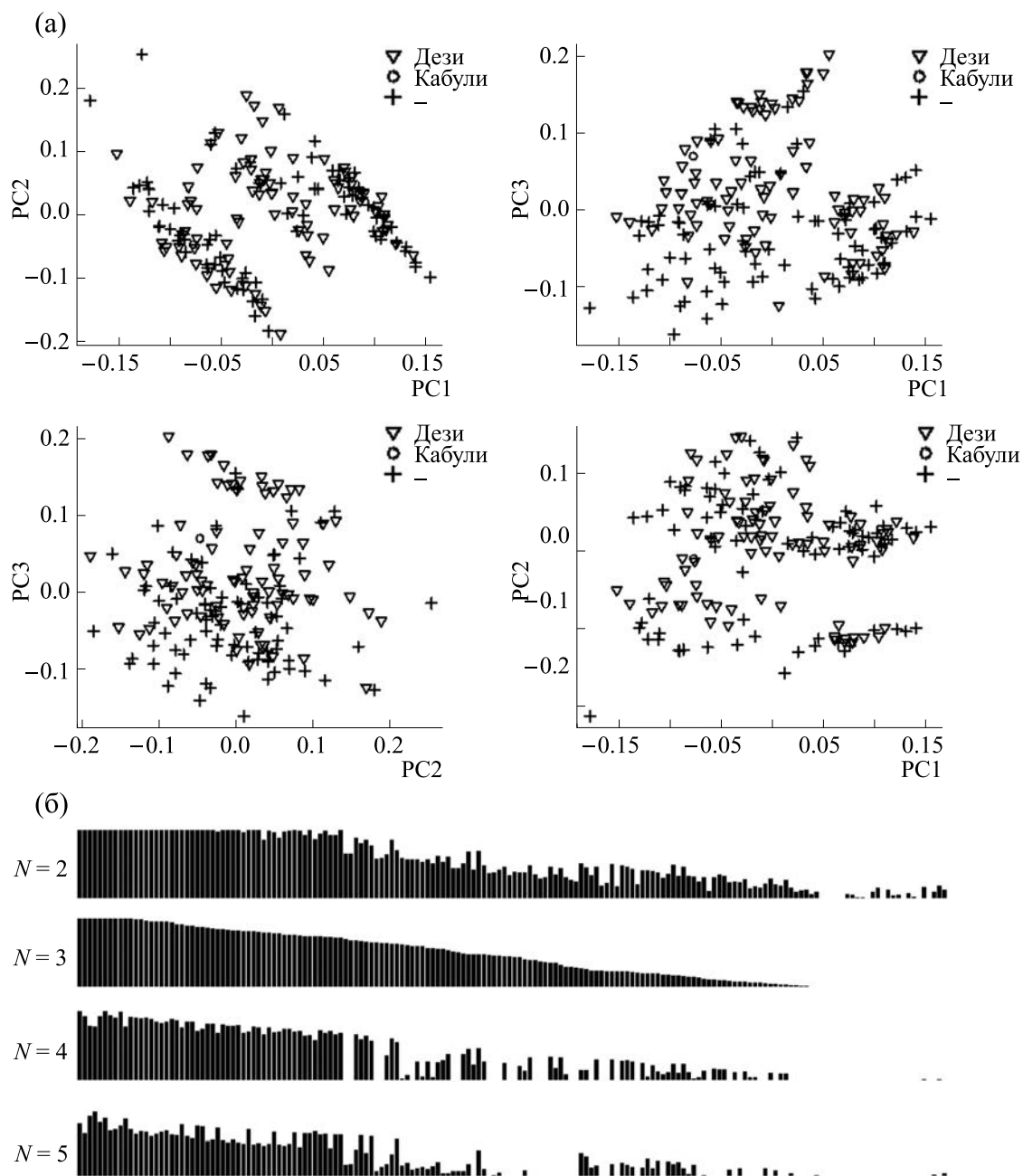


Рис. 1. (а) — Результаты анализа для 1-4 принципиальных компонент, образцы изображены в соответствии с принадлежностью к подтипу по окраске семян: desi/kabuli; (б) — результат работы ADMIXTURE для количества популяций $N=2-5$.

MLM, SUPER, FarmCPU, Blink, представленные в пакете GAPIT3 для R. В результате было найдено 160 однонуклеотидных замен (single nucleotide polymorphism, SNP), связанных с 15 различными признаками, из них 123 имеют статистически значимый аллельный эффект. 23 варианта были найдены несколькими моделями, 4 варианта из них были ассоциированы с несколькими фенотипи-

ческими признаками. В табл. 2 показаны 22 SNP, выявленные несколькими моделями, аллельный эффект которых был подтвержден. Для подтверждения аллельного эффекта каждого варианта был рассмотрен критерий Манна–Уитни между значениями фенотипических признаков у групп образцов содержащих и не содержащих альтернативный аллель (в случаях, когда альтернативный

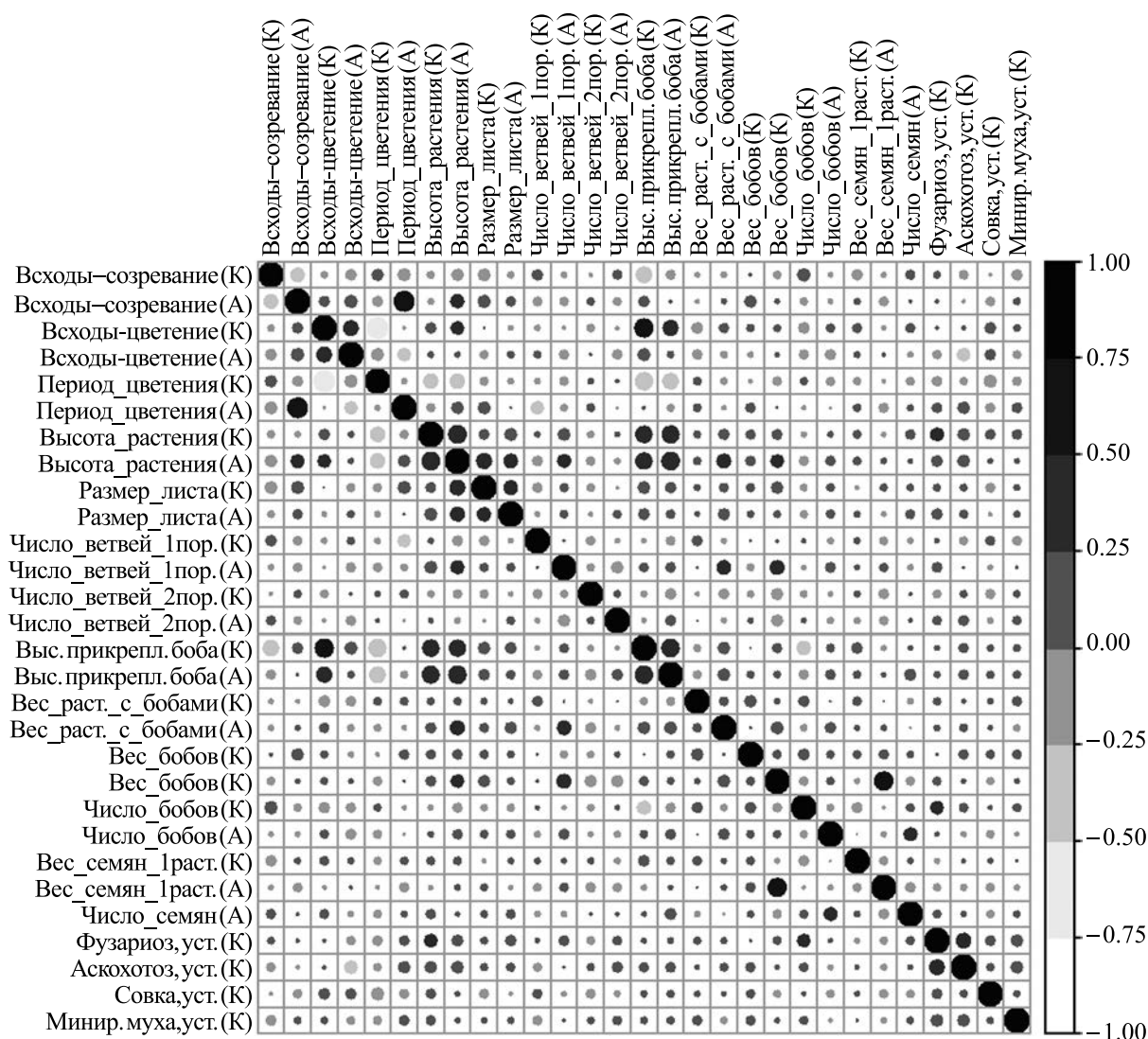


Рис. 2. Корреляция между фенотипическими признаками. (К) – Данные Кубанской опытной станции, (А) – данные Астраханской опытной станции.

аллель присутствовал у всех образцов – сравнивались фенотипические признаки между группами гетерозигот и гомозигот по альтернативному аллелю), значения p -value показаны на рис. 3.

Для рассматриваемого набора образцов наблюдается очень быстрое убывание неравновесия по сцеплению (рис. 4). Для имеющегося набора данных размер LD получается около 50 т.н., тогда как в литературе указываются величины 330 т.н. и 340 т.н. для кабули и дези соответственно. Такая разница может объясняться особенностью и качеством имеющихся у нас данных.

Нами были рассмотрены функциональные особенности генов в LD-окрестности найденных 123 ассоциаций, всего в окрестности найденных

SNP было отмечено 290 генов с различными функциями. Из 123 геномных ассоциаций 18 попали в тело известных генов, 3 из которых попали в тело одного гена, список генов приведен в табл. 3. SNP были ассоциированы с периодом «всходы–созревание», периодом цветения, высотой растения, числом ветвей 1-го и 2-го порядка, размером листа, весом растения и весом семян, а также с устойчивостью к фузариозному увяданию.

Три SNP, ассоциированные с весом семян, попали в ген, связанный с обменом жирных кислот. Варианты, ассоциированные с периодом «всходы–созревание», пересекаются с геном, кодирующим метилтрансферазу (*Ca_23694*), варианты,

Таблица 2. SNP, выявленные как значимые геномные ассоциации несколькими моделями

SNP ID	Хромо- сома	REF/ ALT	Положение в геноме	Модель	MAF	<i>p</i> -value	Эффект	Признак	Происхожде- ние данных
SCM001764.1_9199713	Ca1	A/G	9199713	FarmCPU, Blink	0.41	5.3·e-07	−0.48	Вес растения с бобами	Краснодар
SCM001764.1_18866042	Ca1	G/T	18866042	FarmCPU, Blink	0.31	7.1·e-11	−0.61	Высота растения	Краснодар
SCM001764.1_22963404	Ca1	G/A	22963404	FarmCPU, Blink	0.23	1.6·e-9	−0.49	Размер листа	Астрахань
SCM001764.1_24255799	Ca1	C/T	24255799	FarmCPU, Blink	0.26	5.1·e-07	0.61	Устойчи- вость к фузариозу	Краснодар
SCM001765.1_11031394	Ca2	T/C	11031394	FarmCPU, Blink	0.45	1.6·e-08	−0.52	Вес семян	Краснодар
SCM001765.1_11143297	Ca2	A/G	11143297	FarmCPU, Blink	0.49	1.5·e-07	2.16	Период: всходы- цветение	Краснодар
SCM001766.1_3964840	Ca3	A/G	3964840	FarmCPU, MLM, GLM, Blink	0.08	2.6·e-07	1.08	Высота прикрепле- ния боба	Краснодар
SCM001766.1_4378135	Ca3	G/C	4378135	FarmCPU, Blink	0.46	1.9·e-08	−0.76	Высота растения	Астрахань
SCM001766.1_5689101	Ca3	T/G	5689101	FarmCPU, Blink	0.06	3.8·e-08· 2.0·e-10	0.42, NA	Высота растения, высота прикрепле- ния боба	Астрахань/ Краснодар
SCM001767.1_7480193	Ca4	A/G	7480193	FarmCPU, Blink, SUPER	0.08	3.5·e-09· 5.5·e-09	−0.86, NA	Высота растения, высота прикреп- ления боба	Астрахань/ Краснодар
SCM001767.1_19608475	Ca4	A/G	19608475	FarmCPU, Blink	0.34	6.9·e-08	−0.75	Вес растения с бобами	Астрахань
SCM001767.1_28678319	Ca4	G/A	28678319	FarmCPU, Blink	0.29	3.5·e-09· 6.3·e-09	0.44, 0.69	Высота растения, высота прикрепле- ния боба	Астрахань/ Краснодар
SCM001767.1_30555335	Ca4	A/G	30555335	FarmCPU, Blink	0.32	2.5·e-09	−1.62	Число ветвей 2 порядка	Краснодар
SCM001768.1_24460834	Ca5	G/A	24460834	FarmCPU, Blink	0.31	9.4·e-08	−0.77	Вес растения с бобами	Астрахань
SCM001768.1_44202762	Ca5	C/T	44202762	FarmCPU, SUPER, Blink	0.21	6.8·e-08	0.71	Число ветвей 2 порядка	Астрахань
SCM001769.1_35831438	Ca6	A/T	35831438	FarmCPU, Blink	0.37	1.4·e-07	−0.74	Высота растения	Астрахань

Таблица 2. Окончание

SNP ID	Хромо- сома	REF/ ALT	Положение в геноме	Модель	MAF	<i>p</i> -value	Эффект	Признак	Происхоже- ние данных
SCM001770.1_25146185	Ca7	G/A	25146185	FarmCPU, Blink	0.15	1.9·e-08	0.41	Число ветвей 1 порядка	Краснодар
SCM001770.1_28975339	Ca7	G/A	28975339	FarmCPU, Blink	0.24	8.3·e-08	0.65	Число ветвей 1 порядка	Краснодар
SCM001769.1_141242	Ca6	A/T	141242	FarmCPU, Blink	0.45	9.7·e-08	−0.98	Устойчи- вость к фузариозу	Краснодар
SCM001769.1_39266797	Ca6	C/T	39266797	FarmCPU, Blink	0.49	1.0·e-07	1.31	Вес семян	Астрахань
SCM001769.1_46997240	Ca6	A/C	46997240	FarmCPU, Blink	0.48	1.0·e-07	−0.62	Вес растения с бобами	Краснодар
SCM001769.1_57993704	Ca6	G/A,C	57993704	FarmCPU, Blink	0.50	1.6·e-08 2.4·e-13	−0.02, NA	Размер листа, устойчи- вость к аскохитозу	Астрахань/ Краснодар

Примечание. Показаны средние по моделям значения *p*-value и величина эффекта (если модель его дает).

ассоциированные с периодом цветения — с геном, кодирующим гуанилилтрансферазу (*Ca_09426*), варианты, связанные с высотой растения, пересекаются с геном, кодирующим рибосомный белок (*Ca_01938*) и ДНК-праймазу (*Ca_15072*), работа этих ферментов связана с делением клеток и внутриклеточным транспортом. Тем не менее, большинство вариантов не пересекались с генами, а находились в непосредственной близости от них. В табл. 4 показаны 13 генов, находящихся вблизи четырех вариантов, выявленных несколькими моделями для нескольких фенотипических признаков в данных двух опытных станций.

В большинстве случаев функции белка, производимого с гена, оказались не охарактеризованы. Известные функции оказались связаны с обменом пектина, аденилированием, и энергетическим обменом и транспортом полисахаридов в клетках растений.

Несмотря на то, что устойчивость к грибковым заболеваниям и вредителям коррелирует друг с другом больше, чем с другими признаками (см. рис. 2), значимые для устойчивости к разным за-

болеваниям варианты расположены далеко друг от друга в геноме (см. рис. 5).

Варианты, связанные с устойчивостью к аскохитозу, оказываются вблизи генов, связанных с поражением растительными вирусами и иммунитетом (*Ca_22054*, *Ca_21959*) и фосфорным обменом (*Ca_24946*, *Ca_15816*). Варианты, ассоциированные с устойчивостью к совке, оказались вблизи генов, связанных с регуляцией транскрипции (*Ca_08447*, *Ca_08450*), а также генов, связанных с реакцией на освещенность (*Ca_14991*) и температуру (*Ca_08449*).

Нами было рассмотрено нуклеотидное разнообразие (π -разнообразие) в нашем наборе данных, а также Fst и ROD (уменьшение разнообразия) между группами местных и селекционных сортов. Среднее по окнам в 10000 п.н. нуклеотидное разнообразие для каждой хромосомы показано на рис. 6. Можно видеть, что для нашего набора данных нуклеотидное разнообразие очень мало и слабо отличается по хромосомам. Относительно меньшее разнообразие наблюдается у четвертой и восьмой хромосом.

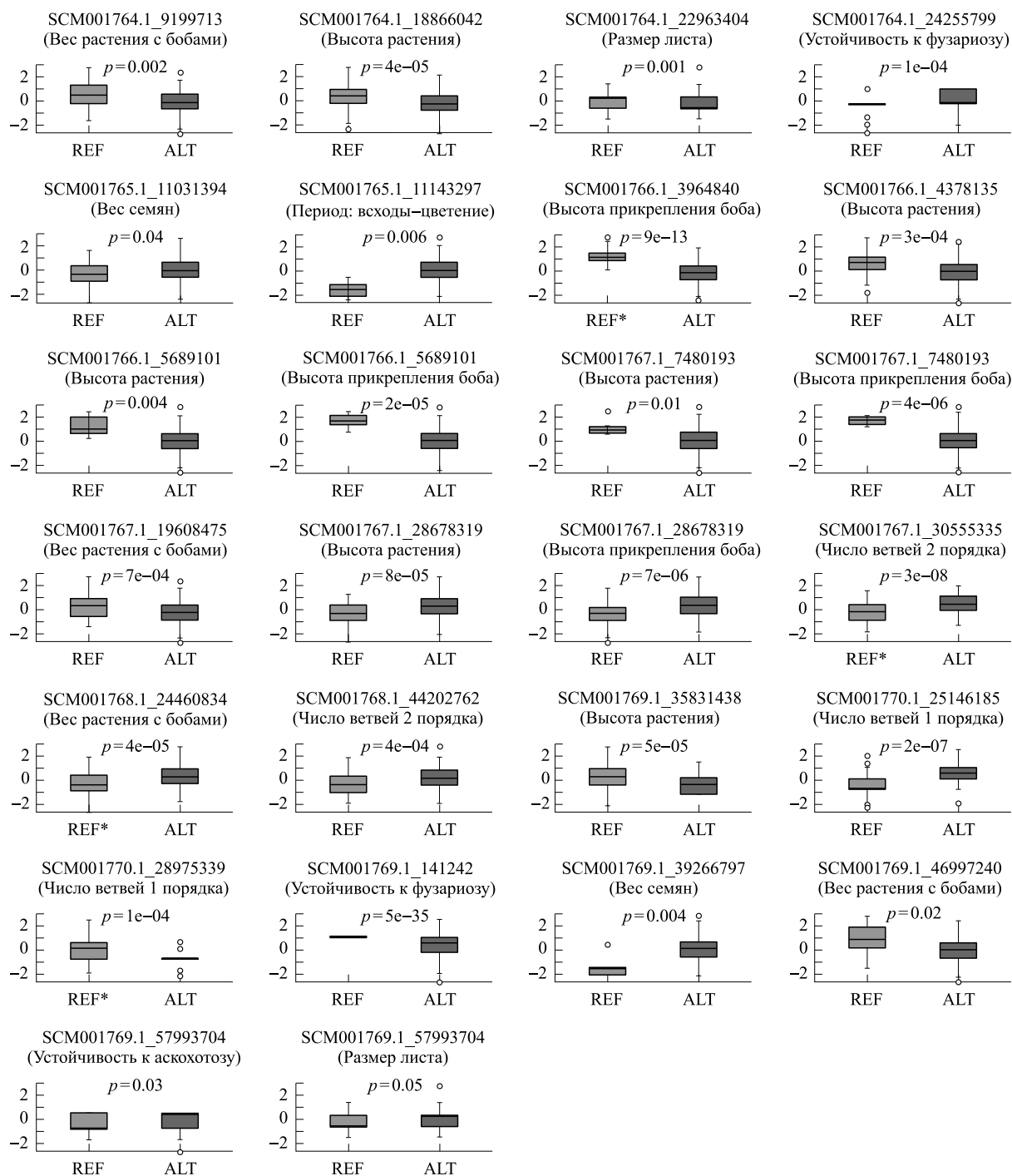


Рис. 3. Сравнение значений квантильно нормированных фенотипических данных между образцами, содержащими и не содержащими альтернативный аллель в соответствующих вариантах. REF/ALT — соответственно референсный и альтернативный аллель, REF*/ALT — генотипы 0/1 и 1/1 по альтернативному аллелю соответственно (в случаях, когда альтернативный аллель присутствует у всех образцов, дикий тип гетерозиготен).

Разнообразие по хромосомам между местными и селекционными сортами оказывается практически одинаковым, уменьшение разнообразия у селекционных сортов наблюдается лишь в неко-

торых участках, приведенных в табл. 5, пересекающихся с генами, связанными с энергетическим обменом (протеаза, полигалактуроназа, белок хлоропластов). Эти гены, вероятно, обеспечива-

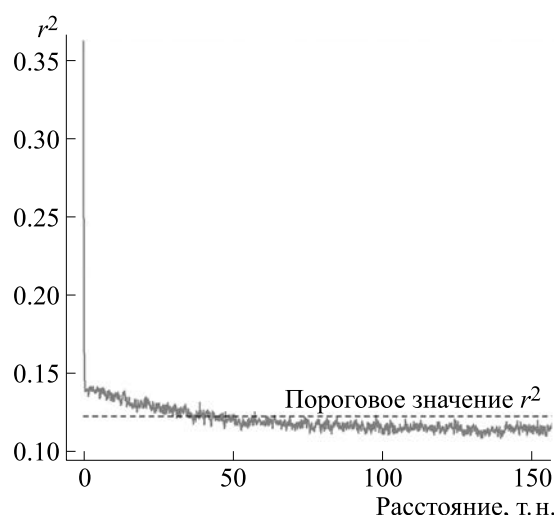


Рис. 4. Убывание неравновесия по сцеплению (linkage disequilibrium) для имеющегося набора данных нута.

ют большую продуктивность селекционных сортов.

Участки, показывающие уменьшение разнообразия среди сортов, устойчивых к грибковым заболеваниям (фузариозу и аскохитозу), также пересекаются с различными важными функциональными генами в первой-седьмой хромосомах. Для устойчивых к фузариозу образцов был выявлен 21 ген, среди которых присутствуют гены ферментов, связанных с белковым и энергетическим обменом — протеинкиназы (*Ca_14253*, *Ca_01018*), изомеразы (*Ca_07236*), гликозидазы (*Ca_04950*). Для устойчивых к аскохитозу образцов были выявлены 75 генов, среди которых гены ферментов, связанных с энергетическим и белковым обменом: регулятор роста (*Ca_06980*), протеинкиназы (*Ca_11633*, *Ca_2074*, *Ca_19214*), изомеразы (*Ca_07236*, *Ca_03117*), протеазы (*Ca_17088*), а также гены белков, связанных с повышенной устойчивостью к заболеваниям (*Ca_08433*, *Ca_05008*, *Ca_15790*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что выборка сортов оказалась не очень генетически разнообразна, что не позволило выделить среди образцов четко прослеживаемые родственные группы и изучить нуклеотидное разнообразие между ними, методы FarmCPU и Blink для поиска геномных ассоциаций показали на этих данных хорошие результаты. Для 15 различных признаков для данных с двух опытных станций было найдено 123 значимых варианта, аллельный эффект которых был статистически подтвержден, на всех восьми хромосомах при фильтрации параметров $MAF = 0.05$. В данном

случае фильтрация была необходима, так как количество образцов было сравнительно небольшим. При фильтрации соответственно исключались редкие варианты, которые могут быть ассоциированы с признаками и найдены на большей выборке.

Из 123 найденных вариантов 22 варианта были найдены несколькими моделями для одного и того же признака, и 4 варианта — найдены несколькими моделями для разных признаков (по данным обеих опытных станций). Обнаружение одних и тех же вариантов несколькими моделями увеличивает надежность полученных данных.

18 выявленных вариантов располагается внутри известных генов, 3 из которых расположены в одном гене. Эти гены связаны с различными признаками, некоторые из них имеют важное значение для скорости роста и деления клеток и для обмена жирных кислот, тем не менее, большая часть найденных вариантов либо располагалась вне известных генов, либо в генах с неизвестными функциями. Многие варианты располагаются в непосредственной близости к важным генам, а варианты, ассоциированные с устойчивостью к грибковым заболеваниям — аскохитозу и фузариозу — располагались вблизи генов, связанных с энергетическим и белковым обменом и устойчивостью к болезням.

Уменьшение нуклеотидного разнообразия у селекционных сортов по сравнению с местными сортами наблюдалось лишь в некоторых участках хромосом, связанных, вероятно, с большей продуктивностью, однако в целом нуклеотидное разнообразие в рассматриваемой выборке было мало. Отдельное рассмотрение участков уменьше-

Таблица 3. Значимые SNP, попавшие в тело известных генов

Хромосома	Положение в геноме	ID гена	Начало гена	Конец гена	Фенотипические признаки	Происхождение данных	Ортолог <i>A. thaliana</i>	Описание функций
Ca4	43512220	ID=Ca_23694; evid_id=GAR_10004833	43511982	43530939	Период: всходы-созревание	Краснодар	AT2G16910	Вероятная S-аденозилметионин-зависимая метилтрансфераза At5g38100
Ca5	24177498	ID=Ca_17652; evid_id=GAR_10010965	24157761	24181955	Период: всходы-созревание	Краснодар	AT3G13330	Гипотетический белок DVH24_038707 (ортолог – активатор протеосомы)
Ca3	8285781	ID=Ca_24378; evid_id=GAR_10006335	8282802	8301564	Период: всходы-созревание	Астрахань	—	Гомеобокс-лейциновый белок zipper PROTODERMAL FACTOR 2
Ca3	20257421	ID=Ca_09426; evid_id=GAR_10018848	20257070	20257745	Период цветения	Краснодар	—	тРНК (His) гуанилилтрансфераза 1
Ca6	52822315	ID=Ca_27699; evid_id=GAR_10001048	52822150	52822566	Период цветения	Краснодар	—	Белок LYK2
Ca1	16671522	ID=Ca_06900; evid_id=GAR_10022047	16670592	16673062	Период цветения	Астрахань	—	Укороченный фактор транскрипции CAULIFLOWER A-подобный
Ca8	1108528	ID=Ca_15072; evid_id=GAR_10007089	1107812	1110239	Высота растения	Астрахань	AT3G03150	ДНК-примаза, малая субъединица
Ca8	6085438	ID=Ca_01938; evid_id=GAR_10025825	6083232	6086628	Высота растения	Астрахань	—	40S рибосомный белок S21-2
Ca2	30921855	ID=Ca_12470; evid_id=GAR_10015200	30902774	30933225	Число ветвей 1 порядка	Краснодар	AT5G05560	Белок 6, содержащий повторы armadillo (ортолог - E3 убиквитинлигаза)
Ca3	11951992	ID=Ca_22252; evid_id=GAR_10005852	11951640	11952416	Число ветвей 1 порядка	Краснодар	—	Кальциевый унипортерный белок 2, митохондриальный
Ca6	29780621	ID=Ca_25982; evid_id=GAR_10003992	29753481	29792628	Вес семян с 1 растения	Краснодар	—	Цинковый палец, содержащий домен CCHH
Ca4	48755155; 48760624; 48767615	ID=Ca_23023; evid_id=GAR_10003504	48740176	48771978	Вес семян с 1 растения	Краснодар	AT1G75890	Муцин-3А, частичный (ортолог - GDSL-подобный белок суперсемейства липазы/ацилгидролазы)
Ca1	9199713	ID=Ca_02875; evid_id=GAR_10025740	9199030	9199943	Вес растения с бобами	Краснодар	—	Неописанный белок
Ca5	24460834	ID=Ca_15581; evid_id=GAR_10012684	24452880	24463063	Вес растения с бобами	Астрахань	AT1G07380	Синтаза слезоточивого фактора (ортолог - Нейтральная/щелочная нелизосомальная церамидаза)
Ca1	22963404	ID=Ca_22347; evid_id=GAR_10007799	22963280	22964164	Размер листа	Астрахань	—	Неописанный белок
Ca6	11454891	ID=Ca_23429; evid_id=GAR_10002517	11454538	11454915	Устойчивость к фузариозу	Краснодар	—	Альфа-подобная субъединица фактора инициации трансляции eIF-2B

Таблица 4. Гены, находящиеся вблизи SNP, выявленных несколькими моделями для данных с обеих опытных станций, ассоциированные с несколькими фенотипическими признаками

Хро-мо-сома	SNP ID	Положение	ID гена	Начало гена	Конец гена	Признаки	Ортолог <i>A. thaliana</i>	Функции гена
Ca3	SCM001766.1_5689101	5689101	ID=Ca_20649 evid_id=GAR_10006968	5671689	5676293	Высота растения, высота прикрепления боба	AT5G15800	Неописанный белок (ортолог – ТФ MADS-box, участвующий в развитии цветка)
			ID=Ca_20648 evid_id=GAR_10006967	5691039	5691242		—	Вероятная пектатлиаза 4
Ca4	SCM001767.1_7480193	7480193	ID=Ca_03488 evid_id=GAR_10024933	7454864	7460054	Высота растения, высота прикрепления боба	AT1G29220	sufE-подобный белок 1, хлоропластный/митохондриальный (ортолог – регулятор транскрипции)
			ID=Ca_03487 evid_id=GAR_10024932	7471601	7473607		AT4G16100	Неописанный белок (ортолог - белок теплового шока, предполагаемый)
			ID=Ca_03486 evid_id=GAR_10024931	7493983	7499371		AT2G47490	Полиаденилат-связывающий белок (ортолог – локализованный в хлоропластах транспортер NAD+)
Ca4	SCM001767.1_28678319	28678319	ID=Ca_26235 evid_id=GAR_10003030	28671220	28671933	Высота растения, высота прикрепления боба	—	Неописанный белок

Таблица 4. Окончание

Ca6	SCM001769.1_579 93704	57993704	ID=Ca_13640 evid_id=GAR_ 10011830	57959110	57971144	Размер листа, устойчи- вость к аскохитозу	AT3G18860	Неописанный белок (ортолог – Белок семейства трансдуцинов/белок семейства повторов WD-40)
			ID=Ca_13639 evid_id=GAR_ 10011829	57976183	57976758		AT3G18850	gag-полипротеин, частичный (орто- лог – лизофос- фатидил- ацилтрансфераза 5)
			ID=Ca_13638 evid_id=GAR_ 10011828	57986478	57987611		AT4G34320	Гипотетический белок L195_g053877, частичный (орто- лог – транс- мембранный белок, предполагаемый)
			ID=Ca_13637 evid_id=GAR_ 10011827	57991873	57992190		AT5G48490	Неописанный белок (ортолог - Бифункциональный ингибитор/белок- переносчик липидов/белок суперсемейства 2S- альбумина семенного запаса)
			ID=Ca_13636 evid_id=GAR_ 10011826	57994881	57999978		AT5G66680	Неописанный белок (ортолог – белковая субъединица олигосахарил- трансферазного комплекса)
			ID=Ca_13635 evid_id=GAR_ 10011825	58002601	58004211		AT4G36750	UDP- глизозилтрансфе- раза 1 (ортолог – белок семейства хинонредуктазы)
			ID=Ca_13634 evid_id=GAR_ 10011824	58006066	58008568		AT1G19360	Неописанный белок (ортолог – арабинозилтранс- фераза, модифицирующая белки экстенсина)

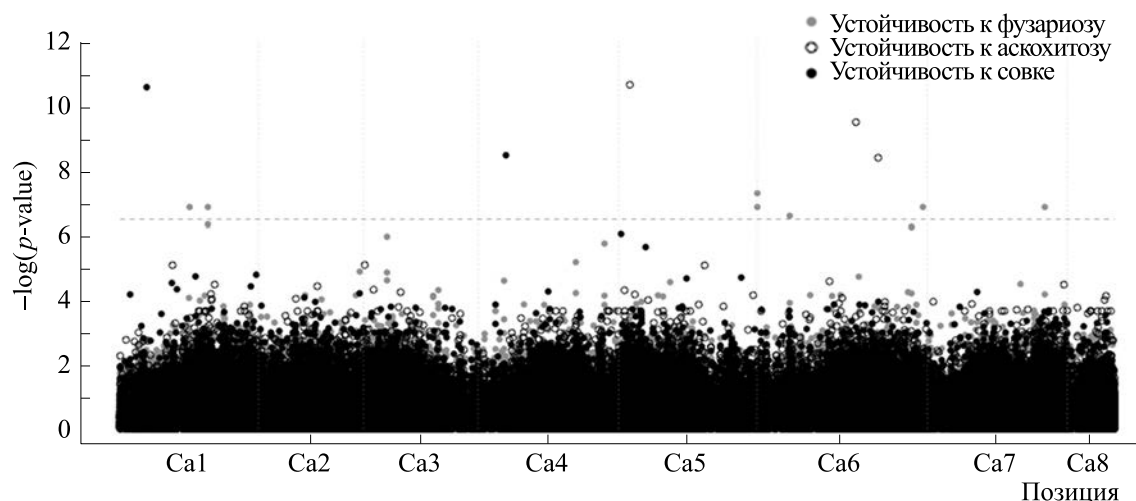


Рис. 5. Манхэттенские графики ассоциации вариантов с устойчивостью к фузариозу, аскохитозу и совке (все модели).

Таблица 5. Гены, пересекающиеся с участками, в которых у селекционных сортов наблюдается уменьшение нуклеотидного разнообразия

Хромосома	ID гена	Начало гена	Конец гена	Ортолог <i>A. thaliana</i>	Функциональное описание
Ca4	ID=Ca_13051 evid_id=GAR_10015638	39403291	39404805	—	deSI-подобный белок At4g17486
	ID=Ca_13050 evid_id=GAR_10015637	39405919	39407732	—	Этилен-чувствительный фактор транскрипции
	ID=Ca_10943 evid_id=GAR_10019818	41687794	41692786	AT4G32630	Вероятная полигалактуроназа (ортолог — ArfGal/RecO-подобный белок, содержащий домен цинкового пальца)
	ID=Ca_10942 evid_id=GAR_10019817	41698842	41704918	AT4G32620	Неописанный белок (ортолог — усилитель белка транскрипционного фактора)
Ca6	ID=Ca_25062 evid_id=GAR_10003009	11711556	11713555	—	Гомолог алкилированного белка репарации ДНК ALKBH8
Ca7	ID=Ca_09259 evid_id=GAR_10019148	12612996	12630579	AT3G50590	Цистеиновая протеаза (ортолог — трансдуцин / белок суперсемейства повторов WD40)
	ID=Ca_09225 evid_id=GAR_10019114	12956542	13028092	AT3G50380	nifU-подобный белок 1, хлоропласт (ортолог — белок, связанный с сортировкой вакуолярного белка, предполагаемый)
	ID=Ca_13788 evid_id=GAR_10013875	37043886	37046659	—	Неописанный белок
	ID=Ca_13789 evid_id=GAR_10013876	37048371	37049951	AT1G01780	Копия белка, частично (ортолог — белок семейства ТФ цинковых пальцев GATA-типа, регулирует организацию актинового цитоскелета)

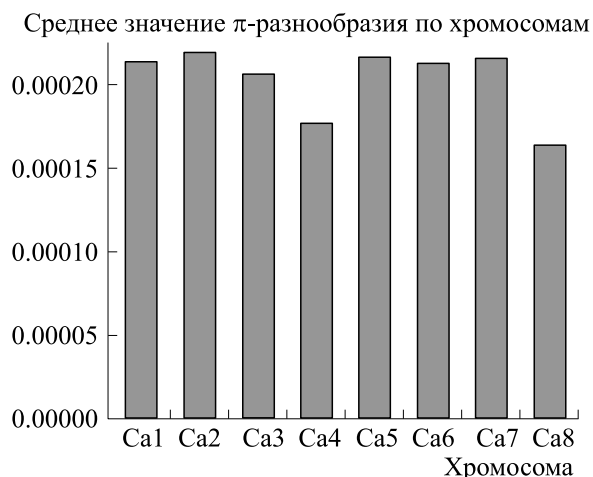


Рис. 6. Среднее по хромосомам нуклеотидное разнообразие, рассчитанное в окнах 10000 п.н..

ния нуклеотидного разнообразия для растений устойчивых и неустойчивых к грибковым заболеваниям позволило выявить в целом уменьшение нуклеотидного разнообразия в участках, пересекающихся с генами растительного иммунитета, а также с генами, связанными с белковым и фосфорным обменом. Тем не менее, применение D-статистики Таджимы не выявило участков, подтверждающих наличие направленной селекции, что указывает на слабую селекционную историю для рассматриваемых нами сортов, большая часть из которых относятся к местным формам.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Суперкомпьютерному центру «Политехнический» (<https://research.spbstu.ru/skc/>) за предоставление вычислительных мощностей для проведения исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-46-02004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. J. Redden and J. D., Berger, In *Chickpea Breeding & Management* (CABI: Wallingford, UK, 2007), pp. 1–13.
2. R. K. Varshney, M. Thudi, M. Roorkiwal, et al, *Nat. Genet.*, **51** (5), 857 (2019).
3. M. Thudi, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 38636 (2016).
4. J. Kumar and S. Abbo, *Adv. Agronomy*, **72**, 107 (2001).
5. V. V. Gursky, K. N. Kozlov, S. V. Nuzhdin, and M. G. Samsonova, *Front. Genetics*, **9**, 547 (2018)
6. U. Ch. Jha, P. Ch. Kole, and N. P. Singh, *Legume Res.*, **44** (4), 382 (2019)
7. A. Sokolkova, S. V. Bulyntsev, P.L. Chang, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3952 (2020)
8. R. K. Varshney, et al., *Nature*, **599**, 622 (2021)
9. P. J. Bradbury, Z. Zhang, D. E. Kroon, et al., *Bioinformatics* **23**, 2633 (2007)
10. Sh. Purcell, et al., *Am. J. Hum. Genet.*, **81** (3), 559 (2007)
11. X. Zheng, D. Levine, J. Shen, et al., *Bioinformatics*, **28** (24), 3326 (2012)
12. D. H. Alexander, J. Novembre, and K. Lange, *Genome Res.*, **19**, 1655 (2009)
13. J. Wang and Z. Zhang, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **19** (4), 629 (2021)
14. P. Danecek, A. Auton, G. Abecasis, et al., *Bioinformatics*, **27** (15), 2156 (2011)
15. Ch. Zhang, Sh.-Sh. Dong, J.-Y. Xu, et al., *Bioinformatics*, **35**, 1786 (2019)

Genome-Wide Association Analysis in Chickpea Landraces and Cultivars

M.A. Duk^{*, **}, A.A. Kanapin^{*}, M.P. Bankin^{*}, M.A. Vishnyakova^{*},
S.V. Bulyntsev^{***}, and M.G. Samsonova^{*}**

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

***Ioffe Institute, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

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

Chickpea (*Cicer arietinum*) is an important leguminous crop, which is widely grown especially in the Near East. In wet weather conditions, the susceptibility of chickpeas to fungal diseases such as Ascochyta blight and Fusarium blight increases. Thus, selection of disease-resistant and early-ripening varieties is critically needed. The present study was conducted to investigate genome associations in 171 samples of chickpea plants, grown in two experimental stations in Krasnodar (Kuban experimental station) and Astrakhan (Astrakhan experimental station), examine relationship between genes and 12 phenotypic traits as well as explore the association between genes and 3 hallmarks of resistance to pathogens: Fusarium blight, Ascochyta blight and Noctuidae. Variants associated with different phenotypic traits were identified using a genome-wide association study (GWAS).

Ключевые слова: genome associations, chickpea, cicer arietinum, pathogen resistance, GWAS

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ ФОТОСИНТЕЗА

© 2023 г. С.И. Зиенко*, В.Л. Жбанова*.*

*Филиал Национального исследовательского университета «МЭИ» в Смоленске,
Энергетический проезд, 1, Смоленск, 214013, Россия

#E-mail: vera-zhbanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.

После доработки 01.08.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Проведено математическое исследование флуоресценции спектра действия фотосинтеза: выполнен расчет типовых спектров фотосинтеза по шкале частот для красного и синего света, осуществлен переход спектра действия фотосинтеза от длин волн к шкале частот, в результате обратного Фурье-преобразования численным методом получена кривая релаксации импульсной (временной) характеристики флуоресценции. Оказалось, что радиус-вектор модуля импульсной характеристики в полярных координатах совершает один полуоборот или половину периода колебаний света во времени. Установлено: оптическая среда растения за время релаксации имеет отрицательный объемный заряд электронов, обладает инверсными свойствами и свойствами когерентного излучения. Условие нейтральности материальной среды не выполняется. Выявлено, что коэффициент отношения переменной флуоресценции хлорофилла для красного и синего света имеет практически одно и то же значение. Анализ зависимости добротности спектра хлорофилла от частоты показывает, что потери энергии флуоресценции в синем свете существенно превышают потери энергии в красном свете. Предложенный метод может найти применение для экспресс-анализа интенсивности фотосинтеза. Также сделан вывод, что растения могут испускать сверхширокополосные сигналы. Время релаксации флуоресценции хлорофилла меньше длительности релаксации электронной поляризации в атомах (молекулах). В результате этого в оптической среде хлорофилла создается инверсия населенностей — на верхнем энергетическом уровне находится больше атомов, чем на нижнем. За счет этого происходит вынужденное испускание и усиление света излучательной рекомбинации. При этом излучение света флуоресценции становится когерентным. Все эти свойства растений рассмотрены впервые и не описаны ни в отечественной, ни в зарубежной литературе.

Ключевые слова: фотосинтез, преобразование Фурье, флуоресценция, когерентное излучение, кривая релаксации.

DOI: 10.31857/S0006302923060078, EDN: ROOPPB

Фотосинтез — преобразование зелеными растениями и некоторыми бактериями энергии света в энергию химических связей органических веществ. Он является основным механизмом в растениях, который определяет характер и степень их роста и развития, а также является комплексным показателем физиологического состояния растений. Для характеристики фотосинтетической деятельности растений используют понятие интенсивности фотосинтеза.

Известно большое количество методов позволяющих исследовать растительные организмы. Существуют электрохимические, оптические, лазерные, радиационные и другие методы исследования состояния фотосинтеза [1–4]. Одним из наиболее эффективных является метод индущи-

рованной флуоресценции [5–7]. Эффективность данного метода характеризуется высокой чувствительностью, оперативностью, кроме того, флуоресцентные измерения не причиняют вреда исследуемым организмам и способны осуществлять неразрушающий контроль. Для этого находят интенсивность флуоресценции хлорофилла при закрытых и открытых реакционных центрах (F_m и F_0 соответственно). Затем определяют переменную флуоресценции ($F_v = F_m - F_0$) хлорофилла в клетках. На практике оценивают отношение F_v/F_m , величина которого тесно связана с первичной продуктивностью в фотосинтезе. Параметры F_v и F_m находят по результатам измерений индукционной кривой затухания флуоресценции [5–7].

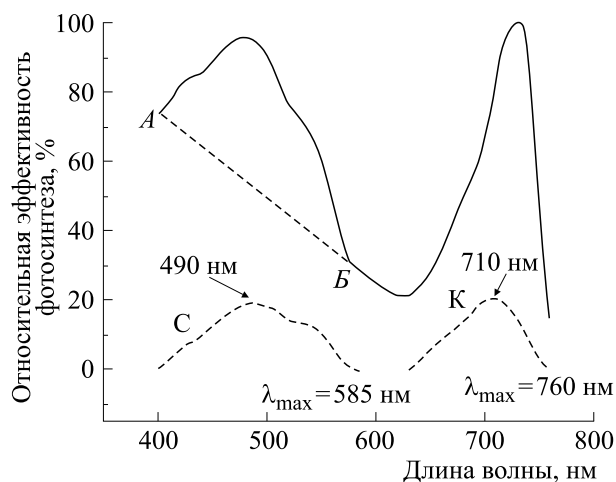


Рис. 1. Спектр относительной эффективности фотосинтеза (жирная линия). Прямая *AB* — постоянная и линейная составляющая. Кривые *C* и *K* имеют по оси ординат произвольные значения.

В данной работе, в отличие от известных публикаций [1–7], параметры флуоресценции определяют численным методом по спектру действия фотосинтеза, что заметно упрощает процедуру их определения. Под спектром действия фотосинтеза понимают зависимость интенсивности фотосинтеза от длины волны падающего света. Эта зависимость показывает при какой длине волны света наиболее эффективно протекают фотохимические реакции фотосинтеза. Спектр действия фотосинтеза по форме повторяет суммированные спектры поглощения его основных и вспомогательных пигментов [8].

Цель работы заключается в математическом исследовании флуоресценции спектра действия фотосинтеза.

В рамках цели поставлены следующие задачи:

- построение типовой кривой спектра действия по шкале частот;
- получение с помощью обратного преобразования Фурье временной зависимости релаксации флуоресценции во времени;
- расчет внешнего и внутреннего квантового выхода флуоресценции;
- аппроксимация зависимости скорости рекомбинации оптических электронов от их концентрации;
- расчет спада концентрации оптических электронов во времени и условий их перехода из возбужденного состояния в основное.

Данные вопросы в литературе практически не рассматривались. Между тем их решение имеет большое научное и практическое значение.

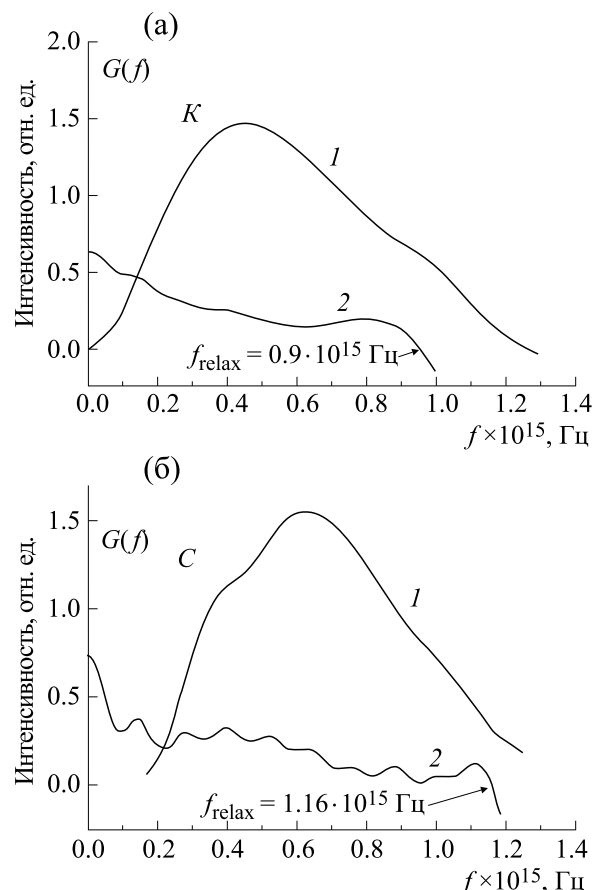


Рис. 2. Дифференциальные функции распределения (кривые *1*) спектра действия фотосинтеза для красного (а) и синего света (б) в диапазоне частот.

ПОСТРОЕНИЕ СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ ФОТОСИНТЕЗА ПО ШКАЛЕ ЧАСТОТ

Хлорофилл гораздо более эффективно поглощает красную и синюю части спектра, которые наиболее эффективны для осуществления фотосинтеза. Поэтому на графике (рис. 1) типового спектра действия присутствуют два пика в красной и синей областях [8].

Для упрощения анализа спектра из жирной кривой, изображенной на рис. 1, вычитали постоянную и линейную составляющую (прямая *AB*) фона [9]. Затем из спектра выделяли его компоненты красного (кривая *K*) и синего (кривая *C*) света.

Анализ данных проводили по шкале энергии: $E = 1240/\lambda_{\max}$, $\lambda_{\max}$ — наибольшее значение длины волны (рис. 1), E — в эВ. Вначале рассмотрим построение оси частот для кривой *K* (рис. 2а). Здесь $\lambda_{\max} = 760$ нм. Начальное значение шкалы энергии находили из соотношения: $E_0 = (1240/760) = 1.63$ эВ. Частоту находили следующим образом. Из шкалы энергии E вычитали энергию E_0 , в

Таблица 1. Параметры спектральных кривых

Свет	Площадь, отн. ед.	f_0 , Гц $\times 10^{15}$	Δf , Гц $\times 10^{15}$	H , отн. ед.	μ
Красный (К)	1.0	0.461	0.693	1.455	1.50
Синий (С)	1.0	0.623	0.675	1.565	1.08

результате получали шкалу локальной энергии $E - E_0$. Затем учитывали переход от энергии E к энергии $(E - E_0)$ с помощью коэффициента $m = E_{\pi}/(E_{\pi} - E_0)$, где $E_{\pi} = 1.74$ эВ – энергия, соответствующая пику спектральной кривой. После этого находили соотношение для расчета частоты $f = m\nu$, где $\nu = (E - E_0)/h$. Здесь $h = 4.1 \cdot 10^{-15}$ эВ – постоянная Планка. Окончательно имеем $f = (m/4.1) \cdot (E - E_0) 10^{15}$ Гц.

В расчете за единицу частоты принимали величину равную 10^{15} Гц. В нашем случае $m = 3.8$. Аналогично строили ось частот для синего света С (рис. 2б). Здесь $\lambda_{\max} = 585$ нм, $m = 1.1$, $E_0 = 1.96$ эВ, $E_{\pi} = 2.53$ эВ. Спектральные кривые I (рис. 2а,б) нормировали по площади, равной единице, т.е. выполнялось условие нормировки спектра:

$$\int_0^{\infty} G(f) df = 1, \quad (1)$$

где $G(f)$ – дифференциальная функция распределения спектра действия фотосинтеза.

Функция $G(f)$ как для красного (К), так и синего света (С) имеет сложную форму (рис. 2а,б). Разложение $G(f)$ с помощью программы Origin на элементарные составляющие в форме кривых Гаусса показывает трехкомпонентный характер поглощения света. Поэтому аналитическое описание функции $G(f)$ не представляется возможным. Параметры спектральных кривых приведены в табл. 1.

Особенностью спектра действия фотосинтеза (в частотной области) является то, что его ширина на полувысоте по величине сопоставима с пиковой (несущей) частотой. Подобным свойством обладают технические средства, предназначенные для передачи, приема и обработки информации с помощью сверхширокополосных сигналов. Основным параметром сверхширокополосного сигнала является показатель широкополосности, который определяется из соотношения [10, 11]:

$$\mu = \frac{\Delta f}{f_r} = \frac{f_{\max} - f_{\min}}{(f_{\max} + f_{\min}) / 2}, \quad (2)$$

где f_r , $f_{\min}$ и $f_{\max}$ – средняя, минимальная и максимальная частоты энергетического спектра соответственно; $\Delta f = f_{\max} - f_{\min}$ – ширина полосы частот сигнала на его полувысоте.

Сигналы с показателем $0.2 \leq \mu \leq 2.0$ называют сверхширокополосными, в английской аббревиатуре – UWB (Ultra Wideband) сигналами. При этом сверхширокополосные сигналы с $\mu = 2$ относятся к видеосигналам, с $0.1 \leq \mu \leq 0.2$ – к широкополосным и $\mu \leq 0.001$ – к узкополосным.

Основное их преимущество перед традиционными узкополосными и широкополосными сигналами – это то, что сверхширокополосные сигналы переносят в μ/μ_n раз большее количество информации (здесь μ и μ_n – показатели широкополосности сверхширокополосного и узкополосного сигналов), а также обладают более высокой разрешающей способностью. В нашем случае (табл. 1), красный свет имеет $\mu = 1.5$ и синий – $\mu = 1.08$. Следовательно, согласно принятой классификации, спектр действия фотосинтеза обладает сверхширокополосными свойствами.

ОСОБЕННОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ВИДИМОМ СВЕТЕ

Особенностью видимого диапазона света, в котором имеет место флуоресценция в растениях, являются его малые временные процессы. Например, для волны 600 нм, период колебаний равен ~ 2 фс, что соответствует фемтосекундному масштабу времени. Это отражает фактически полную реализацию возможностей оптических сигналов. Один полупериод оптического колебания – представляет собой минимальную длительность оптического импульса и один период колебаний предельную «скорость» оптического отклика материальной среды [12, 13]. Эти особенности видимого света проявляются и во временных характеристиках флуоресценции, которые протекают в фемтосекундном диапазоне времени.

Импульсную (временную) характеристику флуоресценции на этапе поглощения света находим по формуле обратного преобразования Фурье:

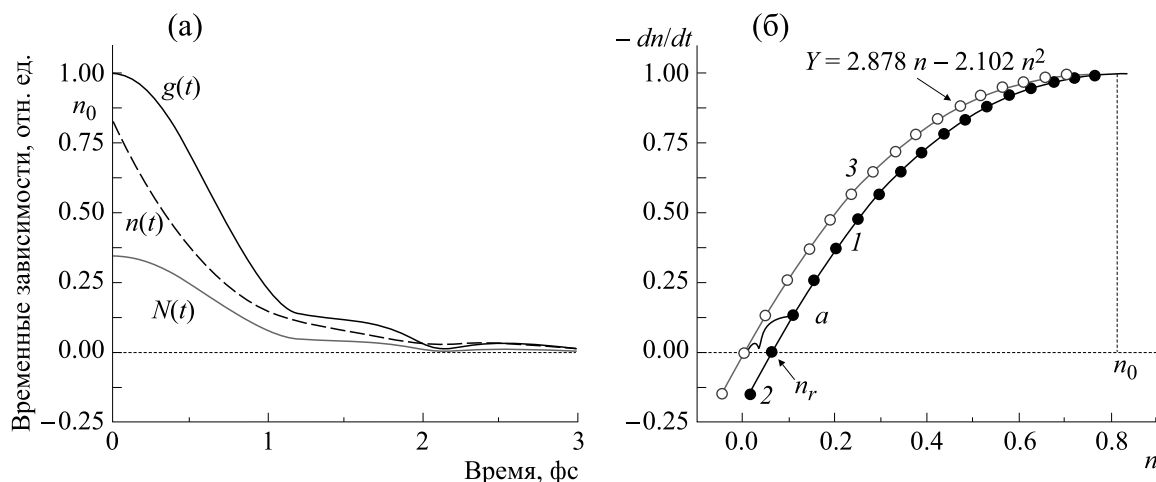


Рис. 3. (а) – Временные зависимости $n(t)$, $g(t)$ и $N(t)$ для красного света; (б) – зависимость $-dn/dt$ от концентрации электронов (1 – эксперимент, 2 – первая аппроксимация, 3 – вторая аппроксимация полиномом второй степени).

$$g^*(t) = \int_0^{\infty} G(f) \exp(-2\pi f t) df. \quad (3)$$

При $t = 0$ интеграл (3) в соответствии с условием (1) равен единице, следовательно, амплитуда флуоресценции $g^*(0) = 1$. Соотношение (3) представим в следующем виде: $g^*(t) = a + j \cdot b$.

Модуль импульсной (временной) характеристики и фазовый угол φ находятся из соотношений:

$$g(t) = (a^2 + b^2)^{1/2}, \quad \varphi = -\arctg(a/b). \quad (4)$$

Численное решение уравнения (3), с учетом графических зависимостей $G(f)$, изображенных на рис. 2а,б, представлено для красного (К) света в виде графиков модуля импульсной (временной) характеристики $g(t)$, на рис. 3а.

Подобную зависимость $g(t)$ имеет флуоресценция синего света. Длительность спада интенсивности флуоресценции в обоих случаях составляет ~ 2 фс. Фемтосекундный диапазон времени характерен для оптических систем видимого диапазона [14–17].

Для представления о длительности переходного процесса по числу периодов колебаний света выполняли решением интеграла (3) в полярной системе координат. График функции $g(\varphi)$ представлен на рис. 4. Можно видеть, что годографы для красного (К) и синего (С) света по форме практически совпадают друг с другом.

Анализ годографов (рис. 4) показывает, что неоднозначное соответствие между длиной радиус-вектора $g(\varphi)$ и углом φ имеет место в окрестности начала координат, размер которой не превышает 7% от начального значения вектора равного единице. При пренебрежении этим участком ра-

диус-вектор $g(\varphi)$ в полярной системе координат совершает один полуоборот. Во временном масштабе это соответствует половине периода колебаний света. За это время оптическая среда хлорофилла переходит из закрытого состояния в открытое.

Интенсивность флуоресценции пропорциональна числу актов рекомбинации в секунду $\sim -(dn/dt)r$, где n – концентрация электронов, захваченных ловушками оптически активных центров [18]. В этом случае $g(t) = -dn/dt$. Отсюда находим соотношение для временного изменения концентрации оптических электронов от времени:

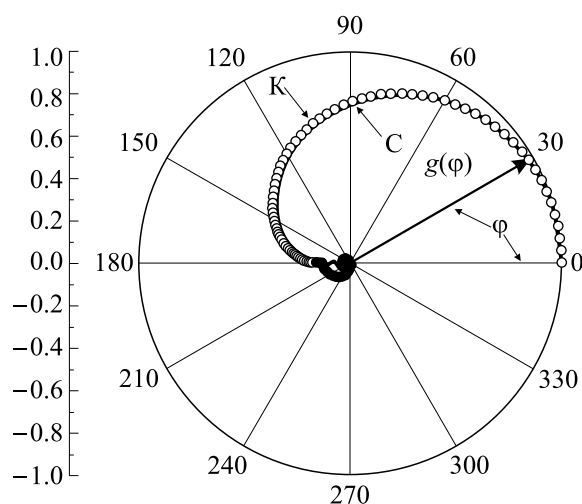


Рис. 4. Годограф импульсной (временной) характеристики флуоресценции в полярной системе координат.

Таблица 2. Параметры аппроксимации

Свет	a , 1/fs	b , 1/fs	n_0 , отн. ед.	K_n	τ_n , фс
Красный (К)	2.878	2.102	0.747	0.747	0.347
Синий (С)	1.970	0.887	0.895	0.895	0.365

$$n(t) = n_0 - \int_0^t g(t) dt, \quad (5)$$

где n_0 — концентрация оптических электронов при $t = 0$: $n_0 = \int_0^\infty g(t) dt$. Численные значения n_0 для красного (К) и синего (С) света приведены в табл. 2.

График функции (5) полученный для красного света численным методом, представлен на рис. 3а, в виде пунктирной линии. Затем исключая время из рассмотрения строили график зависимости $g(t) = -dn/dt$ от концентрации электронов n . На рис. 3б это кривая 1 (сплошная линия). Для устранения неоднородности на участке кривой 1 ниже точки «а» использовали аппроксимацию с помощью кривой 2 (жирные точки). Затем кривую 2 по оси абсцисс сдвигали на величину равную $n_r = 0.06$ фс (рис. 3б). После этого полученную кривую 3 аппроксимировали полиномом второй степени (светлые кружки):

$$g(t) = -(dn/dt) = a_n - b \cdot n^2. \quad (6)$$

Точно такая же форма (рис. 3б) имеет место и для синего света (С). Численные значения параметров a и b для этих двух случаев представлены в табл. 2.

Левую и правую часть соотношения (6) разделим на коэффициент a , в результате можно записать соотношение:

$$-\tau_n(dn/dn) = n - (b/a)n^2. \quad (7)$$

Здесь левая часть уравнения $-\tau_n(dn/dt)$ определяет число оптических электронов, участвующих в излучательной рекомбинации с испусканием кванта света. Они определяют концентрацию атомов на основном (равновесном) уровне $N(t)$. Оптическим электронам соответствует концентрация атомов на верхнем энергетическом уровне испускания $n(t)$. Следовательно, уравнение (7) можно представить так:

$$n(t) - N(t) = (b/a)n^2(t). \quad (8)$$

в формуле (8) правая часть равенства всегда имеет положительное значение, так как $n(t) \geq n(t)$ (кривая $n(t)$ всегда выше кривой линии $n(t)$, см. рис. 3а). поэтому оптическая среда растения имеет отрицательный объемный заряд электронов. условие нейтральности материальной среды не выполняется, что характерно для фемтосекундного диапазона времени. следовательно, время релаксации флуоресценции хлорофилла меньше длительности релаксации электронной поляризации в атомах (молекулах). в результате этого в оптической среде хлорофилла создается инверсия населенностей. здесь на верхнем энергетическом уровне находится больше атомов, чем на нижнем уровне. за счет вынужденного испускания происходит усиление света излучательной рекомбинации электронов и дырок флуоресценции. при этом излучение света флуоресценции становится когерентным.

ПАРАМЕТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НА ЭТАПЕ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА

Оптическую среду зеленого растения удобно представить для анализа в виде динамического звена, имеющего вход и выход. Во временной области для исследования инерционных свойств такого звена выполняют путем подачи на его вход сигналов в форме δ -функции или единичной функции $I(t)$.

Реакция звена на δ -функцию называют импульсной (временной) $g(t)$ характеристикой, а на единичную функцию $I(t)$ переходной характеристикой $h(t)$. Функции $g(t)$ и $h(t)$ связаны между собой соотношением:

$$h(t) = \int_0^t g(t) dt. \quad (9)$$

Численно величина $h(t)$ равна площади, ограниченной кривой $g(t)$ (рис. 5). Импульсная характеристика имеет размерность — число фотонов в единицу времени. Поэтому $h(\infty)$ определяет полное число поглощенных фотонов. Численное ре-

шение (9) для красного (К) и синего (С) света представлено в виде графиков $h(t)$ на рис. 5. Коэффициент передачи динамического звена находится из соотношения: $K_{\Pi} = h(\infty)$ [19]. Амплитуда флуоресценции в оптической активной среде

$$F_0 = \eta_0 \cdot I(0), \quad (10)$$

где внешний квантовый выход $\eta_0 = 1/K_{\Pi} = h(\infty)$.

Численные значения внешнего квантового выхода η_0 для красного (К) и синего (С) цвета приведены в табл. 3.

ПАРАМЕТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В АКТИВНОЙ СРЕДЕ

Внутренний квантовый выход вторичного излучения находили как: $\eta_{\text{вн}} = g_{\text{r}}(n)/g(n)$, где $g_{\text{r}}(n)$ — рекомбинационная компонента излучения. С учетом соотношения (7) находим связь $\eta_{\text{вн}}$ с концентрацией электронов n :

$$\eta_{\text{вн}} = an/(an - bn^2). \quad (11)$$

Когда $t \cong 0$, величина $n = n_0$, численное значение знаменателя в соотношении (11) равно 1 и, поэтому, $\eta_{\text{вн}} = an_0$. Следовательно,

$$F_{\text{м}} = \eta_{\text{вн}} I(0). \quad (12)$$

Численные значения $\eta_{\text{вн}}$ и $F_{\text{м}}$ для красного (К) и синего (С) света приведены в табл. 3. Из данных табл. 3 видно, что коэффициент отношения переменной флуоресценции хлорофилла $(F_{\text{м}} - F_0)/F_{\text{м}}$ для красного и синего света имеет одну и ту же величину и, следовательно, не зависит от частоты света. Это можно объяснить тем, что природа фотофизического этапа фотосинтеза в том и другом случае имеет один и тот же характер.

ЧАСТОТНЫЕ СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

По известной зависимости $g(t)$ вычисляли комплексную частотную характеристику $r^*(f)$. Для этого использовали формулу прямого преобразования Фурье:

$$r^*(f) = \int_0^{\infty} g(t) \exp(-2\pi jft) dt. \quad (13)$$

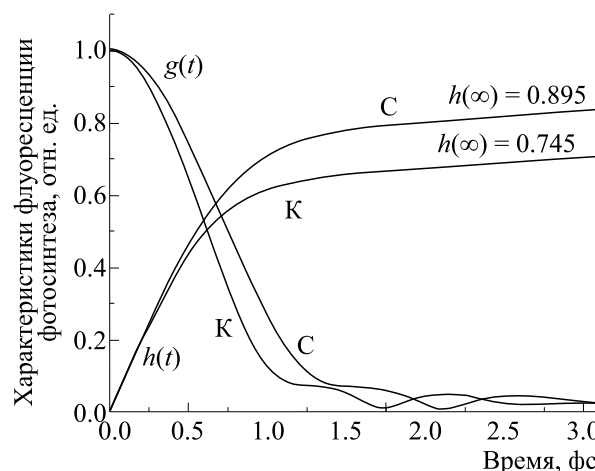


Рис. 5. Импульсные $g(t)$ и переходные $h(t)$ характеристики флуоресценции фотосинтеза.

Частотная характеристика имеет вид:

$$r^*(f) = A + j \cdot B. \quad (14)$$

Фазовый угол:

$$\phi = -\arctg(B/A).$$

Инерционные свойства люминесценции оценивали по зависимости группового времени задержки от частоты. В общем случае групповое время задержки определяется первой производной фазового спектра со знаком «минус» [20]:

$$\tau(f) = -\frac{1}{360} \frac{d\phi}{df} \quad (15)$$

Здесь фазовый угол $\phi(f)$ измеряется в угловых градусах, нормирующий множитель имеет величину 360° .

Графики группового времени задержки для красного (К) и синего (С) света в виде кривой 2 приведены на рис. 2а,б. Здесь можно наблюдать, что, с ростом частоты группового времени задержки по величине уменьшается и принимает нулевое значение, когда частота сигнала равна частоте релаксации f_{relax} (точка пересечения кривой 2 с осью абсцисс). Нулевая временная задержка означает отсутствие взаимодействия света с материальной средой растения. Это означает, что при частоте света, когда она превышает по величине частоту релаксации, электронная поляри-

Таблица 3. Значения квантового выхода и переменных флуоресценции

Свет	η_0	$\eta_{\text{вн}}$	F_0 , ф/с	$F_{\text{м}}$, ф/с	$F_v = F_{\text{м}} - F_0$, ф/с	$F_v/F_{\text{м}}$
К	1.347	2.135	1.347	2.135	0.788	0,369
С	1.127	1.763	1.127	1.763	0.636	0.359

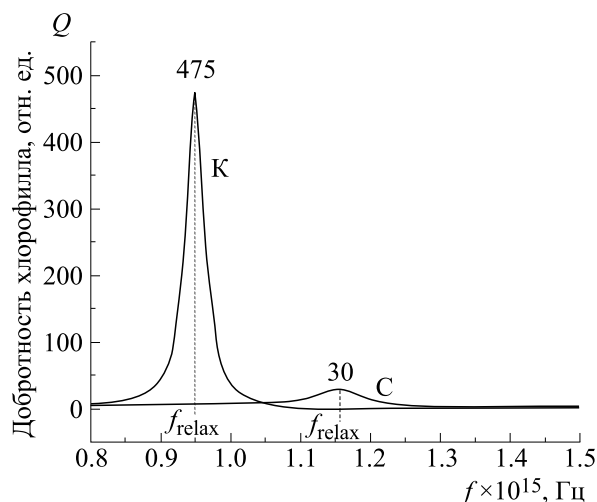


Рис. 6. Зависимость добротности хлорофилла от частоты для красного (кривая K) и синего (кривая C) света.

зация хлорофилла теряет свой отклик. На частоте релаксации заметно уменьшаются активные потери. Для сравнения красного (K) и синего (C) света по этому параметру воспользуемся понятием добротности диэлектрика $Q = B/A$. Графическая зависимость добротности Q от частоты представлена на рис. 6.

Из графика (рис. 6) видно, что пиковое значение добротности красного света превышает добротность синего света в ~ 15.8 раз. На такую же величину потери энергии в синем свете превышают потери энергии в красном свете.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выполнен расчет типовых спектров фотосинтеза по шкале частот для красного и синего света. Показатель широкополосности у них составляет 1.5 и 1.08 соответственно, и поэтому они обладают свойством сверхширокополосных сигналов.

2. Годографы импульсной (временной) характеристики для красного и синего света в полярной системе координат по форме совпадает друг с другом, и совершают всего один полуоборот. Во времени это соответствует половине периода световых колебаний.

3. Получены соотношения для расчета минимальной переменной флуоресценции F_0 , на этапе поглощения света и максимальной величины F_m в активной среде хлорофилла. Установлено, что коэффициент отношения переменной флуоресценции хлорофилла $(F_m - F_0)/F_m$ для красного и синего света имеет одну и ту же величину.

4. Анализ зависимости добротности хлорофилла от частоты показывает, что потери энергии флуоресценции в синем свете существенно превышают потери энергии в красном свете.

В результате пришли к выводу, что растения могут испускать сверхширокополосные сигналы. При этом установлено, что оптическая среда растения имеет отрицательный объемный заряд электронов. Условие нейтральности материальной среды не выполняется. Здесь на верхнем энергетическом уровне находится больше атомов, чем на нижнем уровне. За счет этого происходит вынужденное испускание и усиление света излучательной рекомбинации. При этом излучение света флуоресценции становится когерентным.

Анализ зависимости добротности хлорофилла от частоты показывает, что потери энергии флуоресценции в синем свете существенно превышают потери энергии в красном свете, что требует дальнейшего исследования этого явления.

Все эти свойства растений рассмотрены впервые и не имеют аналогов ни в отечественной, ни в зарубежной литературе.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Rubin, Photochem. Photobiol., **28** (6), 1021 (2008). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1978.tb07741.x
2. Д. И. Орехов, Г. А. Калабин и Л. М. Макальский, Вестн. РУДН, № 1. 24 (2015).
3. J. H. C. Goedheer, Annu. Rev. Plant Physiol., **23** (1), 87 (2003). DOI: 10.1146/annurev.pp.23.060172.000511
4. M. Seibert and R. R. Alfano, Biophys. J., **14** (4), 269 (1974). DOI: 10.1016/S0006-3495(74)85915-1
5. А. Б. Рубин, Соросовский образоват. журн., № 4, 7 (2000).
6. А. Б. Рубин и Т. Е. Кренделева, Успехи биол. химии, **43**, 225 (2003).
7. Е. С. Соломонова, автореферат дисс. ... канд. биол. наук (Севастополь, 2021).
8. Р. А. Карначук и И. Ф. Головацкая, Физиология растений, **45** (6), 925 (1998).
9. О. А. Букин, М. С. Пермяков, А. Ю. Майор и др., Оптика атмосферы и океана, **14** (3), 223 (2001).

10. О. В. Лазоренко и Л. В. Черногор, Радиофизика и радиоастрономия, **13** (2), 166 (2008).
11. *Ultra-wideband Radar Technology*, Ed. by J. D. Taylor (Boca Raton, CRC Press, 2000). <https://doi.org/10.1201/9781420037296>.
12. В. Г. Беспалов, С. А. Козлов, Н. В. Петров и др., *Фемтосекундная оптика и фемтотехнология* (Университет ИТМО, СПб., 2018).
13. Р. М. Архипов, М. В. Архипов, А. А. Шимко и др., Письма в ЖЭТФ, **110** (1), 9 (2019).
14. С. И. Зиенко и В. Л. Жбанова, Автометрия, **58** (2), 24 (2022). DOI: 10.15372/AUT20220204
15. S. I. Zienko and V. L. Zhbanova, J. Commun. Technol. Electronics, **67** (3), 335 (2022). DOI: 10.51368/1996-0948-2021-3-39-46
16. С. И. Зиенко и В. Л. Жбанова, Биофизика, **68** (1), 98 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923010106
17. С. И. Зиенко, В. Л. Жбанова и И. В. Якименко, Прикладная информатика, **18** (3), 61 (2023). DOI: 10.37791/2687-0649-2023-18-3-61-71
18. К. В. Шалимова, *Физика полупроводников* (Энергия, М., 1971).
19. М. П. Туманов, *Теория управления. Теория линейных систем автоматического управления: Учебное пособие* (МГИЭМ, М., 2005).
20. С. И. Баскаков, *Радиотехнические цепи и сигналы* (Высшая школа, М., 2000).

Exploring the Fluorescence Action Spectrum of Photosynthesis

S.I. Zienko* and V.L. Zhbanova*

**Smolensk Branch of National Research University "Moscow Power Engineering Institute",
Energeticheskii proezd 1, Smolensk, 214013 Russia*

The mathematical study of the fluorescence action spectrum of photosynthesis was performed. The calculation of typical spectra for photosynthesis was done for the red and blue frequencies. The transition of the action spectrum of photosynthesis from wavelengths to the frequency scale was completed. A numerical method based on the use of the inverse Fourier transform approach was used to obtain a relaxation curve for the impulse (time) characteristic of fluorescence. It turned out that the radius vector of the module of impulse response in polar coordinates makes one half-turn or half of the period of light oscillations in time. It was established that the optical medium of a plant during the relaxation time has a negative space charge of electrons, inverse properties and properties of the coherent radiation. The condition of neutrality of the material environment is not met. It was found that the ratio of the variable chlorophyll fluorescence for red and blue light has almost the same value. An analysis of the dependence of the quality factor of the chlorophyll spectrum on frequency shows that the fluorescence energy loss in blue light significantly exceeds the energy loss in red light. The proposed method can be used for express analysis of the intensity of photosynthesis. It was also concluded that plants can emit ultra-wideband signals. The relaxation time of chlorophyll fluorescence is shorter than the relaxation time of electronic polarization in atoms (molecules). As a result, a population inversion is created in the optical medium of chlorophyll - there are more atoms in the upper energy level than in the lower level. Due to this, stimulated emission and amplification of light of the radiative recombination occur. In this case, the emission of fluorescence light becomes coherent. All these properties of plants are considered for the first time and have not been described either in domestic or in foreign articles.

Keywords: photosynthesis, Fourier transform, fluorescence, coherent radiation, relaxation curve

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВ ЛИПИДОВ ЛИПОСОМ ИЗ ЛЕЦИТИНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ИХ ФОРМИРОВАНИЯ

© 2023 г. Л.Н. Шишкина*, Д.В. Парамонов**, М.А. Климович*, М.В. Козлов*

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

E-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

**Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения ФМБА РФ, Волоколамское шоссе, 75/1, Москва, 125424, Россия

Поступила в редакцию 13.09.2023 г.

После доработки 13.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Изучено влияние состава и физико-химических свойств липидов лецитина, продолжительности воздействия ультразвука и центрифугирования на состав и физико-химические свойства сформированных из лецитина липосом. Выявлено, что интенсивность перекисного окисления липидов липосом взаимосвязана обратной корреляционной зависимостью с долей фосфолипидов в составе общих липидов лецитина и прямой корреляционной зависимостью с относительным содержанием кардиолипина в составе фосфолипидов лецитина. Показано, что продолжительность озвучивания и центрифугирование вызывают стадийные изменения состава и свойств липидов липосом. При центрифугировании наблюдается уменьшение pH среды и интенсивности перекисного окисления липидов липосом. Выявлено, что стадийные изменения способности липидов липосом к окислению в зависимости от продолжительности озвучивания и центрифугирования обусловлены относительным изменением суммарной доли кислых минорных фракций в составе их фосфолипидов.

Ключевые слова: лецитин, липосомы, ультразвук, центрифугирование, фосфолипиды, перекисное окисление липидов.

DOI: 10.31857/S000630292306008X, EDN: ROQFPU

Использование поверхностно-активных свойств синтетических и природных фосфолипидов (ФЛ) для формирования липосом и исследования возможностей их применения как средств адресной доставки лекарств в организм начались еще во второй половине прошлого века [1–3]. Для получения липосом, как правило, использовали воздействие ультразвуком и центрифугирование. Однако обработка ультразвуком водных дисперсий ФЛ в кавитационном режиме приводит не только к формированию липосом диаметром менее 100 нм [4], но и вызывает инициирование и интенсификацию физико-химических процессов в системе [5]. В процессе кавитации в жидкости происходит образование, рост, пульсация и схлопывание пузырьков. Это приводит к появлению локальных высоких концентраций энергии частиц среды и температуры, обу-

словливая протекание различных процессов: инициирование химических реакций, разрыв химических связей в молекулах, образование радикалов, эрозию поверхностей и др. [4–6]. Центрифугирование также оказывает влияние как на распределение липосом по размерам, так и на состав и физико-химические свойства содержащихся в водной среде липидов [2, 7].

Для приготовления липосом наиболее активно используются яичный или соевый лецитин, представляющие собой смесь природных липидов, среди которых не менее 50% ФЛ. Как и у любых природных объектов, состав липидов разных партий лецитина чрезвычайно вариабелен [8]. Это необходимо учитывать, поскольку набор синтетических липидов и состав липидов, выделенных из печени и головного мозга лабораторных мышей, оказывают существенное влияние на физико-химические свойства и состав сформированных из них липосом [9, 10].

Целью данной работы явилось изучить влияние состава липидов лецитина, продолжительности воздействия ультразвука и последующего центрифугирования на свойства водной среды,

Сокращения: ФЛ — фосфолипиды, ФИ — фосфатидилинозит, ФС — фосфатидилсерин, ФЭ — фосфатидилэтанол-амин, КЛ — кардиолипид, ФК — фосфатидная кислота, ЛФХ — лизоформы фосфолипидов, СМ — сфинголипиды, ФХ — фосфатидилхолин, ТБК — 2-тиобарбитуровая кислота, ТБК-АП — ТБК-активные продукты, ПОЛ — перекисное окисление липидов.

состав и физико-химические свойства сформированных из лецитина липосом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления липосом использовали соевый лецитин-стандарт («БИОЛЕК», Харьков), выпускаемый в виде 10%-го раствора в этаноле в запаянных стеклянных ампулах, которые хранили в морозильной камере холодильника при -18°C . После вскрытия ампулы и удаления исходного растворителя на роторном испарителе взвешенное количество лецитина ресуспендировали в бидистиллированной воде (54.0 ± 0.5 мг/мл), аликвоту объемом 20 мл переносили в ячейку ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т и подвергали ультразвуковому воздействию в кавитационном режиме (частота ультразвука 22.00 ± 1.65 кГц, рабочая поверхность ультразвукового излучателя 3.3 см²). В процессе ультразвуковой обработки температуру в ячейке контролировали с помощью прибора BAT 100 thermometer (Physitempo Inc, США) с медь-константановой термопарой и поддерживали в пределах $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$, охлаждая ячейку водой со льдом. Удаление механических примесей, возникающих в результате эрозии ультразвукового излучателя, и липосом большого диаметра осуществляли центрифугированием дисперсии липосом на центрифугах ОПН-8 (ООО «Дастан», Киргизстан) и MPV-210 (MPV Med. Instruments, Польша) при 5000–8000 об/мин.

Качественный и количественный состав ФЛ лецитина и липосом определяли методом тонкослойной хроматографии с использованием стеклянных пластинок размером 120×90 мм и силикагеля типа Н (Sigma, США) [11]. В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформ–метанол–ледяная уксусная кислота–дистиллированная вода в соотношении 50:30:8:4. Проявление хроматограмм проводили в парах йода. Количественный анализ отдельных фракций ФЛ проводили на фотометре КФК-3 (ПО «ЗМЗ», Россия) при длине волны 800 нм по образованию фосфорно-молибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Помимо определения количественного соотношения отдельных фракций ФЛ анализировали и обобщенные показатели состава липидов: процентное содержание ФЛ (%ФЛ) в составе общих липидов и соотношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ ($\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$), характеризующее способность липидов к окислению [12]. Последнее соотношение вычисляли по формуле: $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ} = (\text{ФИ} + \text{ФС} + \text{ФЭ} + \text{КЛ} + \text{ФК})/(\text{ЛФХ} + \text{СМ} + \text{ФХ})$, где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, КЛ – кардиолипид, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы фосфолипидов, СМ – сфинголипиды, ФХ – фос-

фатидилхолин. При определении состава ФЛ для каждой пробы на пластинку наносили не менее четырех параллельных дорожек.

Содержание диеновых конъюгатов и кетодиенов определяли из соотношения оптической плотности ультрафиолетовых спектров растворов лецитина в гексане в областях 228–232 нм (полоса поглощения, характерная для соединений с сопряженными двойными связями) и 268–272 нм (полоса поглощения, характерная для С=О-содержащих соединений) к 202–205 нм (полоса поглощения, используемая для определения общего содержания липидов в растворе) [8]. Ультрафиолетовые спектры регистрировали на спектрофотометре UV-3101 PC (Shimadzu, Япония). Содержание вторичных продуктов окисления в водных дисперсиях лецитина, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, ТБК-АП), определяли спектрофотометрически при 532 нм (КФЕ-3, Россия) по методу, описанному в работе [13], и относили к 1 мг липидов.

Для определения рН использовали прибор «Экотест-120» (Россия). Содержание механических примесей после воздействия ультразвука (бидистиллированная вода, объем 20 мл) анализировали гравиметрически.

Результаты обрабатывали стандартными методами вариационной статистики и с помощью компьютерного пакета программ KINS [14]. Для оценки результатов использовали стандартные методы статистического анализа: критерий корреляции Пирсона, тест ранговой корреляции Спирмена, к рассмотрению принимали корреляции с уровнем достоверности p менее 0.02. В таблицах и на рисунках результаты представлены в виде среднеарифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы явилось изучение влияния физико-химических свойств и состава липидов лецитина на показатели сформированных из него липосом. Продолжительность озвучивания в этих экспериментах составляла 20 мин, после чего проводили центрифугирование. Были использованы четыре партии лецитина, которые различались как количественным соотношением фракций ФЛ, так и величинами обобщенных показателей состава липидов и степени их окисленности. Это следует из данных, представленных в табл. 1 и 2.

Лецитин партии 4 специально подвергали окислению, для чего вскрытую ампулу выдерживали несколько дней в холодильнике. Поскольку именно ФЛ являются основным субстратом окисления в любых биологических объектах, то доля ФЛ в составе общих липидов лецитина этой

Таблица 1. Количественное соотношение фракций фосфолипидов в использованных в работе партиях лецитина

Фракции фосфолипидов	Относительное содержание фракции (%P)			
	Партия 1 (<i>n</i> = 5)	Партия 2 (<i>n</i> = 5)	Партия 3 (<i>n</i> = 5)	Партия 4 (<i>n</i> = 4)
ЛФХ	4.07 ± 0.38	3.47 ± 0.22	3.93 ± 0.11	10.95 ± 0.65
СМ	3.80 ± 0.30	3.17 ± 0.08	3.78 ± 0.37	10.7 ± 0.9
ФХ	87.7 ± 1.1	90.0 ± 0.2	86.0 ± 1.0	69.7 ± 1.7
ФИ + ФС	0.23 ± 0.05	0.55 ± 0.03	0.55 ± 0.08	2.40 ± 0.70
ФЭ	2.84 ± 0.51	2.10 ± 0.18	3.40 ± 0.53	2.73 ± 0.29
КЛ + ФК	1.35 ± 0.25	0.71 ± 0.05	2.31 ± 0.23	3.60 ± 0.80

Примечание. *n* – Количество хроматографических дорожек.

Таблица 2. Доля фосфолипидов в составе общих липидов (%ФЛ), способность липидов к окислению (ΣЛОФЛ/ΣТОФЛ), содержание продуктов окисления в партиях лецитина, использованных для формирования липосом

Показатель	Партия 1	Партия 2	Партия 3	Партия 4
%ФЛ	57.8 ± 3.6 (<i>n</i> = 7)	79.3 ± 1.7 (<i>n</i> = 7)	52.5 ± 4.5 (<i>n</i> = 6)	25.8 ± 1.6 (<i>n</i> = 7)
ΣЛОФЛ/ΣТОФЛ, отн. ед.	0.0462 ± 0.0044 (<i>n</i> = 5)	0.0348 ± 0.0013 (<i>n</i> = 5)	0.067 ± 0.0045 (<i>n</i> = 5)	0.0307 ± 0.0023 (<i>n</i> = 5)
Содержание диеновых конъюгатов, отн. ед.	0.0219	0.061	0.113	0.527
Содержание кетодиенов, отн. ед.	0.0084	0.020	0.045	0.161
[ТБК-АП], нмоль/мг	–	0.209 ± 0.005 (<i>n</i> = 3)	0.197 ± 0.006 (<i>n</i> = 3)	6.20 ± 0.11 (<i>n</i> = 3)

Примечание. *n* – Число измерений.

партии существенно уменьшилась, а содержание продуктов окисления резко возросло по сравнению с аналогичными показателями в партиях нативного лецитина (табл. 2).

Количественное соотношение фракций ФЛ, обобщенные показатели состава и содержание продуктов окисления в липидах липосом, сформированных из этих четырех партий лецитина, представлены в табл. 3 и 4. Сравнительный анализ данных, представленных в табл. 1–4, свидетельствует как о различиях, так и сложном характере взаимосвязей между физико-химическими характеристиками и составом липидов лецитина и аналогичными показателями сформированных из него липосом. Однако применение разработанных ранее программных модулей для многофакторного анализа экспериментальных данных [15] позволило выявить определенные закономерности.

В сложных биологических системах интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) обычно оценивают по содержанию ТБК-активных продуктов. Необходимо отметить, что в липидах липосом интенсивность ПОЛ выше, чем в липидах исходного лецитина. Только при формировании липосом из окисленного лецитина интенсивность ПОЛ немного ниже, чем в исходном лецитине (табл. 2 и 4). При этом, несмотря на то что ФЛ являются основными субстратами ПОЛ, обнаружена обратная корреляция между содержанием ТБК-активных продуктов в липидах липосом и долей ФЛ в партии лецитина, которую использовали для их формирования (рис. 1). Однако оказалось, что интенсивность ПОЛ в дисперсии липосом обусловлена относительным содержанием КЛ в составе ФЛ соответствующей партии лецитина (рис. 2). Очевидно, это связано с тем, что КЛ является не только одной из наиболее легкоокисляемых фракций ФЛ, но и обладает

Таблица 3. Количественное соотношение фракций фосфолипидов в липидах липосом, сформированных из разных партий лецитина

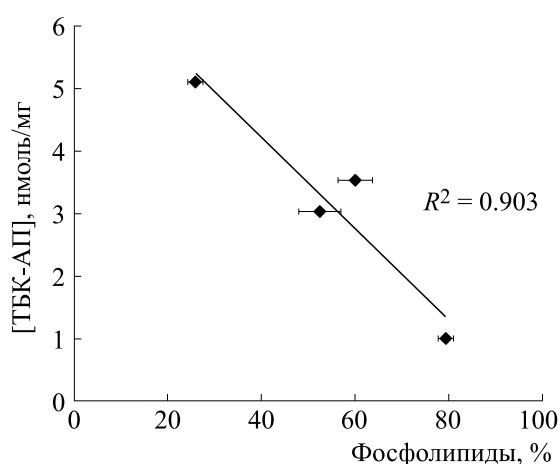
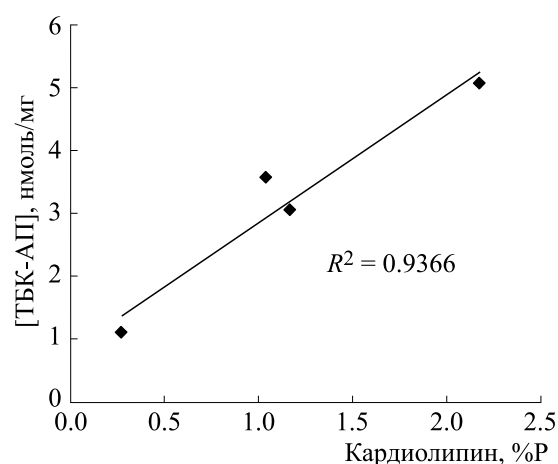
Фракции фосфолипидов	Относительное содержание фракции (%Р) из партии лецитина			
	Партия 1 (<i>n</i> = 4)	Партия 2 (<i>n</i> = 4)	Партия 3 (<i>n</i> = 7)	Партия 4 (<i>n</i> = 4)
ЛФХ	3.74 ± 0.21	5.75 ± 0.30	0.93 ± 0.30	3.62 ± 0.14
СМ	3.59 ± 0.67	2.62 ± 0.42	2.95 ± 0.75	5.65 ± 0.55
ФХ	83.8 ± 0.65	86.75 ± 1.20	93.15 ± 1.20	86.1 ± 1.1
ФИ+ФС	2.00 ± 0.12	1.43 ± 0.10	2.11 ± 0.20	0.50 ± 0.02
ФЭ	2.59 ± 0.25	2.67 ± 0.10	—	0.58 ± 0.29
КЛ+ФК	5.90 ± 0.60	0.80 ± 0.46	0.87 ± 0.22	3.55 ± 0.70

Примечание. **n* – Количество хроматографических дорожек.

Таблица 4. Доля фосфолипидов в составе общих липидов (%ФЛ), способность липидов к окислению (ΣЛОФЛ/ΣТОФЛ), содержание продуктов окисления в липосомах, сформированных из разных партий лецитина

Показатель	Партия 1	Партия 2	Партия 3	Партия 4
%ФЛ	43.4 ± 3.4 (<i>n</i> = 4)	85.5 ± 4.1 (<i>n</i> = 5)	40.9 ± 2.9 (<i>n</i> = 9)	62.6 ± 8.7 (<i>n</i> = 4)
ΣЛОФЛ/ΣТОФЛ, отн. ед.	0.0856 ± 0.0051 (<i>n</i> = 5)	0.0515 ± 0.0036 (<i>n</i> = 5)	0.0307 ± 0.0023 (<i>n</i> = 5)	0.0488 ± 0.0061 (<i>n</i> = 5)
[ТБК-АП], нмоль/мг	3.54 ± 0.11 (<i>n</i> = 3)	1.09 ± 0.03 (<i>n</i> = 3)	3.025 ± 0.09 (<i>n</i> = 3)	5.10 ± 0.11 (<i>n</i> = 3)

Примечание. *n* – Количество хроматографических дорожек.


Рис. 1. Взаимосвязь между содержанием ТБК-активных продуктов в липидах липосом и долей фосфолипидов в составе общих липидов в партиях лецитина, из которых их формировали.

Рис. 2. Взаимосвязь между содержанием ТБК-активных продуктов в липидах липосом и относительным содержанием кардиолипина в фосфолипидах разных партий лецитина.

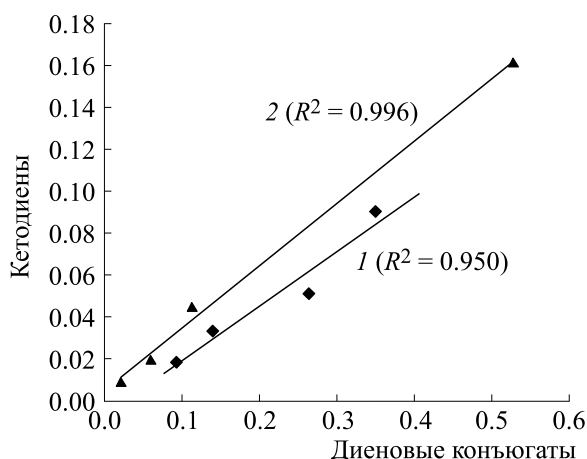


Рис. 3. Зависимость между содержанием кетодиенов и диеновых конъюгатов в липидах разных партий лецитина (1) и сформированных из них липосом (2).

сигнальными функциями, что обуславливает участие этой минорной фракции ФЛ в регуляции метаболизма в различных биологических системах [16, 17].

Ранее было показано [18], что одной из наиболее устойчивых взаимосвязей в физико-химической системе регуляции ПОЛ в биологических объектах к норме и при облучении является прямая корреляция между содержанием кетодиенов и диеновых конъюгатов. Выявлено, что и в исходных партиях лецитина, и в липидах сформированных из них липосом такая закономерность сохраняется, однако график взаимосвязи между содержанием кетодиенов и диеновых конъюгатов в липидах липосом сдвигается вправо по оси абсцисс, а коэффициент линейной регрессии b этой взаимосвязи на 15.5% меньше, чем в липидах лецитина (рис. 3). Это свидетельствует об уменьшении способности липидов к окислению на мембранном уровне, что соответствует данным, представленным в табл. 2 и 4.

Вторым этапом работы явилось изучение продолжительности воздействия ультразвука и последующего центрифугирования на состав и физико-химические свойства липидов липосом. Эти эксперименты проводили на партии 1 лецитина. Точкам $t = 0$ мин соответствуют результаты анализа показателей липидов, выделенных после отгонки исходного растворителя и ресуспендирования липидов лецитина в бидистиллированной воде до и после центрифугирования раствора. Поскольку при работе ультразвукового дезинтегратора в режиме кавитации происходит образование механических примесей, то определяли динамику их содержания при работе УЗДН-2Т в бидистиллированной воде в зависимости от времени озвучивания. Выявлен линейный рост содержания примесей спустя 2.6 мин озвучива-

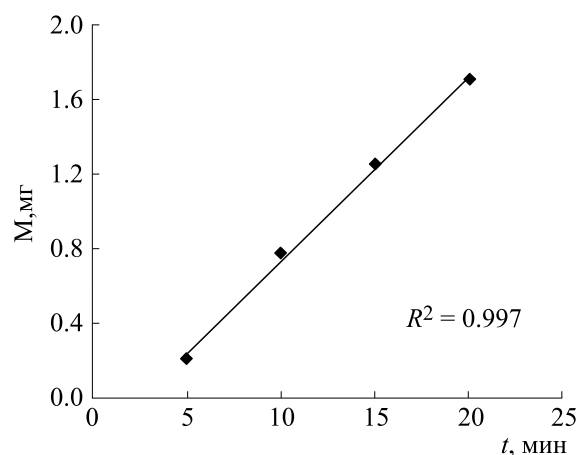


Рис. 4. Влияние времени озвучивания на содержание механических примесей в воде.

ния (рис. 4). Возможно, это тоже оказывает влияние на свойства среды и параметры липидов.

Обнаружено, что влияние времени озвучивания и последующего центрифугирования имеет сложный стадийный характер, что следует из данных, представленных в табл. 5. Так, минимальные значения рН среды выявлены при времени озвучивания 5 мин, а максимальные — при озвучивании в течение 15 мин. При этом центрифугирование вызывает увеличение кислотности среды при всех сроках воздействия ультразвука по сравнению с аналогичными значениями до центрифугирования. Центрифугирование после воздействия ультразвука в течение 5 и 10 мин вызывает резкий рост доли ФЛ в составе общих липидов липосом, однако увеличение времени озвучивания приводит к существенному уменьшению %ФЛ по сравнению с их содержанием в липидах как лецитина (табл. 2), так и после их ресуспендирования в водной среде в обоих вариантах экспериментов (табл. 5). Интенсивность ПОЛ также стадийно изменяется в зависимости от времени озвучивания, однако более активно процессы ПОЛ протекают в нецентрифугированной среде (табл. 5).

При воздействии ультразвука в течение 5 и 10 мин способность липидов липосом к окислению существенно выше до центрифугирования, а при увеличении времени воздействия ультразвука после центрифугирования. Это соответствует изменениям в количественном соотношении фракций ФЛ в составе общих липидов сформированных липосом. Так, доля основной фракции ФЛ в составе липидов липосом ФХ, являющегося одной из наиболее трудноокисляемых фракций, уменьшается после центрифугирования и растет в нецентрифугированных образцах при увеличении времени воздействия ультразвука (рис. 5). Необходимо отметить также, что изменения

Таблица 5. Влияние времени озвучивания и центрифугирования на величины pH среды, содержание ТБК-активных продуктов, долю фосфолипидов (%ФЛ) в составе общих липидов липосом и их способность к окислению ($\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$)

Показатель	0 мин	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин
До центрифугирования					
pH	6.15	6.10	6.15	6.38	6.15
[ТБК-АП], нмоль/мг	1.77 ± 0.05 (n = 3)	4.78 ± 0.14 (n = 3)	5.04 ± 0.15 (n = 3)	3.015 ± 0.09 (n = 3)	5.635 ± 0.17 (n = 3)
%ФЛ	70.7 ± 2.4 (n = 5)	66.75 ± 6.0 (n = 5)	58.0 ± 3.5 (n = 6)	31.5 ± 2.0 (n = 6)	42.65 ± 2.3 (n = 4)
$\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$, отн. ед.	0.090 ± 0.006 (n = 5)	0.1163 ± 0.0069 (n = 5)	0.0686 ± 0.0060 (n = 5)	0.0267 ± 0.0037 (n = 5)	0.0363 ± 0.0034 (n = 5)
После центрифугирования					
pH	5.94	5.67	5.95	6.07	5.91
[ТБК-АП], нмоль/мг	2.22 ± 0.07 (n = 3)	3.32 ± 0.1 (n = 3)	2.85 ± 0.08 (n = 3)	1.86 ± 0.06 (n = 3)	3.54 ± 0.11 (n = 3)
%ФЛ	57.6 ± 3.9 (n = 6)	100	93.75 ± 7.70 (n = 4)	34.7 ± 1.6 (n = 7)	43.4 ± 3.4 (n = 5)
$\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$, отн. Ед	0.0584 ± 0.0025 (n = 5)	0.0478 ± 0.0028 (n = 5)	0.0623 ± 0.0035 (n = 5)	0.1269 ± 0.0132 (n = 5)	0.0856 ± 0.0051 (n = 5)

суммарной доли минорных фракций ФЛ (ФИ + ФС + КЛ + ФК), выполняющих сигнальные функции в биологических системах [16, 17, 19] и являющихся более легкоокисляемыми

фракциями ФЛ, наоборот увеличивается после центрифугирования и уменьшается до центрифугирования с увеличением времени воздействия ультразвука (рис. 6).

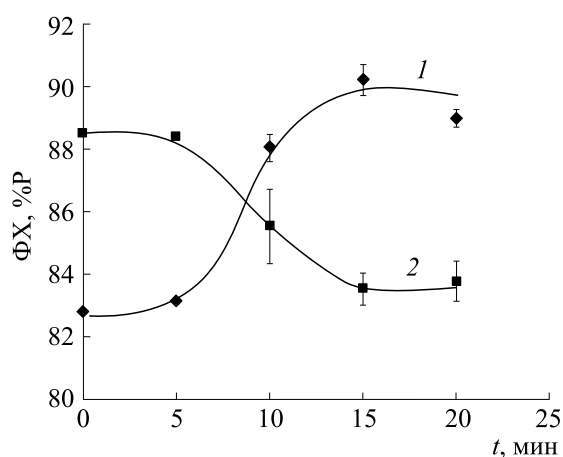


Рис. 5. Динамика относительного содержания фосфатидилхолина в составе фосфолипидов липосом до (1) и после (2) центрифугирования в зависимости от продолжительности воздействия ультразвука.

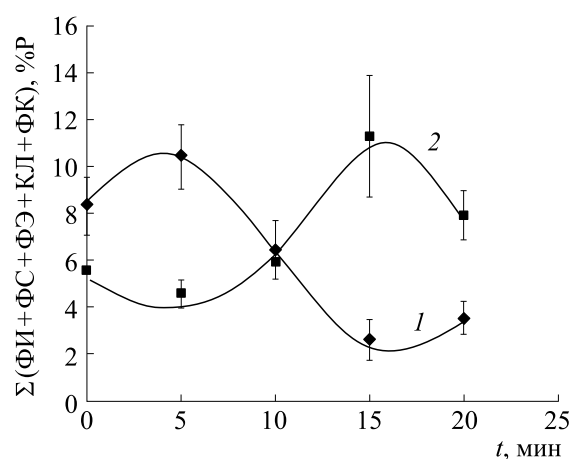


Рис. 6. Динамика суммарной доли минорных фракций (ФИ + ФС + КЛ + ФУ) в составе фосфолипидов липосом до (1) и после (2) центрифугирования в зависимости от продолжительности воздействия ультразвука.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что состав и физико-химические свойства липидов лецитина, а также продолжительность воздействия ультразвука и центрифугирование обуславливают состав и физико-химические свойства сформированных из него липосом. Интенсивность процессов ПОЛ, т.е. содержание ТБК-активных продуктов, в липосомах выше, чем в исходном лецитине, и находится в обратной корреляции от доли ФЛ в составе общих липидов и в прямой корреляционной зависимости от относительного содержания кардиолипина в ФЛ партии лецитина, использованной для приготовления липосом. Продолжительность озвучивания и центрифугирование вызывают существенные изменения как в соотношении фракций ФЛ, содержании ТБК-активных продуктов и способности липидов липосом к окислению, так и pH водной дисперсии липосом. Это соответствует и данным литературы о влиянии центрифугирования на состав и физико-химические свойства липидсодержащих сред [7]. Выявлено, что центрифугирование уменьшает величины pH и интенсивность ПОЛ в липосомах, что связано с изменениями состава липидов. Показано, что стадийные изменения способности липидов липосом к окислению в зависимости от продолжительности озвучивания и центрифугирования обусловлены изменениями суммарной доли таких минорных фракций в составе их ФЛ, как ФИ + ФС + КЛ + ФК.

Следовательно, при анализе биологической активности липосом из лецитина необходимо учитывать, что даже незначительные колебания в содержании минорных фракций в составе ФЛ, обладающих сигнальными функциями и активно участвующих в регуляции процессов в биологических системах, в липидах лецитина оказывают существенное влияние на состав и физико-химические свойства сформированных из него липосом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

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. Л. Б. Марголис и Л. Д. Бергельсон, *Липосомы и их взаимодействие с клетками* (Наука, М., 1986).
2. G. Gregoriadis, *Liposome Technology. Vol. 1: Preparation of Liposomes* (CRC Press, Floryda, 1989).
3. G. Gregoriadis, *Liposome Technology. Vol. 3: Targeted Drug Delivery and Biological Interaction* (CRC Press, Boston, 1990).
4. Ю. Н. Левчук и З. Н. Воловик, *Биофизика*, **28** (2), 266 (1983).
5. *Ultrasound: Its Chemical, Physical and Biological Effects*, Vol. XIII, Ed. by K.S. Suslick (New York: Weinheim, 1988).
6. М. А. Маргулис, *Успехи физ. наук*, 170. 263 (2003).
7. В. А. Меньшов, Л. Н. Шишкина, Е. Б. Бурлакова и др., *Прикл. биохимия и микробиология*, **29** (3), 412 (1993).
8. К. М. Маракулина, Р. В. Крамор, Ю. К. Луканина и др., *Журн. физ. химии*, **90** (2), 182 (2016).
9. М. А. Klimovich, L. N. Shishkina, D. V. Paramonov, and V. I. Trofimov, *Oxid. Commun.*, 33 (4), 965 (2010).
10. M. Mosca, A. Ceglie, and L. Ambrosone, *Chemistry and Physics of Lipoids*, **164** (2), 158 (2011).
11. *Биологические мембраны: Методы*, под ред. Дж. Б. С. Финдлея и В. Х. Эванза (Мир, М., 1990).
12. Л. Г. Шишкина, Е. В. Кушнирева и М. А. Смотряева, *Радиац. биология. Радиоэкология*, **44** (3), 289 (2004).
13. T. Asakawa and S. Matsushita, *Lipids*, **15**, 137 (1980).
14. Э. Ф. Брин и С. О. Травин, *Хим. физика*, **10** (6), 830 (1991).
15. М. В. Козлов, *Дисс. ... канд. биол. наук* (Москва, 2008).
16. В. А. Стручков и Н. Б. Стражевская, *Биохимия*, **65** (5), 620 (2000).
17. Р. Геннис, *Биомембраны: Молекулярная структура и функции* (Мир, М., 1997).
18. Л. Н. Шишкина, М. А. Климович и М. В. Козлов, *Биофизика*, **59** (2), 380 (2014).
19. R. Lordan, A. Tsoupras, and I. Zabetakis, *Molecules*, **22** (11), 1964 (2017). DOI: 10/3390/molecules22111964

Physicochemical Properties and Composition of the Liposome Lipids from Lecithin Depending on Conditions that Lead to the Formation of Liposome Lipids

L.N. Shishkina*, D.V. Paramonov**, M.A. Klimovich*, and M.V. Kozlov*

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

***State Scientific Research Institute of Biological Engineering, Volokolamskoe shosse 75/1, Moscow, 125424 Russia*

The effects of the composition and physicochemical properties of lecithin lipids, ultrasound exposure and centrifugation time on the composition and physicochemical properties of liposomes formed from lecithin were studied. It was found that the intensity of lipid peroxidation of liposomes is interrelated by the reversal correlation with the phospholipids share in the total lipid composition of lecithin and the direct correlation with the relative content of cardiolipin in the lecithin phospholipid composition. It was shown that ultrasound exposure and centrifugation produce stage changes in the composition and properties of the liposome lipids. Decreases in the levels of medium pH and the intensity of lipid peroxidation of liposomes were observed under centrifugal conditions. It was found that the stage changes in the ability of liposome lipids for oxidation depending on the time of ultrasound exposure and centrifugation are due to the relative changes in the sum share of the acid minor fractions in the composition of their phospholipids.

Keywords: lecithin, liposomes, ultrasound, centrifugation, phospholipids, lipid peroxidation

СНИЖЕНИЕ ФОНОВОЙ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ГИПОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ НАРУШЕНИЕМ ИХ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ОТВЕТА НА АКТИВАТОРЫ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА

© 2023 г. В.В. Новиков*,#, Е.В. Яблокова*, И.А. Шаев*, Н.И. Новикова**, Е.Е. Фесенко*

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

#E-mail: dostag@mail.ru

**Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, просп. Науки, 6, Пущино Московской области, 142290, Россия

Поступила в редакцию 30.08.2023 г.

После доработки 03.09.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Показано, что снижение фоновой продукции активных форм кислорода в перитонеальных нейтрофилах мышей после кратковременного (40 минут) пребывания в гипоманнитных условиях (остаточное поле ~ 10 нТл) при физиологических температурах, выявляемое методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции, не сопровождается нарушением хемилюминесцентного ответа на активаторы респираторного взрыва: формилированный пептид N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) и форболовый эфир форбол-12-меристат-13-ацетата (ФМА). Эти результаты получены методами активированной хемилюминесценции с использованием люцигенина и люминола и различных комбинаций применения активаторов продукции активных форм кислорода (форбол-12-меристат-13-ацетат и/или N-formyl-Met-Leu-Phe). Проведенное исследование, в совокупности с ранее полученными результатами, позволяет исключить системы, контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах, из числа основных мишеней и акцепторов, реагирующих на кратковременную депривацию магнитного поля.

Ключевые слова: гипоманнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, люцигенин, люминол, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302923060091, EDN: RORBZG

Гипоманнитное поле относится к биологически активным физическим факторам, и биофизические механизмы его действия нуждаются в детальном изучении [1–5]. Ранее мы показали, что в результате пребывания нейтрофилов в ослабленном (в ~2500 раз) с помощью системы магнитных экранов геомагнитном поле фоновая продукция активных форм кислорода (АФК) в них существенно снижалась [6]. Эти результаты были получены методами флуоресцентной спектроскопии с использованием проникающих в клетку флуоресцентных зондов (дихлордигидрофлуоресцеина-диацетата и дигидрородиамина 123), а также методом хемилюминесцентного анализа с

использованием люцигенина [7], активатора хемилюминесценции, относительно селективного для супероксидного радикала [8]. При добавке малых концентраций (<1 мкМ) активаторов респираторного взрыва, формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата (ФМА), в случае детекции флуоресцентным методом этот эффект гипоманнитного поля сохранялся, но по величине соответствовал эффектам, полученным в опытах без этих активаторов [6]. На основании этих результатов было сложно сделать выводы об основных источниках АФК, реагирующих на изменение магнитных условий. Далее с использованием ингибиторного анализа в опытах на неактивированных нейтрофилах было показано, что добавка динитрофенола — разобщителя окисления и фосфорилирования в мито-

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, fMLF — N-formyl-Met-Leu-Phe, ФМА — форбол-12-меристат-13-ацетат.

хондриях — практически полностью нивелирует различия в продукции АФК между контрольными (геомагнитное поле) и опытными (гипомагнитное поле) группами, в отличие от дифенилгидония — неспецифического ингибитора НАДФН-оксидазы, добавка которого приводила к снижению продукции АФК в обоих случаях и сохранению различий между контролем и опытом [7]. Также на величину эффекта гипомагнитного поля влияла добавка ротенона (ингибитора комплекса I ЭТС в митохондриях) [9]. Все эти результаты в большей степени свидетельствовали о роли митохондрий, а не НАДФН-оксидазы в эффектах ослабленного геомагнитного поля. В связи с этим для более полного анализа эффектов гипомагнитного поля в данной работе были проведены специальные эксперименты, чтобы определить, как пребывание в гипомагнитном поле влияет на хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на введение активаторов респираторного взрыва.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Действие гипомагнитного поля проверяли на способность осуществлять преактивацию (прайминг)/деактивацию нейтрофилов. Для проверки этого действия суспензию нейтрофилов предварительно инкубировали на протяжении 40 мин в гипомагнитных условиях, затем к ней добавляли активатор хемилюминесценции (люминол или люцигенин) и один из активаторов респираторного взрыва (формилированный пептид fMLF или другой активатор генерации АФК, форболовый эфир ФМА). Также проверяли варианты совместного использования этих двух активаторов продукции АФК, о чем будет сказано ниже.

Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения перитонеальных нейтрофилов использованы лабораторные мыши-самцы линии Balb/c массой 24–26 г, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). Для выполнения измерений в рамках одного экспериментального дня использовали суспензию нейтрофилов, полученную из одной мыши. Выделение клеток проводили в день проведения измерений. Для получения клеток в перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 16 ч животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, их брюшную полость промывали 3 мл охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 1 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли не менее чем на 1 ч при 4°C. Эта процедура позволяла снизить спонтанную хе-

милюминесценцию нейтрофилов и перевести эти клетки в «одинаковое» состояние, характеризующееся их равномерным хемилюминесцентным ответом, что обеспечивало возможность стабильной работы с ними в течение экспериментального дня. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%.

Для выполнения экспериментов суспензию нейтрофилов разводили модифицированной средой Хенкса (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5.5 mM глюкозы, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл. Образцы объемом 0.25 мл помещали в круглодонные кюветы из полистирола ($d = 1.2$ см, $l = 5.5$ см), в которых в дальнейшем проводили измерение хемилюминесценции. Нейтрофилы инкубировали при $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 40 мин. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного водного термостата УН 4 (MLW, Германия).

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними (также одновременно проводилась последующая регистрация хемилюминесценции контрольных и экспериментальных образцов). В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура — установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления геомагнитного поля — до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 10 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [10]. Установка состояла из трех, вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм) и была снабжена внутри специальным индуктором (соленоидом) для проведения размагничивания системы и подачи в случае необходимости слабого постоянного тока для формирования постоянного магнитного поля заданной величины. Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее 6).

После инкубации нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции полученных образцов при добавке в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0.35 мМ. В суспензию нейтрофилов помимо люминола был добавлен активатор генерации АФК — хемотаксический формилированный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкМ. В разных вариантах опытов были использованы и другие концентрации fMLF. Для регистрации хемилюминесценции был использован 12-канальный хемилюминесцентный Lum-1200 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа результатов использована программа PowerGraph.

В части опытов вместо fMLF был добавлен другой активатор генерации АФК — форболовый эфир форбол-12-меристат-13-ацетат (Sigma, США) в низких концентрациях (5 или 20 нМ).

В другой части опытов была использована схема двойной последовательной стимуляции нейтрофилов [11]. Для этого до начала инкубации в гипомагнитном поле в суспензию клеток был добавлен активатор генерации АФК — ФМА в концентрации 5 нМ, а после окончания инкубации хемилюминесцентный ответ регистрировали в ответ на введение люминола и пептида fMLF. В этом случае на первом этапе опытов нейтрофилы стимулировали ФМА, агентом с внутриклеточным механизмом действия (имитирующим диацилглицерол и напрямую активирующим мембранную протеинкиназу С [12]), а на втором этапе (при регистрации хемилюминесценции) проводили основную стимуляцию fMLF, агентом с внеклеточным механизмом действия (осуществляющим передачу сигнала через рецепторы fMLP [13]). Такая двойная стимуляция приводила к более полному ответу нейтрофилов на эти стимулы и, следовательно, к возможности повышения чувствительности использованного метода [11].

Наряду с люминол-зависимой хемилюминесценцией регистрировали люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов для определения спонтанной продукции АФК, а также при использовании активаторов АФК. Для этого после инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечных концентрациях 0.2 или 0.4 мМ. Следует отметить, что в ряде случаев дополнительную стимуляцию активаторами продукции АФК (ФМА или fMLF) не проводили, то есть в этих опытах определяли фоновую продукцию супероксидного анион-радикала в нейтрофилах. В других вариантах опытов были использованы fMLF и/или ФМА в тех же концентрациях и последовательности, что и ранее, при проведении опы-

тов и регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции.

Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента. Значения интенсивности люминесценции соответствовали световому потоку, т.е. количеству фотонов в единицу времени: 1 вольт (В) соответствовал ≈ 1000 фотонов/сек. Часть результатов представлена для наглядности в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После инкубации суспензии нейтрофилов в течение 40 мин в гипомагнитных условиях регистрируется существенное снижение (примерно на 30%) хемилюминесцентного сигнала на введение 0.4 мМ люцигенина (табл. 1, рис. 1), что согласуется с данными предыдущих работ [7, 14]. Введение активатора продукции АФК — 1 мкМ fMLF — приводит к существенному (двукратному) росту амплитуды сигнала люцигенин-зависимой хемилюминесценции и нивелирует различия между контрольными и опытными образцами (табл. 1, рис. 2). Также не проявляются различия при инкубации нейтрофилов в присутствии 5 нМ ФМА и последующем введении 0.2 мМ люцигенина (табл. 1, рис. 3), и в опытах с двойной последовательной стимуляцией 5 нМ ФМА и 1 мкМ fMLF (табл. 1, рис. 4). Таким образом, эти эксперименты, проведенные методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции, в совокупности показывают, что реакция систем нейтрофилов по продукции супероксида на введение активаторов респираторного взрыва после кратковременного пребывания в гипомагнитных условиях полностью сохраняется.

Хемилюминесцентный ответ на введение 0.35 мМ люминола у нейтрофилов после 40 мин пребывания в гипомагнитном поле не изменяется (табл. 1, рис. 5). Также не выявлено достоверных отличий в реакции на введение 2 мкМ fMLF в присутствии люминола (табл. 1, рис. 6), в опытах с двойной последовательной стимуляцией (табл. 1, рис. 7) и в реакции на ФМА (табл. 1, рис. 8). Таким образом, эксперименты, проведенные методом люминол-зависимой хемилюминесценции, дополнительно к опытам с люцигенином, показывают, что продукция и других АФК (перекиси водорода, гипохлорита), помимо супероксида, не нарушается в ответ на активаторы респираторного взрыва после кратковременного пребывания нейтрофилов в гипомагнитных условиях. Единственным выявленным значительным эффектом гипомагнитного поля является снижение фоновой продукции супероксида, регистрируемое в опытах с люцигенином без активаторов продукции АФК.

Таблица 1. Значения максимальной интенсивности хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» магнитного поля

№	Методика определения хемилюминесценции, (соответствие рисункам)	Интенсивность хемилюминесценции V , %		
		Контроль	Опыт	p
1	Люцигенин 0.4 мМ (рис. 1)	3.41 ± 0.36 ($100 \pm 10.5\%$)	2.40 ± 0.16 ($70.4 \pm 4.7\%$)	0.00029
2	Люцигенин 0.4 мМ, fMLF 1 мкМ (рис. 2)	6.37 ± 0.68 ($100 \pm 10.6\%$)	6.05 ± 0.51 ($95.0 \pm 8.0\%$)	0.41921
3	Люцигенин 0.2 мМ, ФМА 5 нМ в пробе (рис. 3)	8.65 ± 1.60 ($100 \pm 18.5\%$)	10.94 ± 3.44 ($126.5 \pm 39.8\%$)	0.20986
4	Люцигенин 0.2 мМ, fMLF 1 мкМ, ФМА 5 нМ в пробе (рис. 4)	13.31 ± 2.69 ($100 \pm 20.2\%$)	14.40 ± 4.00 ($108.2 \pm 30.1\%$)	0.62516
5	Люминол 0.35 мМ (рис. 5)	2.49 ± 0.22 ($100 \pm 9.00\%$)	2.41 ± 0.34 ($96.8 \pm 13.7\%$)	0.66769
6.1	Люминол, fMLF 2 мкМ (рис. 6)	7.80 ± 1.59 ($100 \pm 20.4\%$)	6.78 ± 1.31 ($86.9 \pm 16.8\%$)	0.29786
6.2	Люминол, fMLF 2 мкМ, повторный опыт	6.69 ± 0.89 ($100 \pm 13.4\%$)	6.78 ± 1.31 ($101.4 \pm 19.6\%$)	0.90230
7.1	Люминол, fMLF 2 мкМ, ФМА 20 нМ в пробе (рис. 7)	9.89 ± 0.64 ($100 \pm 6.51\%$)	8.48 ± 1.40 ($85.7 \pm 14.1\%$)	0.07258
7.2	Люминол, fMLF 2 мкМ, ФМА 20 нМ в пробе, повторный опыт	9.73 ± 0.64 ($100 \pm 6.51\%$)	10.29 ± 0.85 ($85.7 \pm 14.1\%$)	0.23412
8.1	Люминол, ФМА 20 нМ добавлен при регистрации ХЛ* (рис. 8)	6.70 ± 0.23 ($100 \pm 3.39\%$)	6.50 ± 0.13 ($97.0 \pm 1.9\%$)	0.12049
8.2	Люминол, ФМА 20 нМ добавлен при регистрации ХЛ** (рис. 8)	6.70 ± 0.34 ($100 \pm 5.09\%$)	6.43 ± 0.24 ($96.0 \pm 3.6\%$)	0.37415

Примечание. Количество экспериментов $n = 6$; * — приведены средние максимальные значения по 20 точкам из кинетических кривых, ** — приведены максимальные значения в 1 точке из кинетических кривых.

При анализе полученных результатов следует учесть, что в нейтрофилах имеется несколько источников АФК, в том числе электрон-транспортная цепь митохондрий и системы респираторного взрыва [15, 16]. При этом метод флуоресцентной спектроскопии, примененный нами ранее для исследования эффекта гипомангнитного поля [6], ввиду особенностей используемых зондов (после превращения в активный флуоресцирующий продукт они теряют способность проходить через мембраны) и протокола выполнения процедур

(отмывка красителя) позволяет определить концентрации АФК исключительно внутриклеточной локализации [6]. В то же время метод люминол-зависимой хемилюминесценции фиксирует совокупный пул АФК, поскольку ввиду способности АФК перераспределяться между внутри- и внеклеточным пулами определение места происхождения этих метаболитов данным методом является нетривиальной задачей. Тем не менее, в опытах на нейтрофилах было показано, что примерно за половину свечения отвечают сами клет-

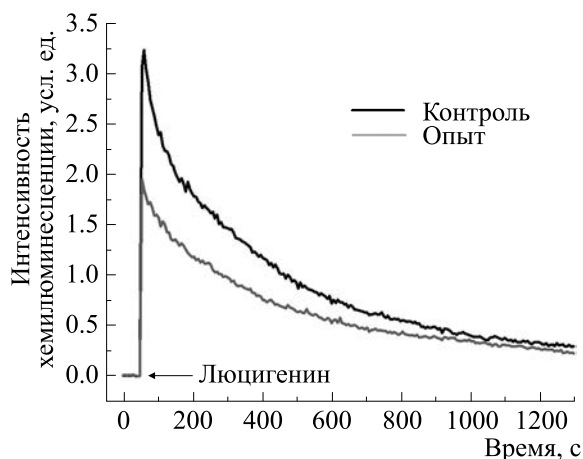


Рис. 1. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.4 мМ люцигенина после действия «нулевого» магнитного поля.

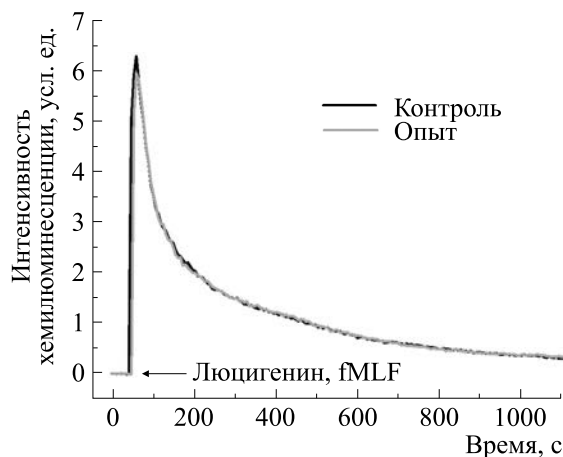


Рис. 2. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.4 мМ люцигенина и 1 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля.

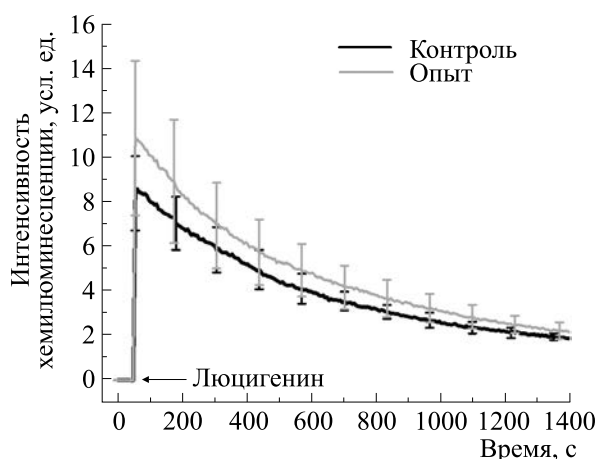


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.2 мМ люцигенина после действия «нулевого» магнитного поля в присутствии 5 нМ ФМА.

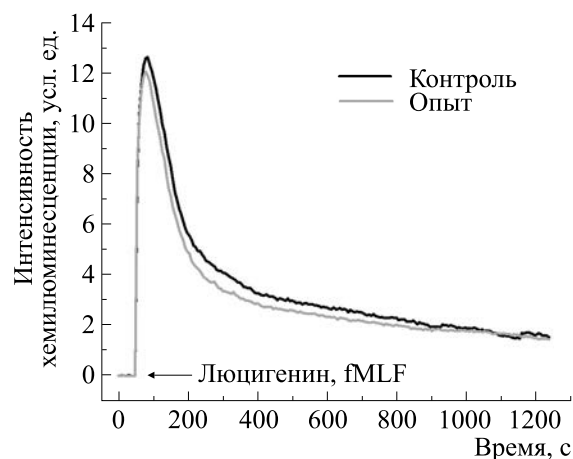


Рис. 4. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.2 мМ люцигенина и 1 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля в присутствии 5 нМ ФМА.

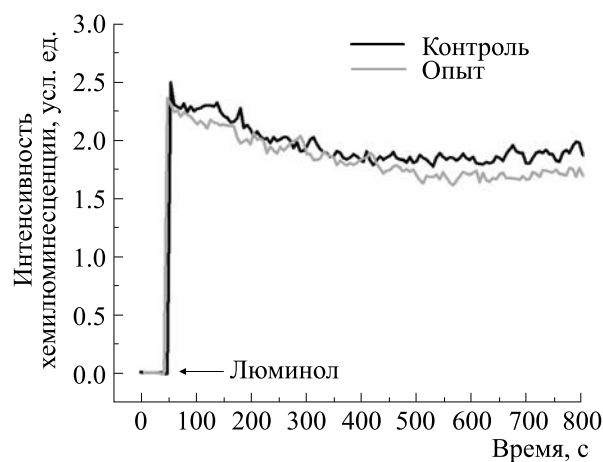


Рис. 5. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола после действия «нулевого» магнитного поля.

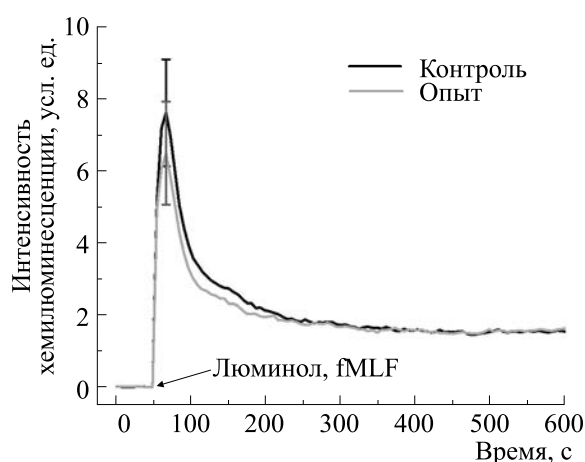


Рис. 6. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола и 2 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля.

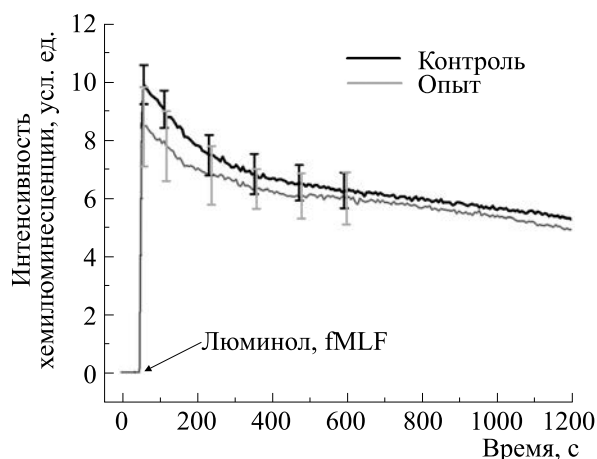


Рис. 7. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола и 2 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля в присутствии 20 нМ ФМА.

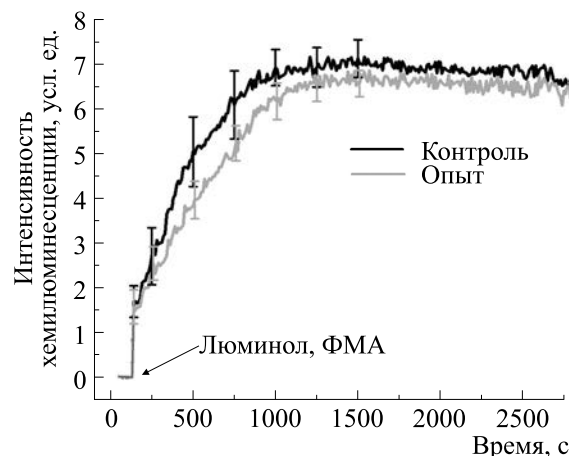


Рис. 8. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола и 20 нМ ФМА после действия «нулевого» магнитного поля.

ки (этот сигнал тушат проникающие через мембраны дитиотреитол и N-ацетилцистеин), а другая половина формируется вне клеток и полностью блокируется непроникающим восстановленным глутатионом [17]. С учетом этого можно предположить, что люминол-зависимая хемилюминесценция не фиксирует изменений АФК гипомангнитной этиологии ввиду затухивания искомого сигнала, имеющего скорее всего внутриклеточное происхождение, на фоне общего свечения. Такого же результата, возможно, следует ожидать и от изолюминола, так как пространственная изомерия аминогруппы фталатного кольца в этом соединении определяет его большую гидрофильность и меньшую способность к преодолению биомембран [18].

При респираторном взрыве нейтрофилы могут генерировать АФК как внутриклеточно, так и внеклеточно, в зависимости от локализации сборки оксидазы, которая, в свою очередь, зависит от природы стимула [18]. Было показано, что при стимуляции нейтрофилов fMLF запускалось внеклеточное высвобождение АФК, при этом продукция внутриклеточных АФК обнаружена не была [19]. Ввиду этого тот факт, что магнитная депривация не отражается на продукции АФК при респираторном взрыве (при регистрации методом активированной хемилюминесценции), может быть объяснен доминированием сигнала от внеклеточных АФК, системы генерации которых невосприимчивы к действию «нулевого» поля. Таким образом, системы генерации активных форм преимущественно во внутриклеточном компартменте характеризуются чувствительностью к магнитной депривации [6] (данные ингибиторного анализа свидетельствуют, что в числе этих систем важную роль играют митохондриаль-

ные электрон-транспортные цепи [7, 9]), в отличие от систем, продуцирующих АФК во внеклеточное пространство при активации нейтрофилов хемоаттрактантами. Следует отметить, что сама активация не устраняет гипомангнитный эффект, поскольку он обнаруживается флуоресцентным методом и в случае стимулированных нейтрофилов [6].

В свете полученных данных с учетом использованных методов регистрации продукции АФК можно сделать вывод о наличии минорной компоненты АФК внутриклеточного происхождения, модулируемой воздействием «нулевого» поля и связанной, в том числе, с функцией митохондриального аппарата, и основной, за которую отвечают системы респираторного взрыва, не испытывающей влияния депривационного фактора. Это позволяет более уверенно исключить системы, контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах, из числа основных мишеней и акцепторов, реагирующих на магнитное экранирование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей» Основным документом, регламентирующим проведение настоящего исследования, являлось «Руководство по работе с лабора-

торными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. N. Binhi and F. S. Prato, PLoS One, **12** (6), e0179340 (2017).
2. B. Zhang and L. Tian, Bioelectromagnetics, **41** (8), 573 (2020).
3. В. В. Крылов, Труды Ин-та биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, № 84 (87), 7 (2018).
4. H. Zadeh-Haghighi, R. Rishabh, and C. Simon, Front. Physiol., **11**, 1026460 (2023). DOI: 10.3389/fphys.2023.1026460.
5. И. А. Шаев, В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **67** (2), 319 (2022).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **63** (3), 484 (2018).
7. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **65** (4), 735 (2020).
8. T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest., **47**, 673 (1987).
9. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **64** (4), 720 (2019).
10. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **65** (2), 524 (2020).
11. Е. В. Проскурнина, М. М. Созарукова, А. М. Полимова и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **161** (2), 288 (2016).
12. F. Rossi, P. Bellavite, G. Bertonet, et al., Adv. Exp. Med. Biol., **141**, 283 (1982).
13. В. Г. Сафронова, А. Г. Габдулхакова, А. В. Миллер и др., Биохимия, **66**, 840 (2001).
14. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **66** (3), 511 (2021).
15. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии, **49**, 341 (2009).
16. G. Fossati, D. A. Moulding, D. G. Spiller, et al., J. Immunol., **170**, 1964 (2003).
17. М. А. Мурина, Д. И. Рошупкин, Н. С. Белакина и др., Биофизика, **50**, 1100 (2005).
18. C. Dahlgren and A. Karlsson, J. Immunol. Methods, **232** (1–2), 3 (1999).
19. H. Fu, J. Bylund, A. Karlsson, et al., Immunology, **12** (2), 201 (2004).

Background Formation of Lower Levels of Reactive Oxygen Species by Neutrophils after Hypomagnetic Field Exposure Is Not Accompanied by the Impairment of Chemiluminescence Response of Neutrophils to Respiratory-Burst Stimuli

V.V. Novikov*, E.V. Yablokova*, I.A. Shaev*, N.I. Novikova**, and E.E. Fesenko*

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

**Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

This study shows that the background formation of lower levels of reactive oxygen species in mouse peritoneal neutrophils after short-term (40 minutes) exposure to hypomagnetic fields with ~10 nT residual field at physiological temperatures, which has been detected by use of lucigenin-dependent chemiluminescence, is not accompanied by the impairment of chemiluminescence response of neutrophils to respiratory-burst stimuli: the formylated tripeptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) and phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). These results were obtained with lucigenin or luminol-enhanced activated chemiluminescence and various combinations of reactive oxygen species production stimuli (phorbol-12-myristate-13-acetate and/or N-formyl-Met-Leu-Phe). Based on the results of the present work as well as on those of previous studies, this study reveals that the systems that control the respiratory burst in neutrophils can be excluded from a list of main targets and acceptors that respond to short-term deprivation of the magnetic field.

Keywords: hypomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, lucigenin, luminol, chemiluminescence

МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТОВ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

© 2023 г. А.К. Чигасова, Л.А. Островская*, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова

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

*E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 04.10.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 18.10.2023 г.

Проведено сравнительное изучение цитотоксической активности и механизма действия полиакрилатов, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил) в отношении клеток опухоли человека (культура клеток MCF-7). Показана высокая цитотоксическая активность препаратов. Обнаружено, что аргакрил в 20 раз превосходит по эффективности аурумакрил. Установлено, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток. Обнаружены различия во влиянии препаратов на структуру ДНК опухолевых клеток.

Ключевые слова: полиакрилаты золота и серебра, культура опухолевых клеток человека MCF-7, цитотоксическая активность, апоптоз, ДНК опухолевых клеток.

DOI: 10.31857/S0006302923060108, EDN: RORUYD

Соединения, содержащие благородные металлы, как показали исследования последних лет, обладают разносторонней биологической, в том числе противоопухолевой активностью [1].

Проведенные нами доклинические исследования в ряду новой для онкологии группы соединений — металлополиакрилатов — позволили выявить значительную противоопухолевую и цитотоксическую активность полиакрилатов, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил), на моделях солидных опухолей животных и клеточных линиях опухолей человека [1–4].

Показано, что природа металла, содержащегося в полимерном соединении, может оказывать весьма существенное влияние на метаболизм препаратов, их взаимодействие с биомакромолекулами, механизм действия, и как следствие этого, на чувствительность опухолевых клеток различного генеза к изучавшимся препаратам [1, 5].

В данной работе приведены результаты сравнительного изучения цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила в отношении клеток опухоли человека (культура клеток MCF-7), а также некоторых аспектов механизма действия препаратов, включая исследование механизма гибели клеток и влияния соединений на структуру ДНК опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Исследовавшиеся полиметаллоакрилаты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов (8 масс. %). Аурумакрил — неполная золотая соль полиакриловой кислоты, отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAgCl}_3\text{H}-)_m$, аргакрил — неполная серебряная соль полиакриловой кислоты, отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720, 1570 см^{-1} . Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде [1].

Оценка цитотоксического эффекта препаратов *in vitro* проведена при их применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 100 до 1000 мкг/мл для аурумакрила и от 10 до 500 мкг/мл для аргакрила.

Культура клеток. Экспериментальной моделью служила клеточная культура рецептор-положительной карциномы молочной железы человека

линии MCF-7, полученная из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Оценка цитотоксического эффекта и анализ апоптотической гибели клеток. Для оценки жизнеспособности клеток использовали йодистый пропиций из коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 (Invitrogen, США) [6].

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия препаратов) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0.25%-м раствором трипси-на-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли 1 мкл раствора йодистого пропиция из упомянутого коммерческого набора. Клетки инкубировали 20 мин при 4°C, ресуспендировали и помещали в камеру Горяева для подсчета погибших клеток.

Подсчет клеток проводили с помощью люминесцентного микроскопа Eclipse Ni-U (Nikon, Япония) с набором светофильтров: В-2Е/С с излучением зеленой флуоресценции — для YO-PRO-1 (возбуждение на 465–495 нм и эмиссия на 515–555 нм) и Y-2Е/С — с испусканием красной флуоресценции для йодистого пропиция (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 600 клеток для каждой точки.

Для определения пути гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аурумакрила и аргакрила использовали метод оценки доли апоптотических клеток среди всех погибших клеток с помощью ДНК-связывающего флуоресцентного красителя YO-PRO-1, который избирательно проникает через мембрану только апоптотических клеток.

Данный метод основан на представлениях о том, что в период апоптоза активируется рецептор P2X7 неселективного катионного канала P2X7R, управляемого аденозинтрифосфатом, что приводит к превращению этого канала в цитолитическую пору [7]. Некоторые красители, такие как флуоресцентный краситель YO-PRO-1, могут проникать внутрь этих пор, после чего клетки начинают флуоресцировать в зеленой области спектра, тогда как другие красители, такие как йодистый пропиций, не обладают этим свойством в данных условиях. Таким образом, YO-PRO-1 может служить ранним маркером апоптотической гибели клеток [8]. Добавление йодистого пропиция позволяет дифференцированно окрасить погибшие клетки, флуоресцирующие после окраски в красной области спектра. Через мембрану живых клеток эти красители не проникают.

Оценку доли клеток на ранней стадии апоптоза проводили с использованием коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 с флуоресцентными красителями YO-PRO-1 и йодистым пропицием (Invitrogen, США). Клетки окрашивали в соответствии с протоколом производителя.

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия препаратов) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0.25%-м раствором трипси-на-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли по 1 мкл раствора YO-PRO-1 и йодистого пропиция из упомянутого коммерческого набора. Клетки инкубировали 20 мин при 4°C, ресуспендировали и помещали в камеру Горяева для подсчета апоптотических клеток. Подсчет клеток в апоптозе проводили с помощью люминесцентного микроскопа Eclipse Ni-U с набором светофильтров: В-2Е/С с излучением зеленой флуоресценции для YO-PRO-1 (возбуждение на 465–495 нм и эмиссия на 515–555 нм) и Y-2Е/С с испусканием красной флуоресценции для йодистого пропиция (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 300 клеток для каждой точки.

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа одонитевых разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом и аргакрилом, использовали метод электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет) [9].

Суспензию контрольных или обработанных препаратами клеток MCF-7 смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1 : 1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали при 4°C в течение 10 мин. Затем в течение 60 мин клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л Na₂ЭДТА, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton-X100) и щелочному электрофорезу (раствор для электрофореза: 300 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, pH >13; стабилизация по напряжению — 0.75 В/см; 20 мин при 4°C) с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C. Для окраски ДНК использовали акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенный видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab).

Образование одонитевых разрывов в структуре ДНК определяли по уровню миграции ДНК в геле агарозы, используя показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет». Влияние препаратов на образование одонитевых разрывов ДНК оценивали, сравнивая показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет» в обработанных препаратами

золота и серебра клетках с аналогичным показателем в контрольных клетках. Повышение этого показателя в клетках, инкубированных с препаратами, по сравнению с контрольными клетками свидетельствует о том, что аурумакрил и аргакрил в исследуемых концентрациях индуцируют однонитевые разрывы.

Анализ двунитевых разрывов ДНК. Для выяснения способности аурумакрила и аргакрила индуцировать двунитевые разрывы ДНК использовали иммуноцитохимический метод определения в клетках фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), детектирующего двунитевой разрыв ДНК. Полагают, что один фокус H2AX соответствует сайту репарации одного двунитевого разрыва ДНК [9].

Клетки на покровных стеклах дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и фиксировали параформальдегидом (4%-й раствор в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером, pH 7.4. Пермеабилизировали 0.3%-м раствором Тритон-X100 в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания.

Слайды инкубировали с кроличьими моноклональными антителами к белку γ H2AX (Anti-phospho-Histone H2A.X Rabbit Monoclonal, Merck—Millipore, США) и с мышинными моноклональными антителами к белку Ki-67 (Anti-Ki-67, Merck—Millipore, США), разведенными в соотношении 1/200 в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого слайды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом родамином (Goat anti-Rabbit IgG(H+L) Rhodamine conjugate, Merck—Millipore, США) и с вторичными козыми поликлональными антителами к мышинному Ig G с красителем Alexa 488 (Merck—Millipore, США), разведенными в соотношении 1/400 в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, при комнатной температуре в течение 1 ч.

Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенный видеокамерой высокого разрешения ProgRes CFcool с использованием наборов светофильтров DAPI (возбужде-

ние 340–380 нм и эмиссия 435–485 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм и эмиссия 600–660 нм).

Анализировали не менее 300 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов γ H2AX использовали программу Focicounter (<http://focicounter.sourceforge.net/>).

Анализ ДНК-сшивок. Изучение влияния препаратов на ДНК опухолевых клеток MCF-7 проводили путем детектирования сшивок ДНК с использованием метода ДНК-комет в щелочных условиях [10].

Клетки инкубировали с препаратами в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C. Затем клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию, содержащую $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных препаратами клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1 : 1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 мин при 4°C. Затем в течение 1 ч клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л Na₂ЭДТА, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton-X100) и щелочной денатурации с последующим проведением электрофореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: 100 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, pH 12.5; стабилизация по напряжению – 2 В/см; 20 мин при 4°C) и с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C.

Для окраски ДНК использовали краситель акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4).

Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенный видеокамерой ProgRes CFcool. Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2.

Анализ сшивок «ДНК–белок». Изучение влияния препаратов на индукцию сшивок «ДНК–белок» проводили с использованием модифицированного метода ДНК-комет в щелочных условиях с применением протеиназы K, которая вызывает разрывы сшивок между ДНК и гистоновыми белками, что приводит к увеличению электрофоретической подвижности ДНК в геле агарозы [10].

Клетки инкубировали с препаратами в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C. Затем клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и пере-

водили в суспензию, содержащую $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных препаратами клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1 : 1) и наносили по 75 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 мин при 4°C . Затем препараты (слайды) клеток, контрольные и обработанные препаратами, помещали в лизирующий буфер с pH 10, содержащий протеиназу К (2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 2 мг/мл протеиназы К) на 60 мин при 37°C , после чего проводили щелочную денатурацию с последующим проведением электрофореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: 100 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, pH 12.5; стабилизация по напряжению — 2 В/см; 20 мин при 4°C) и с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C .

Для окраски ДНК использовали краситель акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4).

Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенном видеокамерой ProgRes CFcool. Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ Statistica 7.0 и Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из пяти независимых измерений с учетом стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксический эффект металлополиакрилатов. Проведено сравнительное изучение закономерностей гибели клеток рака молочной железы MCF-7 под влиянием аурумакрила и аргакрила в зависимости от примененных концентраций препаратов и сроков их инкубирования с клетками в экспериментах с использованием йодистого пропидия.

Цитотоксический эффект аурумакрила. Закономерности, характеризующие гибель клеток в зависимости от концентрации аурумакрила для различных сроков воздействия препарата, представлены на рис. 1.

При воздействии аурумакрила в течение 1 ч максимальная гибель опухолевых клеток составляет 54% и наблюдается при применении препарата в максимальной из изученных концентраций (500 мкг/мл). В концентрациях 100 и 300 мкг/мл

препарат при такой краткосрочной инкубации неэффективен (рис. 1а).

При увеличении сроков инкубации до 6 ч гибель клеток возрастает до 65 и 99% при применении аурумакрила в концентрациях 300 и 500 мкг/мл соответственно (рис. 1б).

При воздействии аурумакрила в течение 24 ч препарат вызывает практически полную гибель клеток (96–99%) при применении в концентрациях 300 и 500 мкг/мл (рис. 1в).

Аурумакрил при использовании в концентрации 100 мкг/мл при всех изученных временных экспозициях не проявляет цитотоксической активности в отношении клеток MCF-7 (рис. 1).

Изменение доли погибших клеток в зависимости от сроков инкубирования с максимально эффективной концентрацией аурумакрила 500 мкг/мл иллюстрируют данные, представленные на рис. 2.

Как видно, уже через 1 ч инкубирования клеток с 500 мкг/мл аурумакрила погибает 54% клеток, а при увеличении длительности воздействия препарата до 6 и 24 ч погибает 99 и 100% клеток соответственно (рис. 2).

Показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с аурумакрилом в течение 24 ч, составляет 200 мкг/мл ($IC_{50} = 16.0$ мкг/мл в пересчете на содержание золота) (рис. 1в).

Цитотоксический эффект аргакрила. Кривые, характеризующие изменения доли погибших клеток в зависимости от концентрации аргакрила для разных сроков воздействия препарата, представлены на рис. 3.

Как видно, при воздействии препарата в течение 1 ч максимальная гибель клеток составляет 85% при применении препарата в наибольшей из изученных концентраций, равной 500 мкг/мл (рис. 3а).

При увеличении длительности воздействия препарата до 6 и 24 ч полная гибель всех 100% клеток регистрируется при применении аргакрила уже в значительно меньших концентрациях (250 и 100 мкг/мл соответственно (рис. 3б,в).

Чрезвычайно высокую цитотоксичность аргакрила в отношении клеток линии MCF-7 наглядно иллюстрируют кривые, характеризующие гибель клеток в зависимости от времени инкубации с препаратом, примененным в концентрациях 100, 250 и 500 мкг/мл, приведенные на рис. 4.

Из представленных данных видно, что абсолютная летальная концентрация аргакрила, вызывающая гибель всех 100% клеток, составляет 250 мкг/мл (20 мкг/мл в пересчете на содержание серебра) уже через 6 ч инкубирования с препаратом.

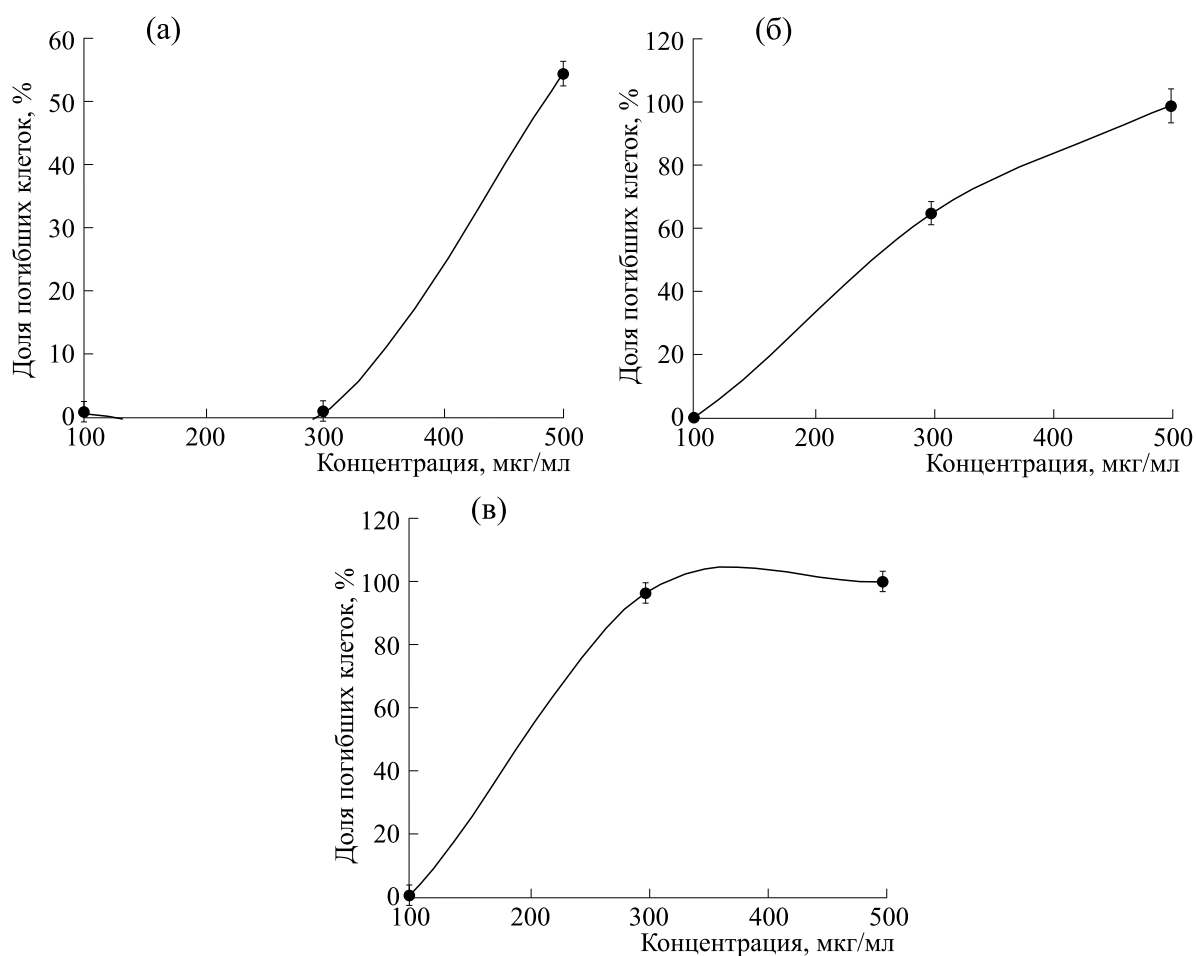


Рис. 1. Концентрационные зависимости гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аурумакрила для различных времен инкубации с препаратом: (а) – 1 час, (б) – 6 часов, (в) – 24 часа. По оси абсцисс – концентрация аурумакрила, мкг/мл. По оси ординат – доля погибших клеток, %.

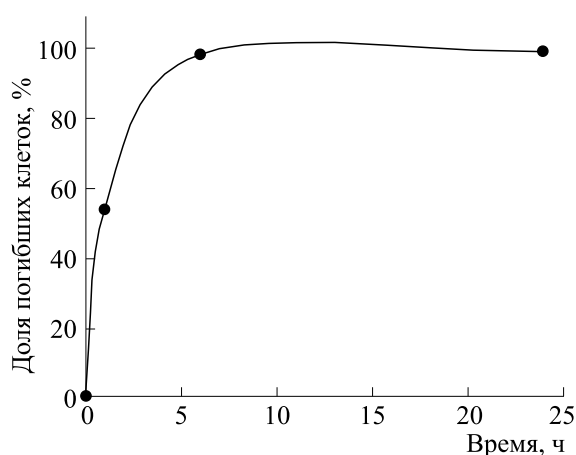


Рис. 2. Изменение доли погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл. По оси абсцисс – время инкубирования клеток с аурумакрилом, ч. По оси ординат – доля погибших клеток, %.

Показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с аргакрилом в течение 24 ч, составляет менее 10 мкг/мл ($IC_{50} < 0.8$ мкг/мл в пересчете на содержание серебра) (рис. 3в).

Сопоставляя данные по характеристике цитотоксического эффекта аурумакрила и аргакрилла в отношении клеток рака молочной железы человека линии MCF-7, полученные в опытах с применением йодистого пропидия, следует отметить, что показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с препаратами в течение 24 ч, составляет (в пересчете на содержание металла) 16.0 и 0.8 мкг/мл соответственно.

Таким образом полученные данные свидетельствуют о высокой цитотоксической активности препаратов, содержащих как золото, так и серебро, в отношении клеток опухоли человека линии MCF-7, однако необходимо отметить, что аргакрил в 20 раз превосходит по эффективности аурумакрил.

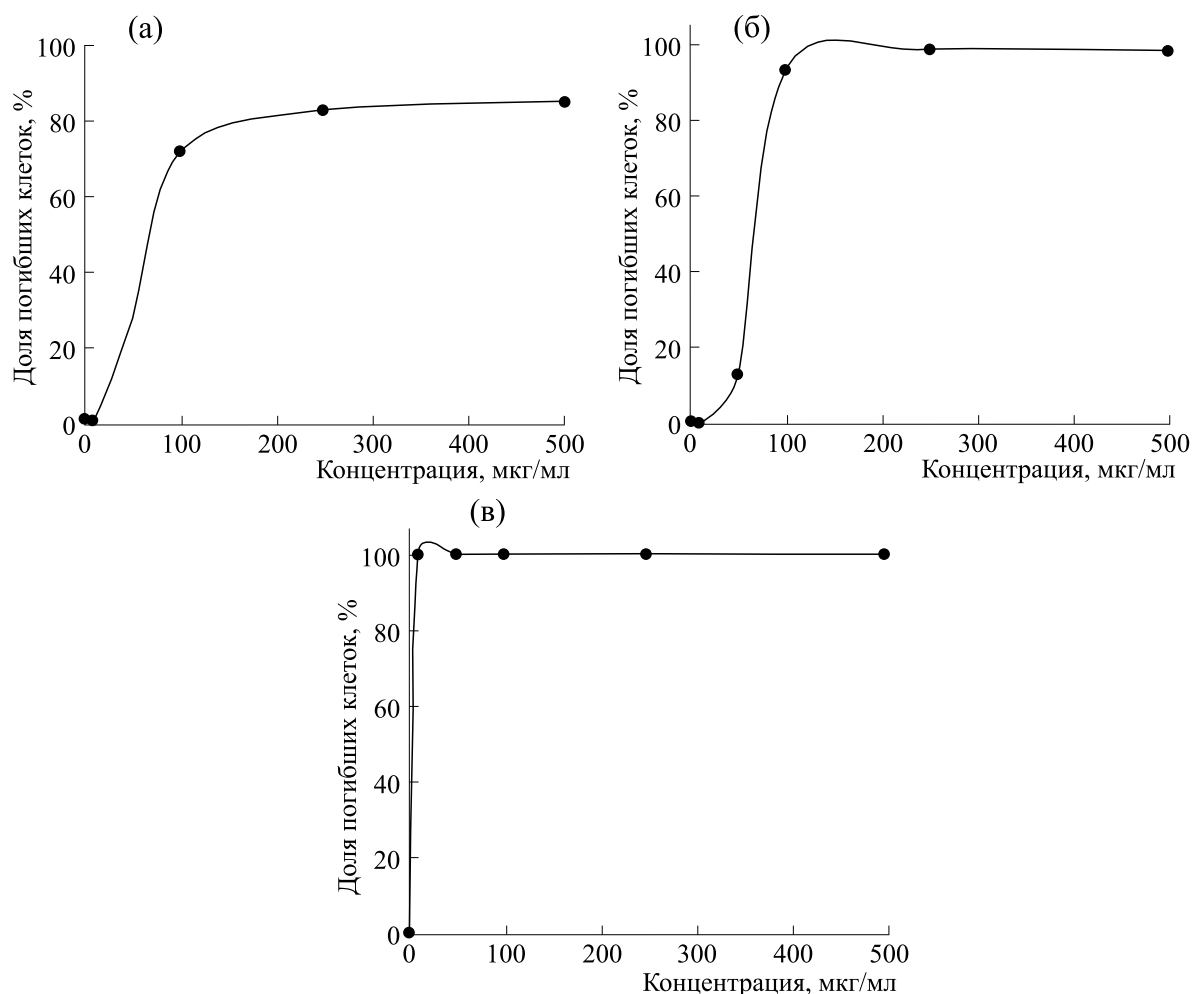


Рис. 3. Концентрационные зависимости гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аргакрила для различных времен инкубации с препаратом: (а) – 1 час, (б) – 6 часов, (в) – 24 часа. По оси абсцисс – концентрация аргакрила, мкг/мл. По оси ординат – доля погибших клеток, %

Механизм гибели опухолевых клеток под влиянием металлополиакрилатов. Соединения, содержащие золото и серебро, подобно другим противоопухолевым препаратам, способны вызывать как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток.

Задача проведенных нами исследований состояла в оценке роли апоптоза в индуцируемом аурумакрилом и аргакрилом процессе гибели опухолевых клеток.

Для определения пути гибели клеток линии MCF-7 под влиянием препаратов использовали ранее описанный метод оценки доли апоптотических клеток среди всех погибших клеток [6].

Апоптотическая гибель опухолевых клеток под влиянием аурумакрила. Изменение доли апоптотических клеток среди погибших клеток в зависимости от концентрации аурумакрила для различных времен воздействия препарата характеризуют данные, представленные на рис. 5.

Как видно из представленных данных, изменение доли клеток, погибающих путем апоптоза, среди общего количества погибших под влиянием аурумакрила клеток имеет выраженный доза и экспозиционно зависимый характер.

Так, концентрация 100 мкг/мл не вызывает апоптотической гибели клеток ни при одном из изученных сроков инкубации (рис. 5).

Доза аурумакрила 300 мкг/мл не вызывающая гибели клеток при часовой экспозиции, при инкубации в течение 6 и 24 ч приводит к апоптотической гибели 65 и 97% из общего числа погибших клеток соответственно (рис. 5).

Применение препарата в концентрации 500 мкг/мл приводит к гибели через апоптоз 55 и 99% клеток через 1, 6 и 24 ч инкубирования соответственно, что особенно четко иллюстрирует зависимость, представленная на рис. 6.

Таким образом, очевидно, что аурумакрил, будучи применен в цитотоксических концентраци-

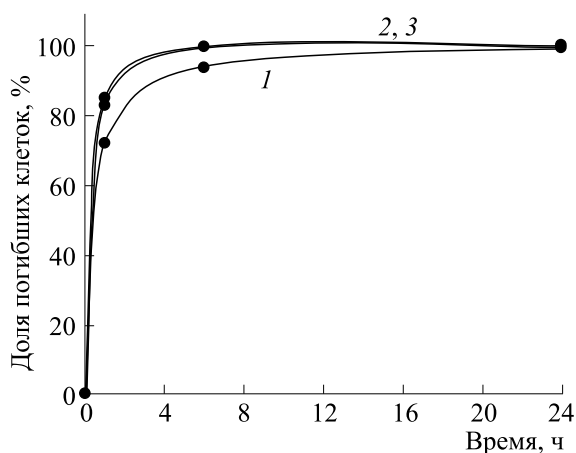


Рис. 4. Изменение доли погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: 1 – 100 мкг/мл, 2 – 250 мкг/мл, 3 – 500 мкг/мл. По оси абсцисс – время инкубирования клеток с аргакрилом, ч. По оси ординат – доля погибших клеток, %.

ях, индуцирует гибель клеток преимущественно через апоптоз, что особенно наглядно проявляется при применении препарата в максимальной из изученных концентраций – 500 мкг/мл, вызывающей практически полную гибель опухолевых клеток MCF-7 (рис. 4 и 6).

Апоптотическая гибель опухолевых клеток под влиянием аргакрила. Способность аргакрила вызывать апоптотическую гибель опухолевых клеток исследована при применении препарата в концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкг/мл.

Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток в зависимости от концентрации аргакрила для разных времен инкубации клеток с препаратом показано на рис. 7.

Зависимость изменения доли апоптотических клеток от времени воздействия аргакрила в различных концентрациях иллюстрируют данные, представленные на рис. 8.

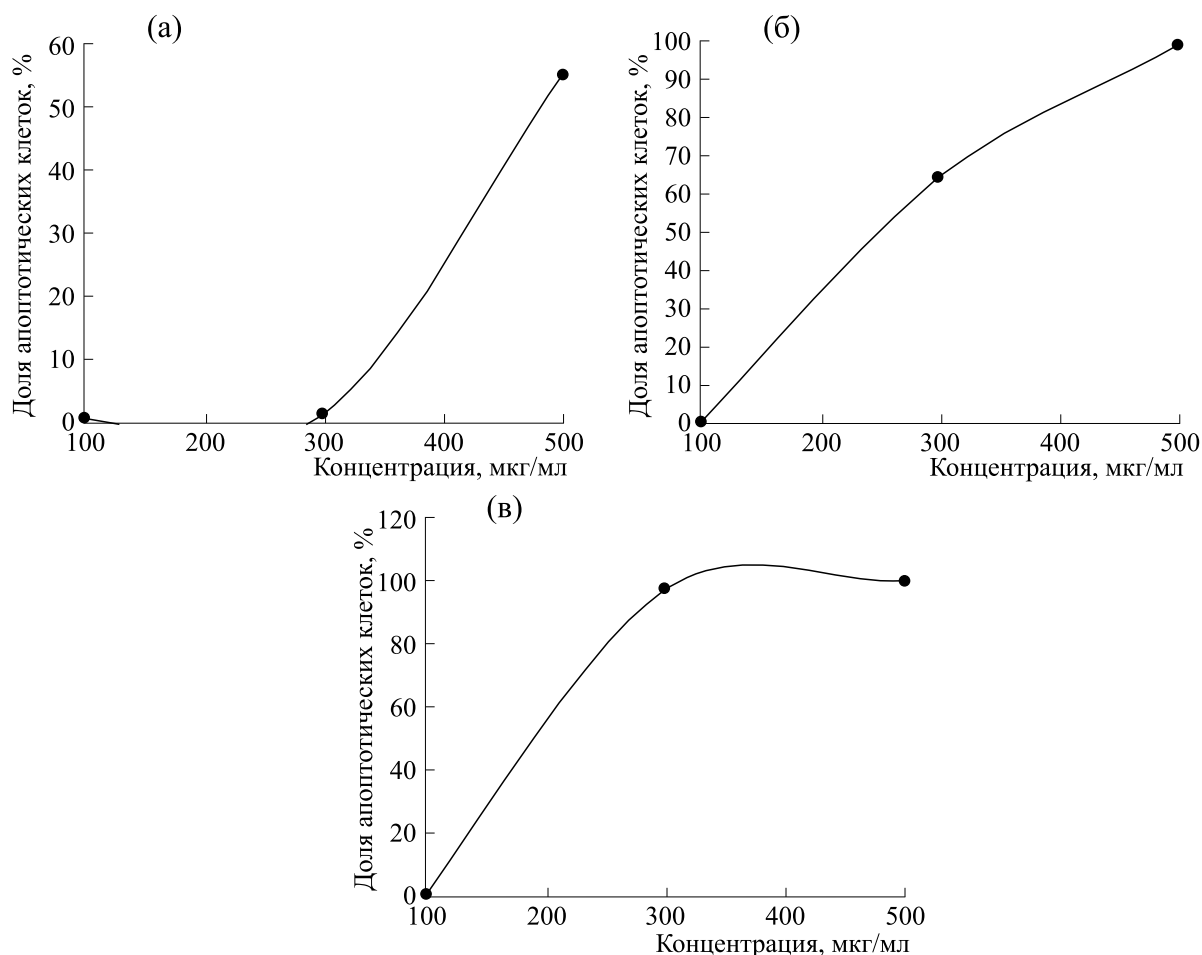


Рис. 5. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аурумакрила для различных времен инкубации: (а) – 1 час, (б) – 6 часов, (в) – 24 часа. По оси абсцисс – концентрация аурумакрила, мкг/мл. По оси ординат – доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

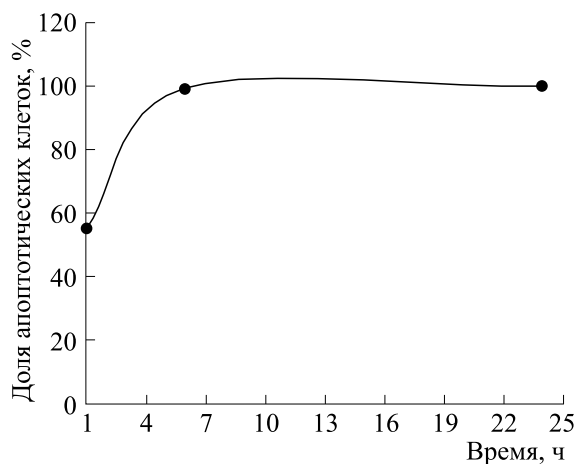


Рис. 6. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аурумакрила (500 мкг/мл). По оси абсцисс — время инкубирования клеток с аурумакрилом, ч. По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

Как было показано, аргакрил проявляет значительно более высокую цитотоксическую активность, чем аурумакрил (рис. 2 и 4).

Это находит свое отражение и в концентрационных закономерностях, характеризующих изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших под влиянием аргакрила клеток.

Как видно, уже при применении в дозе 50 мкг/мл аргакрил вызывает апоптотическую гибель 30, 40 и 50% клеток при инкубировании в течение 1; 6 и 24 ч соответственно (рис. 7).

С увеличением концентрации препарата и времени его воздействия доля апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток нарастает.

Так, при применении аргакрила в концентрации 100 мкг/мл наблюдается апоптотическая гибель 70, 95 и 98% клеток через 1, 6 и 24 ч инкубирования соответственно (рис. 7 и 8).

Применение аргакрила в концентрации 250 мкг/мл вызывает апоптотическую гибель 80,

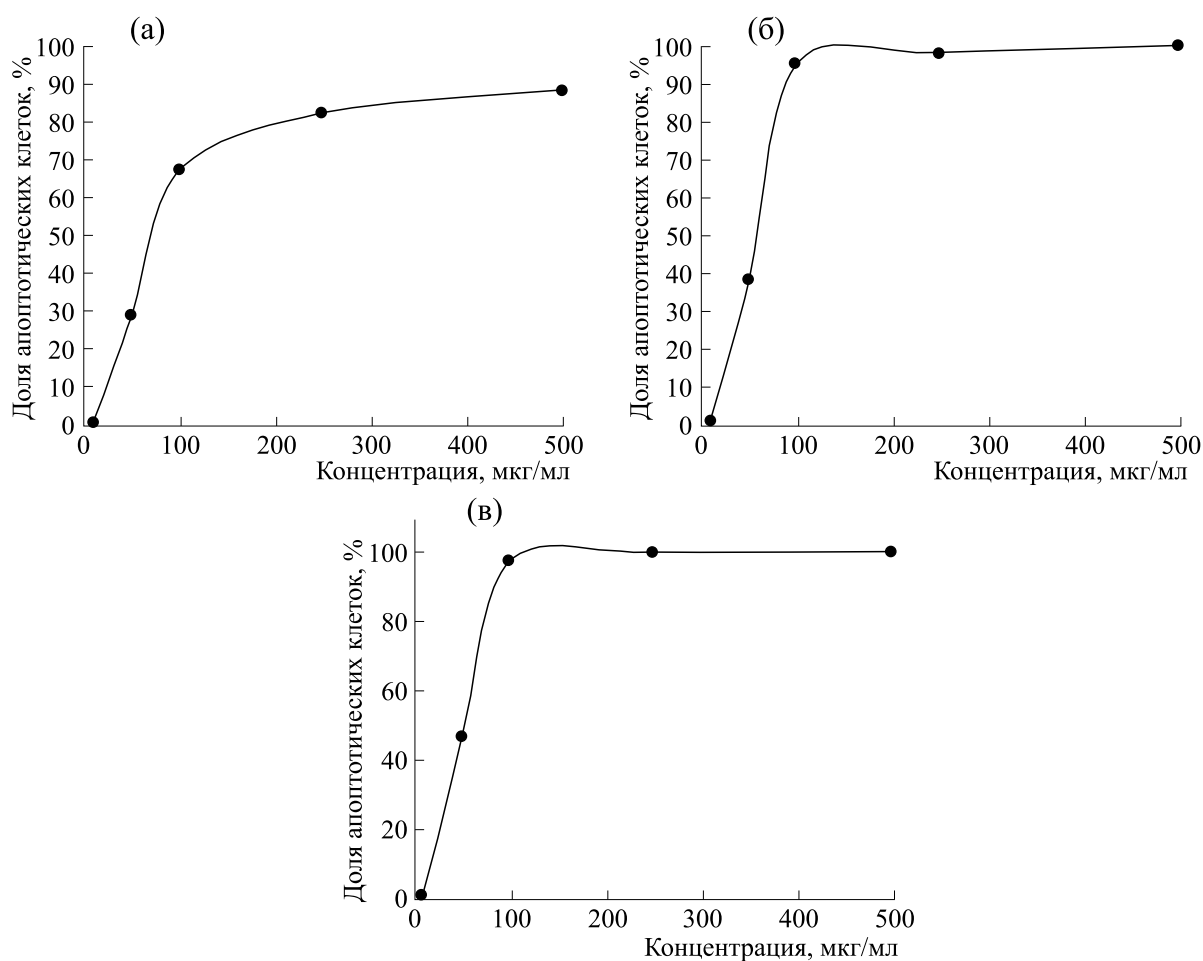


Рис. 7. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аргакрила для различных времен инкубации: (а) — 1 час, (б) — 6 часов, (в) — 24 часа. По оси абсцисс — концентрация аргакрила, мкг/мл/ По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

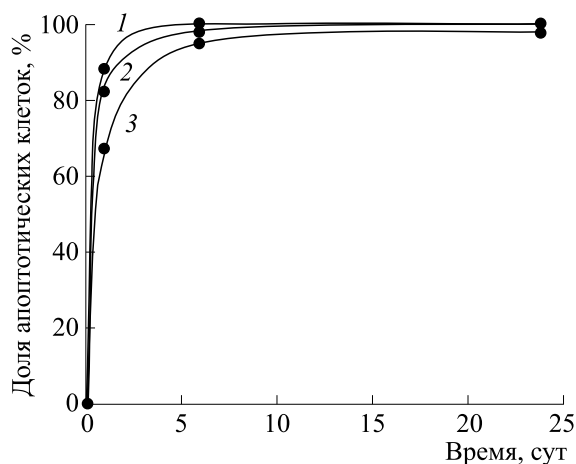


Рис. 8. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: 1 — 500 мкг/мл, 2 — 250 мкг/мл, 3 — 100 мкг/мл. По оси абсцисс — время инкубирования клеток с аргакрилом, ч. По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

98 и 100% клеток через 1; 6 и 24 ч инкубирования соответственно. В концентрации 500 мкг/мл аргакрил вызывает тотальную гибель опухолевых клеток по апоптотическому пути при всех изученных временах экспозиции (рис. 7 и 8).

Таким образом, показано, что высокая цитотоксическая активность аргакрила в значительной мере обусловлена способностью препарата вызывать апоптотическую гибель опухолевых клеток.

Основываясь на представленных результатах можно полагать, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток.

Влияние металлополиакрилатов на структуру ДНК опухолевых клеток. Одной из ключевых внутриклеточных мишеней, воздействие на которую может приводить к гибели опухолевых клеток, является ДНК, что подтверждает многолетний клинический опыт использования алкилирующих противоопухолевых препаратов, до сих пор входящих в арсенал основных лекарственных средств, применяемых для лечения разнообразных опухолей [11].

Известно, что в результате структурных повреждений ДНК, могут возникать одно- и двунитевые разрывы ДНК, а также ДНК-сшивки, которые в случае отсутствия или дефектности репарации этих повреждений ведут к гибели клетки.

Целью настоящего исследования было изучение способности аурумакрила и аргакрила индуцировать разрывы ДНК и образование ДНК-

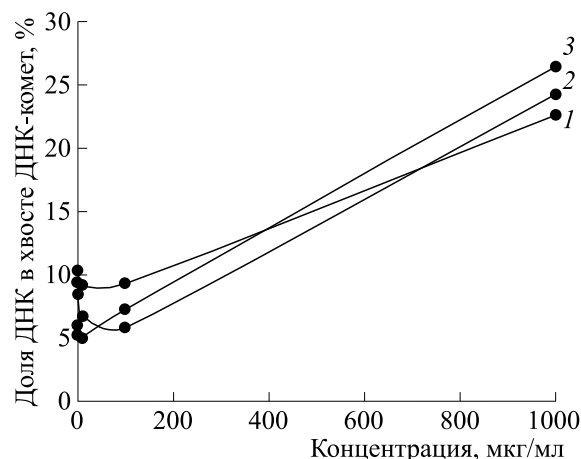


Рис. 9. Влияние аурумакрила на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила при различных сроках инкубации: 1 — 1 час; 2 — 6 часов; 3 — 24 часа.

сшивок в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

Однонитевые разрывы ДНК.

Аурумакрил. Влияние аурумакрила на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 9.

Как видно, аурумакрил индуцирует образование однонитевых разрывов ДНК при применении только в наибольшей из изученных концентраций 1000 мкг/мл, причем этот эффект незначительно зависит от сроков инкубирования клеток с препаратом. Так, доля ДНК в хвосте комет через 1, 6 и 24 ч инкубации клеток с препаратом составляет 22, 24 и 26%, увеличиваясь, соответственно, в 2.4; 4.7 и 4.5 раза по сравнению с контролем (рис. 9).

Этот эффект также наглядно иллюстрируют данные диаграммы распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле и при воздействии аурумакрила (рис. 10).

Как видно из представленных на диаграмме данных, количество клеток с долей ДНК в хвосте ДНК-комет более 20% увеличилось после 6 ч культивирования с аурумакрилом с ~3% в контроле до 47%. Примерно такое же соотношение между числом клеток в хвосте ДНК-комет для интактных и обработанных аурумакрилом клеток зарегистрировано и после 24-часового инкубирования — 6 и 47% соответственно (рис. 10).

Таким образом, очевидно, что аурумакрил (1000 мкг/мл) индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 однонитевых разрывов ДНК, число которых возрастает в три-четыре

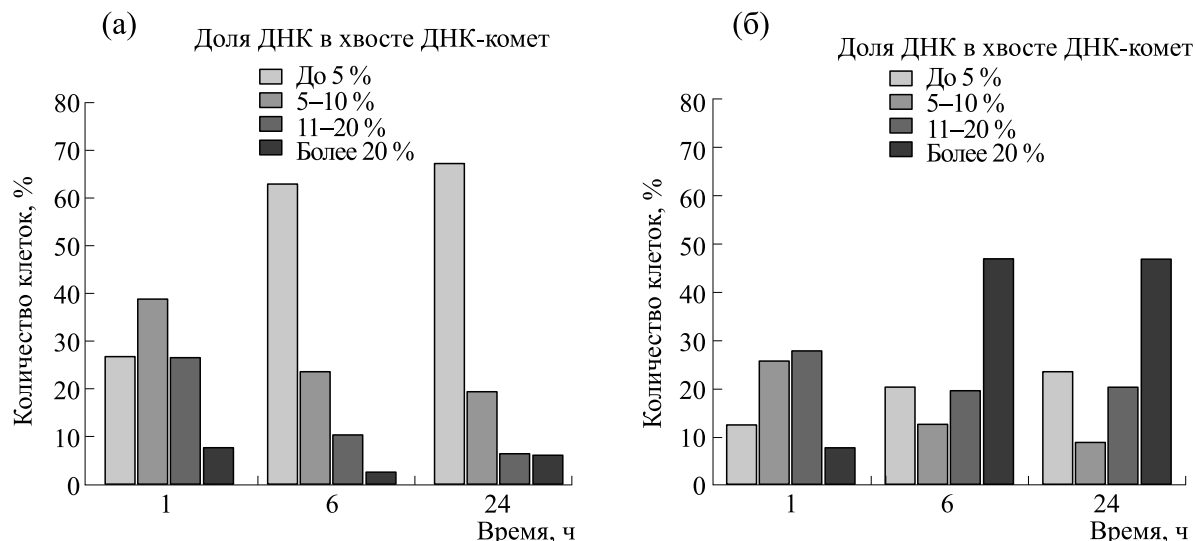


Рис. 10. Диаграмма распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле (а) и при воздействии ауремакрила в концентрации 1 мг/мл (б) в зависимости от сроков инкубирования клеток с препаратом.

с половиной раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле, уже через 1 ч инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток.

Аргакрил. Влияние аргакрила на образование односторонних разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 11.

Как видно из представленных данных, доля клеток в хвосте ДНК-комет увеличивается под влиянием аргакрила, примененного в концентрации 100 мкг/мл, более чем в шесть раз, а под воздействием препарата в концентрации 250 мкг/мл

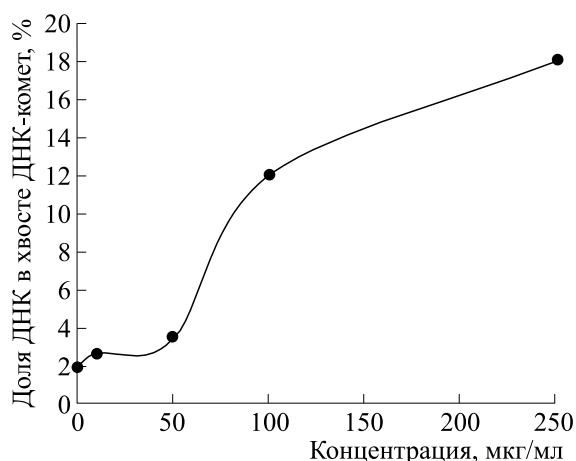


Рис. 11. Влияние аргакрила на образование односторонних разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток с препаратом в течение 24 ч.

— в девять раз по сравнению с контролем (контрольное значение показателя составляет 1.88%) при инкубации с клетками в течение 24 ч (рис. 11).

Таким образом, очевидно, что аргакрил через 24 ч воздействия, будучи применен в концентрациях 100 и 250 мкг/мл, индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 односторонних разрывов ДНК, число которых возрастает соответственно в шесть и девять раз по сравнению со спонтанным уровнем, наблюдаемым в контроле.

Сопоставляя результаты экспериментов по оценке способности индуцировать образование односторонних разрывов ДНК препаратами, содержащими золото и серебро, следует отметить следующие факты:

— ауремакрил индуцирует образование в опухолевых клетках односторонних разрывов ДНК, число которых возрастает в три-четыре с половиной раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле, уже через 1 ч инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток при применении препарата в концентрации 1000 мкг/мл (рис. 9);

— аргакрил при воздействии в концентрациях 100 и 250 мкг/мл в течение 24 ч вызывает повреждения структуры ДНК в виде односторонних разрывов в шесть и девять раз превышающих уровень контроля соответственно (рис. 11).

Иными словами, при оценке действия препаратов по показателю способности к индукции односторонних разрывов ДНК очевидно, что аргакрил оказывает в два раза более значительный эффект при применении в концентрации в десять

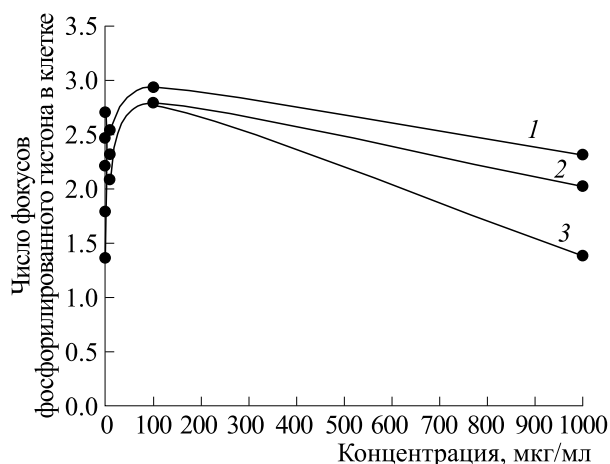


Рис. 12. Влияние аурумакрила на образование двунитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аурумакрила при инкубации клеток в течение 1 часа (1), 6 часов (2) и 24 часов (3).

раз меньшей, чем концентрация аурумакрила (100 и 1000 мкг/мл соответственно).

Таким образом, как следует из представленных данных, аргакрил проявляет себя как значительно более эффективный индуктор одонитевых разрывов ДНК, чем аурумакрил, что, очевидно, отражает особенности взаимодействия содержащихся в исследуемых препаратах металлов — золота и серебра — с биомакромолекулами.

Двунитевые разрывы ДНК. Способность полиакрилатов золота и серебра вызывать двунитевые разрывы ДНК охарактеризована в соответствии с показателем уровня фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), регистрируемого в клетках MCF-7, подвергавшихся воздействию препаратов, по сравнению с контролем.

Аурумакрил. Изменение уровня фокусов γ H2AX в ДНК опухолевых клеток после инкубации в течение 1, 6 и 24 ч с аурумакрилом, примененным концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 10 до 1000 мкг/мл, показано на рис. 12.

Как видно, культивирование клеток MCF-7 в течение 1, 6 и 24 ч приводит к спонтанному образованию двунитевых разрывов ДНК, при котором уровень фокусов γ H2AX имеет значения, равные 1.35, 1.79 и 1.77 соответственно (рис. 12).

Влияние аурумакрила на уровень фокусов γ H2AX (двунитевые разрывы ДНК), имеет дозозависимый характер. При воздействии аурумакрила в концентрации 100 мкг/мл уровень двунитевых разрывов ДНК несколько возрастает по сравнению с контролем и достигает величины, равной 3.0, при всех сроках инкубации. Однако при увеличении концентрации препарата до

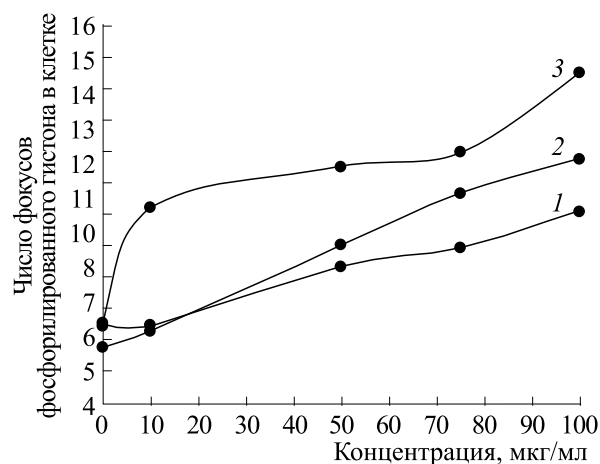


Рис. 13. Влияние аргакрила на образование двунитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток в течение 1 часа (1), 6 часов (2) и 24 часов (3).

1000 мкг/мл уровень фокусов γ H2AX снижается до значений, составляющих 2.3, 2.0 и 1.37 соответственно при инкубации в течение 1, 6 и 24 ч (рис. 12).

Иными словами, число двунитевых разрывов в опухолевых клетках через 24 ч инкубации с аурумакрилом (1000 мкг/мл) остается на уровне спонтанных разрывов, наблюдаемых в контроле (рис. 12).

Приведенные данные убедительно свидетельствуют об отсутствии у аурумакрила способности вызывать образование двунитевых разрывов в молекуле ДНК опухолевых клеток MCF-7.

Аргакрил. Изменение уровня фокусов γ H2AX в ДНК опухолевых клеток после инкубации в течение 1, 6 и 24 ч с аргакрилом, примененным концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл, показано на рис. 13.

Как видно из представленных данных, культивирование опухолевых клеток MCF-7 с аргакрилом в течение 1, 6 и 24 ч приводит к увеличению числа двунитевых разрывов ДНК над спонтанным (контрольным) уровнем в 1.7, 1.8 и 2.2 раза соответственно (рис. 13).

Таким образом, очевидно, что аргакрил, в отличие от аурумакрила, обладает способностью вызывать двунитевые разрывы ДНК в опухолевых клетках, действуя в концентрациях на порядок меньших, чем препарат, содержащий золото (рис. 12 и 13).

ДНК-сшивки. Оценка способности МПА индуцировать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7 проведена с использованием метода ДНК-комет. При этом для дифферен-

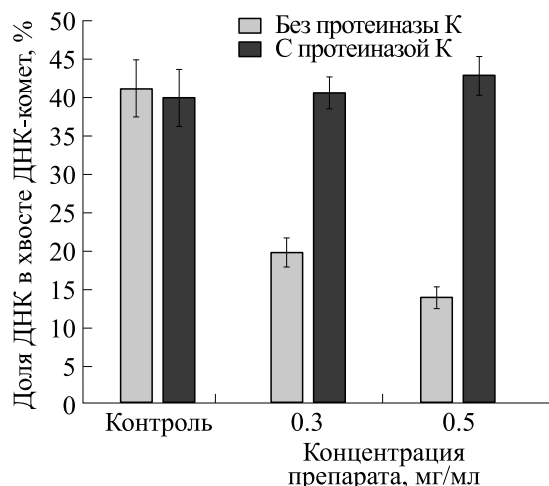


Рис. 14. Индукция аурумакрилом сшивок «ДНК–белок» в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет (%) в зависимости от концентрации аурумакрила (мг/мл) без воздействия протеиназы К и в присутствии протеиназы К.

циации природы сшивок «ДНК–ДНК» и «ДНК–белок» определяли долю ДНК в хвосте ДНК-комет в присутствии протеиназы К, которая, избирательно взаимодействуя с белком, позволяет регистрировать сшивки типа «ДНК–белок».

Аурумакрил. Аурумакрил, как видно из данных, представленных на рис. 14, вызывает в исследуемых опухолевых клетках уменьшение доли ДНК в хвосте ДНК-комет при воздействии в концентрациях 300 и 500 мкг/мл соответственно в два и три раза по сравнению с уровнем контрольных значений (40%). Эти показатели свидетельствуют о том, что аурумакрил вызывает сшивки в молекуле ДНК, число которых возрастает с увеличением концентрации препарата (рис. 14).

При этом отмечено, что в присутствии протеинкиназы К доля ДНК в хвосте ДНК-комет при воздействии аурумакрила в изученных концентрациях сохраняется на уровне контрольных значений (40%), что рассматривается, согласно современному представлению, как свидетельство индукции препаратом сшивок в молекуле ДНК типа «ДНК–белок» (рис. 14) [10, 12].

Аргакрил. Проведенное нами экспериментальное исследование показало, что при воздействии аргакрила не зафиксировано образование сшивок в молекуле ДНК опухолевых клеток, то есть аргакрил, в отличие от аурумакрила, не вызывает сшивок в молекуле ДНК опухолевых клеток.

Таким образом, показано, что препарат, содержащий золото, вызывает сшивки «ДНК–белок» в молекуле ДНК, в то время как препарат серебра не индуцирует появление сшивок в молекуле ДНК.

Анализ данных, характеризующие влияние МПА на структуру ДНК опухолевых клеток (линия MCF-7) позволяет, как нам представляется, предложить следующую трактовку полученных результатов:

– механизм действия аурумакрила реализуется через образование одонитевых разрывов ДНК, трансформирующихся в сшивки типа «ДНК–белок», что, возможно, объясняет снижение спонтанного уровня двунитевых разрывов ДНК в клетках под влиянием препарата;

– механизм действия аргакрила связан с индукцией одонитевых и двунитевых разрывов ДНК, число которых в два раза превосходит контрольный (спонтанный) уровень этих показателей, при отсутствии образования под влиянием препарата сшивок в молекуле ДНК.

Эти результаты указывают на возможные различия в механизме цитотоксического действия аурумакрила и аргакрила, которые, вероятно, определяются природой металлов, содержащихся в исследуемых полиакрилатах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана высокая цитотоксическая активность полиакрилатов, содержащих как золото, так и серебро в отношении клеток опухоли человека линии MCF-7, причем обнаружено, что аргакрил в 20 раз превосходит по эффективности аурумакрил.

Установлено, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток.

Обнаружены различия во влиянии МПА на структуру ДНК опухолевых клеток. Так, аурумакрил вызывает образование одонитевых разрывов ДНК и сшивок типа «ДНК–белок» на фоне снижения спонтанного уровня двунитевых разрывов ДНК, в то время, как аргакрил индуцирует появление одонитевых и двунитевых разрывов ДНК и не вызывает образование сшивок в молекуле ДНК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Островская и Д. Б. Корман, *Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей* (Практическая медицина, М., 2023).
2. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
5. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и др., *Изв. АН. Сер. хим.*, **66** (12), 2314 (2017). DOI: 10.1007/s11172-017-2021-3
6. А. К. Чигасова, Л. А. Островская и Д. Б. Корман, *Биофизика*, **67** (6), 1185 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060151
7. R. Kopp, A. Krautloher, A. Ramírez-Fernández, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **12** (2019).
8. S. Fujisawa, Y. Romin, A. Barlas, et al., *Cytotechnology*, **66**, 259 (2013).
9. А. К. Чигасова, Л. А. Островская и Д. Б. Корман, *Биофизика*, **68** (1), 11 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923010027
10. А. К. Чигасова и А. Н. Осипов, Патент № 2799055, Бюл. изобретений № 19 (2023).
11. Д. Б. Корман, *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
12. O. Merk 1, K. Reiser, and G. Speit, *Mutat Res.*, **471** (1–2), 71 (2000). DOI: 10.1016/s1383-5718(00)00110-8

Mechanism of the Cytotoxic Effect of Noble Metal Polyacrylates on Tumor Cells**A.K. Chigasova*, L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, and N.V. Bluhterova*****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The present study was carried out to investigate and compare the cytotoxic activities and mechanism of action of gold polyacrylates (aurumacryl) and silver polyacrylates (argacryl) using human tumor cell line (MCF-7 cell culture). The tested compounds showed high cytotoxic activity. It was found that argacryl is 20 times more effective than aurumacryl. It was established that apoptosis represents the dominant mechanism by which tumor cells undergo cell death induced by aurumacryl and argacryl. Differences in the effect of drugs on the DNA structure in tumor cells were found.

Keywords: gold polyacrylates and silver polyacrylates, human tumor MCF-7 cell line, cytotoxic activity, apoptosis, tumor cell-derived DNA

ЛИПАЗНАЯ И ЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ГРУНТАХ ИЗ ДРЕВНИХ ПОГРЕБАЛЬНЫХ СОСУДОВ

© 2023 г. Н.Н. Каширская*, Е.В. Чернышева*, С.Н. Удальцов*, Л.Н. Плеханова*.*

*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

*E-mail: dianthus1@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Проведена оценка активности липолитических ферментов микропланшетным методом с использованием гетеромолекулярного обмена в грунтах со дна погребальной посуды, с последующим кластерным анализом. Выявлены группы с контрастным соотношением липаз С12 — С18 и эстераз С4 — С8 в выборке, включающей 57 погребальных горшков возраста двух-трех тысяч лет. Суммарная липолитическая активность образцов грунта из посуды с предположительным исходным присутствием жиросодержащих пищевых заупокойных продуктов составляла выше 6% от максимального значения в пределах выборки. Ингибирование эстераз в присутствии высоких концентраций жирных кислот отражено в предельно низких относительных значениях эстеразной активности почвенного микробного сообщества на фоне максимальных показателей активности липаз С18 и С12 в двух группах горшков. В трех группах наблюдалась эстеразная активность на фоне высокой относительной активности липаз С16, средней относительной активности липаз С18 и предельно низкой активности истинных липаз. В группе горшков с высокой суммарной липолитической активностью (за исключением отдельных экстремальных величин этого показателя) доля активности истинных липаз была в 1.7–1.8 раза выше по сравнению с долей эстеразной активности. Группировка погребальной посуды по соотношению липазной и эстеразной активности отражает характеристики заупокойной пищи, тогда как абсолютные значения активности ферментов среди избранных сосудов с наибольшей суммарной липолитической активностью группируются в соответствии с типом погребения.

Ключевые слова: липолитические ферменты, липаза, эстераза, жирные кислоты, погребальные сосуды, посуда, горшки, заупокойная пища, древняя пища, эпоха бронзы, ранний железный век.

DOI: 10.31857/S000630292306011X, EDN: ROSYVA

Разнообразие липидов, обнаруживаемых в археологических материалах, и сопоставимость их с современными вариантами относит эту группу соединений к надежным биомаркерам в определении состава пищевых продуктов древности [1]. Из всех липидных индикаторов культурного слоя, используемых для получения исторической информации о деятельности человека, наиболее широко применяются биомаркеры копролитов в качестве богатого источника информации о диетах [2]. В образцах древней керамики молекулы липидов являются долговечными биомаркерами пищевых продуктов [3]. Хотя интактные триацлглицерины в керамических фрагментах сохраняются далеко не всегда [4], однако в некоторых случаях их количество достаточно для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии, являющейся критерием для установле-

ния происхождения жиров [5]. Липиды в керамике, как правило, сохраняются в порах размером от нано- до микрометра, однако они обнаруживаются и в зонах размером >200 мкм [6], их сохранению способствует образование солей жирных кислот кальция.

В модельных экспериментах старения растительных и животных жиров исследованы процессы термического разложения, окисления и гидролиза липидов, которые могли происходить в археологических условиях [3, 7]. Жирные кислоты, содержащие по меньшей мере одну двойную связь вдоль углеродной цепи, особенно чувствительны к реакциям окисления [3]. Длинноцепочечные ω -(о-алкилфенил)алкановые кислоты, получаемые при нагревании ненасыщенных жирных кислот, используются для идентификации водных организмов, употребляемых в пищу в

древности [8]. В результате исследования керамических сосудов нубийского городища Каср-Иб-рим с помощью методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии, были обнаружены насыщенные карбоновые кислоты в диапазоне от C12 до C18, с необычно высоким содержанием C12, что совпало с распределением насыщенных жирных кислот, обнаруженных в ядрах финиковой пальмы [9]. В оливковом масле возрастом две тысячи лет, обнаруженном в стеклянной бутылке на археологических раскопках Везувия, триацилглицерины были полностью гидролизрованы, а полученные в результате гидролиза жирные и гидроксигирные кислоты конденсировались в редко встречающиеся эстолиды [10].

Изотопный состав липидных компонентов керамики может дать исчерпывающую информацию о происхождении жиров. Исследования экстрагируемых растворителем липидных компонентов и определение стабильных изотопов углерода основных *n*-алкановых кислот в абсорбированных и карбонизированных остатках жира внутри керамики позволили провести различие между жирами нежвачного (свиного) и жвачного (овечьего или бычьего) происхождения [11]. Анализ изотопного состава липидов из керамических черепков, найденных на побережье Внешних Гебридских островов (Великобритания), выявил смешение жиров жвачных животных и морепродуктов в 71% сосудов [12]. Наличие изопреноидных жирных кислот в липидных остатках, а также характерное значение стабильных изотопов в насыщенных жирных кислотах C16:0 и C18:0 позволило установить назначение керамических кувшинов доколониальных общин хардингов в прибрежных районах Южной Африки [4]. Результаты анализа липидов показали здесь отсутствие молочного жира и наличие жира морских животных. В отличие от наземных животных жиров и растительных масел, масла, полученные из морских животных, содержат значительно большее количество ненасыщенных жирных кислот, особенно с углеродной длиной C18–C22 [4].

Таким образом, остатки липидов в керамических фрагментах способны дать информацию о бытовом использовании древней погребальной посуды. Помещение ритуальной пищи в горшок происходит однократно и не может оказать значительного влияния на состав липидов внутри керамики. В погребении жирная пища смешивается с почвой, стимулируя развитие почвенного липолитического микробного комплекса. Микробные липазы имеют большое значение в археологических исследованиях. В культурных слоях и погребениях липазы, как и другие ферменты [13, 14], выступают в качестве объекта исследования, являясь носителями биологической памяти почв об изменениях условий почвообразования и антропогенной деятельности в прошлом. Способность

ферментов сохраняться в почве связана с условиями, когда разложение органического вещества почвы ограничено [15]. Защиту органического вещества от микробного разложения обеспечивает окклюзия — покрытие поверхности органических фрагментов минеральными частицами фракций пыли и глины [16]. Время существования в почве окклюдированного органического вещества увеличивается на порядок [17]. Кроме того, ферменты, сохраняющие активность в почве на протяжении тысячелетий, должны иметь высокую конформационную стабильность третичной структуры белка, способность сохранять активность при деформации значительных участков биомолекулы [18].

Липолитические ферменты хорошо сохраняются в культурных слоях археологических памятников [19] и сосудах из древних погребений [20]. Они катализируют реакции гидролиза триглицеридов до ди- и моноглицеридов, глицерина и жирных кислот [21], а также обратную реакцию — этерификацию глицерина жирными кислотами в системах с низкой активностью воды [22]. Представители наиболее изученного семейства истинных липаз (по классификации, основанной на сходстве аминокислотных последовательностей [23]) преобразуют длинноцепочечные жирнокислотные субстраты с десятью и более атомами углерода. В целом, к липазам относятся все липолитические ферменты, которые способны высвободить свободные жирные кислоты из длинноцепочечных триацилглицеринов, содержащихся в растительных и животных жирах [24]. Для некоторых липаз отмечается увеличение сродства к субстрату при возрастании длины жирнокислотной последовательности, а также при наличии двойных связей в количестве не более двух [25]. Большее число двойных связей снижает активность, создавая пространственные затруднения при образовании фермент-субстратного комплекса.

Если максимальная активность фермента проявляется в отношении жирных кислот с короткой или средней цепью, их относят к эстеразам [26]. В отличие от истинных липаз, эстеразы могут расщеплять длинные одноцепочечные молекулы жирных кислот, связанных с нитрофенилом, но не способны воздействовать на жиры с тремя углеродными цепями такой же длины. Некоторые микробные липолитические ферменты способны к расщеплению широкого спектра субстратов, хотя в целом уменьшают свою активность при увеличении длины жирнокислотной цепи, однако проявляют более высокую [27] или даже максимальную [28] активность по отношению к жирнокислотным последовательностям средней длины.

Оценка липазной активности и определение численности микроорганизмов, способных вырабатывать липазы, успешно используются в археологической микробиологии [20, 29, 30]. Микробные сообщества почвы вырабатывают липазы в ответ на поступление липидов антропогенного происхождения. Так, при исследовании археологического памятника Сотк-2 (Республика Армения) было выявлено существенное увеличение активности липаз в слое среднего-позднего бронзового века на границе хозяйственной ямы, что в совокупности с другими почвенными характеристиками подтверждает вероятность использования данного участка в качестве места приготовления пищи [19].

Работа микробных липаз является неотъемлемой частью процессов ферментации жиросодержащих пищевых субстратов, а также процессов их порчи и окончательного разложения. В грунте заполнения ритуальных сосудов из древних погребений наблюдается высокая липазная активность, обусловленная исходным наличием питательного субстрата жировой природы [20, 29].

В сосудах с исходным содержанием жирной пищи за образование липаз ответственно как микробное сообщество почвы, попадающей в сосуд, так и микробное сообщество самого пищевого продукта. В условиях погребения микробные сообщества сохраняются в течение неопределенно долгого времени, за счет перехода клеток в покоящееся состояние [31]. При этом значительную долю в погребенных почвах составляют устойчивые группы микроорганизмов, связанные с деятельностью человека [32–34]. Но прежде, чем перейти в состояние покоя, микроорганизмы в сосудах, содержащих пищу, должны воспользоваться избытком органического вещества и выделить ферменты для его утилизации. В древних погребальных сосудах отмечено наличие белкового продукта, на что указывает анализ содержания фосфатов [35].

Однако высокая калорийность пищи и ее значительная масса, сопоставимая с массой почвы, попавшей в сосуд, может оказывать ингибирующее действие на почвенные микроорганизмы и микробные сообщества, а также ингибировать выработку липаз и эстераз. Было установлено, что эстеразы, связанные с клетками *Bacillus*, ингибировались жирными кислотами [36]. Выработка и активность липазы *Pseudomonas fragi* уменьшались при добавлении в среду свиного сала, олеата натрия и солей других ненасыщенных жирных кислот, без влияния на рост клеток [37]. Показана антибактериальная активность сложных эфиров монозамещенных углеводных жирных кислот в отношении ряда бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов, в первую очередь *Listeria monocytogenes*. Известна

антимикробная эффективность свободных жирных кислот — лауриновой (C12:0) и каприловой (C8:0), что в пищевой промышленности используется для борьбы с портящей микрофлорой, особенно с листериями или другими грамположительными патогенами [38]. Лауриновая кислота является наиболее мощной бактерицидной жирной кислотой против грамположительных энтерококков, а каприловая кислота наиболее эффективна против грамотрицательных микроорганизмов, таких, как кишечная палочка [39]. Антимикробные препараты на основе пептидов и жирных кислот длиной от 8 до 12 атомов углерода проявляли оптимальную активность в отношении патогенных штаммов, резистентных к антибиотикам [40]. Моноэфиры сахарозы и жирных кислот проявляли ингибирующий эффект на развитие спор *Bacillus cereus*, предотвращая их переход в размножающиеся клетки, однако по мере снижения концентрации сложных эфиров в среде, клетки возобновляли рост. Потеря антимикробной активности сложных эфиров, наблюдаемая во время культивирования *Bacillus cereus*, была обусловлена их разложением эстеразой [41].

На уровне микробных сообществ, выявлены периоды ингибирования преобладающих микробных групп в анаэробных средах с высоким содержанием липидов. В процессе анаэробного сбраживания содержащих липиды отходов при производстве метана, липиды первоначально гидролизуются до глицерина и длинноцепочечных жирных кислот, которые на следующем этапе преобразуются синтрофными ацетогенными бактериями в водород и ацетат и далее — метаногенными археями, — в метан. Скорость работы микробного сообщества в значительной мере ограничивается накоплением длинноцепочечных жирных кислот, разложение которых происходит по пути β -окисления [42]. Известно, что высокий уровень содержания таких кислот ингибирует деятельность синтрофических ацетогенов и метаногенов, что поначалу объяснялось токсичностью этих соединений и повреждением клеток микроорганизмов [43]. Позднее была выявлена адаптация микробных сообществ к ингибирующим концентрациям длинноцепочечных жирных кислот [44]. В настоящее время не ясно, является ли этот процесс адаптации результатом сдвига микробной популяции в сторону обогащения специфическими и лучше адаптированными разлагателями жирных кислот (популяционная адаптация) или фенотипической адаптации существующих микроорганизмов к их высоким концентрациям (физиологическая акклиматизация). Однако очевидно, что обратимость ингибирования микробного сообщества высокими концентрациями длинноцепочечных жирных кислот связана с постепенным истощением ингибитора ацетогенными микроорганизмами, используя

щими ингибитор в качестве источника питания. Вероятно, механизм ингибирования заключается в адсорбции этих кислот на поверхности клеток, что ограничивает транспортную способность их мембран [45].

Популяционные профили генов 16S рРНК эубактерий и архей показали, что при воздействии длинноцепочечных жирных кислот на микробные сообщества содержащих липиды отходов, преимущество получали β -окисляющие/протеолитические бактерии *Syntrophomonas*, *Clostridium*, *Coprothermobacter* и *Anaerobaculum*, а также род синтрофных архей — *Methanosarcina* [46]. Анализ микробного сообщества из анаэробных мембранных биореакторов совместной переработки смазочных материалов и пищевых отходов выявил преобладание *Lactobacillus* (относительная активность 92.2–95.7%) и *Anaerolineaceae* (относительная активность 13.3–57.5%), которые известны как ферментеры и разрушители жирных кислот [47].

Увеличение концентрации аммиака и летучих жирных кислот при высоких нагрузках биореакторов содержащими липиды отходами приводило к смещению метанообразования от более эффективного ацетокластического, с использованием ацетата, к менее эффективному гидрогенотрофному, с использованием водорода. В данном случае, преимущество получали археи рода *Methanoculleus* [48]. Если же содержимое биореактора было богато не только липидами, но и белками, наблюдалось совместное ингибирование длинноцепочечными жирными кислотами и аммиаком как β -окисляющих, так и метаногенных бактерий, причем на последние в большей мере действовал аммиак [49].

Компостные микробные топливные элементы, используемые для выработки электроэнергии из смеси содержащих липиды пищевых растительных отходов и почвы, могут рассматриваться как модельный вариант аэробных микробных сообществ с высокой липазной активностью. Преобразование содержащих липиды отходов путем компостирования показывает устойчивость к микробному разложению жирных кислот с длинной цепью C19:0, C20:0 [50]. Наличие высоких уровней этих жирных кислот на заключительной стадии компостирования указывает на их малую доступность для аэробной микрофлоры.

В наших объектах исследования — археологических сосудах, заполненных смесью почвы и жиросодержащего субстрата, можно предположить наличие отдельных микрозон с различной проницаемостью для кислорода. Накопление в грунте микробных липаз и эстераз, необходимых для утилизации жиров, должно протекать не равномерно, а с учетом избытка субстрата, который на первых стадиях разложения будет ограничивать

рост микробного сообщества и ингибировать активность микробных липолитических ферментов. Очевидно, что в таких условиях жиры на первых стадиях утилизируются медленно, а по мере их истощения происходит активизация микробного сообщества. К моменту перехода микроорганизмов в состояние покоя, в грунте на дне сосуда должно сформироваться определенное соотношение эстеразной активности, присущей почвенному микробному сообществу в естественных условиях, и липазной активности, проявляемой микроорганизмами в целях утилизации жиров. Особенности строения, общие для большинства липаз и эстераз — погруженность активного центра в глубину молекулы, значительные расстояния между элементами каталитической триады — серином, гистидином и аспаратом (или глутаматом) [51], могут в значительной мере обеспечивать их конформационную стабильность в почве.

В наших исследованиях варианты грунта на дне сосудов, обладающие высокой активностью длинноцепочечных липаз в липолитическом комплексе, демонстрируют изменчивость активности эстераз C4 и C8 — от ничтожно малых, близких к нулю значений, до предельно высоких, превышающих активность длинноцепочечных липаз. Мы полагаем, что контрастные случаи соотношения активности липаз и эстераз не являются случайностью и отражают особенности развития липолитического комплекса в грунте заполнения сосудов. При этом баланс липазной и эстеразной активности может выступать в качестве диагностического признака, позволяющего упростить сортировку объектов, когда их многочисленная выборка делится в результате кластеризации на небольшое число крупных группировок с общими свойствами.

Целью настоящей работы является оценка баланса и соотношений липазной и эстеразной активности почвы на дне сосудов из древних захоронений на основе кластерного анализа.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были исследованы образцы грунта со дна 57 ритуальных горшков (используем упрощение для обозначения разных типов ритуальной посуды — мисок кувшинов, кружек и др.) из погребенных курганных могильников «Литвиновский-III» (эпоха бронзы, 2 образца), «Октябрьский-I» (Моздокский район РСО-Алания, ранний железный век, аланская культура, 25 образцов) и «Братские Первые курганы» (Надтеречный район Чеченской Республики, аланская культура, накануне гуннского вторжения, IV в. н.э., 30 образцов). На курганных могильниках «Октябрьский-I» и «Братские Первые курганы» раскопки проведены Институтом археологии РАН совместно с Инсти-

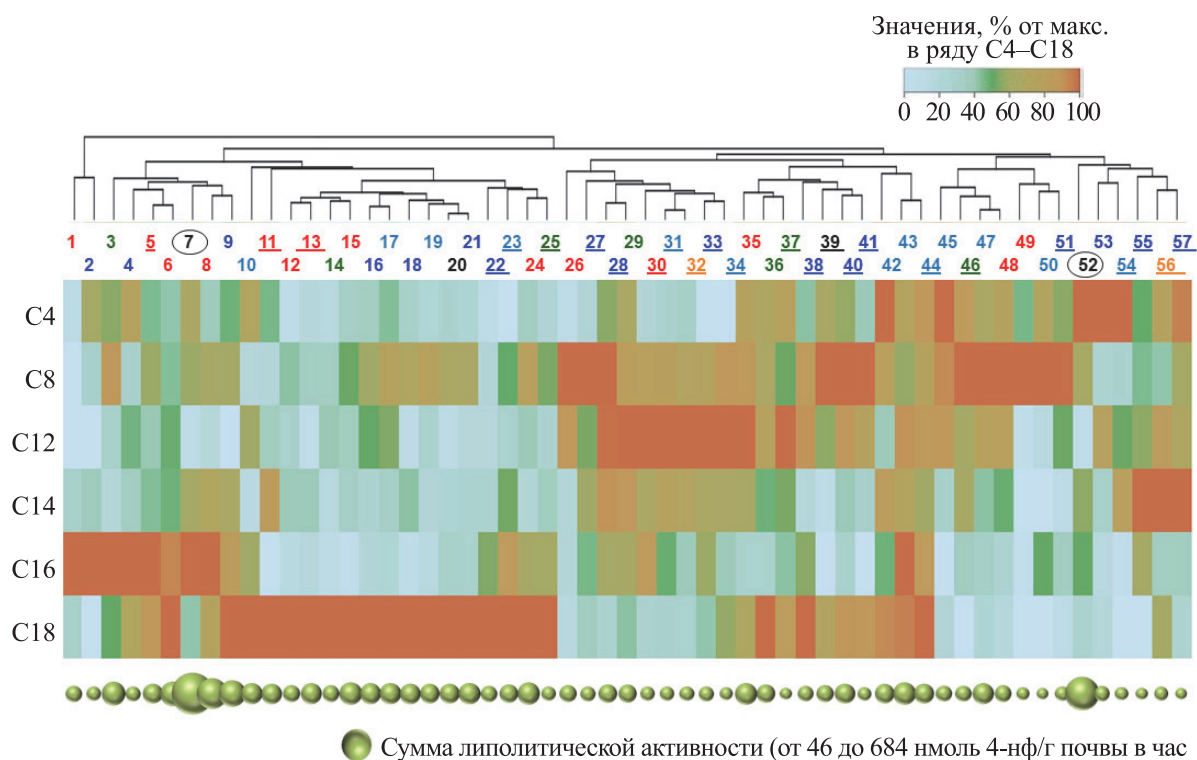


Рис. 1. Кластеризованная тепловая карта активности липолитических ферментов в грунте из древней погребальной посуды. Цветовые обозначения типа посуды по номерам внутри выборки: черный — горшки, красный — кружки, оранжевый — корчаги, зеленый — миски, голубой — кувшинчики, синий — кувшины. Обведены номера образцов из погребений курганного могильника «Литвиновский-III» (эпоха бронзы), подчеркнуты номера образцов из погребений могильника «Октябрьский-I» (аланская культура). Остальные образцы относятся к объекту «Братские Первые курганы» (аланская культура).

тутом гуманитарных исследований АН ЧР и ООО НПЦ «ДАРС» в зоне строительства магистрального газопровода «Моздок—Грозный» [52]. Большая часть находок имела характерные признаки посуды аланской культуры: миски с загнутым внутрь бортиком, кувшинчики с ручкой, расположенной на плечиках или в месте максимального расширения тулова, низкие кружки с ручкой, крепящейся к венчику сверху [53].

Образцы грунта отбирали из придонного слоя заполнения горшков толщиной 1–2 см. Пробы отбирали в поле, с соблюдением асептических условий. В лабораторию образцы доставлены в пластиковых пакетах и хранились при комнатной температуре. Липазную активность грунта определяли микропланшетным методом с использованием хромогенно меченных субстратов на основе п-нитрофенола и процедуры гетеромолекулярного обмена [54, 55]. Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку данных проводили с помощью построения кластеризованных тепловых карт [56].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассматриваемые 57 горшков были идентифицированы как «не пустые» среди 66 исследованных горшков. В этих горшках суммарная липазная активность составляла выше 7% от ее максимальной величины. При построении кластеризованной тепловой карты (рис. 1) для каждого «не пустого» горшка наибольшая активность липолитического фермента в ряду C4 — C8 — C12 — C14 — C16 — C18 принималась за 100%, остальные варианты рассчитывались. Кластеризация была проведена только в ряду погребальных горшков, тогда как ряд липолитических ферментов не группировался, с целью сохранения последовательности от C4 до C18.

Горшки 1 и 2 выделили в отдельную группу, где была обнаружена только активность липазы C16. Остальные варианты в пределах группы не давали значительного вклада в сумму липолитической активности.

На втором уровне горшки 3–57 образовали две большие подгруппы: горшки 3–25 с высокой активностью липаз C16 и C18 и горшки 26–57, где была выявлена высокая активность вариантов со

средней длиной жирнокислотной последовательности.

Подгруппа второго уровня 3–25 включала ряд погребальных горшков с наиболее высокой суммарной липолитической активностью. На третьем уровне кластеризации подгруппа 3–9 характеризовалась наибольшим вкладом липазы C16 в суммарную активность и заметным вкладом эстераз C4 и C8. Грунт из кружек № 5, 6 и 8 отличался пониженной активностью эстеразы C-4 по сравнению с остальными типами сосудов. Подгруппа третьего уровня 10–25 объединялась на основе максимальной активности липазы C-18. Здесь выделялись кувшинчик 10 и кружка 11 с высокой долей активности эстераз C4; кружки и миска 12–15 с низкой активностью всех вариантов липолитических ферментов, кроме C18; кувшины, кувшинчики и горшок 16–21 с повышенной активностью эстеразы C8 и четыре сосуда различного типа 22–25 с заметным увеличением активности C16.

Подгруппа второго уровня 26–57 включала варианты с меньшей суммарной липолитической активностью. Различия средних значений этого показателя между подгруппами 3–25 и 26–57 составляли 1.7 раза, а коэффициент вариации различался незначительно, составляя 65.6 и 66.3% для первой и второй подгрупп соответственно. В обеих подгруппах степень неоднородности уменьшалась по сравнению с их совокупностью, где коэффициент вариации суммарной активности составлял 72.8%.

На третьем уровне подгруппа 26–44 характеризовалась высокой активностью среднецепочечных вариантов C8–C14, а подгруппа 45–57 демонстрировала увеличение доли эстераз C4 и C8 в суммарной липолитической активности.

Подгруппа четвертого уровня 26–34, включающая посуду большинства представленных типов, отличалась минимальной активностью липазы C18, неоднородными показателями активности липазы C16 и высокой активностью вариантов C8–C14 с максимумом C12 (за исключением горшков 26 и 27 с максимумом C8).

Подгруппа четвертого уровня 5–44 показывала синхронное увеличение доли эстеразы C4 и липазы C18, которое сопровождалось заметным снижением вклада среднецепочечных вариантов C12 и C14.

Таким образом, в общей совокупности из 57 единиц посуды с предполагаемым исходным наличием жиросодержащей пищи было выделено несколько групп с различным соотношением активности липаз и эстераз. Варианты 12–25 с высокой активностью истинных липаз C18, на фоне относительно низких значений активности эстераз и липаз, предпочитающих субстраты со средней длиной жирнокислотной последовательности,

как правило, обладали наиболее высокой суммарной липолитической активностью. В этих вариантах погребальных сосудов, скорее всего, присутствовала пища с высоким содержанием бараньего жира. В процессе развития микробного сообщества в системе «пищевой продукт–почва», преимущество получали продуценты истинных липаз с высокой специфичностью к триглицеридам длинноцепочечных жирных кислот, составляющих наибольшую долю в составе жиров животного происхождения. При этом ингибирование естественной эстеразной активности микробного сообщества могло происходить за счет высоких концентраций этих жирных кислот [36, 57]. Варианты 35–44, где активность липазы C18 в большинстве случаев была сопоставима с активностью C12 и C8 и, в ряде случаев – с активностью C14 и C4, могут указывать на меньшее содержание жира в пищевом продукте.

Варианты 45–57 с низкой активностью истинных липаз и максимальной долей эстераз, как правило, отличались меньшими значениями суммарной липолитической активности по сравнению с вариантами 35–44. Исключение составлял горшок 52 из курганного могильника Литвиновский, с экстремально высокой активностью липолитического комплекса. В этом горшке исходное наличие жирной пищи не вызывает сомнений и подтверждается высокой численностью липолитических микроорганизмов в грунте заполнения. Остальные горшки рассматриваемой группы могли содержать пищу с низким содержанием жира. Таким образом, высокая активность эстераз в этих горшках, вероятнее всего, является показателем высокой биологической активности грунта заполнения.

Наиболее сложным для интерпретации случаев представляется максимальный вклад липаз со средней длиной жирнокислотной последовательности в суммарную липолитическую активность. Варианты 26–34 с низкой активностью истинных липаз и, в большинстве случаев, с низкой активностью эстераз, теоретически могли содержать субстрат, насыщенный остатками лауриновой и миристиновой жирных кислот C12 и C14. Их доля достаточно высока в молочном жире, однако для лауриновой кислоты она составляет всего 2.7%, что почти на порядок меньше по сравнению с пальмитиновой кислотой C16. В тоже время содержание в молочном жире миристиновой кислоты C14 близко к содержанию стеариновой кислоты C18 и составляет около 10%. Таким образом, молочный жир с большей вероятностью присутствовал не в сосудах подгруппы 26–34, а в сосудах подгруппы 3–9, с максимальной активностью липазы C16 и отсутствием видимых признаков ингибирования микробных эстераз. Последний факт косвенно свидетельствует о наличии достаточного количества белка в молочном

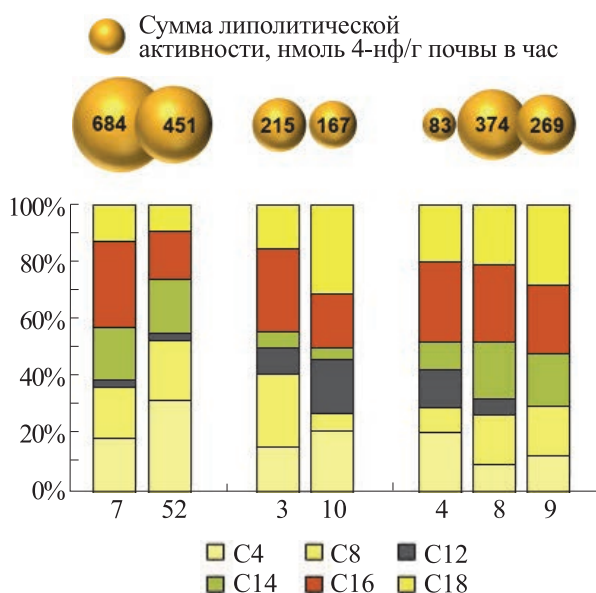


Рис. 2. Сумма и соотношение активности липолитических ферментов в грунте со дна некоторых горшков из древних погребений (номера соответствуют номерам на рис. 1). Образцы 7, 52 – горшки из погребений 9 и 10 первого кургана в составе могильника эпохи бронзы «Литвиновский-III». Образцы 3 и 10 – из миски и кувшинчика детского погребения 1355; образцы 4, 8 и 9 – кувшин, кружка и кувшин-подношение из семейного погребения 1452 курганного могильника аланской культуры «Братские Первые курганы».

продукте. Необходимо отметить, что из грунта со дна сосудов подгруппы 3–9, за исключением образца 5, были выделены культуры бацилл, способные к сбраживанию молока.

В большинстве сложно интерпретируемых вариантов 26–34 липаза C16 проявляла заметную активность, однако меньшую по сравнению с липазой C12. Кроме того, здесь имело место ингибирование эстеразной активности микробного сообщества, что может объясняться значительной концентрацией длинноцепочечных жирных кислот в составе субстрата. Не исключено, что в сосудах группы 26–34 также мог присутствовать молочный жир, но более концентрированный по сравнению с вариантами 3–9. Максимальная активность липаз C12 в данном случае может быть связана с особенностями микробного сообщества, где преимущество получают определенные группы микроорганизмов, вырабатывающие липазу именно с такими свойствами. Как было показано выше, некоторые микробные липолитические ферменты (а также их группы), способные к расщеплению широкого спектра субстратов, хотя в целом уменьшают свою активность при увеличении длины жирнокислотной цепи, однако проявляют более высокую [27] или даже мак-

симальную [28] активность по отношению к остатку лауриновой кислоты C12.

Таким образом, в результате кластерного анализа активности липолитических ферментов в грунте со дна горшков из древних погребений были выявлены варианты с различным соотношением эстераз и липаз. Две группы горшков – 12–25 и 26–34 – демонстрировали ингибирование эстеразной активности микробного сообщества на фоне максимальной активности липаз C18 и C12, что может свидетельствовать о наличии продукта с высоким содержанием жира и низким содержанием белка.

В грунтах на дне остальных горшков была выявлена заметная эстеразная активность, что свидетельствует об относительно благополучии микробного сообщества почвы, смешанной с другими пищевыми субстратами. Как мы полагаем, эти субстраты с наибольшей вероятностью могли содержать бараний жир (варианты 35–44), молочный жир (варианты 3–9) или незначительное количество жира (варианты 45–57).

В горшках из близких погребений 9 и 10 первого кургана могильника «Литвиновский III» (рис. 2) была отмечена предельно высокая суммарная липолитическая активность грунта. В образце с максимальной суммарной активностью активность эстераз C4 и C8 составляла 37%, а активность истинных липаз C16 и C18 – 42%. Другой образец показывал значительно большую долю активности эстераз – 53%, причем активность истинных липаз в сумме составляла всего 26%. Миска и кувшинчик из детского погребения 1355 курганного могильника «Братские Первые курганы» значительно различались по соотношению липаз и эстераз. В грунте из миски была выявлена высокая доля активности эстераз – более 40% от суммы, а также максимальный вклад активности липазы C16. В грунте из кувшинчика активность эстераз не превышала 30% от суммарной активности, а наибольшей активностью отличалась липаза C-18.

Кувшин и кружка, принадлежавшие женщине из семейного погребения 1452 могильника «Братские Первые курганы», а также кувшин-подношение, найденный у входа этого катакомбного погребения, имели свои особенности в соотношении активности липолитических ферментов. Наименьшей суммарной активностью и наибольшей долей активности эстеразы C4 отличался грунт из кувшина. Грунт из кружки обладал максимальной липолитической активностью среди всех изученных сосудов аланской культуры. Здесь при близком соотношении активности истинных липаз уменьшалась доля активности липолитических ферментов C4 и C12 и увеличивалась доля активности ферментов C8 и C14. В грунте из кувшина-подношения не выявлялась активность ли-

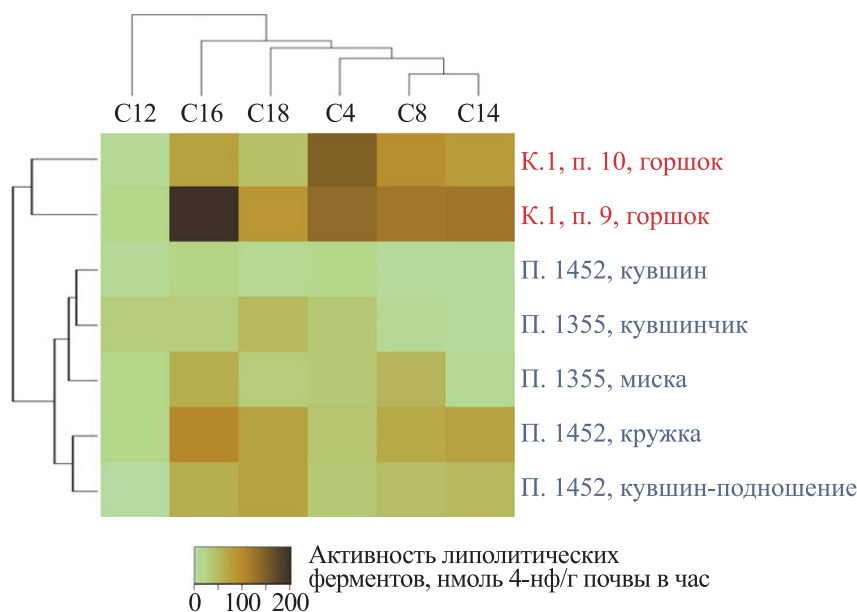


Рис. 3. Кластеризованная тепловая карта активности липолитических ферментов в почве со дна некоторых сосудов из древних погребений. Красным цветом обозначены сосуды из курганного могильника «Литвиновский-III» (эпоха бронзы), синим — «Братские Первые курганы» (аланская культура).

пазы C12. По соотношению активности остальных ферментов этот кувшин имел максимальное сходство с кружкой внутри погребения, за исключением более высокой активности липазы C18. Посуда из погребения 1452 входит в одну группу (рис. 1), где предполагается исходное присутствие молочного жира. При этом кувшин-подношение 9 и детская миска 10 из соседней группы начинают ряд с максимальной активностью липазы C18. Из грунта сосудов аланской культуры (рис. 2) выделены бактерии, способные к сбраживанию молока.

Для этой же группы сосудов показано значительное отставание активности липазы C12 от остальных липолитических ферментов (рис. 3) и группировка большей части сосудов по погребениям, за исключением женского кувшина из погребения 1452, имеющего наиболее близкое сходство с детским кувшинчиком из погребения 1355 по низкой активности эстеразы C8 и липазы C14.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате кластерного анализа липолитической активности в почве дна горшков из древних погребений были выявлены варианты с различным соотношением эстераз и липаз. Две группы горшков показывали предельно низкие значения эстеразной активности почвенного микробного сообщества на фоне максимальной активности липаз C18 и C12, что может быть связано с ингибированием эстераз в присутствии высоких концентраций жирных кислот. В трех группах горш-

ков наблюдалась эстеразная активность на фоне высокой относительной активности липаз C16, средней относительной активности липаз C18 и предельно низкой активности истинных липаз. Группировка горшков по соотношению липазной и эстеразной активности отражает характеристики их исходного содержимого, тогда как абсолютные значения активности ферментов, среди избранной посуды с наибольшей суммарной липолитической активностью, могут быть сгруппированы в соответствии с типом погребения. Таким образом, оценка баланса липазной и эстеразной активности дает полезную информацию для реконструкции исходного содержания пищи в погребальных сосудах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарности археологу В.Ю. Малашеву (Институт археологии РАН, Москва) за предоставленные образцы выборки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-28-01725 «Почвенно-микробиологические, энзимологические и молекулярно-биологические подходы к идентификации пищи в сосудах из погребений», рук. Н.Н. Каширская).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. P. Evershed, *Archaeometry*, **50**, 895 (2008). DOI: 10.1111/j.1475-4754.2008.00446.x
2. L. J. Cramp, I. D. Bull, E. Casanova, et al., in *Lipids in Archaeology. Handbook of Archaeological Sciences* (2023)., V. 1, p. 529
3. A. Irto, G. Micalizzi, C. Bretti, et al., *Molecules*, **27** (11), 3451 (2022).
4. M. S. Copley, F. A. Hansel, K. Sadr, and R. P. Evershed, *South Afr. J. Sci.*, **100** (5), 279 (2004).
5. R. P. Evershed, S. N. Dudd, M. S. Copley, et al., *Accounts Chem. Res.*, **35** (8), 660 (2002).
6. S. Hammann, D. J. Scurr, M. R. Alexander, and L. J. Cramp, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **117** (26), 14688 (2020).
7. M. P. Colombini, F. Modugno, and E. Ribechini, *J. Mass Spectrometry*, **40** (7), 890 (2005).
8. M. Bondetti, et al., *Archaeometry*, **63** (3), 594 (2021).
9. M. S. Copley, P. J. Rose, A. Clapham, et al., *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.*, **268** (1467), 593 (2001).
10. R. Sacchi, et al., *Science of Food*, **4** (1), 19 (2020).
11. S. N. Dudd, R. P. Evershed, and A. M. Gibson, *J. Archaeol. Sci.*, **26** (12), 1473 (1999).
12. E. Casanova, T. D. Knowles, C. Ford, et al., *Radiocarbon*, **62** (6), 1679 (2020).
13. Н. Н. Каширская, Л. Н. Плеханова, С. Н. Удальцов и др., *Биофизика*, **62** (6), 1235 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917060094
14. Н. Н. Каширская, Л. Н. Плеханова, Е. В. Чернышева и др., *Почвоведение*, № 1, 89 (2020). DOI: 10.1134/S0032180X20010098.
15. M. W. I. Schmidt, M. S. Torn, S. Abiven, et al., *Nature*, **478**, 49 (2011).
16. В. М. Семенов, А. С. Тулина, Н. А. Семенова и Л. А. Иванникова, *Почвоведение*, № 4, 393 (2013). DOI: 10.7868/S0032180X13040114
17. M. Von Lützow, I. Kögel-Knabner, B. Ludwig, et al., *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **171**, 111 (2008).
18. В. А. Намиот, А. В. Батыновский, И. В. Филатов и др., *Биофизика*, **61** (1), 54 (2016).
19. Е. В. Чернышева, М. А. Амирян, М. В. Ельцов и др., *Ethnography*, **18** (4), 993 (2022).
20. Е. В. Чернышева, Н. Н. Каширская и К. С. Душанова, *Вестн. археологии, антропологии и этнографии*, № 2 (61), 113 (2023).
21. L. Casas-Godoy, S. Duquesne, F. Bordes, et al., *Methods Mol. Biol.*, **861**, 3 (2012). DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_1
22. А. М. Безбородов и Н. А. Загустина, *Прикладная биохимия и микробиология*, **50** (4), 347 (2014).
23. F. Akram, A. S. Mir, and A. Roohi, *Mol. Biotechnol.*, **65**, 521 (2023). DOI: 10.1007/s12033-022-00592-z
24. T. C. A. Hitch and T. Clavel, *PeerJ.*, **7**, e7249 (2019). DOI: 10.7717/peerj.7249
25. В. С. Гамаюрова, К. Л. Шнайдер и М. Е. Зиновьева, *Вестн. Казанского технологич. ун-та*, **17** (24), 175 (2014).
26. A. Glogauer, V. P. Martini, H. Faoro, *Microb. Cell Fact.*, **10**, 54 (2011). DOI: 10.1186/1475-2859-10-54
27. P. Tirawongsaroj, R. Sriprang, P. Harnpicharnchai, et al., *J. Biotechnol.*, **133** (1), 42 (2008). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.08.046
28. M. Parapouli, A. Foukis, P. Y. Stergiou, et al., *J. Biol. Res.-Thessaloniki*, **25**, 4 (2018). DOI: 10.1186/s40709-018-0074-6
29. 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
30. Н. Н. Каширская, Е. В. Чернышева и В. Ю. Малашев, *История, археология и этнография Кавказа*, **19** (1), 150 (2023).
31. Т. Э. Хомутова, Т. С. Демкина, А. В. Борисов и Н. И. Шишлина, *Почвоведение*, № 2, 239 (2017). DOI: 10.7868/S0032180X1702006X
32. Л. Н. Плеханова, С. Н. Удальцов, А. С. Сыроватко и Н. Н. Каширская, *Биофизика*, **68** (5), 999 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923050204
33. L. N. Plekhanova, in *Proc. 19th Int. Multidisc. Sci. Geoc. conf. SGEM 2018*, **18** (5.2), 173 (2018). DOI: 10.5593/sgem2018/5.2/S20.023
34. T. E. Khomutova and A. V. Borisov, *J. Arid Environ.*, **171**, 104004 (2019). DOI: 10.1016/j.jaridenv.2019.104004
35. В. А. Демкин, Т. С. Демкина и С. Н. Удальцов, *Вестн. археологии, антропологии и этнографии*, № 2 (25), 148 (2014).
36. C. Ruiz, S. Falcocchio, E. Xoxi, et al., *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*, **1672** (3), 184 (2004).
37. J. L. Smith and J. A. Alford, *Appl. Microbiol.*, **14** (5), 699 (1966).
38. P. Nobmann, A. Smith, J. Dunne, et al., *Int. J. Food Microb.*, **128** (3), 440 (2009).
39. C. Q. Sun, C. J. O'Connor, and A. M. Robertson, *Chem.-biol. Interactions*, **140** (2), 185 (2002).
40. C. Zhong, N. Zhu, Y. Zhu, et al., *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, **141**, 105123 (2020).
41. K. Sugimoto, H. Tanaka, R. Moriyama, *Biocontrol Sci.*, **3** (1), 17 (1998).
42. J. Lalman and D. M. Bagley, *Water Res.*, **36** (13), 3307 (2002).
43. C. S. Hwu, S. K. Tseng, C. Y. Yuan, et al., *Water Res.*, **32** (5), 1571 (1998).

44. J. Palatsi, M. Lauren, M. V. Andrés, et al., *Bioresource Technol.*, **100** (20), 4588 (2009).
45. M. A. Pereira, O. C. Pires, M. Mota, and M. M. Alves, *Biotechnology Bioengineering*, **92** (1), 15 (2005).
46. J. Palatsi, M. Viñas, M. Guivernau, *Bioresource Technol.*, **102** (3), 2219 (2011).
47. S. M. Iskander, Y. M. Amha, P. Wang, et al., *Front. Bioengineering Biotechnol.*, **9**, 613626 (2021).
48. Z. Guo, M. Usman, S. A. Alsareii, et al., *Bioresource Technol.*, **337**, 125383 (2021).
49. H. Wang, Q. Yan, X. Zhong, et al., *Bioresource Technol.*, **386**, 129538 (2023).
50. S. Amir, G. Merlina, E. Pinelli, et al., *J. Hazardous Mater.*, **159** (2–3), 593 (2008).
51. R. Gaur, R. Hemamalini, and S. Khare, in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Ed. by A. N. S. Pandey and C. R. Soccol (Elsevier, 2017), p. 175.
52. В. Ю. Малашев, Р. Г. Магомедов, Ф. С. Дзуцев и др., *Археологические открытия*, **2018**, 342 (2020).
53. Д. С. Коробов, В. Ю. Малашев, и Й. Фассбиндер, *Краткие сообщения Института археологии*, № 260, 441 (2020).
54. A. Cowie, V. E. Lonergan, F. S. M. Rabbi, et al., *Soil Res.*, **51**, 707 (2013). DOI: 10.1071/SR13043
55. A. J. Margenot, Y. Nakayama, and S. J. Parikh, *Soil Biol. Biochem.*, **125**, 350 (2018). DOI: 10.1016/j.soilbio.2017.11.006
56. S. Zhao, Y. Guo, Q. Sheng, and Y. Shyr, *BioMed Res. Int.*, **2014**, 986048 (2014). DOI: 10.1155/2014/986048
57. Д. А. Белинская и Н. В. Гончаров, *Биоорганическая химия*, **46** (3), 247 (2020). DOI: 10.31857/S0132342320030045

Lipase and Esterase Activity in Soils from Ancient Burial Vessels

N.N. Kashirskaya*, E.V. Chernysheva*, S.N. Udaltsov*, and L.N. Plekhanov*

**Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

The activity of lipolytic enzymes was assessed using the microplate method using heteromolecular exchange in soils from the bottom of burial vessels, followed by cluster analysis. Groups with a contrasting ratio of lipases C12 – C18 and esterases C4 – C8 were identified in a sample that included 57 burial pots aged two to three thousand years. The total lipolytic activity of soil samples from dishes with the presumptive initial presence of fat-containing food products was above 6% of the maximum value within the sample. Inhibition of esterases in the presence of high concentrations of fatty acids is reflected in the extremely low relative values of esterase activity of the soil microbial community against the background of maximum activity levels of C18 and C12 lipases in two groups of pots. In three groups, esterase activity was observed against the background of high relative activity of C16 lipases, average relative activity of C18 lipases and extremely low activity of true lipases. In the group of pots with high total lipolytic activity (with the exception of certain extreme values of this indicator), the proportion of true lipase activity was 1.7–1.8 times higher compared to the proportion of esterase activity. The grouping of burial vessels by the ratio of lipase and esterase activity reflects the characteristics of the funeral food, while the absolute values of enzyme activity among selected vessels with the highest total lipolytic activity are grouped according to the type of burial.

Keywords: lipolytic enzymes, lipase, esterase, fatty acids, funerary vessels, dishes, pots, funeral food, ancient food, Bronze Age, early Iron Age

ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ КИСЛОРОДА ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ОТ СТЕПЕНИ ИХ КЛАСТЕРИЗАЦИИ В СЛАДЖИ

© 2023 г. И.А. Пономарев*, **, Г.Т. Гурия*, **, #

*Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России,
Новый Зыковский проезд, 4, Москва, 125167, Россия

**Московский физико-технический институт,
Институтский пер., 9, Долгопрудный, Московская обл., 141700, Россия

#E-mail: guria@blood.ru

Поступила в редакцию 26.04.2023 г.

После доработки 26.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Режимы прохождения эритроцитов по микрососудам определяют эффективность транспорта кислорода. В рамках представлений об упаковке эритроцитов в сладжи при прохождении ими микрососудов построена и исследована математическая модель переноса кислорода. Получено аналитическое выражение для зависимости интенсивности высвобождения кислорода от размера эритроцитарного сладжа. Найденное выражение носит инвариантный характер, не зависит от степени детализации описания изменений формы эритроцитов. Обсуждается возможное значение полученных результатов для развития методов экспресс-диагностики кислородтранспортной функции крови человека.

Ключевые слова: кислородтранспортная функция, эритроцитарный сладж, высвобождение кислорода, парашютообразный эритроцит, кластеризация.

DOI: 10.31857/S0006302923060121, EDN: ROWONW

Эритроциты — форменные элементы крови, играющие ключевую роль в транспорте кислорода к органам и тканям. В качестве переносчика кислорода выступает гемоглобин — белок, содержащийся в эритроцитах, способный существовать в двух формах: оксигенированной и деоксигенированной. Циркуляция кислорода в организме человека включает следующие стадии: на первой имеет место образование связей между молекулами кислорода и гемоглобина в легких; на второй — перенос эритроцитов, содержащих оксигенированный гемоглобин, с током крови к органам и тканям; а на третьей — высвобождение кислорода из эритроцитов при их деформации во время движения в микрососудах (капиллярах) [1]. Современные методы оценки снабжения кислородом организма, как правило, основаны на мониторинге первых двух стадий в транспорте кислорода — они позволяют измерять долю оксигенированного гемоглобина, фактически содержащегося в эритроцитах [2–4].

Вопросу о количестве кислорода, реально поступающего в единицу времени в органы и ткани,

уделяется внимание лишь в отдельных работах [5–7]. В настоящее время этот вопрос приобрел особую актуальность. Результаты целого ряда работ указывают на «наличие проблем» именно на третьей стадии транспорта кислорода [8–11]. Оказалось, что оксигенированный гемоглобин может содержаться в эритроцитах в достаточном количестве, однако при прохождении эритроцитов через микрососуды кислород из них не высвобождается [12, 13]. В таких ситуациях при нормальном уровне сатурации крови у пациентов проявляются отчетливые признаки кислородного голодания (даже асфиксии) [14, 15]. Выяснение причин такого рода эффектов стало особенно актуальным в связи с преодолением последствий пневмонии COVID-19.

В настоящей работе методами математического моделирования исследуются процессы, обусловленные изменением формы эритроцитов при их движении в микрососудах. В центре внимания находятся вопросы о высвобождении кислорода из деформированных эритроцитов при их прохождении через наиболее мелкие сосуды: микроартериолы и капилляры. Особое внимание уделяется процессам выделения кислорода из эритроцитов, сгруппированных в сладжи

Сокращения: РОЭ — реакция оседания эритроцитов, COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года

(внутрисосудистые агрегаты из нескольких эритроцитов [16, 17]).

Показано, что интенсивность высвобождения кислорода из эритроцитов снижается тем сильнее, чем крупнее по размеру сладж, в который они входят. Удалось получить явное выражение для зависимости интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов от степени их кластеризации в сладжи (см. формулу (12)). Обсуждаются перспективы создания диагностического метода, основанного на *in vivo* регистрации сладжей, который в оперативном отношении будет более информативным, чем традиционные *in vitro* методы, используемые для оценки состояния кислородтранспортной функции крови.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

В работе рассматривается движение эритроцитов в микрососудах, имеющих диаметр меньший, чем размер нативных эритроцитов в крупных сосудах. Проникновение эритроцитов в микрососуды, в том числе в капилляры, связано с их деформацией. Форма движущихся в микрососудах эритроцитов может существенно видоизменяться в зависимости от объема эритроцита (V), поверхности мембраны (S), а также радиуса микрососуда (R_c) [18, 19]. Движение крови в крупных сосудах принято трактовать как массоперенос гомогенной суспензии, состоящей из плазмы и находящихся в ней клеток (эритроцитов, тромбоцитов и т.д.). В микрососудах же существенную роль в динамике компонентов крови играет гетерогенность: как отдельные, так и сгруппированные в кластеры эритроциты (сладжи) перемещаются под действием сил, действующих на них со стороны плазмы. В данной работе полагалось, что эритроциты способны изменять свою форму при перемещении в микрососудах.

Как известно, изменение формы эритроцита, его деформация (см. рис. 1), происходящая в микрососудах, сопровождается десорбцией кислорода из молекул гемоглобина [20, 21]. Кислород, высвободившийся в результате деформации эритроцита, способен диффундировать через мембрану эритроцита в окружающую плазму. При этом скорость высвобождения кислорода из деформированных эритроцитов полагается прямо пропорциональной площади их мембраны, непосредственно находящейся в контакте с плазмой крови.

Из качественных соображений понятно, что при кластеризации отдельных эритроцитов в сладжи величина поверхности мембраны, непосредственно находящейся в контакте с плазмой крови, заведомо меньше суммарной поверхности всех входящих в сладжи эритроцитов. Вследствие этого интенсивность высвобождения кислорода

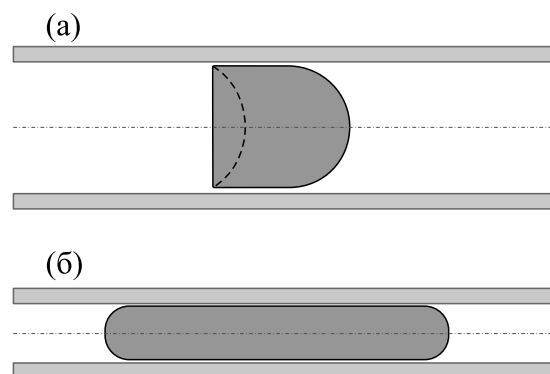


Рис. 1. Формы эритроцита при движении в микрососудах: (а) — парашютообразная форма; (б) — продолговатая форма, подобная «столбику».

из эритроцитов, входящих в сладжи, должна быть меньше, чем из эритроцитов, имеющих возможность отдельно перемещаться в капиллярах.

Целью развитого в настоящей работе подхода являлось нахождение явного выражения для зависимости интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов от степени их кластеризации в сладжи.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние формы эритроцита в микрососудах на транспорт кислорода. Транспорт свободного кислорода из эритроцита в окружающую плазму считался происходящим за счет пассивной диффузии. В силу этого поток кислорода из эритроцитарного сладжа (J) полагался пропорциональным произведению площади поверхности сладжа, непосредственно находящейся в контакте с плазмой крови, на соответствующую разность концентраций:

$$J \propto \Delta C \Sigma, \quad (1)$$

где Σ — площадь поверхности эритроцитарного сладжа; ΔC — разность концентраций кислорода внутри эритроцитов и в омывающей сладж плазме.

Полагалось, что эритроциты, как в крупных сосудах, так и в капиллярах обладают аксиальной симметрией, имеют поперечное круговое сечение радиуса r и длину L . При движении в мелких сосудах и капиллярах передняя и задняя поверхности эритроцитов имеют, вообще говоря, отличную от нуля кривизну. Однако сначала рассмотрим простейший цилиндрический случай (будем схематически рассматривать эритроцит в простейшем «цилиндрическом» приближении), когда величины L и r считались связанными с объемом отдельного эритроцита V и его поверхностью S следующим образом:

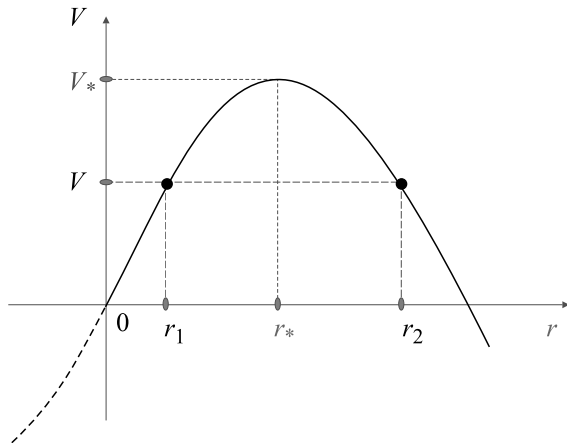


Рис. 2. Кубическая кривая соответствует правой части уравнения (4), где r — радиус эритроцита, V — объем эритроцита; V_* и r_* — критические значения объема и радиуса; r_1 и r_2 — два значения радиуса, которые может иметь эритроцит при объеме V . При $V > V_*$ уравнение (4) не имеет решений при $r > 0$. При $V < V_*$ существуют два решения. Первое из них (r_1) соответствует случаю столбика. Второе решение (r_2) соответствует случаю «монетки».

$$S = 2\pi r^2 + 2\pi rL, \quad (2)$$

$$V = \pi r^2 L. \quad (3)$$

Стоит отметить, что система уравнений (2) и (3) при заданных значениях V и S неоднозначно разрешима относительно величин r и L . Действительно, выражая переменную L из уравнения (2) и подставляя найденное выражение в уравнение (3), получим кубическое относительно величины уравнение:

$$V = \frac{1}{2} S \cdot r - \pi \cdot r^3. \quad (4)$$

Уравнение (4) при заданных значениях V и S допускает графическое решение (см. рис. 2).

Из рис. 2 видно, что в тех случаях, когда объем эритроцита V меньше некоторого критического значения V_* ($0 < V < V_*$), уравнение (4) допускает два положительных решения r_1 и r_2 . Величина V_* определяется следующим выражением:

$$V_* = S^{3/2} \cdot \frac{1}{3\sqrt{6\pi}}. \quad (5)$$

Значения r_1 и r_2 находятся по известным формулам [22]:

$$r_1 = 2\sqrt[3]{\frac{V_*}{2\pi}} \cdot \cos((\varphi/3) - (2\pi/3)), \quad (6)$$

$$r_2 = 2\sqrt[3]{\frac{V_*}{2\pi}} \cdot \cos(\varphi/3), \quad (7)$$

где $\varphi = \arccos(-V/V_*)$. (Здесь приводятся только два положительных корня уравнения (4). Отрицательный корень:

$$r_3 = 2\sqrt[3]{\frac{V_*}{2\pi}} \cdot \cos((\varphi/3) + (2\pi/3))$$

не имеет физического смысла, поскольку радиус не может принимать отрицательные значения.)

В соответствии с уравнением (4) большему по величине корню $r = r_2$ соответствует меньшая длина $L_2 = V/\pi r_2^2$, а меньшему $r = r_1$ — большая длина $L_1 = V/\pi r_1^2$. Решение с большим радиусом ($r = r_2$) ассоциируется с «монеткой», а решение с меньшим радиусом ($r = r_1$) — со «столбиком» (см. рис. 16).

Отметим, что состояния эритроцита в форме монетки и столбика различаются по энергии, необходимой для деформации мембраны. Действительно, легко найти, что энергия (E), связанная с искривлением мембраны эритроцита, задается следующим выражением [23]:

$$E \sim \oint_S \chi^2 dA \sim \left(\frac{1}{r}\right)^2 \cdot 2\pi rL \sim \frac{L}{r} \sim \frac{1}{r^3} \quad (8)$$

где χ обозначает локальную кривизну поверхности мембраны эритроцита, а S — полную поверхность эритроцита.

Выражение (8) показывает, что при отсутствии стерических ограничений эритроциту, имеющему объем V и площадь поверхности S , «энергетически» должно быть выгоднее находиться в состоянии с большим радиусом ($r = r_2$), то есть в форме «монетки», а не в форме вытянутого столбика ($r = r_1$).

При проникновении в микрососуд под действием внешних сил эритроцит способен менять свою форму. Если радиус эритроцита в состоянии типа «столбика» — r_1 оказывается больше, чем размер микрососуда R_c , то по стерическим причинам такой эритроцит не способен проникнуть в данный микрососуд. Другими словами, необходимое условие протекания микрососуда с радиусом R_c эритроцитами с заданным объемом V и площадью S имеет вид:

$$r_1(V, S) \leq R_c, \quad (9)$$

где $r_1(V, S)$ есть меньший из положительных корней уравнения (4), который определяется уравнением (6).

При выполнении условия (9) эритроциты в принципе способны проходить через капилляр. При этом они могут следовать в капилляре как поштучно, так и «паровозиком», сцепившись в сладжи (см. Приложение). Поскольку интенсивность кислородного транспорта из каждого эритро-

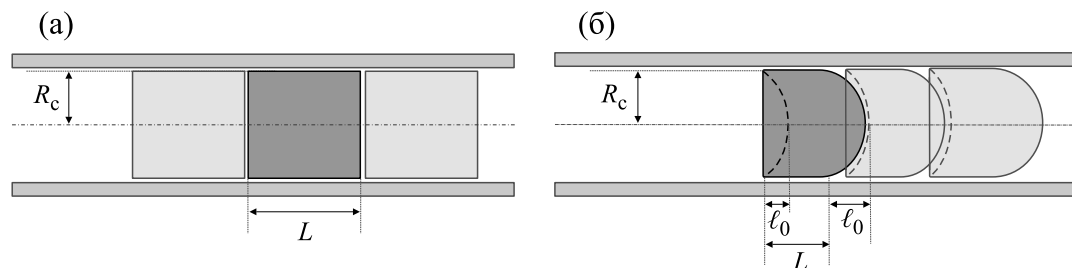


Рис. 3. Схематическое представление эритроцитов в микрососуде, где R_c — радиус микрососуда; L — длина эритроцитарного сладжа: (а) — простое цилиндрическое приближение; (б) — цилиндрическое приближение с аппроксимацией переднего и заднего торцов сферическими сегментами, где ℓ_0 — высота сферического сегмента.

роцита определяется долей площади его мембраны, непосредственно находящейся в контакте с плазмой крови, представляет интерес сравнить режимы поштучного и кластеризованного в сладжи движения эритроцитов в микрососудах.

Несложно показать, что в рассматриваемом «цилиндрическом» приближении контактирующая с плазмой поверхность каждого из отдельно следующих эритроцитов дается следующим выражением:

$$\Sigma_1 = 2\pi r_1^2 + 2\pi r_1 L_1. \quad (10)$$

При этом для N эритроцитов, следующих через капилляр в составе одного сладжа, общая величина контактирующей с плазмой поверхности дается выражением:

$$\Sigma_N = 2\pi r_1^2 + N2\pi r_1 L_1. \quad (11)$$

При выполнении условия (9) из выражений (10) и (11) для отношения потока кислорода J_N из сладжа, содержащего N эритроцитов, к суммарному потоку из N уединенно следующих в капилляре эритроцитов, несложно получить:

$$\frac{J_N}{N \cdot J_1} = \frac{\varepsilon}{\varepsilon + 1} + \left(\frac{1}{\varepsilon + 1} \right) \cdot \frac{1}{N}, \quad (12)$$

где через J_1 обозначается поток кислорода из уединенно следующего эритроцита. Для величины ε использовано обозначение:

$$\varepsilon = L_1/r_1. \quad (13)$$

Так как $r_1 (V, S) \leq R_c$, для получения мажоритарных оценок параметр ε вычислялся при $r_1 = R_c$.

Полученное выражение (12) показывает, что при схематическом представлении эритроцитов в использованном «цилиндрическом» приближении (см. рис. 3а) интенсивность высвобождения кислорода из эритроцита должна убывать обратно пропорционально размеру сладжа (N), в который входит данный эритроцит.

Следует заметить, что выражение (12) было получено при допущении, что передний и задний цилиндрические торцы являются плоскими. В

этой связи представлялось необходимым изучить влияние искривленности передней и задней частей эритроцитов на интенсивность высвобождения кислорода из эритроцитов при их «протискивании» через микрососуды. Такой формы эритроциты с закругленными передними и задними частями часто наблюдаются в экспериментах [24–26]. При этом у имеющих парашютообразную форму эритроцитов передняя часть, как правило, является выпуклой, а задняя — вогнутой (см. рис. 3б).

Выяснилось (см. Приложение), что и при учете кривизны передней и задней поверхностей отношение потока кислорода из сладжей к суммарному потоку из того же числа уединенно следующих эритроцитов задается выражением, аналогичным уравнению (12), в котором вместо параметра ε фигурирует параметр $\tilde{\varepsilon}$. Величина параметра $\tilde{\varepsilon}$ при аппроксимации переднего и заднего торцов эритроцитов сферическими сегментами (см. рис. 3б) легко находится:

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon / (1 + \tilde{\ell}_0^2), \quad (14)$$

где $\tilde{\ell}_0 = \ell_0/R_c$; $\tilde{\ell}_0$ — отношение «высоты сферического сегмента» ℓ_0 к радиусу сосуда R_c (рис. 3б).

Помимо формы эритроцитов, аппроксимируемой с помощью сферических выпукло-вогнутых торцевых сегментов, удалось рассмотреть и несколько иных вариантов. При учете геометрических особенностей искривленности передней и задней поверхностей выяснилось, что во всех рассмотренных случаях отношение потока кислорода из сладжей к суммарному потоку из соответствующего числа уединенно следующих эритроцитов дается выражением типа (12), в котором в качестве параметра ε фигурирует модифицированная должным образом величина $\tilde{\varepsilon}$ (см. Приложение).

ДИСКУССИЯ

Зависимость интенсивности высвобождения кислорода от степени сладжированности, на-

сколько известно авторам, до настоящего времени не анализировалась теоретически. Полученная в настоящей работе при ряде упрощающих допущений формула (12) исходно представлялась недостаточно робастной. Однако анализ, проведенный для ряда реалистичных форм эритроцитов, показал, что связь между интенсивностью высвобождения кислорода из эритроцитов, входящих в сладжи, и размером сладжей во всех рассмотренных случаях задается выражениями по своей математической структуре изоморфными выражению (12) (см. Приложение). При этом выяснилось, что в качестве параметра ε фигурируют величины, отображающие отношение эффективной длины эритроцита (с учетом кривизны его торцов), к радиусу микрососуда. В этом смысле по своей структуре выражение (12), полученное в настоящей работе, представляется если не универсальным, то достаточно общим.

При описании высвобождения кислорода из эритроцитов мы, ради простоты, полагали этот процесс диффузионно лимитированным (см. формулу (1)). Вклад эффектов, связанных с выходом воды из деформируемых эритроцитов, явно не рассматривался. Однако такого рода эффекты при фильтруемости эритроцитов через микрососуды в принципе могут вносить определенный вклад в перенос кислорода. Для анализа эффектов, связанных с выходом воды и растворенного в ней кислорода из эритроцитов, необходимо скорректировать выражение (1), добавив в его правую часть конвективный член:

$$J \propto (D\Delta C + vC) \cdot \Sigma, \quad (15)$$

где Σ — площадь поверхности эритроцитарного сладжа, находящаяся в непосредственном контакте с плазмой; ΔC — разность концентраций кислорода внутри эритроцитов и в омывающей сладж плазме; D — коэффициент диффузии кислорода; C — концентрация кислорода; v — скорость выхода воды через мембрану эритроцита.

Сравнение выражений (1) и (15) показывает, что в обоих случаях площадь поверхности эритроцитов (Σ), находящаяся в непосредственном контакте с плазмой крови, мультипликативно входит в оба выражения. Это значит, что и при дополнительном учете эффектов, связанных с выходом воды из эритроцитов, общее уменьшение поверхности при их кластеризации в сладжи оказывает на интенсивность высвобождения кислорода точно такое же влияние, как и в случае только «диффузионного» транспорта. Другими словами, выражение (12) и его аналоги (см. Приложение) должны оставаться справедливыми и при учете конвективного массопереноса кислорода через мембрану эритроцитов при движении последних в микрососудах.

Вопрос об условиях, при которых перемещающиеся в микрососудах эритроциты способны к

агрегации в сладжи, требует дальнейшего изучения. В настоящее время в диагностических целях широко используется тест РОЭ (реакции оседания эритроцитов), отображающий быстроту оседания эритроцитов в цельной донорской крови *in vitro*. Исследования показали, что реакция оседания эритроцитов в цельной крови *in vitro* носит двухфазный характер. Она начинается с первой быстрой фазы формирования макроскопически протяженных «монетных столбиков», состоящих из агрегированных эритроцитов [27, 28]. За первой следует вторая, медленная фаза — разрушение указанных «столбиков» в поле силы тяжести, что приводит к расслоению крови на эритроцитарный концентрат и надосадок, состоящий из плазмы. По скорости движения границы эритроцитарного концентрата при фракционировании цельной крови в поле тяжести принято судить о степени развития патологических состояний.

В этой связи представляется, что явление кластеризации эритроцитов в микрососудах естественно трактовать как начальную фазу образования «монетных столбиков» в условиях *in vivo* [29]. Если это предположение верно, то методы регистрации процессов образования сладжей *in vivo* должны представлять не меньшую диагностическую ценность для практических целей, чем тесты РОЭ *in vitro*. Из полученных в настоящей работе результатов следует, что средняя величина сладжей может представлять интерес не только как мера, оперативно характеризующая скорость реакций формирования монетных столбиков в условиях *in vivo*, но и как показатель существенно определяющий уровень падения интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов. Действительно, из формулы (12) следует, что информация об изменении во времени средней степени сладжированности эритроцитов при их «протискивании» через микрососуды может быть использована для оценки падения интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов.

Снижение эффективной кислородтранспортной функции относится к числу нежелательных последствий эффектов, вызываемых сладжированием эритроцитов в кровотоке. Физиологические и патологические воздействия на организм человека, приводящие к появлению сладжей, подробно изучаются [30–32], в том числе с использованием методов капилляроскопии и оптических методов [33, 34]. Привлекательность методов детектирования сладжей в системах *in vivo* определяется простотой и оперативностью их выполнения [35, 36]. На проведение указанных тестов требуются минуты, а не часы, как в случае с проведением РОЭ. Детектирование повышенной степени сладжированности эритроцитов в микрососудах может рассматриваться как ранний индикатор развития нежелательных патологий. В этой связи полученные в работе выражения (12) и

(13) позволяют судить о степени «грубости» нарушений кислородтранспортной функции в организме по среднему размеру сладжей, перемещающихся в микрососудах.

Можно предположить, что использование методики для *in vivo* регистрации сладжей позволит создать в будущем диагностический метод в оперативном отношении более информативный, чем традиционно используемые *in vitro* методы, основанные на исследовании РОЭ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена в НМИЦ гематологии МЗ РФ. Авторы благодарят сотрудников лаборатории математического моделирования биологических процессов за плодотворные дискуссии и ценные замечания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Wang and A. S. Popel, *Math Biosci.*, **116** (1), 89 (1993). DOI: 10.1016/0025-5564(93)90062-f
2. E. Ortiz-Prado, J. F. Dunn, J. Vasconez, et al., *Am. J. Blood Res.*, **9** (1), 1 (2019).
3. A. Sircan-Kucuksayan, M. Uyuklu, and M. Canpolat, *Physiol. Meas.*, **36**, 2461 (2015). DOI: 10.1088/0967-3334/36/12/2461
4. A. M. Pilotto, A. Adami, R. Mazzolari, et al., *J. Physiol.*, **600** (18), 4153 (2022). DOI: 10.1113/JP283267
5. N. Tateishi, N. Maeda, and T. Shiga, *Circ. Res.*, **70** (4), 812 (1992). DOI: 10.1161/01.RES.70.4.812
6. A. G. Tsai, P. C. Johnson, and M. Intaglietta, *Physiol. Rev.*, **83**, 933 (2003). DOI: 10.1152/physrev.00034.2002
7. D. C. Poole, T. I. Musch, and T. D. Colburn, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **122**, 7 (2022). DOI: 10.1007/s00421-021-04854-7
8. H. Kohzuki, S. Sakata, Y. Ohga, et al., *Jap. J. Physiol.*, **50**, 167 (2000). DOI: 10.2170/jjphysiol.50.167
9. N. Tateishi, Y. Suzuki, I. Cicha, and N. Maeda, *Am. J. Physiol. — Heart and Circulatory Physiology*, **281**, H448 (2001). DOI: 10.1152/ajpheart.2001.281.1.H448
10. M. Uyuklu, H. J. Meiselman, and O. K. Baskurt, *Clin. Hemorheology and Microcirculation*, **41** (3), 179 (2009). DOI: 10.3233/CH-2009-1168
11. A. Semenov, A. Lugovtsov, P. Ermolinskiy, et al., *Photonics*, **9** (4), 1 (2022). DOI: 10.3390/photonics9040238
12. R. J. Tomanek, *Anatom. Record*, **305** (11), 3199 (2022). DOI: 10.1002/ar.24951
13. D. C. Poole and T. I. Musch, *Function*, **4** (3), zqad013 (2023). DOI: 10.1093/function/zqad013
14. A. Melkumyants, L. Buryachkovskaya, N. Lomakin, et al., *Thrombosis and Haemostasis*, **122** (01), 123 (2022). DOI: 10.1055/a-1551-9911
15. A. Gupta, M. V. Madhavan, K. Sehgal, et al., *Nature Medicine*, **26** (7), 1017 (2020). DOI: 10.1038/s41591-020-0968-3
16. S. Chien, in *The red blood cell*, Ed. by D. M. Surgenor (Acad. Press, London, New York, San Francisco, 1975), pp. 1031–1133.
17. A. N. Beris, J. S. Horner, S. Jariwala, et al., *Soft Matter*, **17** (47), 10591 (2021). DOI: 10.1039/D1SM01212F
18. D. A. Fedosov, M. Peltomäki, and G. Gompper, *Soft Matter*, **10**, 4258 (2014). DOI: 10.1039/C4SM00248B
19. N. Z. Piety, W. H. Reinhart, P. H. Pourreau, et al., *Transfusion*, **56**, 844 (2016). DOI: 10.1111/trf.13449
20. T. J. McMahon, *Front. Physiol.*, **10** (1417), 1 (2019). DOI: 10.3389/fphys.2019.01417
21. J. T. Celaya-Alcala, G. V. Lee, A. F. Smith, et al., *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **41** (3), 656 (2021). DOI: 10.1177/0271678X20927100
22. И. Н. Бронштейн и К. А. Семендяев, *Справочник по математике для инженеров и учащихся втузов*, (Совместное издание издательств «Тойбнер», Лейпциг, и «Наука», Москва, 1981), сс. 169–170.
23. P. B. Canham, *Journal of Theoretical Biology*, **26**, 61 (1970). DOI: 10.1016/S0022-5193(70)80032-7
24. T. Shiga, N. Maeda, and K. Kon, *Crit. Rev. in Oncology/Hematology*, **10** (1), 9 (1990). DOI: 10.1016/1040-8428(90)90020-S
25. T. Tajikawa, Y. Imamura, T. Ohno, et al., *J. Biorheology*, **27**, 1 (2013). DOI: 10.1007/s12573-012-0052-9
26. T. W. Secomb, *Annu. Rev. Fluid Mechanics*, **49**, 443 (2017). DOI: 10.1146/annurev-fluid-010816-060302
27. В. Л. Воейков, *Успехи физиол. наук*, **29**, 55 (1998).
28. A. Rabe, A. Kihm, A. Darras, et al., *Biomolecules*, **11**, 1 (2021). DOI: 10.3390/biom11050727
29. Yu. I. Gurfinkel, O. A. Korol, and G. E. Kufal, *SPIE*, **3260**, 232 (1998). DOI: 10.1117/12.307096
30. I. Cicha, Y. Suzuki, N. Tateishi, and N. Maeda, *Am. J. Physiol. — Heart and Circulatory Physiology*, **284** (6), H2335 (2003). DOI: 10.1152/ajpheart.01030.2002
31. Y. Arbel, S. Banai, J. Benhorin, et al., *Int. J. Cardiol.*, **154** (3), 322 (2012). DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.06.116
32. M. A. Elblbesy and M. E. Moustafa, *Int. J. Biomed. Sci.*, **13** (2), 113 (2017).
33. R. N. Pittman, *Microcirculation*, **20** (2), 117 (2013). DOI: 10.1111/micc.12017
34. A. E. Lugovtsov, Y. I. Gurfinkel, P. B. Ermolinskiy, et al., in *Biomedical Photonics for Diabetes Research*, Ed. by A. V. Dunaev and V. V. Tuchin (CRC Press, London, New York, 2023), pp. 57–79. DOI: 10.1201/9781003112099
35. E. Hysi, R. K. Saha, and M. C. Kolios, *J. Biomed. Optics*, **17** (12), 125006 (2012). DOI: 10.1117/1.JBO.17.12.125006
36. T. H. Bok, E. Hysi, and M. C. Kolios, *Biomed. Optics Express*, **7** (7), 2769 (2016). DOI: 10.1364/BOE.7.002769

ПРИЛОЖЕНИЕ

Влияние искривленности торцов эритроцитов на интенсивность высвобождения кислорода. Проведенное рассмотрение позволило получить простое выражение (12) для интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитарного сладжа. Однако остался не раскрытым вопрос: остается ли выражение (12) справедливым за рамками использованных в основном тексте работы допущений.

Настоящее приложение посвящено анализу влияния формы эритроцитов, обладающих искривленными торцами, на процесс высвобождения кислорода из эритроцитов, входящих в сладж. Рассматривались формы, которые допускают плотную упаковку эритроцитов в сладжах.

Интенсивность высвобождения кислорода из эритроцитов, полученная при учете сферической кривизны обоих торцов. При учете кривизны торцов парашютообразных эритроцитов последние рассматривались обладающими сферической формой сегментов, расположенных на переднем и заднем торцах (см. рис. П1).

В данном случае система уравнений (2) и (3) принимает вид:

$$V = \pi R_c^2 L, \quad (\text{П1})$$

$$\frac{J_N}{N \cdot J_1} = \frac{2\pi(R_c^2 + \ell_0^2) + 2\pi N R_c L}{2N\pi(R_c^2 + \ell_0^2) + 2\pi N R_c L} = \frac{1 + (\tilde{\ell}_0)^2 + N\varepsilon}{N[1 + (\tilde{\ell}_0)^2] + N\varepsilon} = \frac{\varepsilon}{1 + (\tilde{\ell}_0)^2 + \varepsilon} + \frac{1 + (\tilde{\ell}_0)^2}{1 + (\tilde{\ell}_0)^2 + \varepsilon} \cdot \frac{1}{N}, \quad (\text{П7})$$

где J_N — поток кислорода из эритроцитов, входящих в сладж; J_1 — поток кислорода из отдельно следующего эритроцита; N — количество эритро-

$$S = 2\pi(R_c^2 + \ell_0^2) + 2\pi R_c L \quad (\text{П2})$$

Выражения (П1) и (П2) после обезразмеривания принимают вид:

$$\tilde{V} = \varepsilon, \quad (\text{П3})$$

$$\tilde{S} = 2[1 + (\tilde{\ell}_0)^2 + \varepsilon], \quad (\text{П4})$$

где использованы обозначения:

$$\begin{aligned} \varepsilon &= L / R_c, \\ \tilde{S} &= S / (\pi R_c^2), \\ \tilde{V} &= V / (\pi R_c^3), \\ \tilde{\ell}_0 &= \ell_0 / R_c. \end{aligned} \quad (\text{П5})$$

Решая систему уравнений (П3) и (П4), получаем выражение для $\tilde{\ell}_0$:

$$\tilde{\ell}_0 = \sqrt{\frac{\tilde{S}}{2} - \varepsilon - 1}. \quad (\text{П6})$$

Используя выражение (П6) для отношения высвобождения кислорода из эритроцитов, входящих в сладж, по сравнению с отдельно следующими эритроцитами легко получить выражение:

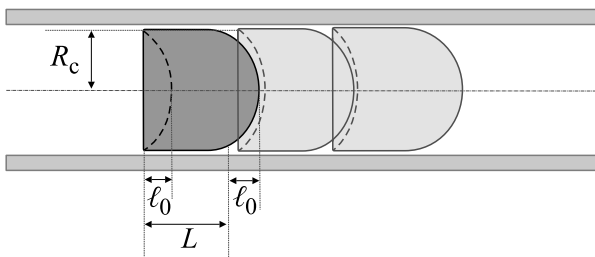


Рис. П1. Схематичное изображение эритроцита в цилиндрическом приближении с аппроксимацией обоих торцов сферическими сегментами. Представлена боковая проекция клетки с обозначением используемых при выводе величин, где L — длина цилиндрической части эритроцита, R_c — внутренний радиус капилляра, ℓ_0 — высота сферического сегмента (в рассмотренном случае радиус кривизны торцевого сферического сегмента (R) задается выражением $R = (R_c^2 + \ell_0^2)/2\ell_0$.

цитов, входящих в сладж; выражения для параметров представлены в формуле (П5).

Уравнение (П7), если ввести обозначение $\tilde{\varepsilon} = \varepsilon / [1 + (\tilde{\ell}_0)^2]$, легко приводится к виду

$$\frac{J_N}{N \cdot J_1} = \frac{\tilde{\varepsilon}}{1 + \tilde{\varepsilon}} + \frac{1}{1 + \tilde{\varepsilon}} \cdot \frac{1}{N}. \quad (\text{П8})$$

Если сравнить выражение (П8) с выражением (12) основного текста, видно, что учет формы эритроцитов, обладающих торцами в виде сферических сегментов, приводит к точно такому же виду зависимости интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов от размера эритроцитарного сладжа. При этом значение параметра $\tilde{\varepsilon}$ дается выражением

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon / (1 + (\tilde{\ell}_0)^2),$$

где $\tilde{\ell}_0$ характеризует высоту сферических сегментов на торцах.

Высвобождение кислорода из эритроцитов при учете кусочно-искривленного заднего торца. Кривизна торцов парашютообразных эритроцитов

может аппроксимироваться не только с помощью сферического приближения. В данном разделе приложения рассмотрим, как должно выглядеть выражение для интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов, форма которых представляется цилиндром с цилиндрическим вырезом в заднем торце (см. рис. П2).

Для величины объема эритроцита справедливо выражение:

$$V = \pi R_c^2 L - \ell_0 \pi r_0^2. \quad (\text{П9})$$

Площадь поверхности эритроцита находится по формуле:

$$S = 2\pi R_c^2 L + 2\pi R_c L + 2\pi r_0 \ell_0. \quad (\text{П10})$$

Обезразмеривание уравнений (П9) и (П10) с помощью замены (П5) и $\tilde{r}_0 = r_0/R_c$ дает:

$$\tilde{V} = \varepsilon - \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0^2, \quad (\text{П11})$$

$$\frac{\tilde{S}}{2} = 1 + \varepsilon + \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0. \quad (\text{П12})$$

Решение системы (П11)–(П12) позволяет для $\tilde{\ell}_0$ и $\tilde{r}_0$ найти выражения:

$$\tilde{\ell}_0 = \frac{\left(\frac{\tilde{S}}{2} - 1 - \varepsilon\right)^2}{\varepsilon - \tilde{V}}, \quad (\text{П13})$$

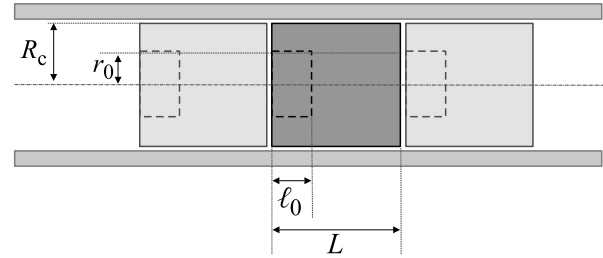


Рис. П2. Иллюстрация эритроцита в цилиндрическом приближении с учетом кривизны заднего торца. Представлена боковая проекция клетки с обозначением используемых при выводе величин, где L — длина цилиндрической части эритроцита, R_c — внутренний радиус капилляра, ℓ_0 — высота цилиндрического выреза; r_0 — радиус цилиндрического выреза в заднем торце.

$$\tilde{r}_0 = \frac{\varepsilon - \tilde{V}}{\frac{\tilde{S}}{2} - 1 - \varepsilon}. \quad (\text{П14})$$

Легко убедиться, что при данном виде аппроксимации $\varepsilon - \tilde{V} \geq 0$.

Используя выражения (П13) и (П14) для отношения высвобождения кислорода из эритроцитов, входящих в сладж, по сравнению с отдельно следующими эритроцитами легко получить следующее выражение:

$$\frac{J_N}{N \cdot J_1} = \frac{2\pi R_c^2 + 2\pi r_0 \ell_0 + 2\pi N R_c L}{2\pi N R_c^2 + 2\pi N r_0 \ell_0 + 2\pi N R_c L} = \frac{1 + \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0 + N \cdot \varepsilon}{N + N \cdot \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0 + N \cdot \varepsilon} = \frac{\varepsilon}{1 + \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0 + \varepsilon} + \frac{1 + \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0}{1 + \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0 + \varepsilon} \cdot \frac{1}{N}, \quad (\text{П15})$$

где J_N — поток кислорода из эритроцитов, входящих в сладж; J_1 — поток кислорода из отдельно следующего эритроцита; N — количество эритроцитов, входящих в сладж; $\tilde{r}_0 = r_0/R_c$, а выражения для остальных параметров представлены в формуле (П5).

Уравнение (П15) приводится к виду

$$\frac{J_N}{N \cdot J_1} = \frac{\tilde{\varepsilon}}{1 + \tilde{\varepsilon}} + \frac{1}{1 + \tilde{\varepsilon}} \cdot \frac{1}{N}, \quad (\text{П16})$$

где

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon / (1 + \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0)$$

Сравнение выражения (П16) с выражением (12) основного текста показывает, что учет кусочно-линейного искривления формы заднего торца эритроцитов приводит к точно такому же виду зависимости интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов от размера эритроцитар-

ного сладжа. При этом, значение параметра $\tilde{\varepsilon}$ дается выражением

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon / (1 + \tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0),$$

где $\tilde{\ell}_0 \cdot \tilde{r}_0$ — характеризует искривленность заднего торца эритроцита.

Высвобождение кислорода из эритроцитов, описываемых с учетом кусочно-линейной искривленности переднего и заднего торцов. Кривизна торцов парашютообразных эритроцитов может учитываться не только в описанных выше приближениях. В данном разделе приложения рассмотрим, как должно выглядеть выражение для интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов, форма которых представляется цилиндром с вырезом в заднем торце и цилиндрической выпуклостью на переднем (см. рис. П3).

Объем и площадь поверхности эритроцитов даются выражениями:

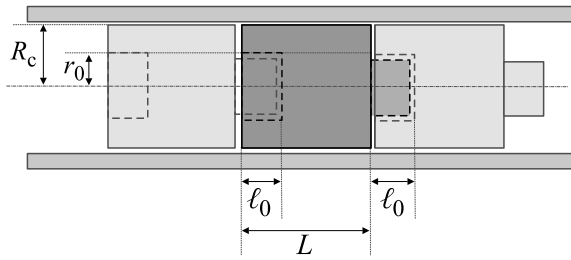


Рис. ПЗ. Иллюстрация эритроцита в цилиндрическом приближении с учетом кривизны переднего и заднего торцов. Представлена боковая проекция клетки с обозначением используемых при выводе величин, где L — длина цилиндрической части эритроцита, R_c — внутренний радиус капилляра, l_0 — высота цилиндрических выреза и выпуклости; r_0 — радиус цилиндрического выреза в заднем торце и выпуклости в переднем.

$$V = \pi R_c^2 L, \quad (\text{П17})$$

$$S = 2\pi R_c^2 + 2\pi R_c L + 4\pi r_0 l_0. \quad (\text{П18})$$

Обезразмериванием уравнений (П9) и (П10) получаем:

$$\tilde{V} = \varepsilon, \quad (\text{П19})$$

$$\frac{\tilde{S}}{2} = 1 + \varepsilon + \tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0, \quad (\text{П20})$$

где введены замены (П5) и $\tilde{r}_0 = r_0/R_c$.

Из уравнения (П20) для $\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0$ получаем следующее выражение:

$$\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0 = \frac{\tilde{S}}{2} - 1 - \varepsilon \quad (\text{П21})$$

В силу выражений (1) и (14) величина интенсивности высвобождения кислорода пропорциональна площади поверхности эритроцитарного сладжа, находящейся в непосредственном контакте с окружающей плазмой. Используя выражение (П21) для отношения высвобождения кислорода из эритроцитов, входящих в сладж, по сравнению с отдельно следующими эритроцитами легко получить следующее выражение:

$$\frac{J_N}{N \cdot J_1} = \frac{2\pi R_c^2 + 4\pi r_0 l_0 + 2\pi N R_c L}{2\pi N R_c^2 + 4\pi N r_0 l_0 + 2\pi N R_c L} = \frac{1 + 2\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0 + N \cdot \varepsilon}{N + 2N \tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0 + N \cdot \varepsilon} = \frac{\varepsilon}{1 + 2\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0 + \varepsilon} + \frac{1 + 2\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0}{1 + 2\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0 + \varepsilon} \cdot \frac{1}{N}, \quad (\text{П22})$$

где J_N — поток кислорода из эритроцитов, входящих в сладж; J_1 — поток кислорода из отдельно следующего эритроцита; N — количество эритроцитов, входящих в сладж; $\tilde{r}_0 = r_0/R_c$, а выражения для остальных параметров представлены в формуле (П5).

Уравнение (П22) приводится к виду

$$\frac{J_N}{N \cdot J_1} = \frac{\tilde{\varepsilon}}{1 + \tilde{\varepsilon}} + \frac{1}{1 + \tilde{\varepsilon}} \cdot \frac{1}{N}, \quad (\text{П23})$$

где

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon / (1 + 2\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0).$$

Для величины $\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0$ справедливо выражение (П21).

Если сравнить выражение (П23) с выражением (12) основного текста, видно, что учет кусочно-линейного искривления формы переднего и заднего торцов эритроцитов приводит к точно такому же виду зависимости интенсивности высвобождения кислорода из эритроцитов от размера эритроцитарного сладжа. В обоих случаях имеет место гиперболический характер данной зависимости. При этом значение параметра $\tilde{\varepsilon}$ дается выражением

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon / (1 + 2\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0),$$

где $\tilde{l}_0 \cdot \tilde{r}_0$ характеризует искривленность заднего торца эритроцита.

Структурная инвариантность выражения для высвобождения кислорода из эритроцитарного сладжа. Величина $\tilde{\varepsilon}$ для сколь угодно сложной формы торцевых участков эритроцитов может вычисляться по методу «исчерпания Архимеда». Метод заключается в расчленении сложного геометрического строения торцов на элементарные цилиндрические сегменты, «блины». Такие разложения на элементарные «блины» позволяют находить верхние и нижние суммы Дарбу. Величина интенсивности высвобождения кислорода оказывается «зажата» между верхней и нижней суммами Дарбу и может быть вычислена по лемме «о двух милиционерах» путем предельного перехода. Описанный в приложении анализ «цилиндрических» эритроцитов с присоединенными к ним «блинами», по мнению авторов настоящей работы, позволяет предположить, что и в случае искривленности «общего положения» структура уравнений, описывающих интенсивность высвобождения кислорода, не изменится. Эти соображения свидетельствуют в пользу инвариантности структуры уравнения (12).

Dependence of the Oxygen Release Intensity from Red Cells on the Degree of Their Clustering in Sludges

I.A. Ponomarev*, ** and G.Th. Guria*, **

**National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation, Noviy Zikovskiy proezd 4, Moscow, 125167 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per., 9, Dolgoprudny, Moscow Region, , 141700 Russia*

An efficiency of oxygen release from red cells strongly depends on the regimes of their motion through microvessels. Mathematical model of oxygen transfer taking into account the red cells ability to form intravascular sludges has been constructed and studied. An analytical expression for the dependence of the oxygen release intensity on the size of erythrocyte sludges were derived. The possible significance of the obtained results for the express diagnostics of the red cell's ability for an oxygen transmission is discussed.

Keywords: oxygen transport, red blood cell aggregation, oxygen release, red blood cell parachute shape, red blood cell clustering

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ АКТИВНОСТИ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА, ДЫХАТЕЛЬНОЙ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМ У КРЫС ПРИ БОЛЕВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2023 г. О.Е. Дик*,#

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

#E-mail: dickviola@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2023 г.

После доработки 18.08.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

С помощью метода вычисления усредненных условных вероятностей рекуррентностей выполнен сравнительный анализ направленности связей между различными физиологическими ритмами в виде колебаний артериального давления, дыхания и нейрональной активности нейронов ретикулярной формации продолговатого мозга двух групп анестезированных крыс при отсутствии и наличии болевого воздействия. Выявлены различные варианты направленности связи между анализируемыми ритмами. Для большинства данных для крыс из контрольной группы и из группы с экспериментально вызванным колитом обнаружена статистически значимая однонаправленность связи. Болевое воздействие не изменяло направленность связи, незначительно уменьшая количество данных с однонаправленной связью. При этом ритмы, связанные с сердечно-сосудистой системой (вариабельность артериального давления крови), управлялись ритмами дыхательной системы, а ритм дыхания контролировал вариабельность нейрональной активности нейронов ретикулярной формации продолговатого мозга.

Ключевые слова: направленность связи, колебания дыхания, кровяное давление, нейрональная активность.

DOI: 10.31857/S0006302923060133, EDN: RPFSEB

Анализ совместных рекуррентностей фазовых траекторий различных физических или биологических сигналов [1] позволяет выявлять различные виды синхронизации между двумя сигналами (фазовой, лаговой или обобщенной) [2] или определять направленность связей между взаимодействующими динамическими системами, генерирующими эти сигналы [3].

Так, при анализе биологических сигналов этот метод был применен для изучения фазовой синхронизации в паттернах электроэнцефалограмм у пациентов с генерализованной и фокальной формами эпилепсии и позволил различать состояния до и во время приступа эпилепсии или идентифицировать очаг эпилепсии [4]. В работе [5] этот метод был применен для определения фазовой синхронизации между прерывистой фотостимуляци-

ей и реакцией мозга с целью различения ответов в группах пациентов с повышенным артериальным давлением и с начальными проявлениями умеренных когнитивных расстройств или при их отсутствии. В работе [6] с помощью этого метода были выявлены различия в степени фазовой синхронизации между ритмическими фотостимулами и ответами мозга у пациентов с нарушениями сердечного ритма в виде мерцательной аритмии.

Определение направленности связи между динамическими системами имеет значение для понимания механизмов функционирования взаимодействующих систем. Например, в работах [7, 8] выявлена связь с преимущественным направлением воздействия со стороны 0.1 Гц колебаний вариабельности сердечного ритма на вариабельность кровенаполнения артериальных сосудов у здорового человека. При этом нарушение регуляции тонуса артериальных сосудов и частоты сердечных сокращений может приводить к патологии сердечно-сосудистой системы.

Взаимодействие сердечно-сосудистой и дыхательной систем включает в себя нервный контроль обеих систем [9]. При этом уменьшение

Сокращения: BPV — вариабельность интервалов артериального давления, NAV — вариабельность интервалов нейрональной активности, RES — частота дыхательного ритма, MCR — усредненная условная вероятность.

неврологического контроля в таких состояниях, как сон или анестезия, могут приводить к синхронизации между дыхательной и сердечно-сосудистой системами [10], а нарушения в сердечно-сосудистой системе, например, в результате острого инфаркта миокарда, могут изменять эти взаимодействия, вызывая уменьшение длительности синхронизации [11, 12], то есть патологические состояния могут изменять взаимодействия физиологических систем. В связи с этим выяснение взаимодействия между сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной системами при развитии патологического состояния представляется весьма актуальной задачей.

В данной работе в качестве патологического состояния рассматривается экспериментально вызванный у крыс колит, характеризующийся хронической абдоминальной болью. Для изучения механизмов абдоминальной боли у человека используются эксперименты на крысах, в которых ноцицептивное колоректальное растяжение имитирует боль, локализуемую в нижней части живота у пациентов с синдромом раздраженной кишки [13]. Это растяжение сопровождается реакциями нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга, а также сокращениями брюшной мускулатуры и изменениями частоты сердечных сокращений и артериального давления [13, 14]. Учет системных реакций на боль, т.е. изменений ритмов сердечно-сосудистой и дыхательной систем предполагает выяснение взаимодействия между возможной вариабельностью артериального давления крови и вариабельностью интервалов нейрональной активности мозга на частоте дыхания во время болевого воздействия.

Существуют различные методы определения направленности взаимодействия слабо связанных и слабо зашумленных систем. Это методы нелинейной динамики, связанные с определением причинно-следственной связи по Грейнджеру [15], с вычислением индекса направленности с помощью фазовой динамики [16] или с нахождением совместных рекуррентностей фазовых траекторий [3].

Метод определения направленности связи на основе условных вероятностей рекуррентностей для анализа биологических экспериментальных данных впервые был использован в работе [17], в которой у беременных женщин обнаружено преимущественное направление связи от дыхательной системы к сердцу и определен двунаправленный характер связи между частотой сердечных сокращений и артериальным давлением. Однако четкая направленность связи между артериальным давлением и дыханием в работе [17] выявлена не была.

Целью данной работы является сравнительный анализ направленности связей между вариабельностью артериального давления крови и дыхания, и между вариабельностью нейрональной активности нейронов ретикулярной формации продолговатого мозга и артериального давления на частоте дыхания до и во время болевого колоректального растяжения в группе здоровых крыс и крыс с экспериментально вызванным колитом с помощью метода вычисления усредненных условных вероятностей рекуррентностей.

МЕТОДЫ

Проанализированы колебания артериального давления, дыхания и нейрональной активности 20 крыс, наркотизированных уретаном (1.5 мг/кг) до и во время болевого воздействия. Данные были предоставлены лабораторией кортико-висцеральной физиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и включали записи от контрольной группы (10 крыс) и группы (10 крыс) с экспериментальным колитом, вызванным введением спиртового раствора пикрилсульфоновой кислоты (20 мг в 0.2 мл 50%-го этанола; Sigma, США) в колоректальную область. Записи от группы крыс с вызванным колитом были получены через неделю после введения пикрилсульфоновой кислоты на пике развития колита.

Артериальное давление регистрировали датчиком давления MLT0670 (ADInstruments Ltd., Великобритания), расположенным в катетере, установленном в бедренной артерии. Колебания дыхания определяли как колебания концентрации CO_2 , измеренные на вдохе и на выдохе с помощью датчика (CapnoScan End-Tidal CO_2 Monitoring Modular System, США), находящегося в эндотрахеальной трубке. Нейрональную активность регистрировали с помощью вольфрамового электрода (WPI, США), погруженного в область каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга.

Болевое воздействие означало механическое растяжение колоректальной области толстой кишки с помощью резинового баллона, которое длилось 60 с. Частота дискретизации составляла 10000 Гц. После 60-секундной релаксации записи повторяли (до и во время воздействия) 6 раз. В целом мы проанализировали 43 записи для каждой группы крыс до и во время болевого воздействия.

На рис. 1а–в представлены короткие фрагменты экспериментальных данных нейрональной активности, колебаний артериального давления и дыхания. Кривые вариабельности интервалов артериального давления (BPV) и вариабельности интервалов нейрональной активности (NAV) показаны на рис. 1г,д. Эти кривые содержали после-

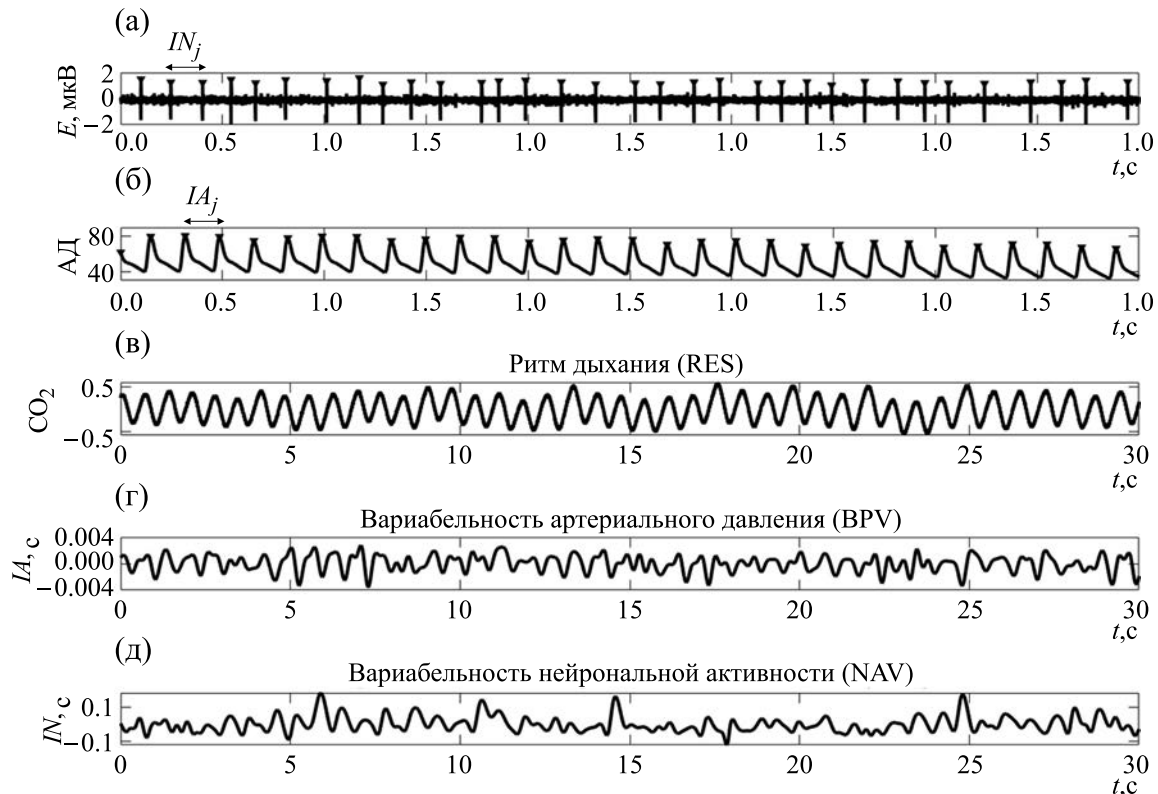


Рис. 1. Фрагменты нейрональной активности (а), колебания артериального давления (б), колебания дыхания (в), кривые вариальности BPV (г) и NAV (д). Интервалы артериального давления (IN_j) и нейрональной активности (IA_j) показаны на рисунках (а) и (б).

довательности временных интервалов между локальными максимумами исходных данных нейрональной активности и артериального давления. В силу нерегулярности интервалов артериального давления и нейрональной активности эти последовательности неэквидистантны. Для преобразования таких последовательностей в эквидистантные мы использовали аппроксимацию кубическими сплайнами с передискретизацией до частоты 1000 Гц. Затем удаляли нелинейные тренды и применяли фильтрацию с удалением колебаний меньше 1 Гц и больше 3 Гц для анализа компонент этих кривых с основными частотами, близкими к частоте дыхательного ритма (RES).

Алгоритм оценки направленности связи между системами X и Y на основе анализа совместных рекуррентностей [18] состоит из следующей последовательности процедур.

1. Построение фазовых траекторий x и y из исходных сигналов $X(t)$ и $Y(t)$, генерируемых системами X и Y , с использованием метода временных задержек [19]:

$$\begin{aligned} x(t) &= (X(t), X(t+d), \dots, X(t+(m-1)d), \\ y(t) &= (Y(t), Y(t+d), \dots, Y(t+(m-1)d), \end{aligned} \quad (1)$$

где d — временная задержка, m — размерность вложения (минимальная размерность простран-

ства, в котором восстановленная траектория воспроизводит свойства исходной траектории).

Оптимальные значения параметров d и m , необходимые для правильного построения рекуррентных диаграмм, находятся с помощью методов поиска минимума функции взаимной информации [20] и минимума ближайших ложных соседей [21].

2. Вычисление матриц рекуррентностей для каждой из построенных траекторий x и y осуществляется в соответствии с формулами [18]:

$$\begin{aligned} R_{i,j}^X &= \Theta(\epsilon_X - \|x_i - x_j\|), \\ R_{i,j}^Y &= \Theta(\epsilon_Y - \|y_i - y_j\|), \quad i, j = 1, \dots, N, \end{aligned} \quad (2)$$

где символ $\| \cdot \|$ означает евклидову норму, Θ — функция Хэвисайда, $N = n - (m-1)d$, n — длина анализируемых сигналов $X(t)$ и $Y(t)$, ϵ_X и ϵ_Y — радиусы окрестностей точек фазовых траекторий. Значения ϵ_X и ϵ_Y выбираются таким образом, чтобы плотность рекуррентных точек для обеих матриц рекуррентностей была одинаковой [18].

3. Вычисление матрицы совместных рекуррентностей $JR_{i,j}^{X,Y}$ по формуле:

$$JR_{i,j}^{X,Y} = \Theta(\varepsilon_X - \|x_i - x_j\|) \Theta(\varepsilon_Y - \|y_i - y_j\|), \dots, i, j = 1, \dots, N. \quad (3)$$

Совместная рекуррентность с точностью до ε -ошибки определяется как возврат состояния x_j фазовой траектории одного сигнала к состоянию x_i и одновременный возврат состояния y_j

фазовой траектории второго сигнала к состоянию y_i [18].

4. Вычисление усредненных условных вероятностей (MCR) рекуррентностей в соответствии со следующими формулами [3]:

$$MCR(X|Y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p(x_i|y_i) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{p(x_i, y_i)}{p(y_i)} = \frac{1}{N} \frac{\sum_{j=1}^N JR_{i,j}^{X,Y}}{\sum_{j=1}^N R_{i,j}^Y}, \quad (4)$$

$$MCR(Y|X) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p(y_i|x_i) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{p(x_i, y_i)}{p(x_i)} = \frac{1}{N} \frac{\sum_{j=1}^N JR_{i,j}^{X,Y}}{\sum_{j=1}^N R_{i,j}^X},$$

где $p(x_i|y_i)$ – вероятность того, что траектория x возвращается в окрестность точки x_i при условии, что траектория y возвращается в окрестность точки y_i ; $p(y_i|x_i)$ – вероятность того, что траектория y возвращается в окрестность точки y_i при условии, что траектория x возвращается в окрестность точки x_i ; $p(x_i)$ – вероятность того, что траектория x возвращается в окрестность точки x_i ; $p(y_i)$ – вероятность того, что траектория y возвращается в окрестность точки y_i .

Эти вероятности оцениваются средними значениями соответствующих столбцов матрицы совместной рекуррентности $R_{i,j}^{X,Y}$ и матриц рекуррентностей $R_{i,j}^X$ и $R_{i,j}^Y$.

5. Если $MCR(X|Y) = MCR(Y|X)$, то связывание считается симметричным. Если $MCR(X|Y) > MCR(Y|X)$, то система X управляет системой Y , то есть связывание однонаправленно. Если $MCR(X|Y) < MCR(Y|X)$, то, наоборот, система Y управляет системой X . Интерпретация этих неравенств основана на различиях в сложности систем X и Y [3, 17]. Если система X управляет системой Y , размерность системы Y больше, чем размерность системы X , потому что динамика Y определяется как состояниями X , так и Y , в то время как Y не влияет на X . Увеличение силы связи от X к Y увеличивает сложность Y . Это приводит к уменьшению вероятности $p(y_i)$ того, что траектория y возвращается в окрестность точки y_i . По-

скольку сложность системы X не изменяется при увеличении силы связи, так как динамика системы X не зависит от динамики системы Y , то вероятность $p(x_i)$ не изменяется. В силу того, что при этом выполняется условие $p(y_i) < p(x_i)$, справедливым является $MCR(X|Y) > MCR(Y|X)$.

Для оценки статистической значимости вычисленных показателей MCR был применен статистический тест с созданием суррогатных временных рядов на основе рекуррентностей [22]. Нулевая гипотеза заключалась в том, что две системы X и Y имеют независимые рекуррентные структуры. Статистический тест включал следующие этапы:

- 1) вычисление величины A , где $A = MCR(X|Y)$ или $A = MCR(Y|X)$,
- 2) вычисление 100 суррогатов Y_{surrj} , $j = 1, \dots, 100$ для системы Y ,
- 3) вычисление A_{surrj} для каждого суррогата Y_{surrj} и получение распределения значений A_{surr} ,
- 4) проверка полученных рядов на соответствие нормальному распределению,
- 5) определение статистики Z :

$$Z = \left| A - \overline{A_{surr}} \right| / \sigma_{surr}, \quad (5)$$

где $\overline{A_{surr}}$ – среднее и σ_{surr} – стандартное отклонение.

При условии $Z > 1.96$ нулевая гипотеза отвергалась на 95%-м уровне значимости и значение A считалось статистически значимым [23]. В этом случае мы сравнивали статистически значимые

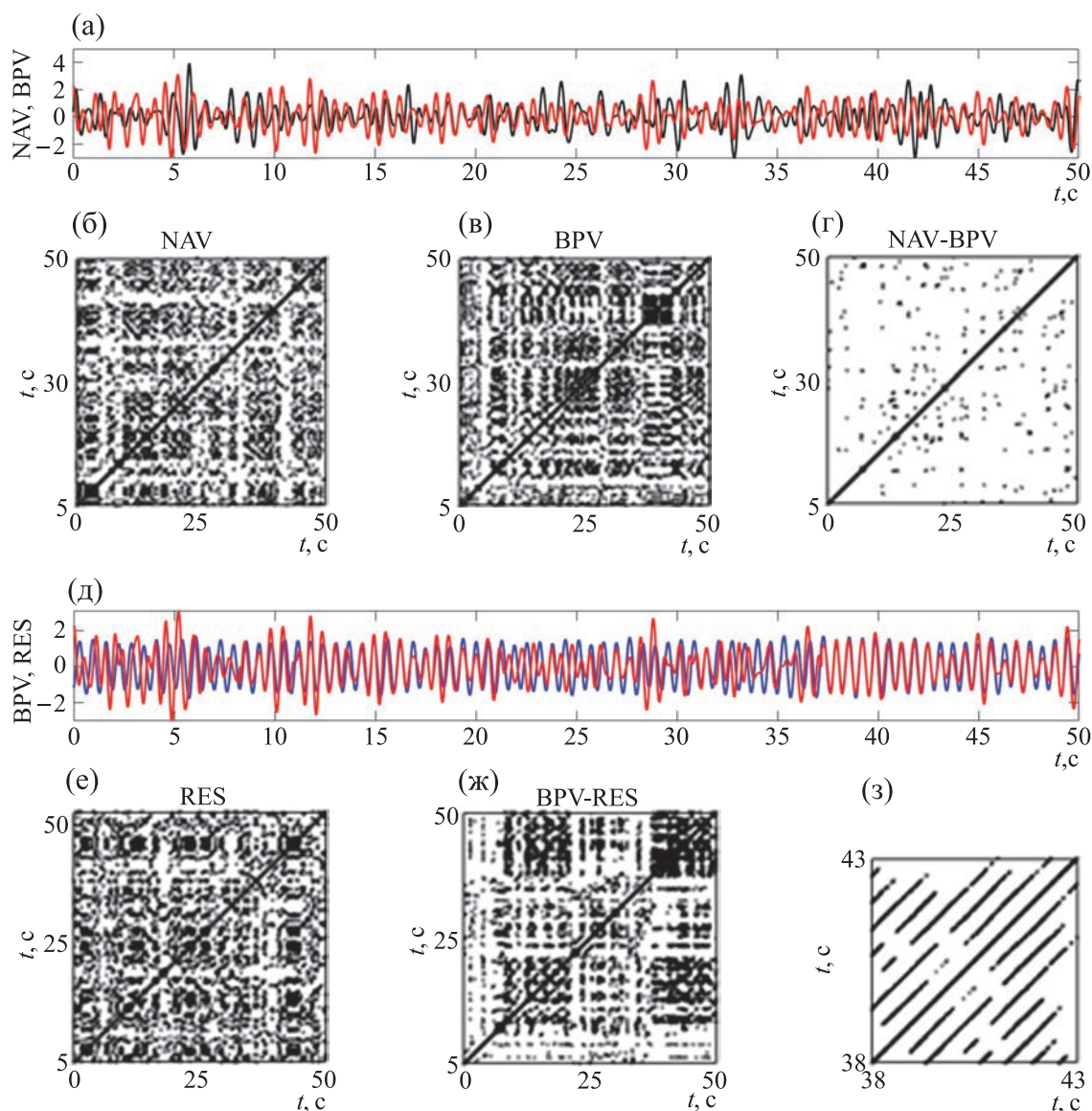


Рис. 2. Пример взаимосвязей между временными рядами NAV и BPV, а также между BPV и RES до болевого воздействия у крысы из контрольной группы: (а), (д) — NAV (черная кривая), BPV (красная кривая) и RES (синяя кривая); (б), (в), (е) — рекуррентные диаграммы для временных рядов NAV, BPV и RES; (г) и (ж) — совместные рекуррентные диаграммы для NAV и BPV и для BPV и RES соответственно; (з) — увеличенный фрагмент совместной рекуррентной диаграммы для BPV и RES.

значения $MCR(X|Y)$ и $MCR(Y|X)$ для того, чтобы выяснить, какое значение MCR больше. Полученная направленность связи между анализируемыми сигналами для одной крысы считалась значимой на уровне значимости 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При построении рекуррентных диаграмм и определении значений показателей MCR мы использовали значения размерности вложения $m = 5$ и лага $d = 15$, а пороговые значения ϵ_X и ϵ_Y выбирались таким образом, чтобы плотность ре-

куррентных точек для обеих матриц рекуррентностей была одинаковой и равной 0.01.

На рис. 2 представлены примеры взаимосвязи между временными рядами NAV и BPV (рис. 2а–г) и между BPV и RES (рис. 2д–з) для крысы из контрольной группы до болевого воздействия.

Индивидуальные рекуррентные диаграммы имеют некоторые отличия (рис. 2б и 2в, рис. 2в и 2е). Совместная рекуррентная диаграмма для NAV и BPV содержит только изолированные точки, то есть практически не имеет одновременных возвратов двух анализируемых траекторий и соответственно совместных рекуррентностей вари-

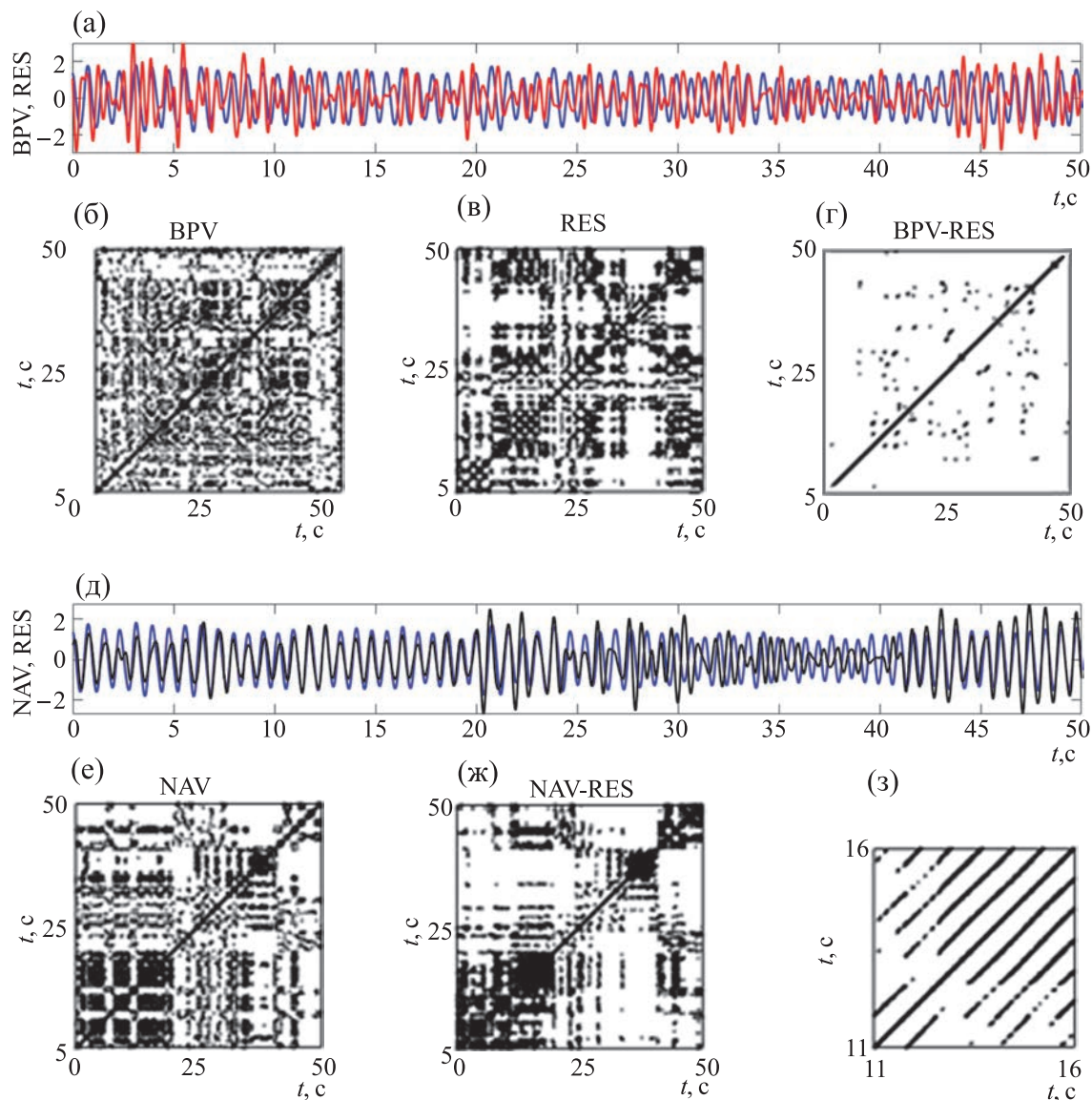


Рис. 3. Пример взаимосвязи между временными рядами BPV и RES, а также между NAV и RES до болевого воздействия у крысы из группы с экспериментальным колитом: (а), (д) — BPV (красная кривая), NAV (черная кривая) и RES (синяя кривая); (б), (в), (е) — рекуррентные диаграммы для временных рядов BPV, RES и NAV; (г) и (ж) совместные рекуррентные диаграммы для BPV и RES и для NAV и RES соответственно; (з) увеличенный фрагмент совместной рекуррентной диаграммы для NAV и RES.

абельности артериального давления и вариабельности интервалов нейрональной активности (рис. 2г).

В отличие от этого, совместная рекуррентная диаграмма для временных рядов BPV и RES, содержит диагональные линии, параллельные главной диагонали, что означает наличие совместных рекуррентностей в анализируемых ритмах (рис. 2ж). Эти линии отчетливо видны на коротком фрагменте длительностью 5 с (рис. 2з). Они расположены друг относительно друга на расстоянии, совпадающем с величиной лага $\tau = 0.63$ с и соответствующем периоду колебаний дыхатель-

ного ритма ($T \approx 1/f_{\text{RES}} \approx 0.63$ с). Участки таких одновременных возвратов двух траекторий и соответственно совместных рекуррентностей (рис. 2з) свидетельствуют о наличии фазовой синхронизации между вариабельностью артериального давления и ритма дыхания, что отражается и на рис. 2д. Рекуррентные диаграммы для временных рядов BPV и RES при этом не идентичны (рис. 2в и 2е), как это было бы в случае не фазовой, а обобщенной синхронизации, связанной с совпадением не только фаз, но и амплитуд колебательных процессов [1, 3].

Таблица 1. Усредненные показатели статистически значимых величин *MCR* для разных групп до и во время болевого воздействия

	Контрольная группа		Группа с колитом	
	до болевого воздействия	во время болевого воздействия	до болевого воздействия	во время болевого воздействия
<i>MCR</i> (NAV BPV) <i>MCR</i> (BPV NAV)	0.18 ± 0.03 0.26 ± 0.03 (26/31)	0.29 ± 0.03 0.42 ± 0.04 (24/31)	0.22 ± 0.03 0.34 ± 0.04 (28/31)	0.18 ± 0.02 0.27 ± 0.03 (23/31)
<i>MCR</i> (BPV RES) <i>MCR</i> (RES BPV)	0.08 ± 0.02 0.16 ± 0.02 (27/31)	0.11 ± 0.03 0.25 ± 0.03 (25/31)	0.07 ± 0.02 0.19 ± 0.02 (28/31)	0.23 ± 0.03 0.37 ± 0.04 (24/31)
<i>MCR</i> (NAV RES) <i>MCR</i> (RES NAV)	0.15 ± 0.02 0.28 ± 0.03 (24/31)	0.10 ± 0.02 0.17 ± 0.02 (23/31)	0.13 ± 0.02 0.21 ± 0.03 (25/31)	0.09 ± 0.02 0.18 ± 0.02 (22/31)

Для рассмотренных примеров значения усредненных условных вероятностей рекуррентностей $MCR(NAV|BPV) = 0.171$ и $MCR(BPV|NAV) = 0.212$ указывают на то, что временной ряд BPV управляет временным рядом NAV, т. е. сигнал, связанный с сердечно-сосудистой системой, в данном случае является ведущим, а сигнал, связанный с нервной системой, оказывается ведомым. Значения $MCR(BPV|RES) = 0.068$ и $MCR(RES|BPV) = 0.105$ определяют управление вариабельности артериального давления ритмом дыхания, т.е. дыхательная система управляет сердечно-сосудистой системой.

Рис. 3 показывает примеры взаимосвязей между временными рядами BPV и RES (рис. 3а–г) и между NAV и RES (рис. 3д–з) для крысы из группы с экспериментальным колитом до болевого воздействия.

Рекуррентные диаграммы для временных рядов BPV, RES и NAV имеют различную структуру рекуррентностей (рис. 3б, 3в и 3е). Совместная рекуррентная диаграмма для BPV и RES (рис. 3г) практически не содержит совместных рекуррентностей между вариабельностью артериального давления и ритмом дыхания. Для совместной рекуррентной диаграммы для временных рядов NAV и RES (рис. 3ж), напротив, характерно наличие совместных рекуррентностей, четко проявляющихся на коротком фрагменте длительностью 5 с (рис. 3з). Эквидистантные диагональные линии этого фрагмента расположены друг от друга на расстоянии, совпадающем с величиной лага $\tau = 0.68$ с, соответствующего периоду колебаний ($T \approx 1/f_{RES} \approx 0.68$ с) ритма дыхания. Наличие фрагментов таких совместных рекуррентностей указывает на наличие фазовой синхронизации между вариабельностью интервалов нейрональной активности и ритма дыхания, проявляющейся и в колебаниях NAV и RES (рис. 3д).

Вычисленные значения $MCR(BPV|RES) = 0.106$ и $MCR(RES|BPV) = 0.185$ указывают на то, что временной ряд RES управляет временным рядом BPV, т. е. в данном примере дыхательная система является управляющей, а сердечно-сосудистая система — ведомой. Значения $MCR(NAV|RES) = 0.127$ и $MCR(RES|NAV) = 0.180$ определяют, что временной ряд RES управляет временным рядом NAV, т. е. ритм дыхательной системы управляет сигналом, генерируемым нервной системой.

Результаты расчета статистически значимых величин *MCR* с доверительной вероятностью 95% среди 43 использованных серий данных в каждой группе показали, что количество статистически значимых величин *MCR* составляет не менее 72% данных (31/43). Для дальнейшего сравнительного анализа определения направления связи мы использовали эти статистически значимые данные, т. е. сравнили 31 статистически значимую величину *MCR* каждого вида (NAV, BPV и RES) для каждой группы.

В табл. 1 представлены усредненные показатели статистически значимых величин *MCR* для разных групп до и во время болевого воздействия. Данные табл. 1 показывают, что до болевого воздействия однонаправленная связь между временными рядами NAV и BPV выявлена для 26 из 31 серий данных из контрольной группы и для 28 из 31 серий данных из группы с экспериментально вызванным колитом. Такой характер связи определяется неравенством вида $MCR(NAV|BPV) < MCR(BPV|NAV)$. В этих случаях временные ряды BPV управляют временными рядами NAV, т. е. сердечно-сосудистая система управляет нервной системой. Для остальных серий данных (5 из контрольной группы и 3 из группы с экспериментально вызванным колитом) связь между временными рядами NAV и BPV была определена как

двунаправленная. Это связано с тем, что различия в показателях $MCR(NAV|BPV)$ и $MCR(BPV|NAV)$ были незначительны. В этих случаях ритмы нервной и сердечно-сосудистой систем определяются как взаимозависимые.

Для временных рядов BPV и RES до болевого воздействия однонаправленная связь была определена в 27 из 31 данных из контрольной группы и в 28 из 31 данных из группы крыс с экспериментально вызванным колитом. Это было связано с неравенством вида $MCR(BPV|RES) < MCR(RES|BPV)$. В этих сериях данных временные ряды RES управляют временными рядами BPV, т. е. ритмы, связанные с сердечно-сосудистой системой, управляются ритмами дыхательной системы. Полученные данные согласуются с данными, описанными в работах, где указывается, что дыхательный ритм часто контролирует ритм сердечно-сосудистой системы [24–27].

Связь между временными рядами NAV и RES до болевого воздействия была определена как однонаправленная в 24 из 31 данных из контрольной группы и в 25 из 31 данных из группы крыс с экспериментально вызванным колитом, поскольку эти данные удовлетворяют условию $MCR(NAV|RES) < MCR(RES|NAV)$. При этом ритм дыхательной системы контролирует ритм нервной системы.

Таким образом, данные табл. 1 показывают, что большинство данных для крыс как из контрольной группы, так и из группы с колитом демонстрируют однонаправленную связь между проанализированными временными рядами. Болевая стимуляция не привела к качественному изменению направления связи, а только незначительно уменьшила количество данных с однонаправленной связью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе выявлены различные варианты направленности связи между анализируемыми физиологическими ритмами в виде колебаний артериального давления, дыхания и нейрональной активности вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга для наркотизированных здоровых крыс и крыс с экспериментально вызванным колитом.

Отсутствие выраженной направленности со стороны нервной системы может быть связано с анестезией, которая, как известно, может увеличивать продолжительность синхронизации между сигналами дыхательной и сердечно-сосудистой систем [10, 28] и снижает влияние болевой чувствительности на эти системы.

Анализ изменения направленности связи при развитии патологического состояния может быть

перспективным для изучения нарушений в регуляции различных физиологических систем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность за предоставленные экспериментальные данные зав. лаб. кортико-висцеральной физиологии Института физиологии им. И.П. Павлова О.А. Любашиной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030), тема 0134–2019–0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперименты с использованием лабораторных животных, выполнялись в соответствии с нормами обращения с животными, регламентированными Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. C. Romano, M. Thiel, J. Kurths, et al., *Europhys. Lett.*, **71**, 466 (2005). DOI: 10.1209/epl/i2005-10095-1
2. J. Kurths, M. C. Romano, M. Thiel, et al., *Nonlinear Dynam.*, **44**, 135 (2006). DOI: 10.1007/s11071-006-1957-x
3. M. C. Romano, M. Thiel, J. Kurths, and C. Grebogi, *Phys Rev E*, **76**, 036211-1 (2007). DOI: 10.1103/PhysRevE.76.036211
4. D. Rangaprakash and N. Pradhan, *Biomed. Signal. Proces. Control.*, **11**, 114 (2014). DOI: 10.1016/j.bspc.2014.02.012
5. O. E. Dick and A. L. Glazov, *Neurocomputing*, **455**, 163 (2021). DOI: 10.1016/j.neucom.2021.05.038
6. O. E. Dick and A. L. Glazov, *Tech. Phys.*, **67** (2), 48 (2022). DOI: 10.1134/S1063784222010030
7. A. R. Kiselev, S. A. Mironov, A. S. Karavaev, et al., *Physiol. Meas.*, **37** (4), 580 (2016). DOI: 10.1088/0967-3334/37/4/580
8. V. S. Khorev, J. M. Ishbulatov, E. E. Lapsheva, et al., *Information and Control Systems*, **1**, 42 (2018). DOI: 10.15217/issn1684-8853.2018.1.42

9. T. E. Dick, Y. H. Hsieh, R. R. Dhingra, et al., *Prog. Brain Res.*, **209**, 191 (2014). DOI: 10.1016/B978-0-444-63274-6.00010-2
10. Y. Shiogai, A. Stefanovska, and P. V. E. McClintock, *Phys. Reports*, **488**, 51 (2010). DOI: 10.1016/j.physrep.2009.12.003
11. D. Hoyer, U. Leder, H. Hoyer, et al., *Med. Eng. Phys.*, **24**, 33 (2002). DOI: 10.1016/S1350-4533(01)00120-5
12. A. S. Karavaev, M. D. Prokhorov, V. I. Ponomarenko, et al., *Chaos*, **19**, 033112-1 (2009). DOI: 10.1063/1.3187794
13. O. A. Lyubashina, A. A. Mikhalkin, and I. B. Sivachenko, *Integrat. Physiol.*, **2** (1), 78 (2021). DOI: 10.33910/2687-1270-2021-2-1-71-78
14. O. A. Lyubashina, I. B. Sivachenko, and A. A. Mikhalkin, *Brain Res. Bull.*, **182**, 2 (2022). DOI: 10.1016/j.brainresbull.2022.02.002
15. L. Faes, G. Nollo, and K. Chon, *Ann. Biomed. Eng.*, **36**, 381 (2008). DOI: 10.1007/s10439-008-9441-z
16. M. G. Rosenblum and A. S. Pikovsky, *Phys. Rev. E*, **64**, 045202-1 (2001). DOI: 10.1103/PhysRevE.64.045202
17. N. Marwan, Y. Zou, N. Wessel, et al., *Phil. Trans. Roy. Soc. A*, **371**, 20110624-1 (2013). DOI: 10.1098/rsta.2011.0624
18. N. Marwan, M. C. Romano, M. Thiel, and J. Kurths, *Phys. Reports*, **438**, 237 (2007). DOI: 10.1016/j.physrep.2006.11.001
19. F. Takens, In *Dynamical Systems and Turbulence, Lecture Notes in Mathematics*, Ed. by D. Rand and L. S. Young, (Springer-Verlag, Berlin, 1981), V. 898, pp. 366–381.
20. M. B. Kennel, R. Brown, and H. D. Abarbanel, *Phys. Rev. A*, **45**, 3403 (1992).
21. A. M. Fraser and H. L. Swinney, *Phys. Rev.*, **33**, 1134 (1986).
22. M. Thiel, M. C. Romano, J. Kurths, et al., *Phil. Trans. Roy. Soc. A*, **366**, 545 (2008).
23. P. R. Bevington and D. K. Robinson, In *Data reduction and error analysis for the physical sciences*, Third ed. (McGraw-Hill Higher Education, 2003), p. 338.
24. V. I. Ponomarenko, M. D. Prokhorov, A. B. Bespyatov, et al., *Chaos, Solitons and Fractals*, **23**, 1429 (2005).
25. M. G. Rosenblum, L. Cimponeriu, A. Bezerianos, et al., *Phys. Rev. E*, **65**, 041909-1 (2002). DOI: 10.1103/PhysRevE.65.041909
26. R. Mrowka, L. Cimponeriu, A. Patzak, and M. G. Rosenblum, *Amer. J. Physiol. Regulatory, Integrative Comp. Physiol.*, **285** (6), 1395 (2003). DOI: 10.1152/ajpregu.00373.2003
27. A. J. Ocon, M. S. Medow, I. Taneja, and J. M. Stewart, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **300**, 527 (2011). DOI: 10.1152/ajpheart.00257.2010
28. A. Stefanovska, H. Haken, P. V. E. McClintock, et al., *Phys. Rev. Lett.*, **85** (22), 4831 (2000). DOI: 10.1103/PhysRevLett.85.4831

Analysis of the Relationship Between the Activity of the Reticular Formation of the Medulla Oblongata, Respiratory and Cardiovascular Systems in Rats under Painful Stimulation

O.E. Dick*

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

Using the method for calculating the average of conditional probabilities of recurrence intervals, a comparative analysis was performed to estimate the direction of coupling between different physiological rhythms in the form of fluctuations in blood pressure, respiration, and the activity of neurons in the reticular formation of the medulla oblongata in two groups of anesthetized rats under pain stimulation or no stimulus. It was found that there are different kinds of the directions of coupling between the analyzed rhythms. Most of the data obtained for rats from the control group and rats with experimentally induced colitis suggest the statistically significant unidirectionality of coupling. Painful stimulation did not affect the direction of coupling, but the amount of data on unidirectionality of coupling slightly reduced. At the same time, the rhythms associated with the cardiovascular system (blood pressure variability) were controlled by the rhythms of the respiratory system, and the respiratory rhythm controlled the variability of the activity of neurons in the reticular formation of the medulla oblongata.

Keywords: directionality of coupling, breathing oscillations, blood pressure, neuronal activity

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА БИОПОЛИМЕРОВ В ГОМОГЕНАТАХ ГИАЛИНОВЫХ ХРЯЩЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

© 2023 г. Т.И. Николаева^{*,#}, Д.А. Барсуки^{**}, М.В. Молчанов^{*}, Д.А. Прохоров^{*},
В.И. Емельяненко^{*}, П.В. Шеховцов^{*}

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

^{**}Пущинский филиал Российского биотехнологического университета,
просп. Науки, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: tomivnik@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.08.2023 г.

После доработки 11.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Исследование степени гидролиза в зависимости от действия разных протеолитических ферментов является одной из задач при разработке нутрицевтиков из соединительных тканей для биомедицины. Гидролиз биополимеров в гомогенатах гиалиновых хрящей из трахей крупного рогатого скота и свиней проводили под влиянием ферментов панкреатина, химопсина, папаина и протеолитического лекарственного средства карипазима, содержащего папаин. Показано, что карипазим производителя ООО «МедФлорина» действует более эффективно по сравнению с карипазимом производителя ЗАО «ВифиТех», причем степень гидролиза коллагена максимальна при температуре 60°C и концентрации карипазима 10%. В гомогенатах гиалиновых хрящей крупного рогатого скота проведен более полный гидролиз протеогликанов, поскольку на ЯМР-спектрах идентифицирована глюкоза – конечный продукт гидролиза гликозаминогликанов.

Ключевые слова: гиалиновые хрящи, коллаген, гликозаминогликаны, степень гидролиза, температура, концентрация.

DOI: 10.31857/S0006302923060145, EDN: ROGVFZ

В последние годы возник интерес к гидролизатам коллагена в качестве инновационного средства для профилактики и лечения артритов и артрозов. Ранее для лечения суставов применяли преимущественно гликозаминогликаны, которые входят в состав протеогликанов. Однако поскольку в хрящах суставов содержится примерно одинаковое количество и коллагена, и гликозаминогликанов, отсутствие коллагеновой компоненты в лекарствах приводит к восстановлению хрящей не более чем на 50%.

В соединительных тканях в организме человека и животных на долю коллагена приходится до 30%. В настоящее время известны 28 генетически разных типов коллагена, из которых коллагены типов I, II, III являются основными и фибриллообразующими [1]. Эти коллагены входят в состав костей, хрящей, связок, сухожилий – соедини-

тельных тканей, из которых образуется суставно-связочный аппарат человека [2].

Структура молекул коллагена формируется из трех полипептидных α -цепей. Каждая α -цепь содержит регулярную последовательность триплетов из аминокислот Гли-Х-У, где первой аминокислотой является глицин [3]. Таким образом, глицин составляет до 33% от содержания всех аминокислот в молекуле коллагена. В триплетах в позициях Х и У располагаются аминокислоты пролин и оксипролин, причем содержание каждой из них составляет примерно 10% [4]. Эти аминокислоты стабилизируют тройную спираль коллагена. Позиции Х и У могут занимать гидрофобные аминокислоты (аланин, валин, серин, лейцин, треонин, фенилаланин, изолейцин, метионин, цистеин) и гидрофильные аминокислоты (аргинин, гистидин, лизин, оксилизин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота).

Биосинтез коллагена и протеогликанов происходит в специализированных клетках соедини-

Сокращение: ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

тельных тканей. Например, в хондроците хрящевой ткани синтезируются и коллаген типа II, и гликозаминогликаны, но в разных частях клетки [5]. Отметим, что фибриллы тканей суставно-связочного аппарата формируются также из комплексов молекул коллагена типов I, II и III с содержащимися в небольших количествах коллагенами типов V, VI, IX и XI [6]. При связывании с коллагеном типа II минорных коллагенов типов IX и XI толщина фибрилл в хрящах регулируется таким образом, что образуются фибриллы наименьшей толщины (20–40 нм). При этом механическая прочность тканей определяется суперспиральной структурой молекул и фибрилл коллагена. С коллагеновыми фибриллами в хрящах, связках и сухожилиях связываются протеогликаны, что приводит к образованию коллагеновых волокон [7].

Известно, что внеклеточный матрикс является структурной основой всех соединительных тканей [8]. Матрикс образуется в процессе связывания коллагена с другими биополимерами и молекулами. Протеогликаны и гликозаминогликаны, расположенные между коллагеновыми фибриллами, занимают большой объем в ткани. Их взаимодействие с коллагеном происходит преимущественно электростатически. Молекулярные механизмы образования матрикса в разных тканях различаются. В хрящах, сухожилиях, связках волокна формируются посредством связывания коллагеновых фибрилл с протеогликанами. В промежутках между фибриллами и протеогликанами расположены гликопротеины, через которые происходит взаимодействие коллагеновых фибрилл с клетками. Фибриллы хрящей имеют небольшую длину, а длина волокон в сухожилиях и связках достигает нескольких миллиметров и сантиметров [9].

Отметим, что в биосинтезе коллагена и образовании фибрилл коллагена могут участвовать низкомолекулярные пептиды, содержащие две-три аминокислоты. Коллаген экзогенного происхождения, поступающий с пищей, распадается на фрагменты в процессе гидролиза под влиянием ферментов желудочно-кишечного тракта. Затем фрагменты расщепляются до низкомолекулярных пептидов. В желудочно-кишечном тракте наряду с пассивным переносом веществ существует механизм АТФ-зависимого транспорта [10]. Высокая скорость всасывания ди- и трипептидов в желудочно-кишечном тракте позволяет эффективно влиять на процесс биосинтеза коллагена и ускорять биосинтез. Эндогенные и экзогенные низкомолекулярные пептиды также могут быть строительными блоками для построения новых фибрилл.

Следует заметить, что при болезнях артритов и артрозов в наибольшей степени разрушаются ги-

алиновые хрящи, в состав которых входит коллаген типа II [11]. Фибриллы в норме имеют плотную упаковку молекул коллагена, но небольшую толщину по сравнению с фибриллами костей, сухожилий и связок. Кроме того, хрящи локализованы в местах связывания разных соединительных тканей, которые испытывают большую механическую нагрузку, что может нарушать их структуру и функционирование. Таким образом, соединительные ткани суставно-связочного аппарата в позвоночнике и суставах могут разрушаться не только в результате болезней, но и перегрузок. Гиалиновые хрящи, которые содержатся в замыкающих пластинках межпозвонковых дисков, придают жесткой структуре позвоночника определенную степень гибкости. Однако изменение структуры коллагеновых фибрилл и протеогликанов в замыкающих пластинках сопровождается образованием позвонковых грыж [5]. Известно, что в суставах костную ткань тонким слоем окружают гиалиновые хрящи, которые при травмах могут легко разрушаться [12]. В медицинской практике для укрепления соединительных тканей используют преимущественно синтетические биоматериалы. Во многих странах наряду с применением таких биоматериалов при хирургических операциях разрабатывают также нутрициологические средства для лечения артритов и артрозов.

Гидролизаты коллагена для биомедицины и нутрициологии получают из соединительных тканей сельскохозяйственных животных и рыб [13, 14]. Чтобы коллаген усвоился в желудочно-кишечном тракте, требуется провести его гидролиз и получить низкомолекулярные пептиды. В нативном состоянии коллаген является молекулой большой длины и жесткой трехспиральной структуры, но в процессе денатурации белка полипептидные цепи разворачиваются и становятся доступными для действия ферментов.

При получении гидролизатов коллагена традиционной процедурой является экстракция белка из тканей разбавленными органическими кислотами (уксусная, лимонная). Однако к недостаткам данного метода относится использование больших объемов растворов, несмотря на то, что сначала проводится концентрирование коллагена, а затем ферментативный гидролиз. Обычно выход аминокислот и пептидов коллагена из соединительных тканей по такому методу составляет от 3 до 5%. Выход конечного продукта увеличивается до 10–15% в результате последовательных этапов ферментативного гидролиза и химического гидролиза [15]. При этом химический гидролиз изменяет структуру аминокислот.

Другим способом получения гидролизатов коллагена является протеолиз коллагена после действия ряда ферментов. В работе [16] в резуль-

тате последовательного действия трех ферментов гидролиз коллагена был эффективным с высоким выходом пептидов. Но молекулярные массы продуктов гидролиза составляли примерно 5 кДа, что соответствовало средней степени гидролиза.

Известно, что в хрящах сельскохозяйственных животных и рыб содержатся прочно связанные спирализованные молекулы и фибриллы коллагена типа II [5, 9]. Плотная упаковка молекул коллагена достигается межмолекулярными связями в поперечном и продольном направлениях фибрилл. Пространственную структуру коллагеновых фибрилл в тканях хрящей стабилизируют протеогликаны. Разрушить внеклеточный матрикс можно разными методами дезинтеграции тканей. Процедура обработки сырья в гомогенизаторе высокого давления позволяет расщепить коллагеновые фибриллы и волокна большой длины на фрагменты. Следовательно, гомогенизация позволяет получить частицы коллагеновых фибрилл, более доступные для протеолиза. Экспериментально отработанный метод гомогенизации хрящей был представлен в наших работах [17, 18].

Гидролиз коллагена в гомогенатах соединительных тканей можно проводить следующими способами: под влиянием температуры (тепловой гидролиз), под действием протеолитических ферментов (ферментативный гидролиз), под влиянием кислот и щелочей (химический гидролиз). Ферментативный гидролиз предпочтителен, поскольку после гидролиза не нарушается структура аминокислот. Под действием ферментов молекулярные связи между полипептидными цепями коллагена разрываются, а полипептидные цепи гидролизуются на пептиды с молекулярной массой около 5 кДа [16].

Гидролизаты коллагена непосредственно из соединительных тканей сложно получить. Это обусловлено высокой механической прочностью коллагеновых фибрилл в тканях животных, что не дает возможности выделить большое количество гидролизованного белка. Основной задачей проводимых нами исследований помимо повышения выхода расщепленных биополимеров является получение низкомолекулярных пептидов коллагена молекулярной массой не более 1 кДа, т. е. с высокой степенью гидролиза. С этой целью мы проводили гомогенизацию тканей при регулируемых параметрах давления и температуры, а затем ферментативный гидролиз биополимеров в гомогенатах. Гидролизаты, которые содержат низкомолекулярные пептиды коллагена и гликозаминогликаны, не требуют больших затрат энергии в процессе пищеварения и усвоения. Исследование степени гидролиза в зависимости от действия разных протеолитических ферментов является одной из задач при разработке нутрицевтиков с низкомолекулярными компонентами. Следует

отметить, что определение степени гидролиза (параметр DH) недостаточно применяется в научно-исследовательских работах прикладного направления. Однако степень гидролиза может быть адекватной характеристикой образцов, полученных из соединительных тканей и предназначенных для биомедицины и нутрициологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гомогенизация хрящевой ткани. Гомогенизацию хрящей из трахей крупного рогатого скота и свиней проводили в гомогенизаторе высокого давления «Донор-3» [19]. Процесс гомогенизации регулировали параметрами давления и температуры. Для сравнительной оценки гидролиземости субстратов применяли спектральный метод и метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В работе использовали спектрофотометр Specord UV VIS (Analytik Jena GmbH, Германия) и ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE III 600 (Bruker BioSpin, Германия).

Ферментативный гидролиз. Температура, pH, концентрация фермента и время гидролиза являются ключевыми факторами, влияющими на образование пептидов и их характеристики. Различные ферменты имеют свои оптимальные значения этих параметров. Например, температура протеолиза может варьировать от 35 до 70°C, концентрация фермента — от 0.01 до 10.00%, pH — от 1.5 до 11.0, а время — от 10 до 600 мин [16]. После гомогенизации хрящей гидролиз биополимеров проводили последовательными процедурами с применением ряда ферментов. Предпочтение для гидролиза белков имеют не отдельные протеазы, а комплексы ферментов [20]. Эти ферменты обладают специфичным действием, разрывая определенные связи в белках. Известно, что химопсин содержит смесь α -химотрипсина и трипсина. Трипсин гидролизует пептидные связи, содержащие остатки аргинина и лизина, а химотрипсин расщепляет пептидные связи с остатками ароматических аминокислот тирозина и триптофана.

Нами был исследован протеолиз под влиянием ферментов с каталитической активностью при разных значениях pH. Мы сравнивали действие ферментов панкреатина, пепсина, химопсина, трипсина и папаина с их импортными аналогами. Далее мы выбрали лекарственное протеолитическое средство «Карипазим», которое выпускают в России два производителя: ЗАО «ВифиТех» и ООО «МедФлорина» (пос. Оболенск, Московская обл., Россия). Сравнительный анализ действия карипазима проводили по отношению к папаину производителя AppliChem (Германия).

В состав карипазима (протеолитическая активность 350 ПЕ) входят папаин, химопсин А, химопсин В, пептидазы А и В, муколитический

Таблица 1. Степень гидролиза ферментативных гидролизатов, полученных под влиянием химопсина и панкреатина

Фермент	Время гидролиза, ч	Параметр DH , %
Химопсин	1	12.9 ± 0.9
	2	14.8 ± 1.2
	3	15.9 ± 1.8
	4	16.8 ± 2.1
	5	17.4 ± 1.5
	6	17.6 ± 2.0
Панкреатин	1	13.7 ± 1.9
	2	15.2 ± 2.2
	3	16.7 ± 1.6
	4	17.9 ± 2.3
	5	18.4 ± 2.0
	6	18.8 ± 1.5

фермент лизоцим. Папаин и его аналоги гидролизуют пептидные, амидные и эфирные связи, содержащие аргинин, лизин, фенилаланин, а также тиоловые эфиры и N-ацетилированные связи. Для папаина установлено специфичное действие по отношению к аминокислотам глицин и лейцин. Поскольку коллаген содержит до 33% глицина, с помощью папаина можно эффективно разрывать молекулы коллагена на фрагменты. Кроме того, под действием папаина расщепляются полисахаридные цепи протеогликанов.

Одной из задач в разработке ферментативных гидролизатов является оценка эффективности расщепления белкового субстрата. Критерием эффективности может быть степень гидролиза, определенная по параметру DH [21, 22]. Параметр DH вычисляли как отношение массовой доли аминного азота к массовой доле общего азота в гидролизате. Определение аминного азота проводили с использованием нингидрина. Метод основан на взаимодействии нингидрина с аминокислотами в слабокислой среде при pH 5.5 с образованием дикетогидриндиленкетогидринамина (комплекс Руэмана сине-фиолетового цвета). Количество аминного азота в исследуемых гидролизатах определяли по калибровочному графику, построенному для стандартных разведений глицина. Общий азот был определен методом Кельдаля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе протеолиз проводили в условиях, влияющих на растворимость гомогената. Процессы растворения и набухания при дезинтеграции соединительных тканей взаимосвязаны, что проверено при исследовании физико-химических свойств кожной ткани [23]. Разрушение

тканей эффективно протекает в области pH, отличающихся от изоэлектрической точки коллагена в растворе. Так как изоэлектрическая точка коллагена находится в интервале нейтральных значений pH (6.5–7.5), переход фибриллярного коллагена в растворимый происходит при кислых и щелочных pH. Поэтому в данной работе применяли ферменты, каталитическая активность которых оптимальна как в области более низких значений pH, так и более высоких значений pH по сравнению с интервалом pH 6.5–7.5.

Ферментативный гидролиз в щелочной области pH. Оптимальная величина pH для действия ферментов панкреатина и химопсина составляет 7.5–9.0, что находится выше изоэлектрической точки коллагена. Гидролиз проводили в K-Na-фосфатном буфере при фиксированных значениях pH (8.0) и температуры (42°C), варьируя концентрацию фермента и время гидролиза. Максимальная степень гидролиза наблюдалась после пяти-шести часов, но гидролиз продолжали в течение восьми часов.

Результаты экспериментов по действию химопсина и панкреатина на гомогенат гиалиновых хрящей крупного рогатого скота в зависимости от времени показали, что значения степени гидролиза (параметр DH) больше в гидролизатах, полученных с использованием панкреатина (табл. 1). Однако статистически значимые различия между образцами не обнаружены. Чтобы повысить степень гидролиза, были дополнительно внесены ферменты в гомогенаты хрящей. Добавление фермента через три часа после начала гидролиза увеличивает степень гидролиза в полтора раза.

Ферментативный гидролиз в кислой области pH. Поскольку изоэлектрическая точка коллагена находится при значениях pH, близких к 7.0, для перевода фибриллярного коллагена в растворимое состояние в кислой области pH следует приме-

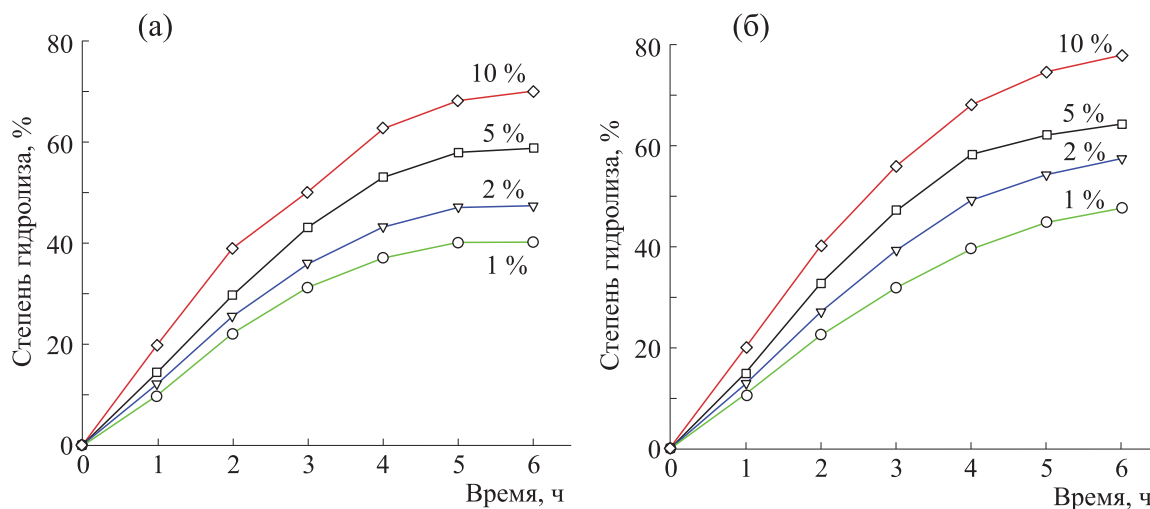


Рис. 1. Степень гидролиза гиалиновых хрящей в зависимости от концентрации карипази́ма (производитель ООО «МедФлорина»): (а) — при температуре протеолиза 50°C, (б) — при температуре протеолиза 60°C.

нять буферные растворы с $\text{pH} < 7.0$. На первом этапе работы для гидролиза мы применяли систему ферментов отечественного производства протепсин (ЗАО «ЗЭФ», пос. Ржавки Московской обл.) и фитопаин (ТУ9291-003-49959837-99), активность которых оптимальна в области pH 5–6. Степень гидролиза под влиянием фитопаина была выше в четыре раза по сравнению со степенью гидролиза под влиянием протепсина. Оптимальным значением для фитопаина в слабокислой области является pH 6.0. Степень гидролиза увеличивается с повышением концентрации фермента от 10 до 20%. При исследовании кинетики протеолиза в течение одного-четырех часов было установлено, что максимальное количество аминного азота образуется в течение первых трех часов. В оптимальных для фитопаина условиях степень гидролиза папаином производства компании AppliChem (Германия) была в 2.5 раза ниже.

Сравнительный анализ действия папаина и фитопаина показал, что под действием фитопаина наибольшая степень гидролиза в диапазоне температуры 45–60°C наблюдается при температуре ферментации, равной 55°C. Найдено, что степень гидролиза после действия фитопаина выше значений параметров гидролиза папаином. Комплекс ферментов, содержащихся в фитопаине, расщепляет больше связей в хрящевых гомогенатах по сравнению с папаином.

Степень гидролиза гиалиновых хрящей под влиянием карипази́ма производителя ООО «МедФлорина» возрастает с повышением концентрации от 1 до 10% (рис. 1). Параметр DH увеличивается в 1.5–1.7 раза с увеличением температуры гидролиза от 50 до 60°C. Более того, пара-

метр DH имеет наибольшую величину при температуре гидролиза 60°C. Кинетические исследования ферментативного гидролиза показывают, что в период от одного до четырех часов идет накопление аминного азота. Наибольшая степень гидролиза, равная 78%, достигается к шести часам.

Степень гидролиза гиалиновых хрящей под влиянием карипази́ма производителя ЗАО «ВифиТех» также возрастает с повышением концентрации от 1 до 10% (рис. 2). Однако параметр DH при температуре гидролиза 60°C имеет наибольшую величину, равную 48%. Это значение в 1.6 раза меньше соответствующего значения параметра DH после гидролиза под действием карипази́ма производителя ООО «МедФлорина». Следует отметить, что для практического применения при получении белковых гидролизатов степень гидролиза не должна быть ниже 50% [20].

В проведенных экспериментах мы установили, что степень гидролиза зависит от производителя карипази́ма. Как видно из рис. 1 и 2, степень гидролиза коллагена под действием карипази́ма производителя ООО «МедФлорина» выше по сравнению со степенью гидролиза под влиянием карипази́ма производителя ЗАО «ВифиТех».

ЯМР-исследования. Мы провели также гидролиз протеогликанов под действием карипази́ма производителя ООО «МедФлорина» при следующих условиях: 33.4 мМ К-Na-фосфатный буфер, pH 6.0, температура 55°C, концентрация фермента 10%. Гидролиз был проведен в течение одного-шести часов. Следует отметить, что эффективность действия гликозаминогликанов (хондропротекторов) на организм человека во многом

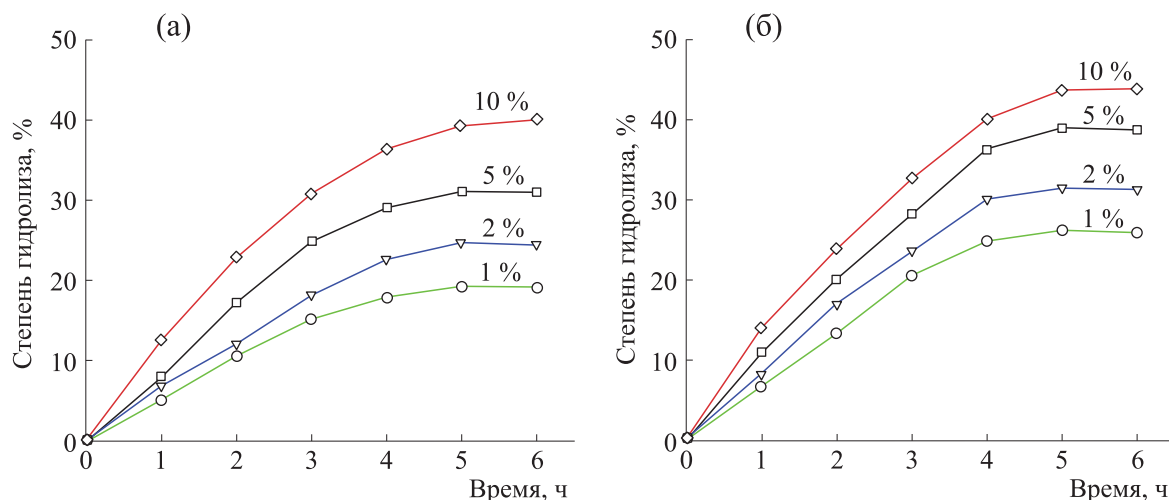


Рис. 2. Степень гидролиза гиалиновых хрящей в зависимости от концентрации карипази́ма (производитель ЗАО «ВифиТех»): (а) — при температуре протеолиза 50°C, (б) — при температуре протеолиза 60°C.

определяется их расщепленностью на дисахариды и моносахариды. Поэтому получение и анализ низкомолекулярных компонентов гликозаминогликанов представляет необходимый этап исследований при разработке нутрицевтиков. Известно, что основными структурными единицами хондроитин-4-сульфата и гиалуроновой кислоты являются дисахариды. После гидролиза гликозаминогликанов образуются как олигосахариды, так и дисахариды и моносахара.

Степень гидролиза протеогликанов и гликозаминогликанов была изучена методом ЯМР. На рис. 3а приведен ЯМР-спектр гидролизата гиалинового хряща из трахей свиней. Протеолиз выполнен в течение шести часов. В области 5.4–5.5 ppm идентифицирован спектр гидролизованного образца — гликогена, состоящего из связанных между собой молекул глюкозы. На рис. 3б приведен ЯМР-спектр гидролизата гиалинового хряща из трахей крупного рогатого скота. Протеолиз также выполнен в течение шести часов. После гидролиза зарегистрирован спектр образца в области 5.0–5.5 ppm, который относится к молекулам гликогена и глюкозы. Гликоген содержит связанные между собой молекулы глюкозы.

Сравнивая гидролизаты из гиалиновых хрящей разных животных, следует заметить, что более полный гидролиз проведен в гомогенатах гиалиновых хрящей крупного рогатого скота, поскольку на спектре идентифицирован моносахарид глюкоза — конечный продукт гидролиза гликозаминогликанов. Для полного гидролиза потребуется увеличить концентрацию карипази́ма до 15% и время гидролиза, что будет выполнено при следующих исследованиях.

ВЫВОДЫ

Исследование степени гидролиза в зависимости от действия разных протеолитических ферментов является одной из задач при разработке нутрицевтиков на основе коллагена. При изучении степени гидролиза биополимеров в гомогенатах гиалиновых хрящей были использованы следующие ферменты: панкреатин, химопсин, папаин и протеолитическое лекарственное средство карипазим, содержащее папаин. Такие параметры ферментативного гидролиза, как pH, температура, продолжительность процесса и концентрация фермента оказывают влияние на степень гидролиза. Степень гидролиза регулируется температурой и концентрацией фермента. С целью практического использования разработок нутрицевтиков, предназначенных для биомедицины и нутрициологии, проверено лекарственное протеолитическое средство карипазим двух производителей. Максимальная степень расщепления коллагена на фрагменты установлена после действия карипази́ма от производителя ООО «Медфлорина» (пос. Оболенск Московской области). Степень гидролиза коллагена, определенная по параметру DH , может быть необходимой и существенной характеристикой научно-исследовательских работ прикладного назначения.

В гомогенатах гиалиновых хрящей крупного рогатого скота проведен более полный гидролиз протеогликанов по сравнению протеолизом в гомогенатах хрящей свиней, поскольку на ЯМР-спектре идентифицирована глюкоза — конечный продукт гидролиза гликозаминогликанов.

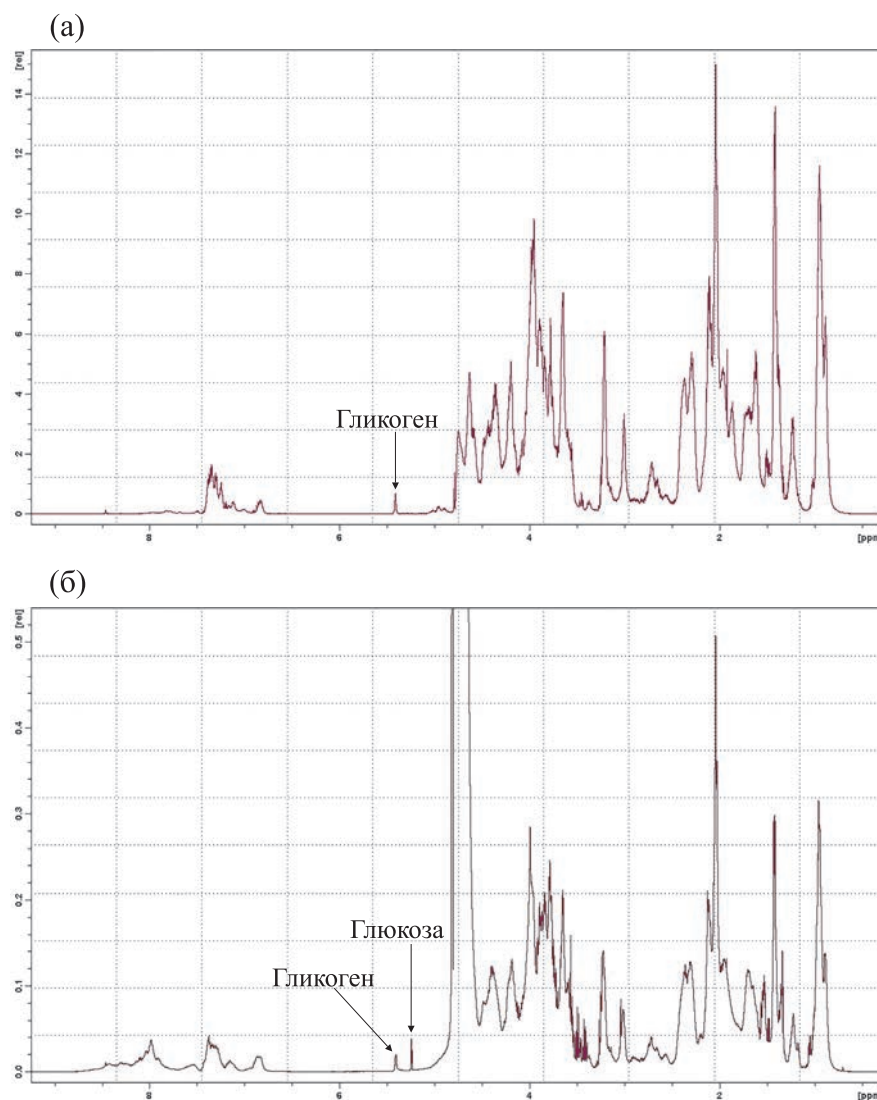


Рис. 3. Двухмерные протонные ЯМР-спектры гидролизатов гиалиновых хрящей, полученных под влиянием карипазима производителя ООО «МедФлорина» в течение шести часов в 33.4 мМ К-На-фосфатном буфере, pH 6.0 при температуре 55°C и концентрации карипазима 10%: (а) — гомогенат гиалиновых хрящей из трахей свиней, (б) — гомогенат гиалиновых хрящей из трахей крупного рогатого скота.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность рецензентам за критический анализ рукописи и ценные замечания. Авторы благодарны организаторам и руководителям Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН за спектроскопические приборы для анализа образцов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена в рамках бюджетного финансирования ИТЭБ РАН по теме № 5 «Физико-химические основы биомедицины».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит экспериментов с использованием людей и животных в качестве объектов исследований. Сырье для экспериментов было закуплено в магазине в замороженном виде и сопровождалось ветеринарно-санитарной документацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. J. Miller, in *Collagen* (CRC Press, Boca Raton, 1988), Vol. 1, P. 139.
2. E. J. Kucharz, *The collagen: biochemistry and pathophysiology* (Springer-Verlag, Berlin, 1992).
3. B. Brodsky and J. A. M. Ramshaw, *Matrix Biol.*, **15**, 545 (1997).
4. D. J. Prockop and K. I. Kivirikko, *Annu. Rev. Biochem.*, **403** (1995).
5. *Лазерная инженерия хрящей* (Физматлит, М., 2006).
6. M. E. Nimni and R. D. Harkness, in *Collagen*, (Boca Raton, CRC Press, 1988), Vol. 1, P. 1.
7. J. E. Scott, *Biochem. J.*, **252**, 313 (1988).
8. A. Veis and A. George, in *Extracellular matrix assembly and structure* (Acad. Press, N.-Y., 1994), P. 15.
9. Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др. *Молекулярная биология клетки* (Мир, М., 1987).
10. В. А. Тутельян, В. Х. Хавинсон и В. В. Малинин., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **135** (1), 1, (2003).
11. T. Aigner and J. Stöve, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **55** (1), 569 (2003).
12. В. Н. Павлова, Т. Т. Копьева, Л. И. Слущкий и Г. Г. Павлов, *Хрящ* (Медицина, М., 1988).
13. V. S. Simons and G. L. Steinmeyer, *J. Sci. Rep.*, **8**, 17733 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-36046-3
14. H. Song and B. Li, *Biomed. Sci. Tech. Res.*, **1** (2), (2017).
15. Т. Н. Пивненко, Г. Ю. Клычкова, Н. Н. Ковалев и др., Патент РФ №2250047, БИ № 41 (2005).
16. M. Ahmed, A. K. Verma, and R. Patel, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 100315 (2020). DOI: 10.1016/j.scp.2020.100315
17. Т. И. Николаева, М. В. Молчанов, К. С. Лауринавичюс и др. *Международ. журн. приклад. и фундамент. исследований*, **10** (3), 442 (2016).
18. Т. И. Николаева, К. С. Лауринавичюс, В. В. Капцов и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **167** (2), 194, (2019).
19. В. В. Капцов, Г. Н. Русаков, Ю. А. Илларионов и др., Патент РФ № 2035855, БИ № 15 (1995).
20. Л. Я. Телишевская, *Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение* (Аграрная наука, М., 2000).
21. Q. Wang, P. Ma, X. Ma, and D. J. Fan, *Chem. Pharm. Res.*, **6**, 278 (2014).
22. S. Iltchenko, A. P. Kempka, R. C. Prestes, and R. Bras. *Tecnol. Agroindustr.*, **11** (1), 2165 (2017).
23. А. Н. Михайлов, *Коллаген кожного покрова и основы его переработки* (Легкая индустрия, М., 1971).

Comparative Analysis of the Degree of Hydrolysis of Biopolymers in Hyaline Cartilage Homogenates in the Presence of Proteolytic Enzymes

T.I. Nikolaeva*, D.A. Barsuk**, M.V. Molchanov*, D.A. Prokhorov*,
V. I. Emelyanenko*, and P.V. Shekhovtsov*

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

**Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University,
prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Investigating the degree of hydrolysis in the presence of different proteolytic enzymes is one of the tasks regarding further development of nutraceuticals obtained from connective tissues for biomedicine. Hydrolysis of biopolymers in cattle and swine tracheal hyaline cartilage homogenates was carried out in the presence of the following enzymes: pancreatin, chymopsin, papain and karipazim, a drug that contains papain, a proteolytic enzyme. This study shows that karipazim manufactured by MedFlorina LLC has better efficacy than karipazim manufactured by ZAO Vifiteh, and the greatest degree of hydrolysis for collagen occurs at 60°C and karipazim concentration of 10%. More complete hydrolysis of proteoglycans was performed in the cattle hyaline cartilage homogenates, because the analysis of NMR spectra revealed the glucose, the final product of glycosaminoglycan hydrolysis.

Keywords: hyaline cartilage, collagen, glycosaminoglycans, degree of hydrolysis, temperature, concentration

БИОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ОЛЬФАКТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2023 г. А.Е. Матухно*, М.В. Петрушан*, Л.В. Лысенко*, **, #, В.Н. Киной*

*Научно-исследовательский технологический центр нейротехнологий Южного федерального университета, пр. Стачки, 194, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

**Физический факультет Южного федерального университета, ул. Зорге, 5, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

#E-mail: lalv@sfedu.ru

Поступила в редакцию 08.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Биосенсорные методы анализа активно совершенствуются и приобретают все большее значение в сферах безопасности, медицины, в частности, мониторинга онкозаболеваний, контроля качества окружающей среды и др. В настоящей работе рассматривается развитие биосенсорной системы на основе технологии использования обонятельной луковицы (ОЛ) животных макросматиков с помощью оптических методов визуализации одорант-специфичных паттернов гломерулярной активности. Сложности автоматической детекции одорологических вызванных паттернов при повторяющейся стимуляции обусловлены процессами адаптации, проявляющимися в обратимом изменении чувствительности нейронных структур обонятельного анализатора. Экспериментально установлены оптимальная длительность стимулов и межстимульных интервалов, позволяющая стабилизировать характер ответной реакции гломерул при повторяющейся стимуляции и визуализировать паттерны гломерулярной активности с постоянной точностью. Полученные результаты расширяют существующий инструментарий, применяемый для разработки биосенсорных систем.

Ключевые слова: биосенсорные системы, мультифотонная микроскопия, обонятельная луковица.

DOI: 10.31857/S0006302923060157, EDN: RMCRFW

Разработка технологии биосенсорных систем связана, прежде всего, с выяснением структурно-функциональной организации обонятельного анализатора животных [1], включая молекулярный уровень мембранных белков [2–5], развитием микроэлектродных [6] и информационных технологий [7]. Как известно, отличительными особенностями обонятельного анализатора животных-макросматиков являются чрезвычайно высокая чувствительность, широкий (практически неограниченный) спектр распознаваемых запахов и способность распознавать последние в реальном масштабе времени. Сфера применения биосенсорных систем, обладающих такими свойствами и лишенных ограничений, свойственных живым организмам (необходимость обучения распознаванию целевых веществ, зависимость эффективности распознавания от состояния животного и ряда других факторов), потенциально чрезвычайно широка и включает решение акту-

альных проблем в области безопасности, качества жизни человека и ряде других.

Одно из перспективных направлений развития технологии биосенсорных систем связано с визуализацией кальциевых сигналов нейрональной активности на доступной (дорсальной) поверхности обонятельной луковицы (ОЛ) животных-макросматиков (в частности, грызунов – мышей и крыс) нейрооптическими средствами (минископ, лазерная сканирующая микроскопия).

Эпителий носовой полости млекопитающих содержит большое количество) обонятельных сенсорных нейронов (ОСН), в частности, у мышей их более 2 млн [8]. Основная функция ОСН состоит в выделении, кодировании и передаче информации о качестве, интенсивности и продолжительности действия специфических для них одорантов в обонятельную луковицу, которая является первичным звеном обработки сенсорной информации в центральной нервной системе. Известно, что каждый ОСН экспрессирует только один тип гена, связанного с определенным типом мембранных G-связанных рецептор-

Сокращения: ОЛ – обонятельная луковица, ОСН – обонятельные сенсорные нейроны, ФК – функциональная карта, РИ – регионы интереса).

ных белков (рецепторов), способных взаимодействовать с лигандами (химическими соединениями) со сходными химическими свойствами и молекулярной структурой [9–11]. Известно также, что, в частности, в геноме мышей содержится более 1000 генов этого семейства [12, 13]. Предполагается, что сложные запахи (включающие множество одорантов) кодируются комбинациями ОСН, чувствительных к разным одорантам. Увеличение концентрации молекул одорантов приводит к возрастанию числа активируемых сенсорных нейронов.

Аксональные проекции ОСН, экспрессирующих гены одного типа, конвергируют в локальных областях (гломерулах), расположенных на поверхности обоих ОЛ [14–16]. Гломерулы представляют собой сферические (диаметром 50–300 мкм), морфологически и функционально обособленные модули, в которых аксоны ОСН контактируют с дендритами митральных и пучковых клеток, передающих информацию о запахах в вышележащие отделы мозга, а также дендритами интернейронов, формирующих внутри- и межгломерулярные тормозные связи [17].

Различными методами функционального картирования ОЛ показано, что одоранты с различными молекулярными свойствами вызывают распределенные, но повторяющиеся пространственно-временные паттерны гломерулярных ответов [14, 18–23]. Гломерулы, активирующиеся одорантами со сходными молекулярными свойствами, пространственно группируются в пределах так называемых кластеров [24–30]. Количество гломерул, активируемых одорантами со сходной топологией, зависит от их концентрации [19, 31–34]. При этом, информация о качестве одоранта содержится не только в пространственной локализации, но и во временной динамике гломерулярной активации [35–37].

Немаловажное значение в формировании пространственно-временных функциональных карт гломерулярной активности при длительной или повторяющейся стимуляции имеют процессы адаптации, проявляющейся в обратимом изменении чувствительности нейронных структур обонятельного анализатора. Показано, что механизмы краткосрочной адаптации (секунды, минуты) связаны с процессами, протекающими на уровне ОСН [37–39], а также нейронных сетей ОЛ [40] с вовлечением высших отделов ЦНС, в частности, кортикофугальных влияний пириформной коры [41–44]. Механизмы долговременной адаптации (десять минут, часы) связаны, по-видимому, со сложными морфологическими перестройками синаптических связей на уровне нейронных сетей ОЛ [40, 45], что важно для восприятия высоко значимой запаховой (ольфакторной) информации. Вследствие указанных причин повторная

ольфакторная стимуляция животного даже относительно простыми по своим физико-химическим свойствам одорантами (мономолекулярными соединениями) приводит к существенной вариативности функциональных карт гломерулярной активности ОЛ [46, 47, 48], которая, как правило, ограничена областью соответствующих одорант-специфичных кластеров. Наряду с этим, вариативность паттернов гломерулярной активности связана с физиологическими причинами (флуктуации рН крови, концентраций O_2 и CO_2 в крови), а также попаданием различного количества молекул одоранта в носовую полость вследствие неравномерного дыхания животного. Вследствие указанных причин создание биосенсорных систем на основе оптических методов визуализации нейрональной активности доступной поверхности ОЛ предполагает разработку средств распознавания одорант-специфичных паттернов функционально активных гломерул (функциональных карт), регистрируемых в виде потока соответствующих изображений. Эффективность работы таких биосенсорных систем будет определяться воспроизводимостью функциональных карт при многократном предъявлении идентичных по своим физико-химическим свойствам одорантов. Однако в научной литературе отсутствуют сведения о динамических характеристиках реакций гломерул при повторяющейся стимуляции с учетом всех приведенных выше факторов, а также рекомендации по стабилизации функциональных карт гломерулярной активности, режимах активации сложной многослойной нейронной сети ОЛ с учетом механизмов синаптической пластичности.

Целью данной работы являлось определение параметров ольфакторной стимуляции животных для стабильной регистрации воспроизводимых одорант-специфичных функциональных карт с помощью методов лазерной сканирующей микроскопии.

Анализ полученных экспериментальных данных позволил установить оптимальные параметры длительности стимулов и межстимульных интервалов при повторяющемся ольфакторном воздействии.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Эксперименты проводили на шести взрослых (в возрасте 5.5–8 месяцев, массой 300–500 г) самцах domestikированных серых крыс (*Rattus norvegicus*), приобретенных в лаборатории эволюционной генетики ИГиГ СО РАН (Новосибирск). Выбор этих животных определялся тем, что их морфофункциональные особенности обонятельной системы, согласно имеющимся данным, наименее деформированы в ре-

зультате искусственного отбора. Крыс содержали в условиях 12/12-часового цикла «свет/темнота» в отдельных клетках при постоянной температуре ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) и влажности. Животные имели свободный доступ к пище (полнораационный экструдированный комбикорм) и очищенной воде.

Наркоз и хирургические процедуры. Детальное описание хирургических процедур приведено в работе [49]. Для анестезии использовали (внутримышечно) смесь ксилазина гидрохлорида (10–15 мг/кг, препарат Ксилазин) и тилетамина с золазепамом (10 мг/кг, препарат Золетил 100). При снижении глубины наркоза допускали дополнительное введение до 25% первоначальной дозы Золетила 100. Для снижения внутричерепного давления вводили внутривенно маннитол (1 г/кг). Для локальной анестезии подкожно вводили 0.1 мл лидокаина. Животные под наркозом свободно дышали. Во время операции температура тела поддерживалась в пределах $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. После краниотомии, а затем и дуратомии в ОЛ болюсно с помощью микропипетки вводили раствор чувствительного к кальцию красителя Cal-590 AM (AAT Bioquest, США) в концентрации 1 мМ. Краниальное окно заполняли 1.5%-м агарозным гелем. Трепанационное отверстие закрывали с помощью покровного стекла толщиной 0.17 мм (Gerhard Menzel, Германия), закрепляя его стоматологическим светоотверждаемым полимером. Для фиксации животного под объективом во время визуализации на его голове был закреплен держатель в виде прямоугольной стальной пластины.

Оборудование для визуализации кальциевых сигналов и стимуляции животного одорантами. Принципиальная схема экспериментальной установки для визуализации кальциевых сигналов на поверхности ОЛ животных приведена на рис. 1а. Регистрацию флуоресценции кальций-чувствительного красителя на уровне гломерулярного слоя ОЛ (50–200 мкм от уровня поверхности) проводили в мультифотонном режиме с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного 10-кратным объективом (W Plan-Apochromat 10 $\times$ /0.5 DIC D-0.17 VIS-IR M27 75 мм). Краситель Cal-590 AM возбуждали с помощью фемтосекундного лазера Chameleon Discovery (Coherent, США) на длине волны 1040 нм. Кальциевые сигналы регистрировали с помощью NDD-детектора на основе арсенида фосфида галлия в диапазоне 575–610 нм. Временные серии изображений были получены с частотой 4.2057 кадра в секунду и пространственным разрешением 256×256 пикселей. Каждый пиксель соответствовал размеру 4.74×4.74 мкм на проецируемой поверхности ОЛ. Ротральная и каудальная области ОЛ сканировали отдельно (рис. 1б). Полученные изображения впоследствии программно «сшивали».

Животных под объективом микроскопа перемещали с помощью моторизованного предметного стола ZDeck HZ101PM (Prior Scientific, Великобритания). Настройку микроскопа LSM 880 и моторизованного предметного стола осуществляли с помощью интегрированного программного обеспечения Zen Black 2.3 (Carl Zeiss, Германия). Для исследования стимул-зависимой кальциевой активности гломерул, расположенных на дорсальной поверхности ОЛ животных, микроскоп LSM 880 был синхронизирован с системой предъявления одорантов через специальное триггерное устройство (рис. 1а). Таким образом, была реализована возможность получения временных серий изображений с точной привязкой начала и конца каждого стимула к конкретным кадрам формируемого в процессе сканирования видеопотока. Оригинальная система предъявления одорантов включала емкости и электромагнитные клапаны (Burkert, Германия), управляемые программным обеспечением. Для ольфакторной стимуляции использовали насыщенные пары метилбензоата ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOCH}_3$). Газо-воздушные смеси одоранта приготавливали, используя очищенный угольным фильтром воздух. Скорость потока газовой смеси во время стимуляции составляла ≈ 1 л/мин.

Обработка и анализ временных серий изображений, получаемых в ходе визуализации кальциевых сигналов. Общая стратегия обработки данных для анализа стимул-зависимой активности нейронных структур ОЛ может быть представлена следующим образом:

- 1) компенсация движения сканируемых поверхностей, вызванного дыханием и сердцебиением;
- 2) формирование функциональной карты (ФК) гломерулярной активации, вызванной ольфакторной стимуляцией, посредством вычисления разности текущей и фоновой интенсивности флуоресценции;
- 3) «сшивание» ротральной и каудальной частей ФК для соответствующих областей сканирования в единое изображение;
- 4) детектирование активных гломерул и определение их морфофункциональных характеристик.

Рассмотрим эти этапы более детально.

Этап 1. Поскольку размеры области сканирования достаточно малы, принимается, что движение сканируемых областей является однородным, т.е. движение всех точек можно представить как движение целого.

В процессе стабилизации сначала вычисляется изображение усредненной флуоресценции по всем кадрам временной серии. Из этого изображения усредненной интенсив-

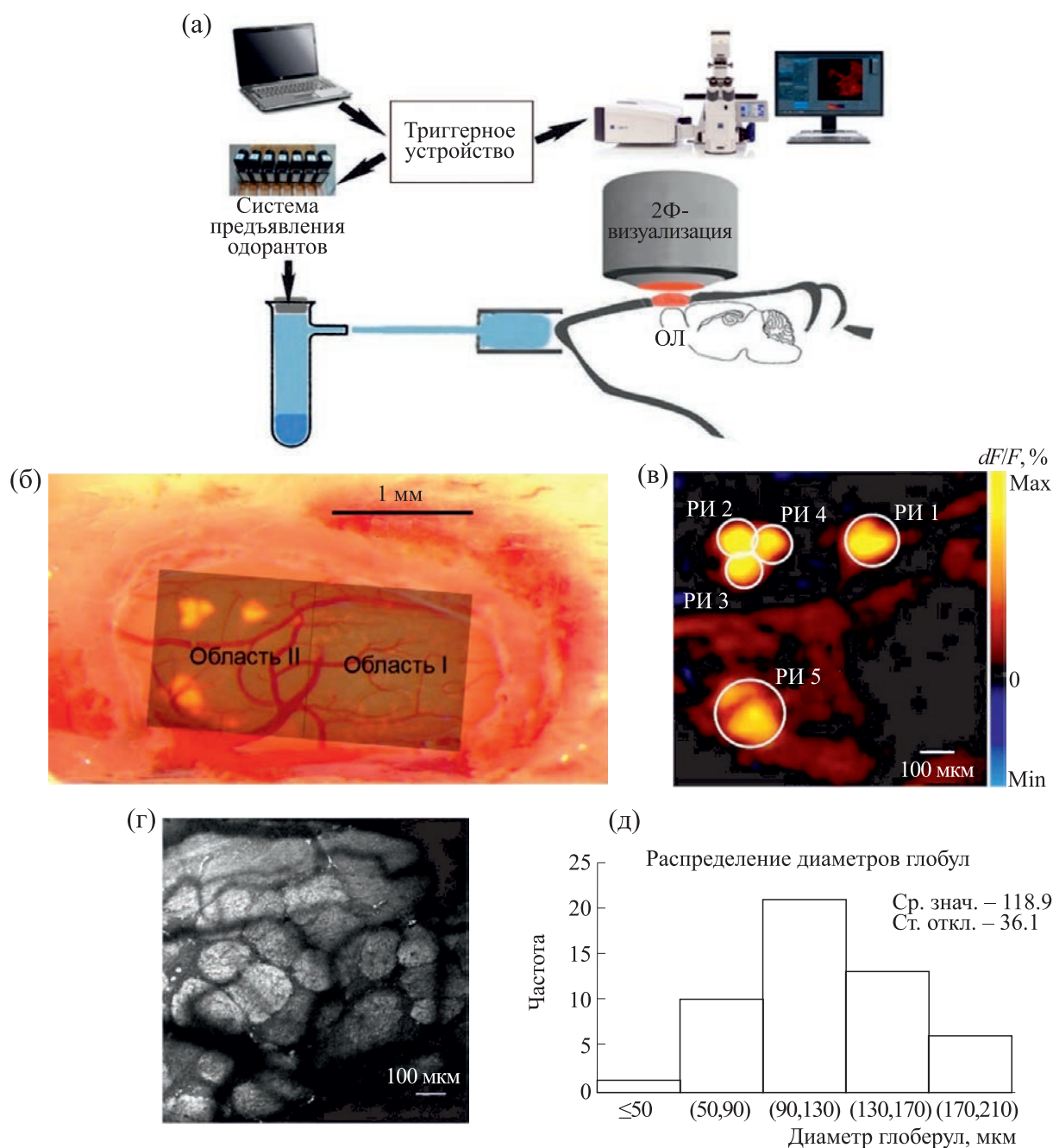


Рис. 1. Принципиальная схема экспериментальной системы двухфотонной (2Ф) визуализации сигналов кальций-чувствительного флуоресцентного красителя на дорсальной поверхности (ОЛ) крыс. (а) — Схема экспериментального оборудования с синхронизацией системы подачи одорантов и лазерного сканирующего микроскопа. (б) — Оптически прозрачное краниальное окно над дорсальной поверхностью ОЛ с двумя областями сканирования (область I и область II, шкала 1 мм); (в) — функциональная карта (ФК) стимул-зависимой кальциевой активности ОЛ животных (соответствует области II). dF/F — шкала цветового кодирования, отражающая отклонение интенсивности флуоресценции от фона (0). На ФК белыми окружностями выделены регионы интереса (РИ), внутри которых площадь активности соответствует реальным размерам гломерул у данного вида животных (шкала 100 мкм). (г) — Гломерулярное поле ОЛ серых крыс, полученное с помощью интраназального окрашивания флуоресцентным красителем. (д) — Гистограмма распределения диаметров гломерул. Среднее значение диаметров (ср. знач.) — 118.9 мкм, стандартное отклонение (ст. откл.) — 36.1.

ности за эталон берется изображение несколько меньшего размера (246×246 пикселей) относительно первоначальных кадров (256×256). Далее осуществляется поиск максимально соответствующих эталонному фрагментов в каждом изображении временной серии. Максимальное соответствие определяется методом скользящего окна с минимизацией евклидова расстояния между разверткой интенсивностей изображения усредненной интенсивности флуоресценции и разверткой интенсивностей каждого изображения временной серии в рамках окна обработки. Найденные соответствия задают последовательность координат, которые определяют характер относительного движения изображений временной серии (1).

$$\{x_s, y_s\} = \underset{i,j}{\operatorname{argmin}} \sqrt{\sum_{x,y \in X} |f(x,y) - g(x+i, y+j)|^2}, \quad (1)$$

где $\{x_s, y_s\}$ — координаты верхнего левого угла оптимального (согласно критерию 1) положения скользящего окна, $f(x,y)$ — функция интенсивности среднего изображения; $g(x,y)$ — функция интенсивности окна размером 246×246 пикселей одного кадра временной серии, X — прямоугольная область скользящего окна.

Последовательность координат $\{x_s, y_s\}$ для серии кадров определяет траекторию однородного движения изображения. Выбор размера скользящего окна для поиска соответствующих фрагментов последовательных кадров обусловлен ожидаемой интенсивностью движения наблюдаемого объекта. В частности, окно размером 246×246 пикселей имеет 10×10 положений внутри оригинального изображения размером 256×256 пикселей. Этот диапазон возможных положений соответствует ожидаемой интенсивности интегрального движения изображений в рамках последовательной серии, не превышающей ± 5 пикселей.

В процессе стабилизации происходит переход к новой «стабилизированной» временной серии изображений меньшего размера (246×246), вырезанных из изображений оригинальной временной серии (256×256) в положениях максимального соответствия в рамках выбранной метрики.

Процедура стабилизации повторяется дважды. На второй итерации в качестве среднего изображения используется среднее стабилизированное (при первой итерации) изображение. В результате формируются дважды стабилизированные

временные серии изображений, отражающие интенсивность флуоресценции кальций-чувствительного красителя. Двойная стабилизация используется для повышения эффективности устранения межкадровых пространственных смещений, обусловленных движением мозга, вызванным дыханием и изменением кровенаполнения сосудов. В частности, точность устранения движения определяется тем, насколько функция интенсивности среднего изображения (формула (1)) отражает структуру наблюдаемого фрагмента ОЛ. Например, в случае интенсивного движения наблюдаемой области ОЛ усредненное изображение будет размытым. В результате поиска соответствий фрагментов кадров временной серии с таким размытым усредненным изображением, траектория однородного движения изображения может быть вычислена неточно, ввиду разного уровня резкости (размытости) кадров временной серии и усредненного изображения. При втором проходе процедуры стабилизации в качестве среднего изображения выбирается изображение, усредненное по серии стабилизированных (на первом проходе) кадров временной серии. Ввиду частичной компенсации движения при первом проходе стабилизации, резкость усредненного изображения на стабилизированной временной серии увеличивается (уменьшается размытость), соответственно, ожидается более высокая точность определения траектории однородного движения изображения на втором проходе процедуры стабилизации.

Этап 2. На этапе вычисления ФК, связанных со стимул зависимыми кальциевыми сигналами, на стабилизированном временном ряду изображений флуоресценции условно выделяли предстимульные, стимульные и постстимульные периоды. В рамках всего предстимульного периода (длительность периода составляла ≈ 3 с во всех случаях) формируется новое фоновое усредненное изображение ($Baseline(x,y)$). Для стимульного и постстимульного периодов формируется новый массив усредненных изображений, где усредняются дважды стабилизированные изображения за секундные или двухсекундные отрезки (в зависимости от режима стимуляции). Затем для каждого усредненного изображения в стимульный и постстимульный период рассчитывается дифференциальная разность текущей интенсивности флуоресценции (dF/F) от фонового согласно уравнению (2):

$$dF / F = \frac{Act(x,y) - Baseline(x,y)}{Baseline(x,y) + Bias} \times 100, \quad (2)$$

где $Act(x,y)$ — развертка интенсивности пикселей изображения, полученного усреднением кадров заданного стимульного периода; $Baseline(x,y)$ — развертка интенсивности пикселей фонового

изображения; *Bias* — смещение для подавления высоких значений относительной активности при околонулевом уровне фоновой активности (устанавливали равным 5).

Таким образом, сформированные ФК характеризуют пространственное распределение среднего отклонения интенсивности флуоресценции от фона в пределах окна наблюдения.

Для визуализации пространственного отклонения интенсивности флуоресценции от фона ФК представлена в виде соразмерных (246×246) изображений с цветовой кодировкой, учитывающей шкалу интенсивности флуоресценции для всей временной серии по результатам сравнения усредненных изображений секундных или двухсекундных отрезков. Цветовой код отражает отклонение активности от фона — теплые цвета (от черного до красного и желтого) кодируют увеличение флуоресценции, а холодные (от черного до синего) — снижение (рис. 1в).

Этап 3. ФК нейрооптических откликов для разных областей сканирования «сшиваются» в общие карты. Области сканирования имеют частичное пересечение. Поскольку размеры сканируемых областей фиксированные, то при сшивании ФК учитываются координаты центров областей сканирования, согласно двумерным координатам моторизированного предметного стола.

Этап 4. Для детектирования основных функциональных единиц ОЛ — гломерул, активирующихся при ольфакторной стимуляции, были определены их размеры и количество на дорсальной поверхности ОЛ серых крыс. Определение пространственных параметров гломерул осуществляли с помощью интраназальной инъекции декстрановой формы красителя Oregon Green 488 (как описано в работе [31]). Пример изображений ретроградного флуоресцентного окрашивания гломерул показан на рис. 1г.

Измерение окрашенных гломерул ($n = 51$) с наиболее четкими очертаниями (количество животных — 4) показало, что 1) они имеют почти круглую форму и 2) их средний диаметр составляет 118.9 мкм (рис. 1д, стандартное отклонение — 36.1 мкм). Учитывая диаметр гломерул и размеры трепанационного окна (примерно 3.0×1.5 мм, что, согласно сделанным оценкам, составляет около 50–60% площади дорсальной поверхности ОЛ) следовало ожидать, что в пределах наблюдаемой области сканирования могут находиться до 150 гломерул, что составляет около 3.57–6.08% от их общего количества (около 2400–4200 на каждой доле ОЛ у крыс [50, 51]).

Определение оптимальных параметров ольфакторной стимуляции осуществляли по стимул-зависимому изменению кальциевой активности (флуоресценции) для каждой идентифицированной активной гломерулы. Для этого на предварительно сформированных функциональных кар-

тах выделяли регионы активности с относительной однородностью ответной реакции и по площади сопоставимые с размерами реальных гломерул. Детектированные гломерулы обозначали соответствующими регионами интереса (РИ) (например, рис. 1в). Далее для каждой детектированной гломерулы в границах соответствующих РИ на дважды стабилизированных временных сериях кальциевого сигнала рассчитывали стимул-зависимое изменение кальциевой активности как разность текущей интенсивности флуоресценции от фонового уровня (dF/F) согласно уравнению (1). В этом случае за текущую интенсивность флуоресценции принимали среднее значение яркости всех пикселей, попадающих в границы выделенных РИ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как указывалось выше, целью настоящего исследования являлось определение таких значений длительности межстимульных интервалов и стимулов, которые обеспечивают формирование специфической для одорантов и стабильной (от стимула к стимулу) пространственной структуры (паттернов) гломерулярной активности на функциональных картах.

Каждый эксперимент включал 2 этапа. На первом этапе вариабельность межстимульных интервалов сочеталась с постоянной длительностью стимулов. На втором, напротив, вариабельность длительности стимулов сочеталась с постоянным межстимульным интервалом.

Для определения оптимальных параметров ольфакторной стимуляции использовали как сформированные ФК стимул-зависимой гломерулярной активации, так и ответные реакции индивидуальных гломерул, согласно установленным РИ.

Оптимальная длительность межстимульных интервалов. Для определения оптимальной длительности межстимульных интервалов в сериях, включающих пятикратное предъявление стимулов фиксированной длительности (3 с), межстимульный интервал от серии к серии задавался равным 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 и 50 с.

В результате проведенных экспериментов с использованием указанного выше протокола стимуляции была зафиксирована существенная трансформация паттернов гломерулярной активности в зависимости от длительности межстимульного интервала. Индивидуальные гломерулярные ответные реакции практически у каждого животного имели различия амплитудных (интенсивность флуоресценции) и временных параметров. Сам по себе этот факт не является новым и описан, например, в работе [52].

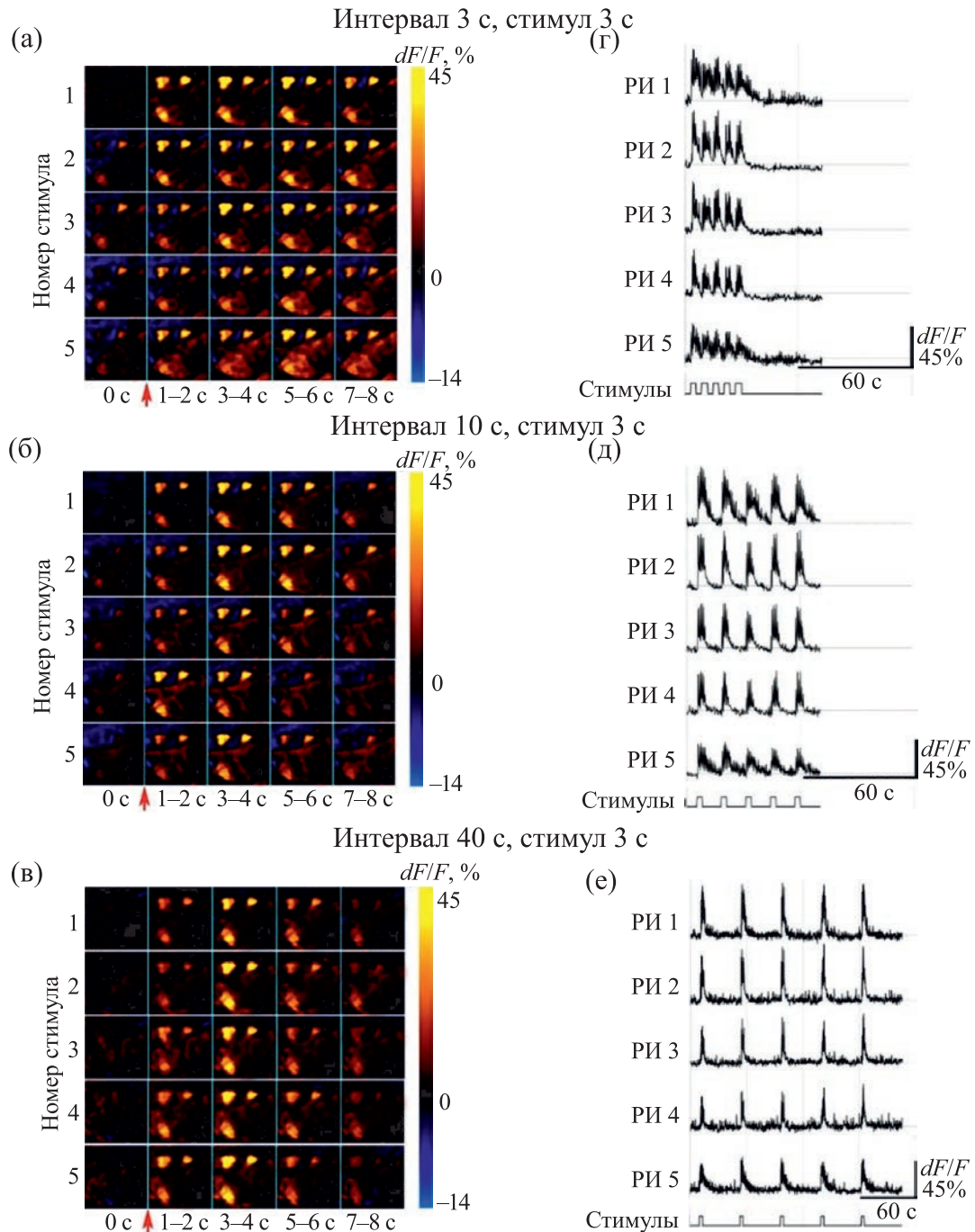


Рис. 2. Пространственно-временные паттерны гломерулярной активности ОЛ крыс, вызванные ольфакторной стимуляцией (насыщенные пары метилбензоата) с варибельным межстимульным интервалом и постоянной длительностью стимулов. (а)–(в) – Усредненные функциональные карты, полученные при повторной стимуляции (порядковый номер стимула обозначен слева цифрами): (а) – межстимульный интервал 3 с при длительности стимулов 3 с, (б) – межстимульный интервал 10 с при длительности стимулов 3 с, (в) – межстимульный интервал 40 с при длительности стимулов 3 с. (г)–(е) – Ответная реакция детектированных по морфофункциональным признакам гломерул (выделенных как соответствующие РИ на рис. 1в), полученная в условиях пятикратной стимуляции: (г) – межстимульный интервал 3 с при длительности стимулов 3 с, (д) – межстимульный интервал 10 с при длительности стимулов 3 с, (е) – межстимульный интервал 40 с при длительности стимулов 3 с. dF/F – дифференциальная разность интенсивности флуоресценции (уравнение (2)).

Для наглядности изложения полученных результатов на рис. 2 представлены ФК и индивидуальные гломерулярные ответные реакции, полученные на областях сканируемой поверхности мозга, приведенных на рис. 1б и 1в, где по морфо-функциональным признакам детектированы 5 гломерул, которые выделены соответствующими РИ. На рис. 2а–в ФК сгруппированы по столбам согласно порядковому номеру ольфакторного стимула (номер слева) и в колонки согласно периоду времени до и после стимуляции (обозначение секунд снизу). Для каждого РИ представлены ответные реакции в соответствии с режимом стимуляции (рис. 2г–е).

На рис. 2а можно видеть, что при длительности межстимульных интервалов 3 с только перед первым из 5 стимулов (красная стрелка снизу) нет фоновой гломерулярной активности в предстимульный период. Перед каждым последующим стимулом в предстимульный период заметна существенная гломерулярная активность, что свидетельствует о недостаточности времени для восстановления уровня интенсивности флуоресценции до фонового состояния, соответствующего минимальному уровню активности гломерул в отсутствие специфических для них одорантов во вдыхаемом животным воздухе. Анализ активности индивидуальных детектированных гломерул, выделенных соответствующими РИ (рис. 2г), свидетельствовал о наличии волнообразного изменения интенсивности флуоресценции без восстановления до фонового уровня в межстимульный период. Кроме того, наблюдается снижение амплитуды ответной реакции гломерул с каждым последующим стимулом, что, по-видимому, связано с эффектом привыкания. Последнее согласуется со сведениями, приводимыми другими авторами [36].

При длительности межстимульного интервала 10 с (рис. 2б,д) интенсивность флуоресценции в предстимульный период заметно меньше, но у двух (РИ1 и РИ5) из пяти детектированных гломерул полностью не восстанавливается до состояния покоя.

При увеличении длительности межстимульного интервала до 40 с гломерулярной активности в предстимульный период не наблюдается. Восстановление интенсивности флуоресценции до базового (предстимульного) уровня происходит для всех детектированных гломерул (рис. 2в,е).

Описанную выше динамику наблюдали у 28 детектированных гломерул у 6 животных (рис. 3а–в). На указанных изображениях серыми линиями обозначены стимул-зависимые реакции индивидуальных детектированных гломерул, черной — усредненная ответная активность. Следует отметить существенную амплитудную вари-

бельность (интенсивность флуоресценции) индивидуальных гломерулярных ответов.

С целью определения оптимальной длительности межстимульного интервала для формирования стабильных (хорошо выраженных и с постоянной амплитудой) ответных реакций гломерул на фоне повторяющейся стимуляции рассчитывали отношение сигнал/фон (K_M), согласно уравнению (3):

$$K_M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\frac{1}{k} \sum_{j=1}^k I_{ij}^{\text{сигнал}}}{\frac{1}{k} \sum_{j=1}^k I_{ij}^{\text{фон}} + \text{Bias}}, \quad (3)$$

где $I^{\text{сигнал}}$ — средняя интенсивность флуоресценции в границах каждого РИ (с центром окружности x, y и диаметром d) в стимульный период, $I^{\text{фон}}$ — средняя интенсивность флуоресценции для каждого РИ в предстимульный период, n — количество наблюдаемых РИ (28 у 6 животных), k — количество стимулов (5) в серии ольфакторной стимуляции. Предстимульные и стимульные периоды для расчетов $I^{\text{фон}}$ и $I^{\text{сигнал}}$ всегда были равны интервалу времени ≈ 3 с. Bias — смещение значений относительной активности при около-нулевом уровне фоновой активности (устанавливали равным 1).

Как следует из рис. 3г, максимальное (оптимальное) значение межстимульных интервалов составляет 40 с.

Оптимальная длительность стимулов. На втором этапе в сериях с пятикратным предъявлением стимулов длительностью 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 20 с межстимульный интервал был фиксированный и составлял 40 с.

Изменение длительности стимулов оказало существенное влияние на формирование паттернов гломерулярной активности, что отражается на представленных ФК (рис. 4а–в). При длительности стимулов 1 с (рис. 4а) в предстимульный период (слева от красной стрелки внизу) гломерулярной активности нет для каждого стимула в серии (обозначены соответствующим номером слева). Ответные реакции РИ, представленные на рис. 4г, подтверждают этот факт. В этом случае дифференциация пространственных паттернов гломерулярной активности в предстимульный и стимульные периоды может быть успешно выполнена.

При увеличении длительности стимулов до 13 с в предстимульный период регистрируется активность некоторых детектированных гломерул, появляются окрашенные пятна (темно оранжевый цвет) на ФК слева от красной стрелки (рис. 4б). Пространственное положение регионов активности на ФК в предстимульный период соответствует РИ1 и РИ5, представленным на

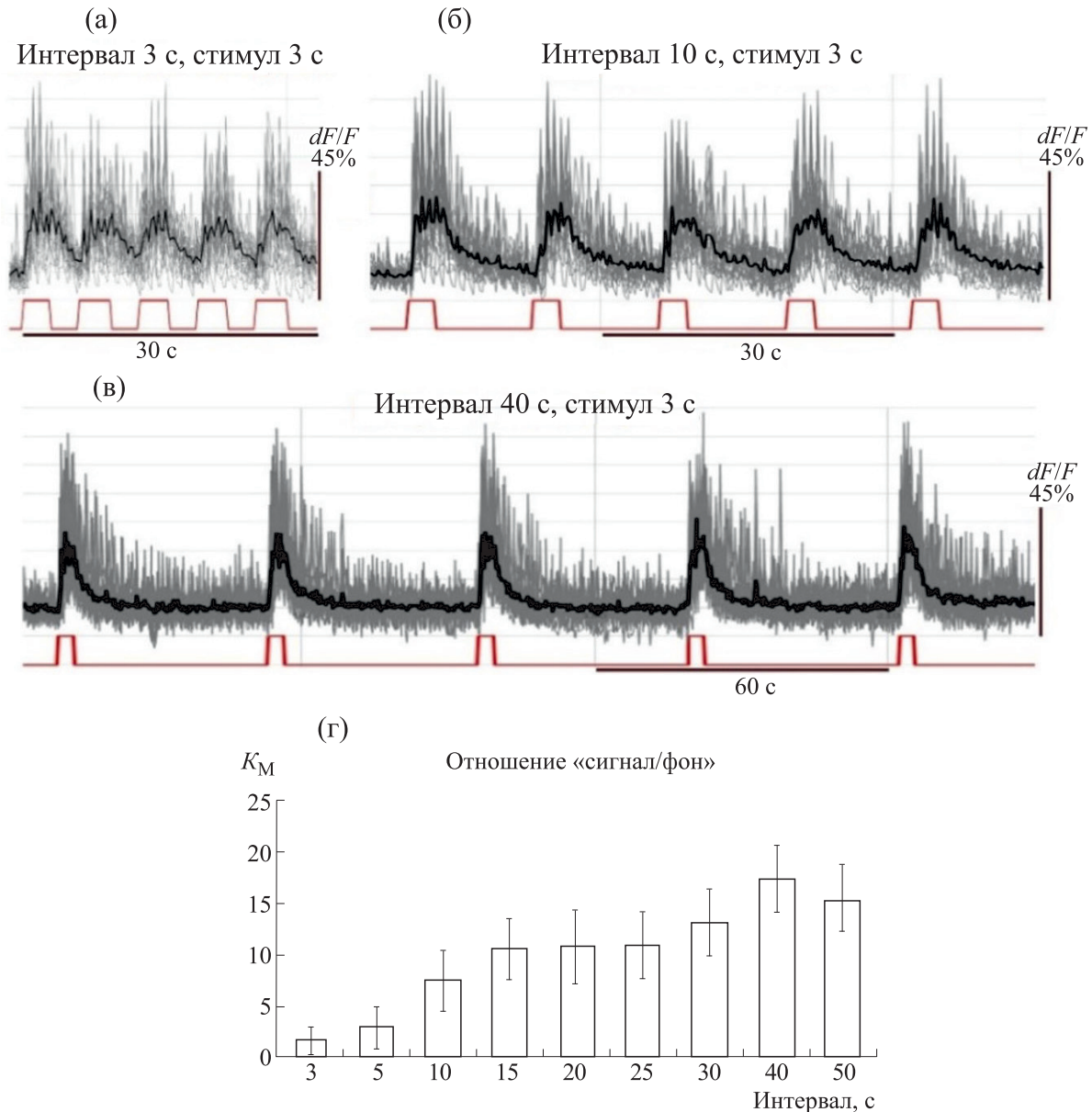


Рис. 3. Стимул-зависимая ответная реакция 28 гломерул, детектированных у шести животных экспериментальной группы. (а) — Динамика кальциевых сигналов детектированных гломерул, полученная при межстимульном интервале 3 с при длительности стимулов 3 с; (б) — межстимульный интервал 10 с при длительности стимулов 3 с; (в) — межстимульный интервал 40 с при длительности стимулов 3 с. Серые линии — индивидуальные гломерулы, черная кривая соответствует усреднению по всем гломерулам. Кальциевые сигналы для всех детектированных гломерул нормированы (dF/F) согласно уравнению (2). (г) — Зависимость ответной реакции гломерул от длительности межстимульных интервалов, представленная в виде отношения сигнал/фон (K_M), согласно уравнению (3).

рис. 4д. График активности для РИ1 свидетельствует о том, что интенсивность флуоресценции не возвращается к фоновому уровню перед каждым последующим стимулом. Для РИ5 следует отметить появление значительных флуктуаций интенсивности флуоресценции в предстимульные периоды, связанных, в частности, с дыханием. При этом наблюдается снижение амплитуды регистрируемого сигнала от стимула к стимулу (эффект привыкания), что заметно на ФК, вы-

строенных в колонку после красной стрелки (рис. 4б), как смещение яркости соответствующего региона активности (по шкале цветового кодирования справа) от ярко желтого до оранжевого цвета.

Увеличение длительности стимулов до 20 с приводит к значительным преобразованиям паттернов гломерулярной активности (рис. 4в). Для некоторых РИ гломерулярная активность обнаруживается в предстимульный период. Важно от-

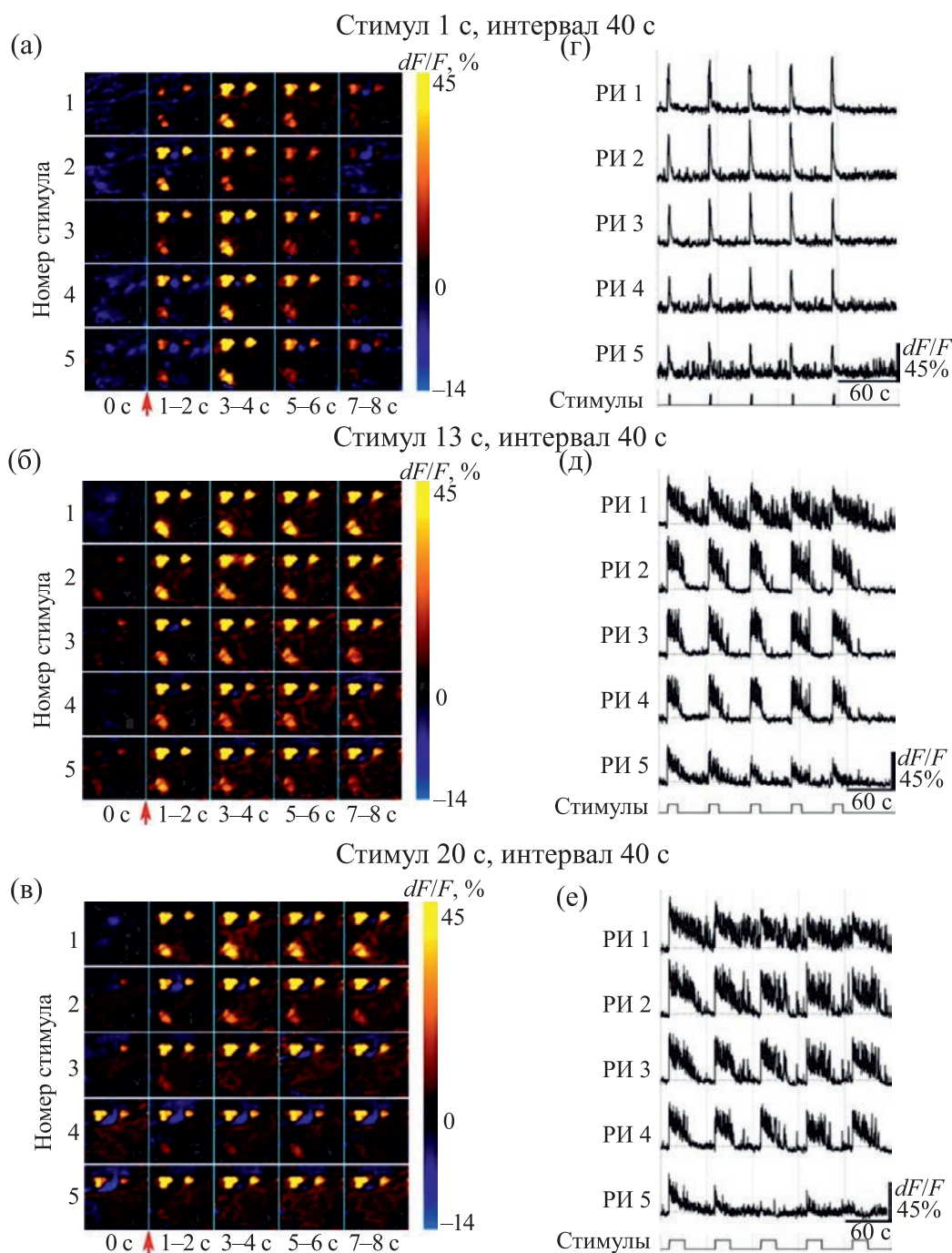


Рис. 4. Пространственно-временные паттерны гломерулярной активности ОЛ крыс, вызванные ольфакторной стимуляцией (насыщенные пары метилбензоата) с вариабельной длительностью стимулов и постоянным межстимульным интервалом. (а)–(в) – Усредненные функциональные карты, полученные при повторной стимуляции (порядковый номер стимула обозначен слева цифрами): (а) – длительность стимулов 1 с при межстимульном интервале 40 с, (б) – длительность стимулов 13 с при межстимульном интервале 40 с; (в) – длительность стимулов 20 с при межстимульном интервале 40 с. (г)–(е) – Ответная реакция детектированных по морфофункциональным признакам гломерул (выделенных как соответствующие РИ на рис. 1в), полученная в условиях пятикратной стимуляции: (г) – длительность стимулов 1 с при межстимульном интервале 40 с, (д) – длительность стимулов 13 с при межстимульном интервале 40 с, (е) – длительность стимулов 20 с при межстимульном интервале 40 с. dF/F – дифференциальная разность интенсивности флуоресценции (уравнение (2)).

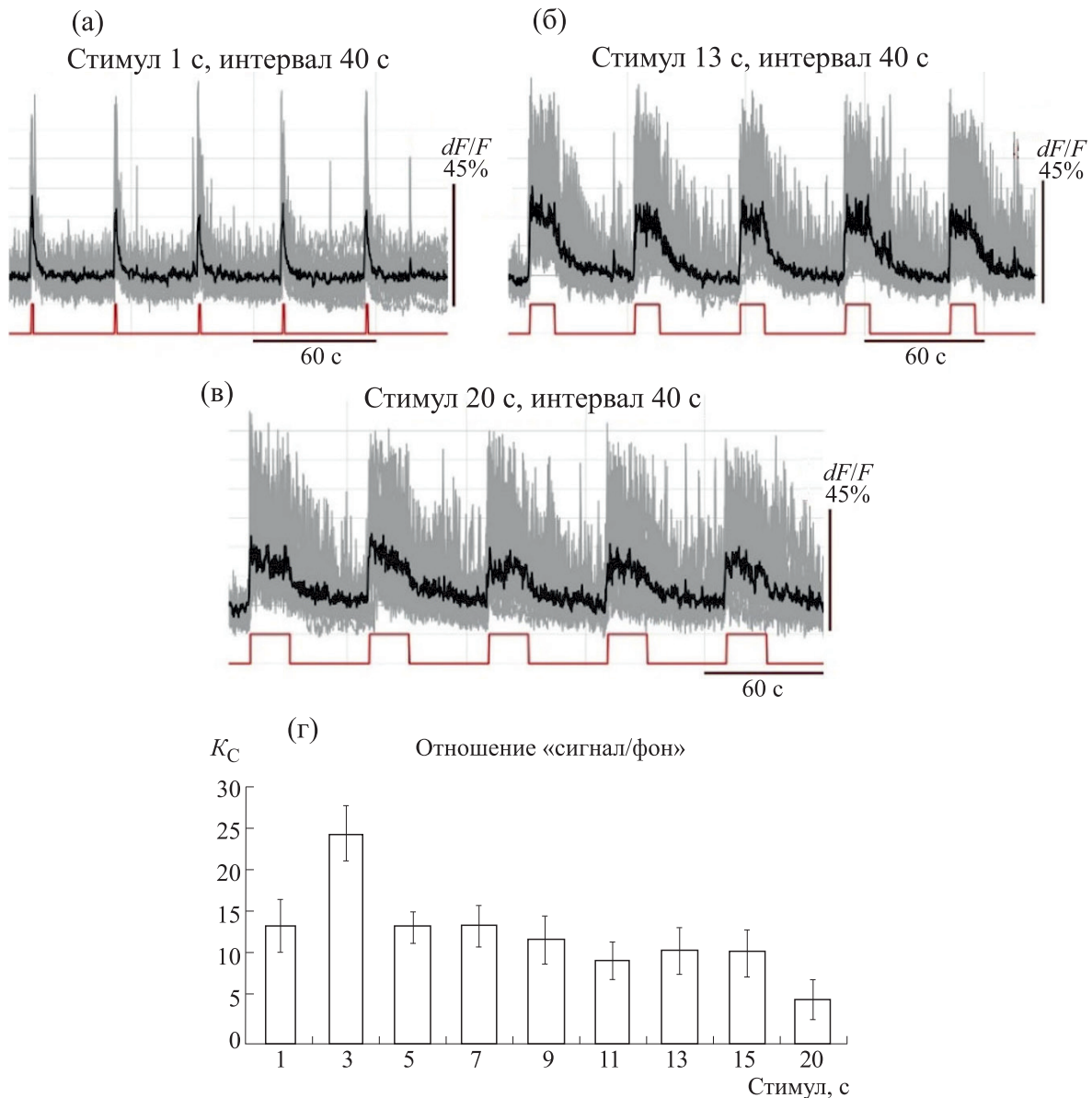


Рис. 5. Стимул-зависимая ответная реакция 28 детектированных гломерул. (а) — Динамика кальциевых сигналов детектированных гломерул, полученная при длительности стимулов 1 с и межстимульном интервале 40 с; (б) — длительность стимулов 13 с и межстимульный интервал 40 с; (в) — длительность стимулов 20 с и межстимульный интервал 40 с. Серые линии — индивидуальные гломерулы, черная кривая соответствует усреднению по всем гломерулам. Кальциевые сигналы для всех детектированных гломерул нормированы (dF/F) согласно уравнению (2). (г) — Зависимость ответной реакции гломерул от длительности стимулов, представленная в виде отношения сигнал/фон (K_C), по аналогии с уравнением (3).

метить, что для детектированной гломерулы, обозначенной РИ5, наблюдается эффект привыкания в стимульный период, который выражается в снижении амплитуды ответной реакции вплоть до полного ее отсутствия во время предъявления последнего пятого стимула (рис. 4е).

Ответная реакция 28 детектированных гломерул представлена на рис. 5а–в (серые линии — стимул-зависимые реакции индивидуальных гломерул, черная линия — усреднение). Как следует

из рисунка, наблюдается существенная вариабельность амплитуды (интенсивность флуоресценции) индивидуальных гломерулярных ответов. При длительности стимулов 20 с (рис. 5в) активность гломерул не восстанавливается до фоновое состояние в течение всего межстимульного интервала (40 с).

Для определения оптимальной длительности стимулов рассчитывали отношение сигнал/фон (K_C), по аналогии с уравнением (3). Отличие за-

ключалось в определении длительности стимульных периодов для расчетов $I_{\text{сигнал}}$, которую приравнивали к длительности стимулов. Длительность предстимульных периодов для расчетов $I_{\text{фон}}$ всегда была равна ≈ 3 с.

На рис. 5г представлена зависимость K_C от длительности стимулов для 28 идентифицированных гломерул. Как следует из рисунка, оптимальная длительность стимула, при которой отношение сигнал/фон принимает максимальное значение, составляет 3 с.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Как следует из приведенных выше результатов, визуализация постсинаптических реакций гломерул, вызванных предъявлением одоранта, обнаружила зависимость вызванных стимулом паттернов гломерулярной активности от длительности стимулов и межстимульных интервалов. Топология гломерулярных ответов в пределах области сканирования на соответствующих ФК, полученных при варьировании этих двух параметров, зависела от свойств индивидуальных гломерул. Например, при длительности межстимульного интервала 10 с восстановление ответной реакции (интенсивности флуоресценции) до предстимульного (фоновое) уровня наблюдалось не у всех детектированных гломерул (рис. 3б и 3д). Длительная стимуляция (20 с) приводила к инактивации ряда гломерул во время повторного предъявления одоранта (рис. 4в и 4е). Доля гломерул, активирующихся в ответ на повторяющиеся стимулы, оставалась стабильной при длительности межстимульного интервала не менее 30 с и длительности стимулов, не превышающей 3 с.

Полученные нами результаты согласуются с данными, приводимыми и другими авторами [52], указывающими на индивидуальную вариабельность временных параметров гломерулярных ответов, которые играют важную роль в процессах идентификации одорантов на уровне ОЛ.

Таким образом, для формирования одорант-специфичных функциональных карт гломерулярной активности необходимо учитывать индивидуальные свойства гломерул, попадающих в поле наблюдения. Рассчитанные в настоящей работе критерии отношения сигнал/фон для разных режимов стимуляции с переменным межстимульным интервалом (K_M) и переменной длительностью стимулов (K_C), на наш взгляд, позволяют выявить параметры стимуляции, которые обеспечат получение относительно стабильных (воспроизводимых от стимула к стимулу) функциональных карт, отражающих пространственную топологию паттернов гломерулярной активности на дорсальной части ОЛ исследуемых животных. Согласно критерию сиг-

нал/фон, для получения отчетливой и устойчивой ответной реакции гломерул в условиях периодической ольфакторной стимуляции длительность межстимульного интервала должна составлять около 40 с, длительность стимула — около 3 с. С другой стороны, нам удалось подтвердить гипотезу о том, что, подобрав режим стимуляции, можно стабилизировать характер ответной реакции гломерул при повторяющейся стимуляции, а функциональные карты воспроизводить с постоянной точностью.

Важно отметить, что приведенные временные параметры стимуляции определены для насыщенных паров метилбензоата, который является достаточно летучим веществом (давление насыщенных паров 0.38 мм рт. ст. при 25°C). Для низких концентраций летучих веществ ответная реакция гломерул по всей площади ОЛ будет отличаться, поскольку известно, что количество активируемых гломерул [20, 31, 33], а также амплитуда ответной реакции индивидуальных гломерул [19, 34] зависят от концентрации одорантов. Для низких концентраций летучих соединений оптимальные параметры ольфакторной стимуляции необходимо определять дополнительно.

Разработка биосенсоров — обширное направление исследований, включающее множество различных стратегий и методов, зависящих не только от анализируемого вещества, но и от условий эксплуатации биосенсора и предполагаемой точности измерений. Биосенсорные системы, считывающие информацию с использованием микроэлектродов и микроэлектродных матриц непосредственно из обонятельной системы млекопитающих, широко используются для задач распознавания летучих соединений [1, 53–56]. Несмотря на данные о высокой эффективности таких систем, следует отметить, что микроэлектродный метод чувствителен к иммунным реакциям и движениям электродов, что затрудняет получение нейронных сигналов в течение длительного периода времени [57–59]. Методы оптической визуализации лучше подходят для записи активности нейронов, дающих проекции в определенные области [60]. Хотя у кальциевой визуализации есть недостаток, заключающийся в более низком временном разрешении, чем у микроэлектродного метода, оптическая визуализация менее чувствительна к электрическим шумам и артефактам окружающей среды, что, дополнительно к чрезвычайно высокой чувствительности и специфичности к широкому спектру одорантов, дает возможность получать более стабильный сигнал в течение длительного времени. Особые свойства такого типа биосенсоров обусловлены технической возможностью анализа флуоресцентной кальций-зависимой активности больших по площади областей мозга. Это очень важно в случае регистрации сигналов от обоня-

тельного анализатора, поскольку кодирование информации на уровне первичного звена обработки сенсорной информации (обонятельной луковицы) осуществляется посредством пространственно-временных паттернов гломерулярной активности [14, 18–23, 61].

В настоящее время работы, связанные с визуализацией кальция, сосредоточены в основном на шумоподавлении, коррекции движения, классификации для идентификации клеток и количественной оценки кальциевых сигналов [62]. Проблемы биосенсоров, связанные с совместимостью живых организмов с техническими средствами, позволяющими проводить измерения, до сих пор не решены полностью. В частности, при разработке таких систем необходимо учитывать межиндивидуальные особенности локальных перегруппировок стереотипных (относительно анатомических ориентиров) позиций одорант-специфичных гломерул [19, 21, 22, 25, 63–65], а также гетерогенные свойства индивидуальных гломерул, связанные с временными параметрами фазо-зависимых гломерулярных ответов относительно вдохов [52]. Указанные проблемы требуют дополнительных усилий для ввода в эксплуатацию биосенсоров, связанные с калибровкой подобной системы для каждого анализируемого вещества и его концентраций.

Настоящая работа решает вопросы, связанные гетерогенными свойствами индивидуальных гломерул, что обеспечивает дополнительные возможности в реализации биосенсорных систем, основанных на оптической визуализации кальциевых сигналов гломерул. На основании полученных экспериментальных данных мы рекомендуем физиологически обоснованные временные параметры ольфакторной стимуляции, поскольку в современных научных исследованиях по данной тематике нет единого представления по этому вопросу [6, 31, 41, 43, 66]. Эволюция предложенного нами подхода к разработке биосенсорной системы возможна при использовании минискапа с большим полем зрения [67], позволяющего проводить оптическую визуализацию через краниальные окна у свободно подвижных грызунов, что поможет сделать биосенсорную систему портативной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00683, <https://rscf.ru/project/22-25-00683/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по биоэтике Южного федерального университета (протокол № 4 от 29.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Кирой, П. О. Косенко, И. Е. Шепелев и др., Журн. аналит. химии, **78** (8), 1 (2023).
2. V. Akimov, E. Alfinito, J. Bausells, et al., Analog. Integr. Circ. Sig. Process., **57**, 197 (2008).
3. H. J. Ko and T. H. Park, J. Biol. Eng., **10** (17), 1 (2016).
4. Y. Lu, Y. Yao, S. Li, et al., Sensor Rev., **37** (4), 396 (2017).
5. О. Д. Новикова, Г. А. Набережных и А. А. Сергеев, Биофизика, **66** (4), 668 (2021).
6. K. Gao, S. Li, L. Zhuang, et al., Biosens. Bioelectron., **102**, 150 (2018).
7. I. V. Shcherban, P. O. Kosenko, O. G. Shcherban, et al., Inform. Sci. Control Systems, **5**, 62 (2020).
8. K. Mori, H. Nagao, and Y. Yoshihara, Science, **286** (5440), 711 (1999).
9. T. C. Bozza and J. S. Kauer, J. Neurosci., **18** (12), 4560 (1998).
10. B. Malnic, J. Hirono, T. Sato, et al., Cell, **9** (5), 713 (1999).
11. T. Bozza, P. Feinstein, C. Zheng, et al., J. Neurosci., **22** (8), 3033 (2002).
12. P. Mombaerts, Annu. Rev. Neurosci., **22**, 487 (1999).
13. X. Zhang and S. Firestein, Nat. Neurosci., **5** (2), 124 (2002).
14. R. Vassar, S. K. Chao, R. Sitcheran, et al., Cell, **79** (6), 981 (1994).
15. P. Mombaerts, F. Wang, C. Dulac, et al., Cell, **87** (4), 675 (1996).
16. B. Zapiec and P. Mombaerts, Cell Rep., **30** (12), 4220 (2020).
17. T. Imai, Semin. Cell Dev. Biol., **35**, 180 (2014).
18. K. Mori and Y. Yoshihara, Prog. Neurobiol., **45**, 585 (1995).
19. Y. Oka, S. Katada, M. Omura, et al., Neuron, **52**, 857 (2006).
20. B. D. Rubin and L. C. Katz, Neuron, **23** (3), 499 (1999).
21. E. R. Soucy, D. F. Albeanu, A. L. Fantana, et al., Nat. Neurosci., **12** (2), 210 (2009).
22. B. Zapiec and P. Mombaerts, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **112** (43), E5873 (2015).
23. S. DeMaria and J. Ngai, J. Cell Biol., **191** (3), 443 (2015).
24. N. Uchida, Y. K. Takahashi, M. Tanifuji, et al., Nat. Neurosci., **3** (10), 1035 (2000).
25. L. Belluscio and L. C. Katz, J. Neurosci., **21** (6), 2113 (2001).
26. Y. K. Takahashi, M. Kurosaki, S. Hirono, et al., J. Neurophysiol., **92** (4), 2413 (2004).
27. K. M. Igarashi and K. Mori, J. Neurophysiol., **93** (2), 1007 (2005).
28. K. Mori, Y. K. Takahashi, K. M. Igarashi, et al., Physiol. Rev., **86** (2), 409 (2006).

29. B. A. Johnson and M. Leon, *J. Comp. Neurol.*, **503** (1), 1 (2007).
30. K. Touhara, in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Ed. by A. Lajtha and K. Mikoshiba (Springer, Boston, 2009), pp. 139–160.
31. M. Wachowiak and L. B. Cohen, *Neuron*, **32** (4), 723 (2001).
32. M. Meister and T. Bonhoeffer, *J. Neurosci.*, **21** (4), 1351 (2001).
33. M. Wachowiak, L.B. Cohen, *J. Neurophysiol.*, **89** (3), 1623 (2003).
34. M. L. Fletcher, A. V. Masurkar, J. Xing, et al., *J. Neurophysiol.*, **102** (2), 817 (2009).
35. H. Spors, M. Wachowiak, L. B. Cohen, et al., *J. Neurosci.*, **26** (4), 1247 (2006).
36. R. M. Carey, J. V. Verhagen, D. W. Wesson, et al., *J. Neurophysiol.*, **101** (2), 1073 (2009).
37. B. Bathellier, O. Gschwend, and A. Carleton, in *The Neurobiology of Olfaction*, Ed. by A. Menini (CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2010), pp. 329–340.
38. T. Kurahashi and T. Shibuya, *Brain Res.*, **515** (1-2), 261 (1990).
39. F. Zufall and T. Leinders-Zufall, *Chem. Senses*, **25** (4), 473 (2000).
40. D. Chaudhary, L. Manella, A. Arellanos, et al., *Behav. Neurosci.*, **124** (4), 490 (2010).
41. D. A. Wilson, *J. Neurophysiol.*, **80** (2), 998 (1998).
42. D. A. Wilson, *J. Neurophysiol.*, **84** (6), 3036 (2000).
43. D. A. Wilson, *J. Neurophysiol.*, **90** (1), 65 (2003).
44. A. R. Best and D. A. Wilson, *J. Neurosci.*, **24** (3), 652 (2004).
45. A. M. McNamara, P. D. Magidson, C. Linster, et al., *Learn Mem.*, **15** (3), 117 (2008).
46. J. R. Schafer, I. Kida, F. Xu, et al. *Neuroimage*, **31** (3), 1238 (2006).
47. J. V. Verhagen, D. W. Wesson, T. I. Netoff, et al., *Nat. Neurosci.*, **10** (5), 631 (2007).
48. B. G. Sanganahalli, M. R. Rebello, P. Herman, et al., *Neuroimage*, **126**, 208 (2016).
49. R. A. Arefev, V. N. Kiroy, N. V. Bulat et al., *J. Neurosci. Methods*, **361**, 1 (2021).
50. E. Meisami. *Chem. Senses*, **15** (4), 407 (1990).
51. F. Pain, B. L. Heureux, and H. Gurden, *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 2689 (2011).
52. R. Iwata, H. Kiyonari, and T. Imai, *Neuron*, **96** (5), 1139 (2017).
53. L. Zhuang, T. Guo, D. Cao, et al., *Biosens. Bioelectron.*, **67**, 694 (2015).
54. K. Gao, S. Li, L. Zhuang, et al., *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 150 (2018).
55. E. Shor, P. Herrero-Vidal, A. Dewan, et al., *Biosens. Bioelectron.*, **195**, 113664 (2022).
56. P. Zhu, S. Liu, Y. Tian, et al., *ACS Chem. Neurosci.*, **13** (12), 1727 (2022).
57. R. Biran, D. C. Martin, and P. A. Tresco. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **82**(1),169 (2007).
58. J. Thelin, H. Jörntell, E. Psouni, et al., *PLoS One*, **6** (1), e16267 (2011).
59. L. S. Kumosa. *Adv. Sci. (Weinh)*, **10** (6), e2205095 (2023).
60. G. J. Broussard and L. Petreanu, *J. Neurosci. Methods*, **360**, 109251 (2021).
61. M. Wachowiak, W. Denk, and R. W. Friedrich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (24), 9097 (2004).
62. M. Robbins, C. N. Christensen, C. F. Kaminski, et al., *F1000Res.*, **10**, 258 (2021).
63. J. Strotmann, S. Conzelmann, A. Beck, et al., *J. Neurosci.*, **20** (18), 6927 (2000).
64. A. Nakashima, N. Ihara, M. Shigeta, et al., *Science*, **365** (46), 1 (2019).
65. K. Zhu, S. Burton, M. Nagai, et al., *Nature Commun.*, **13**(1), 5137 (2022).
66. M. C. Cheung, W. Jang, J. E. Schwob, et al., *Front. Neural. Circuits*, **7**, 207 (2014).
67. C. Guo, G. J. Blair, M. Sehgal, et al. *Sci. Adv.*, **9**(16), eadg391 (2023).

Biosensor Systems: Determination of Optimal Time Parameters of Olfactory Stimulation

A.E. Matukhno*, M.V. Petrushan*, L.V. Lysenko*, **, and V.N. Kiroy*

*Research Technology Center of Neurotechnology, Southern Federal University,
prosp. Stachki 194, Rostov-on-Don, 344090 Russia

**Department of Physics, Southern Federal University, ul. Zorge 5, Rostov-on-Don, 344090 Russia

Biosensor systems are improving swiftly and become increasingly important in areas such as defense and security, medical field, especially, cancer screening and detection, environmental quality monitoring, and so forth. The present work describes the development of a biosensor system, based on the use of macroscopic animal olfactory bulb (OB) visualized by optical imaging of odor-evoked glomerular activity patterns. The difficulties that automatic detection of odor-evoked patterns presents under multiple stimulation are associated with adaptation processes, which are manifested as a reversible change in the sensitivity of the neural structures of the olfactory system. The optimal stimulus duration and interstimulus intervals for stabilizing the glomerular response and getting images of glomerular activity patterns under the multiple odor stimulation with constant accuracy have been experimentally found. The results obtained show the availability of other resource in addition to the existing tools used for the development of biosensor systems.

Keywords: biosensor system, multiphoton microscopy, olfactory bulb

МЕТОД КРАТКОСРОЧНОГО ПРОГНОЗА УЛЬТРАДИАННЫХ И ИНФРАДИАННЫХ РИТМОВ НА ОСНОВЕ РЕГИСТРАЦИИ ФЛУКТУАЦИЙ РАДИОАКТИВНОСТИ КАЛИЯ-40

© 2023 г. М.Е. Диатроптов*,#, М.А. Диатроптова**, С.М. Слесарев***

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071, Россия

**НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра имени академика Б.В. Петровского, ул. Цюрупы, 3, Москва, 117418, Россия

***Ульяновский государственный университет, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновск, 432017, Россия

#E-mail: diatrom@inbox.ru

Поступила в редакцию 22.08.2023 г.

После доработки 11.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

В Москве и Ульяновске проведено одновременное наблюдение флуктуаций радиоактивности от природного изотопа калия-40. Показано, что изменения скорости счета от источников в данных географических точках не одновременны, а синхронизированы по местному солнечному времени. Основываясь на этом наблюдении и учитывая, что флуктуации радиоактивности коррелируют с ритмами температуры тела, разработан и подтвержден метод краткосрочного прогноза ультрадианных ритмов активности животных. Также проведен анализ согласованности динамики интенсивности флуктуаций распада и ежесуточных показателей прироста клеточной культуры L-929. Установлено, что наивысший коэффициент корреляции регистрируется при сопоставлении показателя пролиферативной активности культуры с величиной интенсивности флуктуаций распада, взятой за предыдущие сутки. Таким образом, основываясь на данных о флуктуациях радиоактивного распада калия-40, являющихся индикатором биотропного фактора среды, можно проводить краткосрочные прогнозы ультрадианных и инфрадианных биологических ритмов.

Ключевые слова: флуктуации, макрофлуктуации, радиоактивность, ультрадианные ритмы, инфрадианные ритмы.

DOI: 10.31857/S0006302923060169, EDN: RLHRXY

Ультрадианные внутрисуточные и инфрадианные трех-четырёхсуточные ритмы различных физиологических и биохимических показателей у животных описаны в многочисленных работах [1–7]. Однако механизмы формирования этих биологических ритмов не установлены. Нами было показано, что ультрадианные ритмы активности и температуры тела у мелких млекопитающих и птиц синхронны между особями, находящимися в изоляции друг от друга даже в условиях постоянного освещения, обеспечивающих исключение синхронизирующего влияния светового ориентира смены дня и ночи [8]. Это наблюдение указывает на существование внешнего фактора, влияющего на активность животных. Удобным для исследования механизмов формирования инфрадианных ритмов является интенсивность пролиферативной активности клеток в культуре, имеющая околочетырёхсуточную ритмичность [9]. Наличие ритмов в культуре клеток L-929 ука-

зывает на действие фактора среды не только через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему организма, но и на изолированные фибробластоподобные клетки. Эксперименты по ежедневному размораживанию одинаковых проб культуры клеток L-929 и последующему анализу инфрадианных ритмов их пролиферативной активности показал, что этот ритм в клетках полностью определяется внешним воздействием, т.е. является экзогенным [9]. Иными словами, в природе существует некий фактор среды, оказывающий стимулирующее влияние на двигательную активность животных и угнетающее на пролиферативную активность клеток.

Сопоставление различных гелиогеофизических параметров с ультрадианной и инфрадианной динамикой биологических параметров не привело к выявлению значимых и постоянно наблюдающихся корреляций. Нами была выявлена

связь динамики температуры тела с геомагнитными Рс5-пульсациями [10], однако применение пермаллового экрана не повлияло на амплитуду и степень синхронизации ультрадианных ритмов мышей [11]. Учитывая, что в динамике скорости счета от радиоактивных источников выявляются периоды, аналогичные спектру ультрадианных ритмов животных, нами было выполнено исследование, подтверждающее связь флуктуаций радиоактивности калия-40 с ритмами температуры тела мелких млекопитающих и птиц [12]. Феномен закономерных флуктуаций радиоактивного распада был установлен разными группами исследователей [13–20]. Вероятно, помимо случайных флуктуаций на радиоактивный распад или на приборы его регистрирующие, действует квазиритмический фактор внешней среды. Как показали наши исследования, этот фактор или воздействие, тесно с ним связанное, является биотропным.

Чтобы приблизиться к пониманию природы данного фактора необходимо установить является ли этот фактор глобальным или зависит от места исследования. В частности, флуктуации радиоактивного распада наблюдаются одновременно в разных географических точках или зависят от местного солнечного времени? Что касается биологических ритмов, то ранее нами было показано, что в различных географических точках (Москва и Ульяновск) ультрадианные ритмы температуры тела мышей, находящихся в условиях постоянного освещения, синхронизированы по местному солнечному времени [21].

Таким образом, представляется актуальным:

1) сопоставить динамику флуктуаций скорости счета от природного радиоактивного источника ^{40}K в двух географических пунктах, расположенных на разных долготах (Москва и Ульяновск);

2) оценить возможность краткосрочного прогноза ультрадианных ритмов животных в Москве на основе данных по флуктуациями радиоактивности ^{40}K , измеренным в Ульяновске;

3) сопоставить динамики интенсивности флуктуаций радиоактивного распада ^{40}K и ежесуточных показателей прироста клеточной культуры L-929, имеющих инфрадианную ритмичность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Динамику температуры тела регистрировали у половозрелых самцов мышей линии C57Bl/6, массой тела 26–30 г ($n = 8$), хомячков Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) ($n = 7$) и обыкновенных зеле-

нушках (*Chloris chloris*) ($n = 8$). Не позднее, чем за две недели до эксперимента животным в брюшную полость имплантировали датчики ДТН4-28/ТЛ4-28 (ООО «ЭМБИ РЕСЕРЧ», Новосибирск). В качестве анестетика внутримышечно вводили золетил (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 5–7 мг/кг. Животных содержали в индивидуальных клетках. Доступ к воде и пище был свободным. Температуру тела измеряли с частотой 1 раз в мин, данные накапливались в памяти датчика в течение 20 сут, а затем считывались бесконтактным способом. Все виды животных находились при постоянном искусственном освещении, что позволяло исключить возможное синхронизирующее действие на ультрадианные ритмы режима свет/темнота. Животных беспокоили максимально редко – раз в четыре-пять дней, в разное время суток. Периоды повышения температуры, вызванные посещением человека, исключались из анализа. С целью исключения присутствующего околосуточного тренда вычисляли ежеминутные изменения температуры тела у каждой особи. Учитывая, что предполагаемый активизирующий внешний фактор могут воспринимать не все животные и не всегда, вычисляли медианное значение по группе животных, а затем сглаживали показатели путем вычисления скользящего среднего с окном в 13 мин.

Исследование пролиферативной активности культуры клеток было проведено на трансформированных фибробластах мыши L-929. Культуру клеток L-929 культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с L-глутамином (Capricorn Scientific, Германия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera, Франция), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO_2 . С целью выявления инфрадианных ритмов пролиферативной активности культуры L-929 ежедневно в период с 9 по 31 марта 2023 г. клетки в количестве 100 тыс. в объеме 2 мл среды высевали на 8 чашек Петри диаметром 35 мм. Для оценки пролиферативной активности каждые последующие сутки клетки снимали с двух чашек Петри путем добавления 1 мл раствора трипсин 0.25% : версен 0.02% (1 : 1) и инкубировали 5 мин при 37°C. Количество клеток L-929 подсчитывали на автоматическом счетчике клеток TC-20 (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве показателя, характеризующего пролиферативную активность культуры, вычисляли ежесуточное увеличение численности клеток: отношение числа клеток в культуре в день исследования по отношению к предыдущему дню. Для анализа использовали показатели ежесуточного

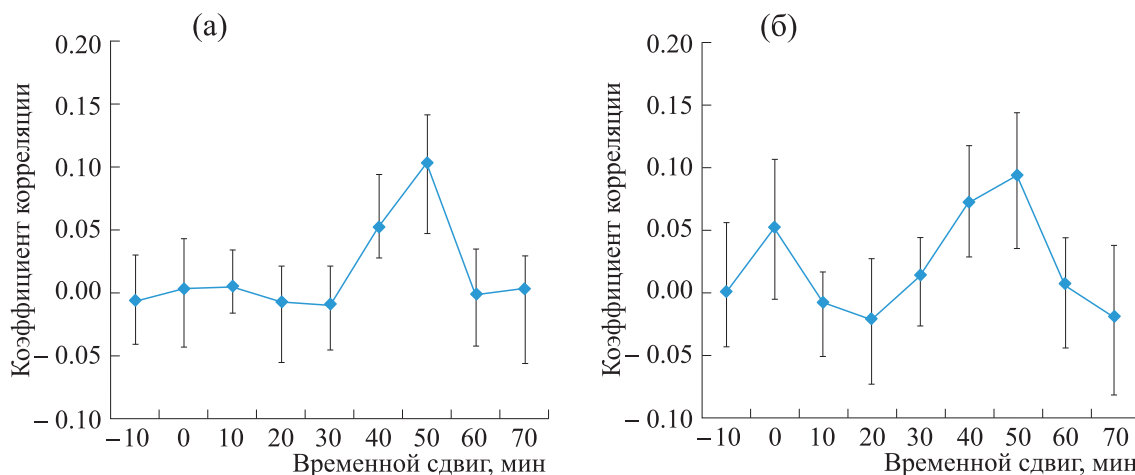


Рис. 1. Значения коэффициентов корреляции между двумя временными рядами интенсивности радиоактивности ^{40}K , регистрируемыми в Москве и Ульяновске, рассчитанные с разной величиной сдвига друг относительно друга. Представлены медианы и интерквартильный размах: (а) — данные за период 24 февраля—31 марта 2023 г., (б) — данные за период 2—30 апреля 2023 г.

прироста клеток через трое суток инкубации, что является временем наиболее стабильного логарифмического увеличения их численности.

В качестве источника природного радиоактивного изотопа ^{40}K использовали сульфат калия (ОАО «Буйский химический завод», Буй, Костромская обл.). Интенсивность радиоактивного распада измеряли с помощью сцинтилляционного детектора Atom Fast 8850 (НПП «КБ Радар», Москва), основой которого является кристалл йодида цезия (CsI) размером $8 \times 8 \times 50$ мм. С целью изоляции системы от атмосферных гамма-квантов пакеты с сульфатом калия вместе с детектором были помещены в свинцовый короб внутренним размером $20 \times 20 \times 20$ см и толщиной стенки 30 мм. Такой экран ослаблял фоновые значения скорости счета примерно в 20 раз. Датчик, расположенный в центре короба, обкладывали равномерно со всех сторон сульфатом калия. Ежеминутные показатели скорости счета сглаживали скользящим средним в окне 13 мин. В среднем приборы регистрировали около 2000 событий в мин. При исследовании инфранианной динамики суточную величину параметра интенсивности флуктуаций радиоактивного распада рассчитывали следующим образом: вычисляли величину ежеминутных изменений зарегистрированных мощностей дозы, брали эти значения по модулю, а затем вычисляли среднее за сутки значение. Два прибора внутри одной локации давали аналогичную многосуточную динамику с коэффициентом корреляции более 0.8.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Для выявления связи исследуемых динамик биологических параметров и скорости радиоактивного распада использованы методы вычисления коэффициента корреляции Пирсона (r) и метод наложения эпох. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильных размахов. Статистическую значимость различий между значениями показателей определяли по t -критерию Стьюдента. Результаты расчетов считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сглаженные суточные кривые динамики скорости счета, полученные от приборов, находящихся в Москве и Ульяновске, сопоставляли по универсальному времени, т.е. одновременно и с разным временным сдвигом. В среднем за 36 суток наблюдений (с 24 февраля по 31 марта 2023 г.) при анализе одновременных рядов значение коэффициента корреляции значимо не отличалось от нуля, тогда как при временном сдвиге в 50 мин, соответствующем сопоставлению кривых по местному солнечному времени, коэффициенты корреляции составили 0.10 (0.05, 0.14) и статистически значимо отличались от величин, рассчитанных при других временных сдвигах ($p < 0.001$) (рис. 1а). Необходимо отметить, что в другой период наблюдений (со 2 по 30 апреля 2023 г.) помимо выраженного пика, наблюдающегося по местному времени, также регистрируется досто-

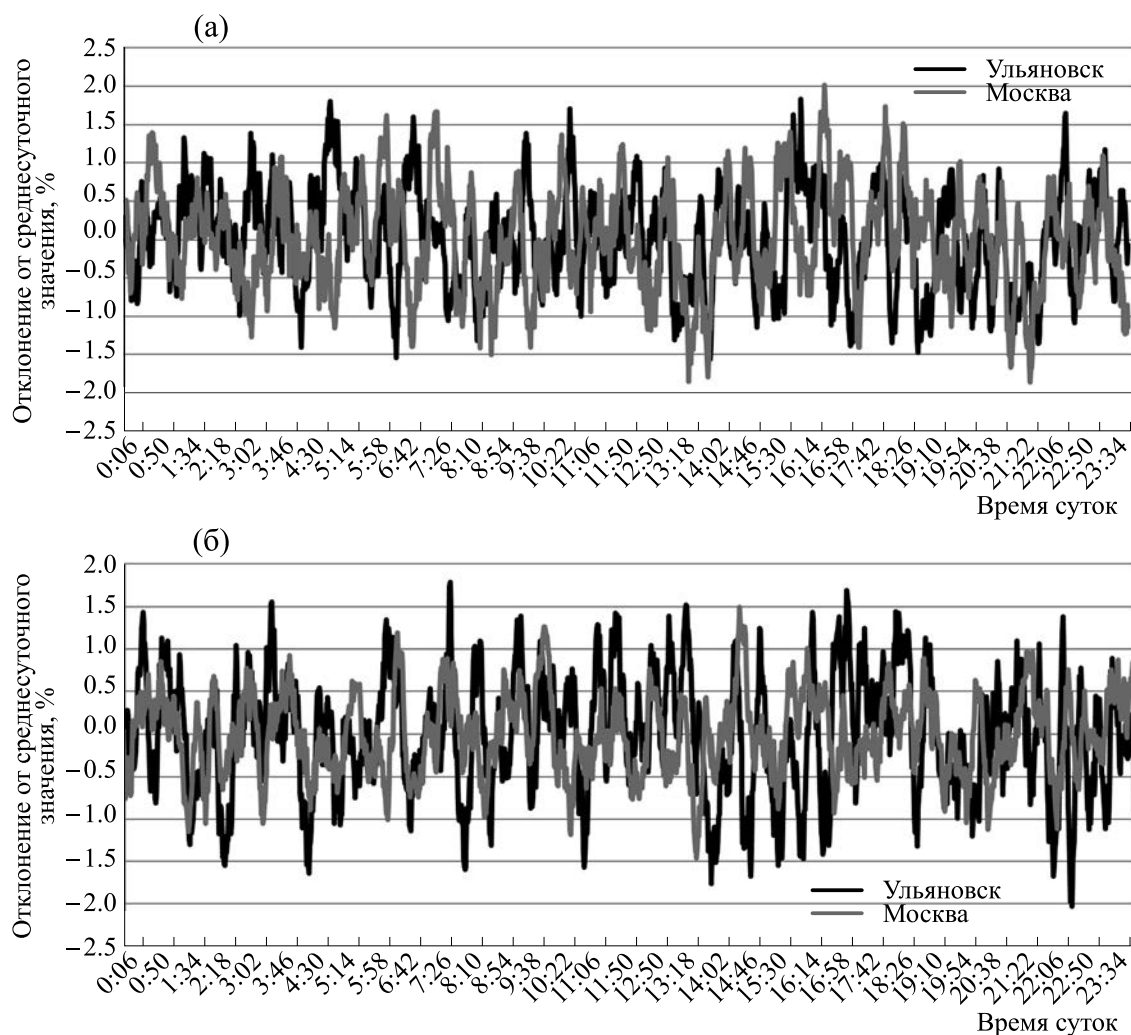


Рис. 2. Динамики интенсивности радиоактивности ^{40}K , регистрируемые в Москве и Ульяновске, сопоставленные по местному солнечному времени (сдвиг в 45 мин): (а) — средний уровень синхронизации, $r = 0.10$ ($p < 0.001$), данные за 30 марта 2023 г.; (б) — высокий уровень синхронизации, $r = 0.19$ ($p < 0.001$), данные за 26 марта 2023 г.

верное увеличение показателя по глобальному времени (рис. 16). Примеры, иллюстрирующие динамику измеренной радиоактивности ^{40}K в Москве и Ульяновске при сопоставлении по местному солнечному времени приведены на рис. 2.

При сопоставлении динамики ежеминутных изменений температуры тела по группе зеленушек, находящихся в Москве, с интенсивностью радиоактивного распада ^{40}K в Ульяновске наилучшее совпадение наблюдалось при рассмотрении с 50-минутным смещением — вначале наблюдается всплеск скорости счета в Ульяновске, а через 50 мин — увеличение величины ежеминутного прироста температуры тела у птиц в Москве. При таком смещении коэффициенты корреляции со-

ставляли 0.09 (0.04, 0.15) и статистически значимо отличались от показателей, рассчитанных при других временных сдвигах. Для хомячков наблюдалась аналогичная, но несколько менее выраженная закономерность с $r = 0.06$ (0.02, 0.11). При аналогичном сопоставлении динамики температуры тела мышей с интенсивностью радиоактивного распада статистически значимые коэффициенты корреляции не выявлены. Вероятно, это связано с тем, что основной период активности мышей примерно в два раза более продолжительный, чем у птиц и хомячков. Следовательно, у мышей не каждый момент увеличения интенсивности возбуждающего фактора среды сопровождается откликом.

Распределение методом наложенных эпох динамики изменения интенсивности радиоактив-

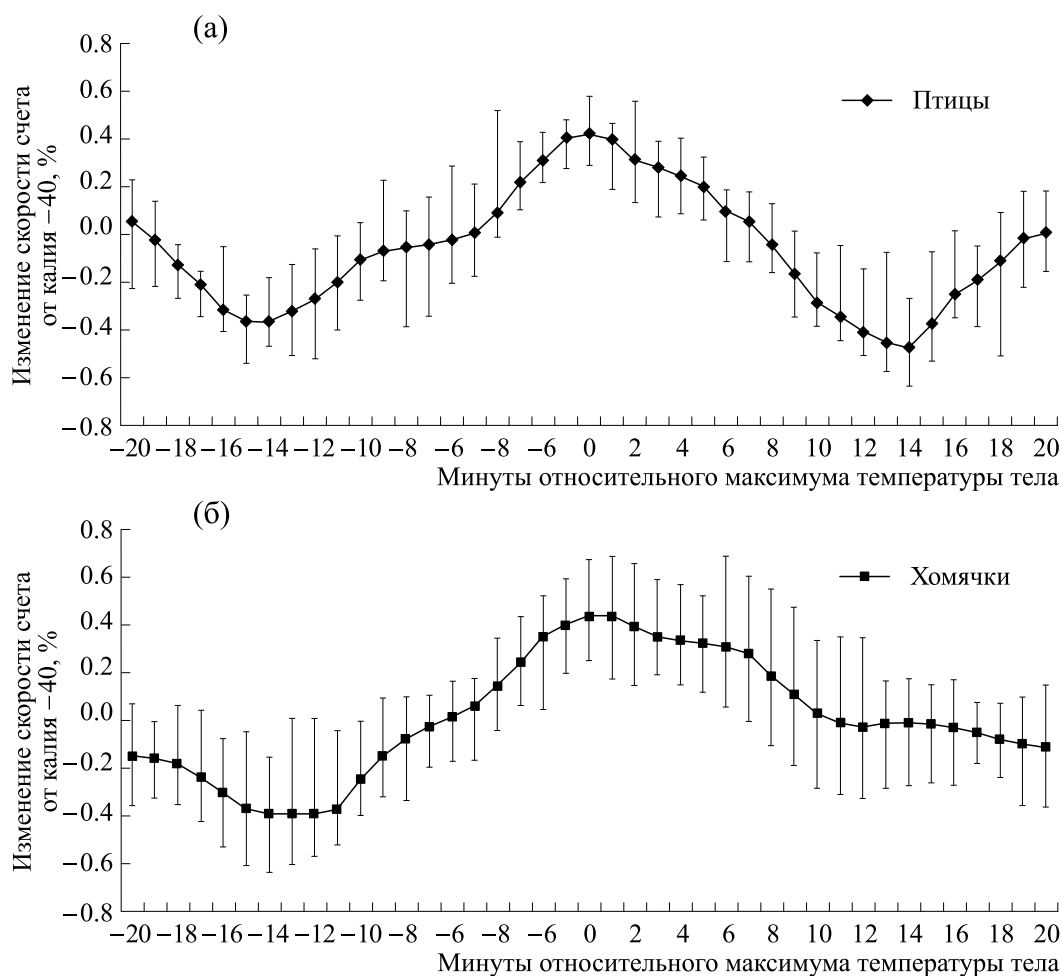


Рис. 3. Распределение методом наложенных эпох динамики изменения интенсивности радиоактивного распада, регистрируемой в Ульяновске, относительно наблюдаемых в Москве моментов максимумов выраженных (более 0.02°C в мин) увеличений прироста температуры тела у представителей различных классов животных по местному солнечному времени: (а) — зеленушки (класс птиц), (б) — хомячки (класс млекопитающих). Представлены медианы и интерквартильный размах.

ного распада относительно моментов максимумов выраженных (более 0.02°C в мин) увеличений прироста температуры тела по местному солнечному времени показало отсутствие принципиальных различий между исследуемыми видами животных (рис. 3). При сопоставлении данных по местному солнечному времени в период максимальных ежеминутных приростов температуры тела животных наблюдается статистически значимое увеличение скорости счета от калия-40 ($p < 0.001$).

При анализе связи ежесуточных показателей прироста числа клеток в культуре с интенсивностью флуктуаций радиоактивного распада наивысший коэффициент корреляции наблюдался при условии сопоставления результатов прироста клеточной культуры, полученной около 12 часов

текущего дня, с интенсивностью флуктуаций радиоактивного распада за предыдущие сутки, т.е. временная разница между параметрами составляла 12 ч. При таком условии величина ежесуточного приращения числа клеток в культуре отрицательно коррелировала с интенсивностью флуктуаций радиоактивного распада ^{40}K ($r = -0.53$, $p = 0.016$) (рис. 4). Для наглядности на рис. 4 данные по интенсивности флуктуаций радиоактивности представлены с обратным знаком.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основываясь на полученных результатах, можно утверждать, что наблюдаемые в Ульяновске изменения скорости счета от природного изотопа ^{40}K через 50 мин с большой вероятностью

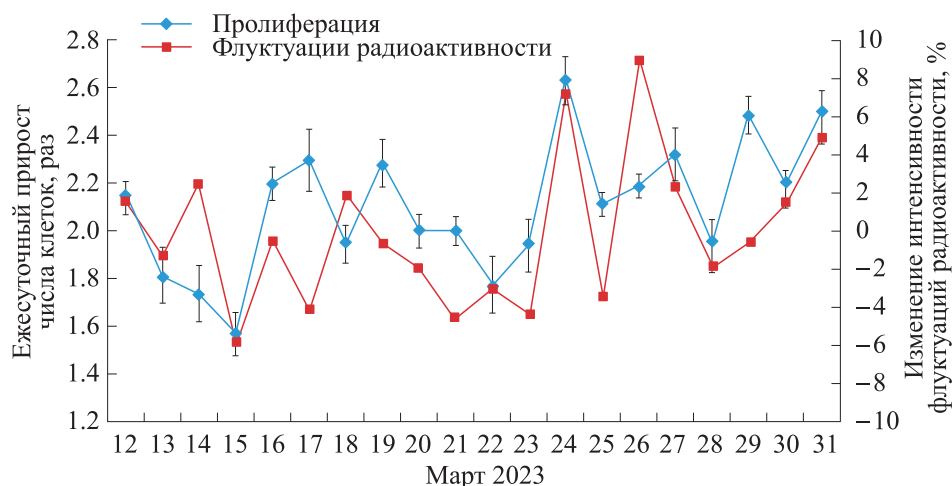


Рис. 4. Динамика ежесуточного приращения числа клеток культуры L-929 в сопоставлении с изменением интенсивности флуктуаций радиоактивности от ^{40}K . Данные по флуктуациям радиоактивности смещены на 1 сут вперед и для наглядности взяты с противоположным знаком.

будут наблюдаться в Москве. При анализе одно-временных рядов связь между показателями в Москве и Ульяновске в период 24 февраля—31 марта не наблюдалась, а в другой временной интервал (со 2 по 30 апреля) она регистрировалась, но по величине была значительно меньшая, чем по местному времени. Следовательно, фактор, влияющий на радиоактивный распад или систему его регистрации, не действует одновременно на все точки Земли. Нужно отметить, что заметный суточный тренд в динамике флуктуаций радиоактивности не наблюдается. Основной вклад в обнаруженный эффект вносят колебания в диапазоне 20—240 мин. Мы не обнаружили связи изменения радиоактивности с моментами восхода/захода Солнца, не наблюдается также резких изменений показателя в полдень или полночь. Однако именно вращение Земли каким-то образом определяет фазу этих колебаний в конкретной географической точке.

Необходимо отметить, что в условиях постоянного освещения у птиц циркадианный ритм составлял 23 ч, а фаза активности ежедневно смещалась по оси времени примерно на 1 час. Следовательно, полученный нами результат не может определяться случайным совпадением внутрисуточных гармоник биологического и физического процесса. Также нужно заметить, что для млекопитающих нами была получена более выраженная корреляционная связь, при сопоставлении динамики температуры тела не с абсолютными изменениями радиоактивности, а с интенсивностью их флуктуаций [12], тогда как для птиц такой закономерности не выявлено.

Основываясь на том, что показатель интенсивности радиоактивного распада является индикатором биотропного фактора среды, и фаза его колебаний определяется местным солнечным временем, можно прогнозировать ультраниантные ритмы активности животных с опережением в случае Ульяновск—Москва на 50 мин. Практического применения для этого метода пока трудно придумать, однако сам по себе факт работоспособности такого прогноза убедительно подтверждает обнаруженные вышеприведенные феномены.

Полученная нами отрицательная корреляционная связь между пролиферативной активностью культуры клеток и интенсивностью флуктуаций радиоактивности от ^{40}K указывает на действие искомого биотропного фактора не только через нервную или эндокринную систему, как это вероятно происходит в случае ультраниантных ритмов, но и непосредственно на отдельные фибробластоподобные клетки. Установленное нами 12-часовое запоздание реакции клеток на данный внешний фактор можно использовать при проведении химиотерапии, когда необходимо введение препарата в фазу деления клеток при максимальной чувствительности опухолевых клеток к препарату [22]. Вероятно, и колебания пролиферативной активности клеток и флуктуации радиоактивности являются независимыми следствиями некоторого внешнего фактора, подавляющего пролиферацию клеток и усиливающего флуктуации радиоактивности. Однако без проведения соответствующих исследований нельзя ис-

ключать и непосредственное действие флуктуаций радиоактивности на биообъекты.

ВЫВОДЫ

1. Динамика флуктуаций скорости счета от природного радиоактивного источника ^{40}K в географических точках, расположенных на разных долготах (Москва — Ульяновск), синхронизирована по местному солнечному времени.

2. На основе данных о флуктуациях радиоактивности ^{40}K в Ульяновске можно предсказывать с опережением на 50 мин динамику изменения температуры тела животных в Москве.

3. Установлена возможная прямая или косвенная связь флуктуаций радиоактивности ^{40}K и температуры тела исследуемых биообъектов.

4. Установлено, что ежесуточные показатели прироста численности клеточной культуры L-929 отрицательно коррелируют с интенсивностью флуктуаций радиоактивности ^{40}K .

5. Колебания пролиферативной активности клеток и флуктуации радиоактивности могут являться как взаимозависимыми, так и независимыми следствиями некоторого внешнего фактора, подавляющего пролиферацию клеток и усиливающего флуктуации радиоактивности. Однако эта разница не влияет на эффективность использования найденной связи для построения краткосрочного прогноза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ИПЭЭ РАН 0089-2021-0004 «Экологические и эволюционные аспекты поведения и коммуникации животных».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с экспериментальными животными руководствовались Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС об охране животных, используемых в научных целях. Эксперимент одобрен комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН (Протокол № 14 от 15.01.2018 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. Я. Глыбин, В. А. Святуха и Г. Ш. Цициашвили, *Биофизика*, **40** (4), 829 (1995).
2. C. Focan, G. Cornélissen, and F. Halberg, *In Vivo*, **9**, 401 (1995).
3. C. Maschke, J. Harder, G. Cornelissen, et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **57**, 126 (2003).
4. R. Jozsa, A. Olah, G. Cornelissen, et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **59**, 109 (2005).
5. В. Я. Бродский, *Биохимия*, **79** (6), 619 (2014).
6. I. D. Blum, L. Zhu, L. Moquin, et al., *Elife*, **3**, ID e05105 (2014).
7. C. Bourguignon and K. F. Storch, *Front. Neurol.*, **8**, ID 614 (2017).
8. М. Е. Диатроптов, Г. Н. Арсеньев, В. С. Шатеева и др., *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия*, **8** (1), 76 (2022).
9. М. А. Диатроптова, А. М. Косырева, О. В. Макарова и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **172** (8), 244 (2021).
10. М. Е. Диатроптов, Н. В. Ягова, Д. В. Петровский и А. В. Суров, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **171** (5), 639 (2021).
11. М. Е. Диатроптов и М. А. Диатроптова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **171** (6), 777 (2021).
12. М. Е. Диатроптов и А. В. Суров, *Докл. РАН. Науки о жизни*, **509** (1), 137 (2023).
13. С. Э. Шноль, *Космофизические факторы в случайных процессах* (Svenska fysikarkivet, Стокгольм, 2009).
14. А. Г. Пархомов, *Космос. Земля. Человек. Новые грани науки* (Наука, М., 2009).
15. В. А. Панчелюга и М. С. Панчелюга, *Биофизика*, **60** (2), 395 (2015).
16. В. А. Панчелюга, *Метафизика*, № 4, 10 (2020).
17. A. G. Parkhomov. *Int. J. Pure Appl. Phys.*, **1** (2), 119 (2005).
18. E. Fischbach, J. B. Buncher, J. T. Gruenwald, et al., *Space Sci. Rev.*, **145**, 285 (2009).
19. S. A. Bogachev, A. G. Khramov, I. A. Kishin, et al., *J. Phys.: Conf. Series*, **1690**, 012028 (2020).
20. V. Milián-Sánchez, F. Scholkmann, P. Fernández de Córdoba, et al., *Sci. Rep.*, **10**, ID 8525 (2020).
21. М. Е. Диатроптов, С. М. Слесарев и Т. А. Зенченко, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **172** (7), 87 (2021).
22. M. A. Blank, V. A. Gushchin, F. Halberg, et al., *In Vivo* (Athens, Greece), **9** (4), 395 (1995).

Method for Short-Term Prediction of Ultradian and Infradian Rhythms Based on the Registration of Fluctuations in the Rates of Radioactive Decay of Potassium-40

M.E. Diatropov*, M.A. Diatropova**, and S.M. Slesarev***

*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

**A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery, ul. Tsurupy 3, Moscow, 117418 Russia

***Ulyanovsk State University, ul. Lva Tolstogo 42, Ulyanovsk, 432017 Russia

Observations of fluctuations in the rates of radioactive decay of potassium-40, a naturally occurring radioactive isotope of potassium, were made simultaneously in Moscow and Ulyanovsk. It was shown that variations of the count rates from sources in these geographic areas did not happen at the same time but were synchronized with local solar time. Based on this observation and taking into account that fluctuations in the rates of radioactive decay correlate with body temperature rhythms, a method for short-term prediction of ultradian rhythms of animal activity was developed and validated. The correlation analysis was conducted to see the relationship between the dynamics of the intensity of radioactive decay rates variability and the daily growth rates of the cell culture L-929. It was found that the maximum correlation coefficient can be observed after comparison of the indicator of the proliferative activity of the culture with the value of the intensity of radioactive decay rates variability as it was the day before the comparison. Thus, based on the data on fluctuations in the rates of radioactive decay of potassium-40, which is an indicator of the biotrophic factor of the environment, it is possible to make short-term forecasts of ultradian and infradian biological rhythms.

Keywords: fluctuations, macrofluctuations, radioactivity, ultradian rhythms, infradian rhythms

ПОЧЕМУ ВДЫХАНИЕ ГАЗООБРАЗНОГО ОКСИДА АЗОТА НЕ ВЛИЯЕТ НА СИСТЕМНОЕ АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ?

© 2023 г. А.Ф. Ванин^{*,#}, А.А. Абрамов^{**}, А.Б. Вагапов^{***}, А.А. Тимошин^{**}, А.В. Пекшев^{***},
В.Л. Лакомкин^{**}, Э.К. Рууге^{**}

^{*}Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

^{**}Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. Е.И. Чазова Минздрава РФ,
ул. Академика Чазова, 15а, Москва, 121552, Россия

^{***}Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,
2-я Бауманская ул., 5/1, Москва, 105005, Россия

[#]E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 24.08.2023 г.

После доработки 24.08.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Выяснена причина отсутствия гипотензивного действия газообразного NO, вводимого путем ингаляции в организм животных и человека. Поскольку этот дефект полностью устранялся при одновременной ингаляции NO и внутривенного введения животным (крысам) растворов низкомолекулярных тиолов, сделан вывод, что газообразный NO, попадая через легкие в кровь, циркулирующую в большом круге кровообращения, в результате одноэлектронного окисления превращается в катион нитрозония (NO⁺), не способный оказывать вазодилатирующее и тем самым гипотензивное действие на животных и человека. Связывание NO⁺ с низкомолекулярными тиолами приводит к его включению в S-нитрозотиолы с последующим высвобождением этого нитрозильного агента в форме нейтральных молекул NO, характеризующихся гипотензивной активностью. Образование в крови и тканях органов экспериментальных животных в этих опытах динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами, которые могли бы вызывать гипотензивный эффект, в этих опытах не обнаружено. Гипотензивное действие ингалируемого NO, обнаруживаемое в легких, могло быть обусловлено проникновением NO через внешнюю стенку сосудов с последующей активацией индуктора вазодилатации и гипотензии — фермента гуанилатциклазы — непосредственно в стенках сосудов.

Ключевые слова: газообразный оксид азота, ингаляция, гипотензия, катион нитрозония, S-нитрозотиолы.

DOI: 10.31857/S0006302923060170, EDN: RLNHSE

В настоящее время возник новый раздел биологии — биология оксида азота (NO) — простейшей молекулы, появляющейся в организме человека и животных ферментативным путем при окислении гуанидинового остатка L-аргинина и функционирующей в качестве одного из эндогенных универсальных регуляторов разнообразных биологических процессов [1]. Столь фундаментальная роль оксида азота делает заманчивой идею использовать экзогенный NO в качестве

агента, который мог бы влиять, например, в качестве лекарственного средства на различные физиологические и биохимические процессы в организме человека и животных. Так, поскольку эндогенный NO способен вызывать вазодилатацию и тем самым оказывать на организм человека и животных гипотензивное действие [2, 3], можно было ожидать что ингаляция человеку и животным газообразного NO (а ингаляция — наиболее реальный способ введения в организм значительного количества этого агента) позволит быстро снимать спазм кровеносных сосудов и тем самым купировать гипертонический криз.

Однако, уже первые исследования влияния ингалируемого NO (iNO) животным показали,

Сокращение: САД — среднее артериальное давление, ДНКЖ-ТСЛ — динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, М-ДНКЖ — моноядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ — биядерная форма динитрозильных комплексов железа.

что предполагаемое действие этого газа обнаруживалось только в легких, т. е. для крови, циркулирующей только в малом, но не в большом круге кровообращения [4, 5]. Такого рода эффект, т. е. отсутствие влияния iNO на системное артериальное давление, был продемонстрирован и при испытаниях газообразного NO на здоровых добровольцах [6].

Можно было предположить, что молекулы NO, проникая через легкие в кровь и связываясь в ней с гемовыми группами гемоглобина, могли в результате этого окисляться до нитрита/нитрата и тем самым «выходить из игры». При этом соответствующее количество гемоглобина, превращаясь в метгемоглобин, также «выходило из игры». Испытания на добровольцах показали, что, действительно, при небольшой, не более 200–300 ppm, концентрации NO в газовом потоке практически весь вдыхаемый добровольцем iNO связывался с гемоглобином с последующим превращением в нитрит/нитрат, тем самым в крови не оставалось свободных молекул NO которые могли бы, активируя гуанилатциклазу в стенках сосудов, вызвать расслабление последних и тем самым снижение среднего артериального давления (САД). Такого рода ситуация изменялась при повышении концентрации iNO в газовом потоке до 1000–2000 ppm, когда количество NO, выдыхаемого за 15 мин добровольцем, начинало существенно, (более чем в два раза) превосходить количество NO, связавшегося с гемоглобином, т. е. примерно такое же количество этого агента «застревало» в организме человека, превратившись, очевидно, в другое соединение [6].

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы разобраться, во что превращаются в этом случае молекулы iNO, теряя способность не улечиваться из организма вместе с выдыхаемым воздухом?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали восстановленный глутатион, L-цистеин, N-ацетил-L-цистеин и диэтилдитиокарбамат (все реактивы — от Sigma, США).

Получение NO-содержащего газового потока. Потоки газообразного NO, использовавшиеся для ингаляции крыс линии Вистар, получали на серийных аппаратах «ПЛАЗОН» (ТУ 9444-001-96571701-2007, зав. №№ 2450 и 492, произведены ООО «ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана» (Москва)).

Формирование NO-содержащих газовых потоков осуществляли из атмосферного воздуха манипуляторами — плазмохимическими генераторами NO, конструкция которых описана в публикациях [6, 7]. Для измерения параметров NO-

содержащей газовой среды при ингаляционном действии использовали газовый анализатор ОП-ТИМА 7 производства компании MRU GmbH (Германия), позволяющий измерять в газовых потоках температуру в диапазоне 0–650°C с погрешностью 1%, а также содержание оксида азота и диоксида азота в диапазоне соответственно 0–5000 ppm и 0–1000 ppm с погрешностью 5%.

Ингаляция NO крысам. Ингаляцию крыс осуществляли газовым потоком с концентрацией NO 1000 ppm в течение 15–20 мин при температуре 38°C путем подачи потока NO через шприц в носовую полость животного.

ЭПР-измерения на крови и органах крыс. Спектры ЭПР замороженных препаратов крови, легких, печени и почек крыс регистрировали на радиоспектрометре Varian 109E (Varian, США) в X-диапазоне при 77 К. Образцы крови и ткани органов перед замораживанием помещали в ампулы диаметром 4 мм с последующим быстрым замораживанием в жидком азоте. Оценку концентрации парамагнитных центров, ответственных за ЭПР сигнал, проводили методом двойного интегрирования с использованием в качестве стандарта замороженный раствор М-ДНКЖ с глутатионом с известной концентрацией комплексов.

Определение среднего артериального давления у крыс, характерного для крови, циркулирующей в большом круге кровообращения, проводили по методике, описанной в работе [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Главный результат работы состоит в следующем. В дополнение к уже известному факту отсутствия какого-либо влияния iNO на САД [4–6], полученному нами в опытах на крысах (рис. 1), мы обнаружили, что при одновременном введении этим животным iNO (путем его ингаляции) и различных тиолов (путем их внутривенного введения) мгновенно начиналось снижение САД. После прекращения ингаляции iNO сразу же наблюдалось восстановление САД. Этот эффект иллюстрируется на рис. 2, полученном в такого рода эксперименте, когда в качестве тиола животному вводили глутатион (в дозе 6.4 мкмоль на кг массы животного). Такой же результат был получен при использовании других тиолсодержащих соединений — N-ацетил-L-цистеина или L-цистеина.

Можно было предположить, что отсутствие гипотензивного эффекта при введении крысам только одного iNO было обусловлено поступлением из легких в кровь, циркулирующую в большом круге кровообращения, недостаточного количества этого агента. Это предположение полностью снимается регистрацией в крови опытных крыс интенсивного сигнала ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина (рис. 3, спектр 1). Его

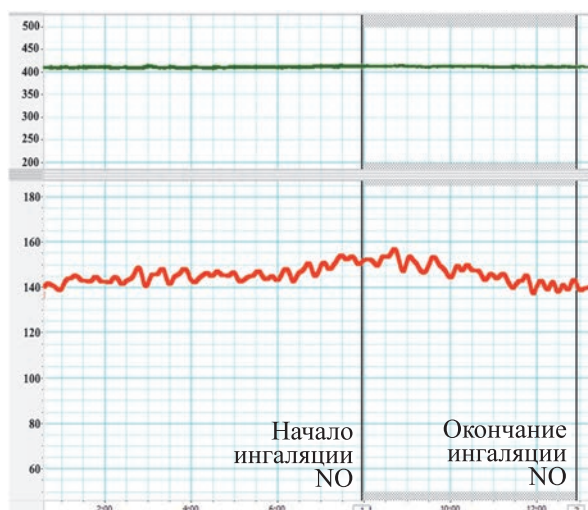


Рис. 1. Сохранение среднего артериального давления у крысы при 15 мин ингаляции ей газообразного NO при концентрации этого газа в потоке, равной 1000 ppm. По оси абсцисс — время эксперимента в минутах. Верхний график — число сердечных сокращений, уд/мин, нижний график — САД, мм рт. ст.

интенсивность соответствовала включению в эти комплексы до 0.1 мМ NO, что характеризовало стационарный уровень нитрозильных комплексов гемоглобина в организме крыс. Этот уровень должен был определяться с одной стороны поступлением NO в эритроциты с последующим его связыванием с гемоглобином, а с другой стороны — эффективным необратимым окислением связанного с гемовыми группами NO в нитрит/нитрат с одновременным переходом этих групп в мет-форму.

В принципе, об уровне этих форм, т.е. об уровне мет-гемоглобина можно было судить по снижению степени насыщения крови кислородом. Такая оценка была проведена в работе [6] при 15-минутной ингаляции добровольцев потоком газообразного NO с концентрацией 1000 ppm. Насыщение крови кислородом снижалось при этом на 8–9%. Отсюда следовало, что не менее 8–9% гемовых групп в гемоглобине добровольцев должно было связаться с NO. Согласно работе [6], этот уровень был в 2 раза ниже общего количества NO, поглощенного организмом добровольцев. Другая половина NO превращалась в неизвестное вещество — вещество X, не способное улетучиваться из организма добровольцев с выдыхаемым воздухом и не способное оказывать на них гипотензивное действие.

Есть основание предполагать, что такое же вещество появлялось в организме крыс в наших опытах. Появление у него способности вызывать гипотензию при дополнительном, наряду с ингаляцией iNO, внутривенном введении в кровь животных тиолов, означает, что, реагируя с тиолами, соединение X либо снова превращалось NO, либо в соединение, способное выступать в качестве донора NO — агента, вызывающего расслабление сосудов и тем самым на уровне организма — эффект гипотензии. Характерно, что одновременно с этим резко усиливался сигнал ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина (спектр 2 на рис. 3), очевидно, в результате повышения уровня NO в крови крыс.

Современные представления о химических превращениях NO в организме животных и человека с высокой долей вероятности позволяют предположить, что такими донорами NO могли быть либо S-нитрозотиолы с наиболее характер-

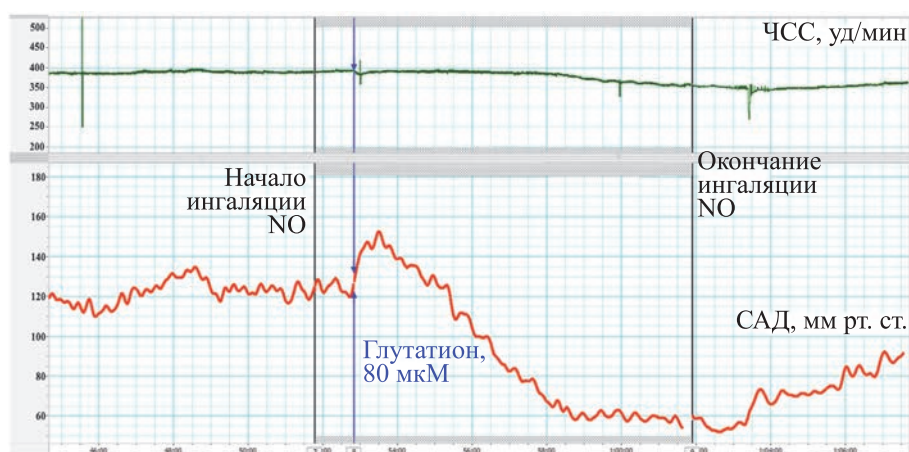


Рис. 2. Изменение системного артериального давления у крысы при ингаляции газового потока NO при концентрации 1000 ppm с одновременным внутривенным введением животному 6.4 мкмольа глутатиона на кг веса животного, соответствующем 80 мкМ глутатиона на 1 л крови крысы. По оси абсцисс — время эксперимента в минутах. Верхний график — число сердечных сокращений, уд/мин, нижний — САД, мм рт. ст.

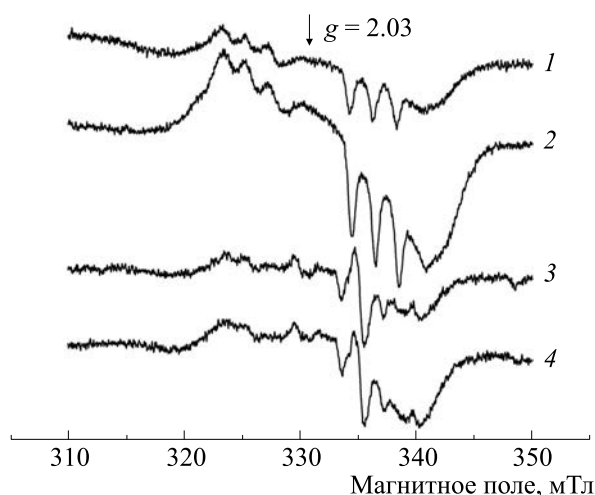


Рис. 3. Спектры ЭПР крови крысы после ингаляции ей в течение 15 мин газового потока iNO с концентрацией 1000 ppm (спектр 1, препарат 1), с одновременным внутривенным введением ей глутатиона в дозе 6,4 мкмоль на кг веса животного (спектр 2, препарат 2). Спектры 3 и 4 зарегистрированы в препаратах 1 и 2 после их выдерживания в 100 мМ растворе диэтилдитиокарбамата. Спектры зарегистрированы при температуре 77 К.

ной для них резонансной структурой $RS^- - NO^+$ [8, 9], либо динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами (ДНКЖ-ТСЛ) с наиболее характерными для их моно-(М-ДНКЖ) и биядерной (Б-ДНКЖ) форм резонансными структурами (соответственно $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]^+$ и $[(RS^-)_2Fe^{2+}_2(NO)_2(NO^+)_2]^{2+}$ [9–12]). М-форма ДНКЖ-ТСЛ парамагнитна и характеризуется сигналом ЭПР с $g_{cp} = 2.03$ ($g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$) [12]. Такой сигнал как в спектре ЭПР крови, так и в спектрах ЭПР органов крыс (легких, печени, почках и сердце), наложенных на сигнал ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина, обнаружить не удалось. Поскольку, как показали соответствующие оценки, предельная чувствительность радиоспектрометра для такого обнаружения составляла 0,5 мкМ М-ДНКЖ-ТСЛ, концентрация этих комплексов в указанных биопрепаратах (если бы они и возникали в них) не превышала этой величины. В соответствии с данными, приводимыми в работе [11], при такой концентрации М-ДНКЖ-ТСЛ не могли инициировать значительного снижения САД, приведенного на рис. 2.

Аналогичное заключение можно было сделать и в отношении Б-ДНКЖ-ТСЛ, которые, как и М-ДНКЖ-ТСЛ, могли возникать в крови и органах крыс [13]. Эти исходно диамагнитные комплексы можно было бы также выявить методом

ЭПР, проводя их обработку производными диэтиокарбамата, например, диэтилдитиокарбаматом (формула $(C_2H_5)_2N-CS_2$). В ходе разрушения этим соединением Б-ДНКЖ-ТСЛ диэтилдитиокарбамат перехватывал бы на себя железомононитрозильную группу из железодинитрозильных фрагментов Б-ДНКЖ с образованием мононитрозильных комплексов железа с диэтилдитиокарбаматом, характеризующихся сигналом ЭПР с $g_{\perp} = 2.045$, $g_{\parallel} = 2.020$ и триплетной сверхтонкой структурой при $g_{\perp}$ [13]. Поскольку в этом случае такого сигнала ЭПР в препарате крови, обработанном диэтилдитиокарбаматом, обнаружить не удалось (рис. 3. спектры 3 и 4), говорить о появлении в крови Б-ДНКЖ-ТСЛ как индуктора гипотензии также нет основания, так что единственной причиной обнаруженного у крыс эффекта гипотензии могло быть только появление в их крови соответствующих $RS-NO$.

Последние в присутствии добавленных в кровь тиолов могли возникать только при связывании тиолов с катионами нитрозония (NO^+) [8, 14] – продуктами одноэлектронного окисления нейтральных молекул NO, т. е. газообразного оксида азота, поступавшего через легкие в кровь животных. Судя по тому, что САД начинало быстро восстанавливаться у этих животных после прекращения NO-ингаляции, возникшие перед этим $RS-NO$ быстро распадались, очевидно, с высвобождением NO, что и обеспечивало эффект гипотензии.

Отсутствие сколько-нибудь заметного снижения САД при интенсивной iNO-ингаляции (рис. 1) в отсутствие тиолов однозначно свидетельствует о полном исчезновении попадающих в кровь молекул NO. Как следует из вышеизложенного, это исчезновение, очевидно, было обусловлено одноэлектронным окислением этих молекул – их превращением в соединение X–катионы NO^+ . Последние снова могли превратиться в NO после связывания с тиолами, способными высвобождать его в организме животных и человека. В отсутствие тиолов при сохранении нейтрального значения pH крови катионы нитрозония должны были необратимо в результате гидролиза превращаться в анионы нитрита (NO_2^-) [14].

Каким же образом NO в крови мог превращаться в NO^+ ? Такое превращение может реализоваться по двум механизмам. Во-первых, окисление NO до NO_2 с последующим связыванием последнего с NO должно было приводить к образованию триоксида азота N_2O_3 с резонансной структурой $NO^+ - NO_2^-$, способной в качестве донора NO^+ S-нитрозировать тиолы. Во-вторых, одноэлектронное окисление NO могло в крови

реализоваться в результате реакции восстановительного нитрозирования, т. е. при взаимодействии NO с комплексами Fe^{3+} и Cu^{2+} , входящими в состав белков крови — соответственно трансферрином и церулоплазмином. При этом взаимодействии ионы железа и меди могли окислять NO до NO^+ с последующим образованием мононитрозильных аддуктов $\text{Fe}^{2+}\text{—NO}^+$ и $\text{Cu}^+\text{—NO}^+$. Последующая их реакция с ионами гидроксидов или тиолами и должна была приводить к образованию соответственно анионов нитрита или RS—NO .

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют с большой долей вероятности утверждать, что основной причиной того, что ингаляция газообразного NO как животным, так и добровольцам не приводит к заметному снижению у них САД, является быстрое одноэлектронное окисление молекул NO в циркулирующей крови до их катионной формы. Таким образом вместо молекул NO, способных активировать в стенках сосудов индуктор вазодилатации и гипотензии — гуанилатциклазу, появляются неактивные в этом отношении катионы нитрозония и анионы нитрита, что и приводит к снятию эффекта гипотензии.

Иная ситуация реализуется, очевидно, при контакте iNO с тканью легкого. В этом органе молекулы iNO поступают в кровеносные сосуды с их внешней стороны, так что они могут непосредственно воздействовать на гуанилатциклазу в стенках сосудов, что и должно приводить к эффектам вазодилатации и снижению артериального давления в легких, т. е. в малом круге кровообращения. Вместе с тем проникновение iNO в ткань сосудов должно было привести к появлению в легких М- и Б-ДНКЖ-ТСЛ, как стабилизаторов NO и индукторов гипотензии. Спрашивается, почему в наших опытах не удалось обнаружить эти комплексы? Не исключено, что они могли исчезать в результате воздействия анионов супероксида на включенные в ДНКЖ молекулы NO [15]. Этот распад должен был в соответствии с приведенными выше резонансными структурами М- и Б-ДНКЖ-ТСЛ приводить к высвобождению из них катионов нитрозония. Часть этих катионов могла необратимо превратиться в анионы нитрита, а другая часть — из-за наличия в ткани сосудов низкомолекулярных тиолов включиться в соответствующие RS—NO , которые и могли вызывать вазодилатацию и тем самым снижение артериального давления в легких.

В соответствии с данными, приводимыми в работах [16–19], катионы нитрозония и могут избирательно оказывать негативное, токсическое действие на нормальные и опухолевые клетки,

бактерии и вирусы. Речь идет о работах, в которых было показано, что катионы нитрозония, высвобождающиеся под действием производных дитиокарбамата из М- и Б-ДНКЖ-ТСЛ, способны были подавлять пролиферацию коронавируса SARS-CoV-2 в организме сирийских хомячков [16], оказывать цитотоксическое действие на культуры фибробластов и опухолевых клеток BCF-7 [17, 18], а также на бактерии *Escherichia coli* [19]. Если, действительно, ингаляция iNO в организм человека и животных приводит к появлению в циркулирующей крови катионов нитрозония, по крайней мере их часть, избежавшая превращения в анионы нитрита, может оказывать на человека и животных благоприятное действие в качестве агентов, подавляющих пролиферацию патогенных вирусов и бактерий. В пользу этого предположения свидетельствует лечебное действие ингаляции газообразным NO на пациентов, больных ковидом, носителей ВИЧ, а также на пациентов с постковидным синдромом [7, 20].

Не исключено, что гидролиз части катионов нитрозония в крови, мог конкурентно подавляться представленными в ней ионами хлора, образующими с катионами нитрозония нитрозохлориды ($\text{NO}^+\text{—Cl}^-$). Последние, как незаряженные молекулы, проникая сквозь клеточные мембраны, могут во внутриклеточном пространстве как доноры NO^+ S-нитрозировать тиолы. В результате клетки и ткани могут подвергаться действию как катионов NO^+ , высвобождающихся из нитрозохлорида, так и молекул NO, высвобождающихся из образующихся S-нитрозотиолов (RS—NO). Такого рода превращения, связанные с образованием в крови нитрозохлорида, насколько нам известно, до сих пор не исследовались.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с крысами проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18, III.1986). Неукоснительно соблюдались положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных

(Вашингтон, округ Колумбия, 2011) и другие нормы международного права, регулирующие содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования. Экспериментальный протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова» МЗ РФ (регистрационный номер протокола заседания № ЛЭПС/18.07.23 от 18 июля 2023г.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric oxide biology and pharmacology* (Acad. Press, Zurich, Switzerland, 2000).
2. S. S. Gross and M. S. Wolin, *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 737 (1995).
3. C. F. Nathan and D. J. Stuehr, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 726 (1990).
4. C. Frostell, M. D. Fratacci, J. C. Wain, et al., *Circulation*, **83**, 2038 (1991).
5. R. Rossaint, U. Pison, H. Gerlach, et al., *Eur. Heart J.* **14** (Suppl. 1), 193 (1993).
6. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., *Биофизика*, **66** (1), 183 (2021).
7. Е. В. Печёнкин, А. В. Коврижкин, А. В. Пекшев и др., *Биофизика*, **67**, 1251 (2022).
8. B. M. Gaston, J. Carver, A. Doctor, et al., *Mol. Intervention*, **3**, 253 (2003).
9. T. Liu, M. Zhang, M. H. Terry, et al., *Mol. Pharmacol.*, **93**, 427 (2018).
10. А. Л. Клещев, П. И. Мордвинцев и А. Ф. Ванин, *Studia Biophys.*, **105**, 93 (1985).
11. V. L. Lakomkin, A. F. Vanin, A. A. Timoshin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 413 (2008).
12. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholar Publ., Cambridge, 2019).
13. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **62**, 1 (2017).
14. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
15. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **18**, 37 (2008).
16. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др. *Биофизика*, **67**, 938 (2022).
17. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.*, **110**, 2315 (1997).
18. A. F. Vanin, V. A. Tronov, R. R. Borodulin, et al., *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 93 (2021).
19. А. Ф. Ванин, Д. И. Телегина, В. Д. Микоян и др. *Биофизика*, **67**, 938 (2022).
20. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, Е. В. Печёнкин и др. *Биофизика*, **68**, 114 (2023).

Why Gaseous Nitric Oxide Inhalation Does Not Influence on Systemic Arterial Pressure in Human and Animal Organisms?

A.F. Vanin*, A.A. Abramov, A.B. Vagapov***, A.A. Timoshin**, A.V. Pekshev***, V.L. Lakomkin**, and E.K. Ruuge****

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

**E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia

***N.E. Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia

The reason has been elucidated why gaseous nitric oxide inhalation does not produce hypotensive effect in human and animal organisms. The defect was completely removed when low molecular thiol solutions were added by intravenous pathway simultaneously with gaseous NO inhalation into the animals (rats). The proposition was made that gaseous NO molecules including through the lungs into the circulation of the blood are transformed as a result of one-electron mechanism oxidation into nitrosonium cation (NO⁺) which are not capable of vasodilating and thereby hypotensive action on men and animals. NO⁺ cation binding with low molecular thiols results in the S-nitrosothiol (RS-NO) formation with following release of the nitrosyl component from the RS-NO in the form of neutral NO molecule characterized with hypotensive activity. The formation of another NO donor — dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands did not occur in the animals. Hypotensive action observed in lungs could be determined by gaseous NO penetration through external vascular wall followed by the activation of vasodilation and hypotensia inductor — guanylate cyclase enzyme immediately inside of vascular walls.

Keywords: gaseous nitric oxide, inhalation, hypotensia, nitrosonium cation, S-nitrosothiols

МЕТААНАЛИЗ РАНДОМИЗИРОВАННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ

© 2023 г. Б.Г. Гарамян*,#

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

#E-mail: garamjan13@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 05.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Проведен теоретический анализ литературных данных по скорости распространения пульсовой волны при помощи сочетания электрокардиографических и фотоплетизмографических сигналов. Ее диагностическое значение в медицинской практике — это применение в качестве неинвазивного метода измерения артериального давления, а также для определения жесткости артерий. В некоторых исследованиях показана связь между скоростью распространения пульсовой волны и факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. Скорость распространения пульсовой волны является ранним маркером и предиктором сердечно-сосудистого риска как у лиц с нормальным артериальным давлением, так и у людей с гипертензией и используется в качестве «золотого стандарта» при определении жесткости артерий, однако, вопрос точности и автоматизации измерения скорости распространения пульсовой волны по-прежнему остается открытым.

Ключевые слова: пульсовая волна, скорость распространения пульсовой волны, время прохождения пульсовой волны, фотоплетизмограмма, жесткость артерий, артериальное давление.

DOI: 10.31857/S0006302923060182, EDN: RLRPSY

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются самой распространенной причиной смертности в мире и в России, в частности. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно от сердечно-сосудистых заболеваний умирает 17.5 млн человек, что составляет треть всех смертей в мире и половину от заболеваний неинфекционного характера. В 2018 году в России общая смертность от заболеваний системы кровообращения составила 583.1 на 100000 населения, при этом среди лиц трудоспособного возраста этот показатель составил 147.0 на 100000 населения (30.6% от всех причин смертности, 32.5% среди мужчин и 22.9% среди женщин. При этом важно, что 80% преждевременных инфарктов и инсультов может быть предотвращено при своевременной диагностике и соответствующей терапии [1–4].

Сокращения: ЭКГ — электрокардиография, АД — артериальное давление, СРПВ — скорость распространения пульсовой волны, ВППВ — время прохождения пульсовой волны, ФПГ — фотоплетизмография, ЧСС — частота сердечных сокращений.

В настоящий момент в клиническую практику внедрено множество способов оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы, включая такие методы, как электрокардиография (ЭКГ), ультразвуковое исследование сердца, фонокардиограмма, измерение артериального давления (АД), включая мониторинг по Холтеру, коронароангиография, флебография, ультразвуковое исследование сосудов и многие другие. С одной стороны, они обладают достаточно большой информативностью в отношении диагностики различной патологии сердечно-сосудистой системы, с другой — большинство из них достаточно сложны, трудоемки и дорогостоящи для применения их в качестве скрининга и прогнозирования развития сердечно-сосудистых заболеваний. Многие из этих методов позволяют диагностировать наличие патологических изменений только при развитии клинической картины, упуская субклинический период, наиболее благоприятный для терапии. Часть из вышеупомянутых методов оценивают только функциональное состояние сердца, но не учитывают сосудистое русло, которое вносит большой вклад в нормальную работу кровеносной системы. Ши-

Таблица 1. Дизайн-исследование пульсовой волны по этапам

1 этап (<i>n</i> = 1648)	Поисковые ресурсы: – Scopus – PubMed – E-library	Поиск по ключевым словам:	Пульсовая волна
			Артериальное давление
			Жесткость артерий
2 этап (<i>n</i> = 643)	Критерии включения:	Название статьи/аннотация	
		Период публикаций 1990–2021	
	Критерии исключения:	Дублирование	
3 этап (<i>n</i> = 221)	Статьи по методам:	ЭКГ (<i>n</i> = 5)	
		ФПГ (<i>n</i> = 68)	
		ЭКГ и ФПГ (<i>n</i> = 148)	
4 этап (<i>n</i> = 86)	Полнотекстовые статьи по связи динамики пульсовой волны с неинвазивной оценкой АД и жесткостью артерий		

роко известно, что состояние сосудистой стенки является важнейшим параметром, отражающим состояние кардиоваскулярной системы. Во многих исследованиях была показана необходимость оценки сосудистой стенки при принятии персонализированных диагностических и терапевтических решений (оценка риска развития сердечно-сосудистых катастроф, дифференцированный подход к терапии и оценка ее эффективности) [5, 6]. Поэтому поиск неинвазивных, простых, но в то же время информативных и воспроизводимых методов, позволяющих оценивать показатели состояния сосудистой стенки, используемые в качестве независимых предикторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, являются актуальными.

Одним из таких методов, с помощью которого оценивают такие важные характеристики сосудистой стенки, как жесткость, эластичность, растяжимость и податливость, является оценка двух взаимно зависимых величин — скорости распространения пульсовой волны (СРПВ) и времени прохождения пульсовой волны (ВППВ) [7]. Пульсовая волна представляет собой волну повышенного давления, распространяющуюся от начального участка аорты к периферии вследствие систолы левого желудочка и выброса определенного объема крови в аорту [8].

Цель данного обзора — рассмотреть механизмы формирования, регуляции и прохождения пульсовой волны и представить ее диагностические значения в медицинской практике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа взаимосвязи пульсовой волны с артериальным давлением и артериальной жесткостью были использованы поисковые ресурсы Scopus, PubMed и E-library по следующим ключевым словам: пульсовая волна, артериальное давление, жесткость артерий (*n* = 1648). В критериях включения были учтены название статьи/аннотация и период публикации (1990–2021 гг.); в критериях исключения — повторения статей (*n* = 643). Далее все полученные статьи (*n* = 221) были разделены по использованным методам: электрокардиография (*n* = 5); фотоплетизмография (ФПГ, *n* = 68); электрокардиография и фотоплетизмография (*n* = 148). Последним этапом фильтра был поиск полнотекстовых статей по связи динамики пульсовой волны с неинвазивной оценкой АД и жесткостью артерий (*n* = 86), результаты которого представлены в табл. 1.

ИСТОРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И СОВРЕМЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ РИСКОВ

Исследование, диагностический анализ и классификация артериального пульса некоторых поверхностно расположенных артерий восходят к традиционной китайской, тибетской, индийской, а позже греческой и арабской медицине. Среди особо выдающихся исследователей физиологии микроциркуляторного русла и пульсовых волн можно выделить следующих ученых: Гален (129–216 гг.) описал 27 видов пульса и их значение; Дж. Борелли (1608–1679) объяснил непре-

рывность кровотока в артериях при отсутствии притока крови из сердца в течение диастолы за счет эластичности артерий, поддерживающих кровоток во время диастолы; Л. Эйлер (1707–1783) впервые описал уравнения движения идеальной жидкости по деформируемой трубке; работы Ж. Фурье (1768–1830) легли в основу исследований пульсовых волн как набора возмущений малой амплитуды, которые распространяются с разными скоростями по течению (падающие волны) и против течения (отраженные волны) крови; Ж.-М. Пуазейль (1797–1869) описал законы истечения жидкости через цилиндрическую трубку; А. Моенс (1846–1891) и Д. Кортвег (1848–1941) вывели формулу, определяющую связь скорости распространения пульсовой волны с толщиной стенки и модулем упругости, которая в 1957 г. была обобщена Дж. Уомерсли (1907–1958) для случая, где учитывается вязкоупругий материал стенки и дисперсия (зависимости скорости от частоты волны); О. Франк (1865–1944) предложил ноль-мерную модель сосудистого русла как единого упругого резервуара [9].

В современной клинической практике определяется систолическое и диастолическое артериальное давление, измеренное с помощью сфигмоманометрии плечевой манжеты [10]. Вместе с тем артериальная жесткость имеет независимую прогностическую ценность для сердечно-сосудистых событий. Она предлагается в качестве дополнения к систолическому и диастолическому давлению и в рутинной диагностике обычно не рассматривается [11]. Экспертный протокол определения жесткости аорты в повседневной практике при помощи измерения скорости прохождения волны каротидно-бедренного пульса предписывает следующее. В качестве «золотого стандарта» используются скорости пульсовой волны в сонной и бедренной артериях: чем жестче аорта, тем выше каротидно-феморальная СРПВ [12]. В «Руководстве по лечению артериальной гипертензии» Европейского общества гипертензии и Европейского общества кардиологов СРПВ более 10 м/с указывается в качестве показателя бессимптомного признака прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний, который увеличивает глобальный сердечно-сосудистый риск [13]. Благодаря этому жесткость аорты приобрела независимую прогностическую ценность для летальных и нефатальных сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с гипертонической болезнью [14] и может быть использована для реклассификации пациентов со средним риском в более высокий или более низкий сердечно-сосудистые риски [13, 14].

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ

Периодический выброс крови в аорту сопровождается упругими деформациями ее стенок и колебаниями давления крови. Распространяющиеся далее по сосудистой системе колебания давления крови вместе с деформацией стенок сосудов называют пульсовой волной. Амплитуда локального пульсового давления уменьшается при распространении пульсовой волны от аорты к периферии. Прежде всего это связано с увеличением соотношения суммарной поверхности сосудов к их суммарному объему за счет дробления сосудов на более мелкие. Исходная энергия пульсовой волны на выходе из левого желудочка сердца, оставаясь практически постоянной, распределяется по увеличивающемуся объему ветвящихся сосудов и становится минимальной на уровне мелких артериол и капилляров [15].

РЕГИСТРАЦИЯ СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ

Метод исследования СРПВ основан на том факте, что скорость волны пульсового давления на стенки сосудов изменяется в зависимости от величины самого давления. СРПВ можно измерить по времени прохождения пульсовой волны (ВППВ) между двумя измерительными датчиками, например, ЭКГ и ФПГ [15, 16]. ВППВ рассчитывается как временная разница между зубцом R в ЭКГ и показаниями с ФПГ [17, 18] (рис 1). Каждый участок ЭКГ соответствует определенной фазе сокращения сердца. Нижняя кривая — пульсовые колебания, характеризующие изменение кровенаполнения в зондируемом объеме ткани со временем в определенном участке сосудистой системы. Начало систолы происходит раньше, чем начало увеличения прилива крови к исследуемому участку сосуда. Для прохождения волны давления по сосудистой системе требуется некоторое время Δt , что соответствует ВППВ, которое может быть определено из сравнения верхней и нижней кривой. Зная из анатомических соображений расстояние по сосуду от сердца до исследуемого участка (L), можно определить среднюю скорость пульсовой волны (v) [19, 20]:

$$v = L/\Delta t. \quad (1)$$

Д.И. Рощупкин с соавторами [21] предложили новую деформационную формулу скорости распространения пульсовой волны, которая измеряется в м/с:

$$\sqrt{\frac{dS}{\delta dp}} = \sqrt{\frac{2r}{Eh}}, \quad (2)$$

где dS — локальное изменение площади просвета (S) сосуда при изменении давления крови на dp ,

δ — плотность крови, r — внутренний радиус сосуда, E — модуль эластичности артерии, h — толщина артериальной стенки.

Левая часть формулы получена из дифференциального уравнения Ламе

$$p = a_0 \tau / r^2. \quad (3)$$

Здесь введено обозначение $a_0 \tau rh = \text{const}$, где p — внутрисосудистое давление, τ — тангенциальное напряжение, согласно модифицированному уравнению Гука:

$$\tau = pr^2 / a_0. \quad (4)$$

Правая часть формулы получена из гемодинамического телеграфного уравнения и показывает, что фазовая скорость (v) любой гармонической составляющей пульса описывается следующим уравнением:

$$v = 1 / \sqrt{LC} = \sqrt{Eh / 2r\delta}, \quad (5)$$

где L и C — соответственно инерционная индуктивность и гемодинамическая емкость единицы длины кровеносного сосуда. Это уравнение известно, как формула Моенса—Кортевега, из него видно, что скорость распространения гармонических составляющих давления не зависит от частоты [21].

Это уравнение связывает СРПВ с модулем эластичности артерии E , толщиной артериальной стенки h , внутренним радиусом артерии r и плотностью крови δ . Если $\delta = \text{const}$, то три переменные (то есть E , h и r) являются основными факторами, от которых зависит СРПВ. Кроме того, эластичность артериальной стенки важна для кровообращения, так как благодаря эластичности артерии могут трансформировать прерывистый сердечный выброс в непрерывный поток. [22]. Поскольку параметры в уравнении Моенса—Кортевега (5) могут отличаться от артерии к артерии, и их трудно измерить, альтернативная формула была преобразована из уравнения (5) Брэмуэллом и Хиллом [23]. Последнее более удобно использовать для расчета СРПВ, когда нет данных об артериальной эластичности и артериальных размерах [16]. Из-за неинвазивности метода и низкой стоимости измерения ВППВ является мощным физиологическим параметром, который широко используется для различных клинических применений, например, в качестве меры дыхательного усилия [24], оценки артериальной жесткости, оценки АД и др. [25].

В работе [26] авторами был использован новый фазовый подход для количественного измерения ВППВ в сердечно-сосудистой системе человека с применением частотно-временного анализа Гильберта—Хуанга, результаты которого показали, что низкочастотные колебания параметров пульсовой волны могут мультипликативно вли-

ять на динамику кровенаполнения периферических сосудов, а также эти колебания имеют преимущественно центральное происхождение, общее для левой и правой руки.

В дальнейшем в работе [27] было проведено сравнение нового фазового подхода с общепринятым морфометрическим методом, в ходе которого не удалось выявить достоверных различий между ВППВ, которые определялись двумя вышеуказанными методами. Однако в исследуемой группе добровольцев вариабельность значений ВППВ, определяемых фазовым методом, меньше, чем при использовании общепринятого морфометрического метода. Также была выявлена высокая степень корреляции ВППВ по сосудам правой и левой руки независимо от используемого метода расчетов.

ВЗАИМОСВЯЗЬ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ И ВРЕМЕНИ ПРОХОЖДЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ

Наиболее важной с клинической точки зрения является взаимосвязь ВППВ с артериальным и пульсовым давлением. Взаимосвязь АД и ВППВ изучалась многими учеными на основании моделей артериальной стенки. Последние учитывали эластичность артерий, вязкость, влияние старения и болезней на механические свойства сосудов. Кроме того, выводы о влиянии АД на ВППВ оценивались на основании моделей прохождения артериальной волны, чтобы связать упругость стенки сосудов с ВППВ. В результате было установлено, что ВППВ часто обратно пропорциональна АД и может быть оценена из оценки времени между проксимальным и дистальным показателем пульсовой волны на артерии [28]. Не менее важным прогностическим маркером оценки сердечно-сосудистого риска является пульсовое давление. Пульсовое давление — это разница между систолическим и диастолическим артериальным давлением. Показано, что пульсовое давление можно оценить, используя ВППВ в модели прохождения пульсовой волны, с дополнительным предположением, что объем крови и диаметр сосудов остаются постоянными в главных артериях, которые определяют пульсовое давление [29, 30]. Однако эти допущения неверны, когда речь идет о значительных изменениях ударного объема, которые происходят довольно часто с изменениями АД. Доступные в настоящее время методы, основанные на ВППВ, могут быть непригодными для целей оценки пульсового давления во многих случаях. Поэтому перспективным является неинвазивный метод оценки артериального и пульсового давления, основанный на времени прохождения импульса и периода предвыброса. Эти показатели были измерены неинвазивно с использованием электрокардиограммы,

сейсмокардиограммы и фотоплетизмограммы. В предлагаемом методе была использована двух-элементная модель Виндкесселя для моделирования пульсового давления с отношением ударного объема, аппроксимированного по периоду предвыброса, и артериальной податливости, что была оценена по ВППВ [31].

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СКОРОСТЬ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ

На СРПВ могут влиять различные факторы, включая морфологический тип сосуда (эластический или мышечный), диаметр и площадь сечения просвета сосуда, жесткость стенки, биомеханику сосудистой стенки, реологические свойства крови (состояние системы свертывания/противосвертывания крови), возраст человека, уровень артериального давления, липидный и углеводный обмен, ренин-ангиотензиновую систему, электролитный состав крови, антропометрические характеристики, генетические особенности [32, 33].

Эластические и мышечные артерии отличаются по строению сосудистой стенки с различным соотношением эластических и мышечных волокон, что существенно влияет на СРПВ, поскольку от них зависит жесткость и растяжимость стенки сосуда. К сосудам эластического типа относят аорту и крупные артерии, более периферические артерии относятся к сосудам мышечного типа. Повышение жесткости периферических артерий, а также наличие большего и более близкого расположения точек отражения вследствие ветвления артериального дерева, которые формируют волну отражения, суммирующуюся с основной пульсовой волной, приводит к увеличению СРПВ [34].

Второй важный показатель, прямо коррелирующий со СРПВ, – жесткость сосудистой стенки. В норме при сохранности эластичности сосудистой стенки в период диастолы волна отражения возвращается обратно в восходящую аорту [35]. Изменения эластичности стенки сосудов, приво-

дящие к образованию ригидных артерий, сопровождаются более ранним возвращением волны отражения, совпадающим с систолой желудочка, что выражается в виде увеличенного систолического артериального давления и пульсового давления, а также повышения постнагрузки на левый желудочек сердца с развитием гипертрофии и ухудшением диастолической функции сердца [36], ухудшению коронарной перфузии и последующему фиброзированию миокарда [37]. Многие авторы указывают на прямую связь субэндокардиальной ишемии миокарда с ригидностью аорты [38].

Показатель жесткости артерий в значительной мере связан с возрастом – по мере старения он увеличивается, что приводит к повышению СРПВ. Возрастание жесткости сосудистой стенки связано, в первую очередь, с возрастным изменением баланса комплекса структур, которые ее образуют – увеличением коллагеновых волокон и дегградацией эластиновых. Это приводит к увеличению скорости ударной волны и более раннему ее отражению, а, следовательно, и увеличению СРПВ. Интересно, что возрастное увеличение СРПВ происходит быстрее и заметнее в сосудах эластического типа, чем мышечного. Это связано с тем, что периферические артерии (мышечного типа) меньше подвержены возрастным изменениям, так как их стенки содержат меньше эластических волокон. В центральных же артериях, напротив, дегенеративные изменения, происходящие в сосудистой стенке, более выражены. Поэтому целым рядом авторов были предложены формулы, по которым рассчитывается норма СРПВ в зависимости от возраста, например, формулы, предложенные Е.Б. Бабским и В.Л. Карпманом [34, 35, 39, 40]:

$$\text{СРПВ(эл.т. сос.)} = 0.1B^2 + 4B + 380, \quad (6)$$

$$\text{СРПВ(мышечн. сос.)} = 8B + 425, \quad (7)$$

где B – это возраст [35, 39].

Нормативные значения СРПВ по возрасту указаны в табл. 2 и 3 [41].

Таблица 2. Физиологические значения скорости распространения пульсовой волны в зависимости от возраста [41]

Сосуды эластического типа		Сосуды мышечного типа	
Возраст, лет	СРПВ, м/с	Возраст, лет	СРПВ, м/с
14–30	5.7	14–20	6.1
31–50	6.6	21–30	6.8
51–70	8.5	31–40	7.1
Старше 70	9.8	41–50	7.4
		Старше 50	9.3

Таблица 3. Нормальная скорость распространения пульсовой волны по сосудам эластического и мышечного типов у детей различных возрастов [41]

Возраст, годы	Статистический показатель	По Д.Ш. Голдовской		По М.К. Осколковой		По Л.В. Ломинадзе	
		C _э	C _м	C _э	C _м	C _э	C _м
До 3	M	—	—	—	—	484.0	611.5
	± s	—	—	—	—	—	—
	± m	—	—	—	—	23.0	11.0
От 4 до 7	M	515.0	529.0	661.0	699.0	455.0	683.8
	±s	37.0	42.3	99.0	93.0	—	—
	±m	7.4	13.4	19.8	18.6	30.0	7.0
От 8 до 10	M	498.4	543.0	616.0	783.0	533.0	805.0
	±s	46.4	65.0	79.0	27.0	—	—
	±m	12.0	20.5	9.2	3.1	15.9	9.0
От 11 до 14	M	492.0	561.0	610.0	871.0	512.0	936.0
	±s	39.5	46.0	57.0	94.0	—	—
	±m	7.9	11.5	6.6	10.9	16.2	19.4

Примечание. C_э — сосуды эластического типа; C_м — сосуды мышечного типа; скорость распространения пульсовой волны дана в см/с.

Одним из основных факторов, вносящих существенный вклад в изменение СРПВ, является уровень артериального давления. При этом наибольшее значение имеет уровень систолического АД и пульсового давления. Было показано, что они коррелируют с увеличением ригидности сосудов и вызывают увеличение СРПВ. По мнению ряда авторов, пульсовое давление можно считать реальным показателем возраста артерий, который далеко не всегда соответствует биологическому возрасту человека. В свою очередь, уровень диастолического АД также влияет на СРПВ, но в значительно меньшей степени, по сравнению с систолическим АД. Кроме того, важным фактором, влияющим на СРПВ, является среднее АД, которое тесно связано с эластичностью сосудистой стенки. Таким образом, при высоком АД (артериальная гипертензия, гипертонический криз, нейроциркуляторная дистония гипертонического типа) за счет пассивного растяжения стенки сосудов увеличивается значение СРПВ, вследствие чего при определении СРПВ необходимо также измерять уровень среднего давления. Аналогичные изменения прослеживаются при наличии у человека сахарного диабета, который, как известно, оказывает повреждающее действие на сосуды. У людей с артериальной гипертензией или сахарным диабетом сонные артерии могут стать более жесткими, чем бедренная или лучевая, жесткость которых в меньшей степени изменяется с возрастом или при артериальной гипертензии. Напротив, при низком уровне среднего давления, например, при нейроциркуляторной дистонии гипотонического типа, наблюдается

снижение СРПВ. С другой стороны, в артериях мышечного типа достаточно часто можно наблюдать несоответствие между изменениями среднего давления и СРПВ, которое, как считается, связано с тоническим напряжением гладкой мускулатуры стенки сосуда. Данный тонус может варьировать в зависимости от состояния эндотелия сосудов, а также активности ренин-ангиотензиновой системы и симпатической нервной системы. Чтобы определить степень влияния мышечного тонуса сосудистой стенки, В.П. Никитин предложил использовать индекс, который рассчитывается как отношение СРПВ по артериям мышечного типа к СРПВ к артериям эластического типа. В норме он варьирует от 1.11 до 1.32. Когда тонус сосудов возрастает, индекс соответственно повышается, и наоборот. При атеросклерозе сосудов он уменьшается за счет более высокого показателя СРПВ по эластическим сосудам. Он также изменяется при артериальной гипертензии (в зависимости от стадии заболевания). Тем не менее, несмотря на то, что констрикция артерий и артериол приводит к приближению точек отражения и более раннему появлению отраженной волны в аорте, вклад этого механизма в СРПВ значительно меньше по сравнению с изменениями, к которым приводит снижение эластических свойств артерий [34, 35, 39, 42, 43].

Важное значение для СРПВ имеет состояние эндотелиальной системы, потому как она может оказывать регуляторное влияние на тонус сосудов. Так, было показано, что ацетилхолин может влиять на изменение мышечного тонуса изолиро-

Таблица 4. Скорость распространения пульсовой волны в различных сосудах [35; 52]

Структура	Скорость, м/с
Аорта	4–6
Артерии мышечного типа	8–12
Крупные вены	1–2
Полые вены	0.5–1.0

ванной артерии без участия нейрогуморальных механизмов, причем основную роль в этом процессе играют эндотелиальные клетки, которые способны синтезировать различные биологические факторы, регулирующие тонус сосудистой стенки, включая вазодилатирующие, такие как, в первую очередь, оксид азота NO, эндотелиальные факторы релаксации, простациклин и эндотелий-зависимый фактор гиперполяризации и вазоконстрикторные, например, супероксид анионы, тромбоксан A₂, эндотелин-1. Например, в ответ на растяжение стенки сосудов при увеличении тока крови или повышении АД происходит активация эндотелия, сопровождающаяся синтезом и секрецией NO, который обладает свойством расслаблять гладкую мускулатуру сосудов, способствуя вазодилатации. Наряду с этим на процесс вазодилатации могут влиять иные факторы, такие как старение, атеросклероз, сердечная недостаточность, дислипидемия, сахарный диабет, уремия, менопауза [35, 44].

Во многих исследованиях в области спортивной медицины было показано влияние физической нагрузки на СРПВ. Так, рядом авторов было отмечено, что при значительной физической нагрузке у спортсменов происходило заметное увеличение эластического сопротивления сосудистых стенок, что является в целом адаптационным механизмом сердечно-сосудистой системы, препятствующим депонированию крови. Примечательно, что оптимальная физическая нагрузка у тренированных лиц, наоборот, снижает СРПВ и артериальную ригидность [35, 45–47].

Что касается частоты сердечных сокращений (ЧСС), пола и этнических признаков, то имеющиеся данные неоднозначны — в некоторых исследованиях была подтверждена их связь с СРПВ, а в других — нет [48–51].

Таким образом, СРПВ имеет связь со множеством факторов, оказывающих на нее влияние, что, с одной стороны, позволяет использовать ее в качестве интеграционного показателя, ассоциированного с большим количеством состояний и нозологий, а с другой стороны затрудняет определение вклада каждого конкретного фактора в изменение данного показателя.

СРПВ у здоровых лиц постепенно возрастает по мере продвижения от центра к периферии: от 5–6 м/с в аорте до 8–12 м/с — в артериях мышечного типа [35, 52] (см. табл. 4).

РОЛЬ СИСТЕМНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ В РЕГУЛЯЦИИ СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ

Тонус сосудов. Важную роль в гемодинамике имеет тонус сосудов, представляющий собой степень напряжения сосудистой стенки при определенной величине внутрисосудистого давления. Он обеспечивается присутствием в сосудистой стенке гладкой мускулатуры — при ее сокращении тонус сосудов повышается, а просвет сосуда сужается (вазоконстрикция) и наоборот. Повышенный тонус сосудов сопровождается увеличением сопротивления току крови, снижением его объемной скорости, а также повышением АД. Напротив, низкий сосудистый тонус обеспечивает увеличение перфузии органа и снижение АД. Регуляция тонуса сосудов осуществляется миогенными, нервными и гуморальными механизмами, которые могут действовать как локально, местно (миогенные, гуморальные — ионы, метаболиты, тканевые гормоны), так и на системном уровне (нервные, гуморальные — истинные гормоны) [53].

В работе [54] было показано, что изменения СРПВ тесно связаны с изменениями диаметра артерий. Это говорит о том, что в физиологических условиях СРПВ в мышечных артериях определяется тонусом гладкой мускулатуры, и не зависит от специфического сигнального пути. Этот вывод согласуется с артериальным тонусом в мышечных артериях, возникающим в основном как внутренняя миогенная реакция на трансмуральное давление. Хотя СРПВ является мерой артериальной жесткости, на нее могут влиять как диаметр артерии, так и внутренняя эластичность артериальной стенки. Клиническая значимость этого исследования связана с возможностью избирательно снижать тонус мышечных артерий с результирующей вазодилатацией и снижением СРПВ. Однако в исследовании [55] говорится, что СРПВ зависит не только от внутренней жесткости артериальной стенки, но и от напряжения стенки. А натяжение стенки, в свою очередь, зависит от толщины стенки, радиуса, тонуса гладкой мускулатуры сосудов и увеличения АД.

Нервная регуляция. Нервная регуляция сосудистого тонуса осуществляется за счет сосудодвигательного центра. Он имеет несколько уровней организации. Сегментарный, или спинальный уровень сосудодвигательного центра расположен в спинном мозге, включая сегменты с С8 по L2. Здесь, в боковых рогах серого вещества, находятся симпатические центры спинного мозга, содер-

жащие сосудодвигательные нейроны. Центральный уровень расположен в центральной нервной системе и представлен гемодинамическим центром в продолговатом мозге, регулируемым активностью гипоталамуса, подкорковых центров и корой больших полушарий [53].

Центральные механизмы регуляции гемодинамики включают в себя сосудодвигательный и кардиоингибиторный центры. Их отдельные нейроны располагаются в разных отделах центральной нервной системы, а основной сосудодвигательный центр расположен в продолговатом мозге. Он состоит из четырех зон. Сенсорная зона аккумулирует сигналы от баро- и хеморецепторов сосудов, рецепторов растяжения предсердий и перенаправляет их к другим зонам. Прессорная зона имеет прямой выход на спинальный уровень гемодинамического центра и активизирует симпатические нейроны сердечного и сосудодвигательного центров, поэтому ее возбуждение вызывает рост ЧСС и АД. Депрессорная зона функционирует совместно с кардиоингибиторным центром и оказывает тормозное влияние на прессорную зону. Активация этих зон приводит к урежению ЧСС и снижению АД [53].

Авторы работы [56] показали, как систолическое и диастолическое давление, пульсовое давление и СРПВ зависят от возраста и пола у здоровых людей и пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Повышенные пульсовое давление и СРПВ напрямую связаны с повышенной жесткостью сосудов и являются основными факторами риска ишемической болезни сердца и инсульта.

Гипоталамический уровень состоит из депрессорной и прессорной зон. Депрессорная зона регулирует депрессорную зону расположенного в продолговатом мозге центра, а прессорная, соответственно, на прессорную. Он оказывает влияние через нервные механизмы регуляции, обеспечивая перераспределение крови в организме при различных функциональных состояниях, а также через гормональные механизмы, регулируя работу желез внутренней секреции [53].

Корковый уровень оказывает влияние на гемодинамику при подготовке организма к выполнению определенных нагрузок, мыслительных операций, реализации эмоций. Доказана выработка условных рефлексов на изменение гемодинамики в ответ на боль, холод и тепло. Влияния на гемодинамику со стороны коры больших полушарий в основном носят прессорный характер, т.е. способствуют росту ЧСС и АД [53].

В работе [57] было показано, что ВППВ и амплитуда пульсовой волны у здоровых добровольцев снижаются централизованно в ответ на влияние тепловых болевых раздражителей.

Исследование [58] продемонстрировало возможный механизм зависимости СРПВ от ЧСС, который можно объяснить взаимодействием частотного спектра формы пульсовой волны и частотно-зависимой вязкоупругости стенки артерии. Чем выше частотная зависимость комплексного модуля упругости артериальной стенки, тем больше изменение СРПВ при изменении ЧСС [58].

Гуморальная регуляция. Гуморальная регуляция сосудистого тонуса обеспечивается регуляторным действием гормонов и продуктов метаболизма, которые могут оказывать различное, иногда разнонаправленное действие. Метаболиты, включая CO_2 , высокую концентрацию протонов H^+ , молочную кислоту и аденозин, действуют местно, вызывая вазодилатацию, как и низкое парциальное давление O_2 . Избыток кислорода, напротив, вызывает локальное сужение просвета сосуда. Основные гуморальные факторы и их действие описано в табл. 5 [53].

В работе [59] было обнаружено, что СРПВ имеет значительную и отрицательную корреляцию с гормоном роста и инсулиноподобным фактором роста.

Авторы работы [60] исследовали 1290 пациентов, смешанную группу, состоящую из пациентов с нормальной и нарушенной функцией почек, и обнаружили, что у пациентов с самым низким терцилем функции почек наблюдалась обратная зависимость между клиренсом креатинина и СРПВ аорты.

Есть данные, показывающие взаимосвязь между уровнем глюкозы и СРПВ [61].

Роль гидродинамических характеристик сосудистого русла. В ходе ряда исследований, проводившихся на основе математической модели большого круга кровообращения сердечно-сосудистой системы, который включал однокамерный насос, артерию, периферическую артерию, микроциркуляторное русло, периферическую вену, вену, и обобщенный сосудистый резервуар, проведен анализ колебательной кинетики гидродинамических параметров — величин давления крови и объемных скоростей выходящего кровотока — для следующих сосудов: артерии, периферической артерии, артериолярной части капилляра, периферической вены и вены. Результаты показали, что существует связь между активностью сердца и низкочастотными колебаниями кожного кровотока в микроциркуляторном русле. Эта связь обуславливается гидродинамическими свойствами сосудистого русла, при этом вегетативная регуляция участия в ее формировании не принимает. Колебания формируются пассивно, без активного участия процессов регуляции эндотелиальной, нейрогенной и миогенной природы.

Таблица 5. Факторы, влияющие на сосудистый тонус [53]

Вазоконстрикторы	Вазодилататоры	Двойственное влияние
Ангиотензин (эффект на артериолы и венулы)	Брадикинин (эффект на все сосуды)	Адреналин (через $\alpha 1$ -рецепторы – констрикция, через $\beta 2$ – дилатация)
Вазопрессин (эффект на артериолы)	Каллидин (эффект на все сосуды)	Серотонин (если тонус повышен – дилатация, если тонус снижен – констрикция)
Норадреналин (эффект на все сосуды)	Гистамин (эффект на артериолы и венулы)	NO (при гипоксии – дилатация, при гипероксии – констрикция)
Тромбоксан (эффект на все сосуды)	Ацетилхолин (эффект на все сосуды)	
Ренин (эффект на все сосуды)	Натрийуретический гормон (эффект на все сосуды)	
Эндотелин (эффект на все сосуды)	Простагландины (эффект на все сосуды)	
	АТФ, АДФ, АМФ (эффект на все сосуды)	

Полученные результаты указывают на детектирующее свойство моделируемого сосудистого русла, позволяющее определять модулирующий сигнал. Такая регуляция является характеристикой системы, состоящей из нелинейной и фильтрующей составляющих [62–64].

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНАЛИЗА ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

«Золотым стандартом» для оценки артериальной жесткости в клинической практике на сегодняшний день остается измерение СРПВ [65–67].

СРПВ отражает многие гемодинамические параметры, ее определение находит широкое применение в кардиологии. Так, было показано, что у лиц, страдающих ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией, показатели СРПВ значимо более высокие по сравнению с показателями здоровых людей того же возраста, что позволяет рассматривать анализ СРПВ в качестве важного показателя определения степени риска ишемической болезни сердца и контроля терапии, а также скрининга в амбулаторных условиях для выявления группы риска по сердечно-сосудистым катастрофам. В многочисленных исследованиях была показана высокая прогностическая роль повышения СРПВ в оценке риска развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с острым коронарным синдромом и ишемической болезнью сердца. Определение СРПВ имеет прогностическую значимость в от-

ношении пятилетней выживаемости пациентов с ишемической болезнью сердца [68–73].

Другой кардиологической проблемой, при которой определение СРПВ имеет большую диагностическую и прогностическую значимость, является артериальная гипертензия. Было показано, что повышение СРПВ является признаком субклинического атеросклероза и может являться независимым фактором риска развития артериальной гипертензии [36, 74, 75].

Еще одной областью применения измерения СРПВ у пациентов с артериальной гипертензией является косвенное определение АД. Сильная корреляционная связь с уровнем систолического АД позволяет использовать его при разработке амбулаторных систем мониторинга АД [76–78]. Во многих работах было показано, что измерение СРПВ может использоваться в качестве альтернативы традиционной системы мониторинга АД [79, 80].

Связь хронической сердечной недостаточности и СРПВ была подтверждена в многочисленных исследованиях [81–83].

Таким образом, СРПВ является актуальным методом исследования у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, преимущества которого сложно переоценить. Более того, все чаще появляются исследования, демонстрирующие эффективность и значимость определения параметров пульсовой волны в иных областях медицины, таких как нефрология, гинекология и акушерство, эндокринология. Было показано, что изменения СРПВ наблюдаются при таких патологиях, как сахарный диабет, атеросклероз, пре-

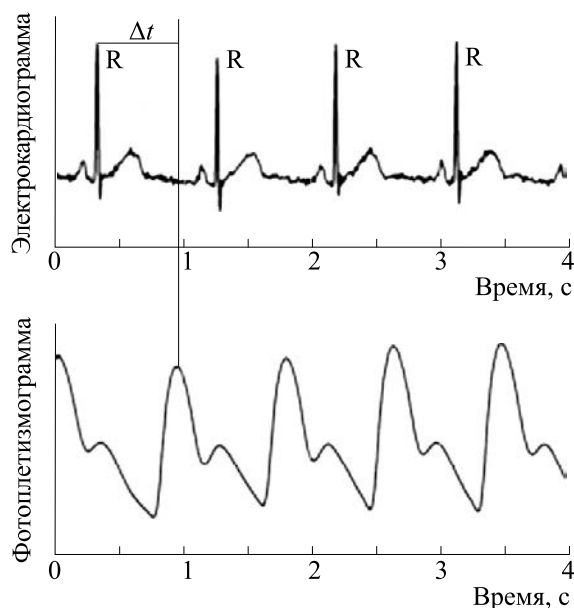


Рис. 1. Расчет времени прохождения пульсовой волны по сигналам электрокардиограммы и фотоплетизмограммы (адаптирован из работы [17]).

эклампсия, хроническая болезнь почек, ревматоидный артрит, хроническая обструктивная болезнь легких и, по-видимому, спектр заболеваний, в которых измерение СРПВ имеет прогностическую и диагностическую значимость, данными нозологиями не ограничивается. Еще одной перспективной областью диагностики, в которой возможно применение оценки СРПВ, является прогноз развития и прогрессирования когнитивных нарушений. Недавнее исследование продемонстрировало, что повышение СРПВ может являться предиктором перехода слабых и умеренных когнитивных нарушений в деменцию [84].

Кроме того, оценку ВППВ и СРПВ в сочетании с оксиметрией и определением ЧСС можно использовать для мониторинга частоты дыхательных движений и диагностики апноэ во сне [85–87].

В табл. 6 суммируются данные по СРПВ и ВППВ в норме и при различных патологиях в более чем 20 исследованиях.

Таким образом обобщая итоги результатов, можно считать, что ВППВ и СРПВ являются маркерами, используемыми в медицинской практике, в частности, для измерения АД неинвазивным, непрерывным и безманжетным способом, особенно для тех, кто подвержен риску сердечно-сосудистых заболеваний. Однако все еще существуют проблемы, которые необходимо решить. Если развитие этого направления будет продолжаться по той же траектории, что и сейчас, мы очень надеемся, что в ближайшем будущем неин-

вазивный, безманжетный и непрерывный способ для мониторинга АД на основе ВППВ может иметь практическое применение в медицинской практике, в особенности в интенсивной терапии и кардиологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении многих веков пульсовая волна представляла огромный интерес в медицинской сфере разных народов и до сих пор ее изучение является актуальным вопросом. Формирование скорости распространения пульсовой волны представляет собой сложный физиологический механизм, на который влияют много различных факторов, таких, как: физические характеристики и морфологический тип сосудов, реологические свойства крови, возраст человека, физические нагрузки, биохимические реакции организма и многие другие.

Стоит отметить, что регуляция СРПВ осуществляется миогенными, нервными и гуморальными механизмами, которые могут действовать как локально, местно (миогенные, гуморальные – ионы, метаболиты, тканевые гормоны), так и на системном уровне (нервные, гуморальные – истинные гормоны).

Существуют разные способы измерения скорости распространения пульсовой волны. На сегодняшний день широко применяются измерения с помощью сочетания сигналов ЭКГ и ФПГ. Оценка СРПВ является «золотым стандартом» определения артериальной ригидности в клинической практике. Она находит свое применение в

Таблица 6. Показатели СРПВ и ВППВ по данным разных авторов у здоровых пациентов и пациентов с различными заболеваниями

Нозология	СРПВ/ВППВ у пациентов	СРПВ/ВППВ в группе контроля	Метод определения	Ссылка
Здоровые волонтеры		313 ± 28 мс (ВППВ) 287 ± 22 (ВППВ) Общ 302 ± 28 (ВППВ) 398 ± 29 (ВППВ) 392 ± 32 (ВППВ) Общ 397±31 (ВППВ)	Палец руки, мужчины Палец руки, женщины Палец ноги, мужчины Палец ноги, женщины (ФПГ + ЭКГ)	[50]
Молодая группа Старшая группа		252 [IQR 236–276] мс (ВППВ) 261 [IQR 219–285] мс (ВППВ)	ФПГ+ЭКГ	[88]
Гипертензия Нормотензия Гипотензивная фаза	254.4 ± 18.9 мс (ВППВ) 260.7 ± 18.9 мс (ВППВ) 282.1 ± 22.4 мс (ВППВ)		ФПГ+ЭКГ	[85]
Интервальные и обычные тренировки (до и после)	1104±35 см/с (СРПВ) 1096±21 см/с (СРПВ)	1167±32 см/с (СРПВ) 1160±28 см/с (СРПВ)	Бедренно-лодыжечный	[89]
Артериальная гипертензия	10.4 м/с ± 2.2 м/с (СРПВ)	7.3 м/с ± 0.8 м/с (СРПВ)	Плече-лучевой+ЭКГ	[68]
Ишемическая болезнь сердца	10.3 м/с ± 2.5 м/с (СРПВ)	7,3 м/с ±0,8 м/с (СРПВ)	Плече-лучевой+ЭКГ	[68]
Артериальная гипертензия	10.75 ± 2.03 м/с (СРПВ)	10.06 ± 1.98 м/с (СРПВ)	Каротидно-феморальный + ЭКГ	[90]
Гиперуремия	11.78 ± 2.10 м/с (СРПВ)	9.98 ± 1.98 м/с (СРПВ)	Каротидно-феморальный + ЭКГ	[90]
Артериальная гипертензия	8.04 ± 1.8 м/с (СРПВ)	6.85 ± 1.66 м/с (СРПВ)	Каротидно-феморальный + ЭКГ	[91]
Артериальная гипертензия	89.68 ± 16.81 мс (ВППВ) 22.65 ± 11.92 мс (ВППВ) 2.47 ± 0.49 м/с (СРПВ) 15.03 ± 15.11 м/с (СРПВ)	92.67 ± 16.15 мс 25.61 ± 10.18 мс 2.35 ± 0.47 м/с 10.23 ± 6.15 м/с	УЗИ (Допплер)	[92]
Артериальная гипертензия (дети)	4.9 ± 0.7 м/с (СРПВ)	4.3 ± 0.7 м/с (СРПВ)	Каротидно-феморальный + ЭКГ	[93]
Ожирение (дети)	5.0 ± 0.9 м/с (СРПВ)	4.3 ± 0.7 м/с (СРПВ)	Каротидно-феморальный + ЭКГ	[93]
Артериальная гипертензия + ожирение (дети)	5.2 ± 0.6 м/с (СРПВ)	4.3 ± 0.7 м/с (СРПВ)	Каротидно-феморальный + ЭКГ	[93]
Артериальная гипертензия	Более 18.3 м/с – предиктор сердечно- сосудистых заболеваний		Плече-лодыжечный	[94]

Таблица 6. Окончание

Артериальная гипертензия	-0.61 ± 0.21 м/с % (индекс ВППВ к общемировым лонгитюдным показателям)	-0.45 ± 0.11 м/с %	Каротидно-фemorальный + ЭКГ	[90]
Артериальная гипертензия + сахарный диабет 1	6.8 ± 1.0 м/с (субклиническая группа) 7.6 ± 1.5 м/с (СРПВ)	5.9 ± 0.7 м/с (СРПВ)	Mobil-O-Graph (осциллография)	[95]
Сахарный диабет	9.4 ± 1.6 м/с (СРПВ)	8.8 ± 1.6 м/с (СРПВ)	Mobil-O-Graph (осциллография)	[96]
Сахарный диабет 2	10.3 ± 2.5 м/с (СРПВ)	9.6 ± 1.6 м/с (СРПВ)	Каротидно-фemorальный	[97]
Сахарный диабет 2	Повышение глюкозы 1.23 на каждый 1 м/с		Каротидно-фemorальный + ЭКГ	[98]
Артериальная гипертензия + хроническая болезнь почек	+0.5 м/с по сравнению с донорами (СРПВ)		Mobil-O-Graph (осциллография)	[99]
Обструктивное апноэ сна	10.7 ± 2.2 м/с (СРПВ)	10.3 ± 2.1 м/с (СРПВ)	Каротидно-фemorальный + ЭКГ	[100]
Обструктивное апноэ сна	9.5 ± 1.0 м/с (СРПВ)	8.6 ± 1.4 м/с (СРПВ)	Mobil-O-Graph (осциллография)	[100]
Нарушение дыхания во сне	37.8 [IQR 45.0] (индекс моментов снижения ВППВ)	8,2 [IQR 12.7] (индекс снижения ВППВ)	Только ФПГ	[101]
Артериальный проток	54.7 ± 6.7 мс (ВППВ)	65.5 ± 9.8 мс	ФПГ+ЭКГ	[102]
Ревматоидный артрит	7.3 м/с [IQR 6.2–9.4] (СРПВ)		Ультразвуковое исследование сердца, Допплер	[103]
Ревматоидный артрит	8.0 ± 2.1 м/с (СРПВ)	10.1 ± 3.4 м/с	Каротидно-фemorальный	[104]
Ревматоидный артрит и артериальная гипертензия	7.3 ± 1.5 м/с (СРПВ)	10.3 ± 3.1 м/с	Каротидно-фemorальный	[104]

ранней диагностике различных патологий, включая артериальную гипертензию, атеросклероз сосудов и др., а также применяется как альтернативный метод измерения АД (особенно при необходимости непрерывного наблюдения) и используется для апробации фармакологических средств и в качестве оценки эффективности лечения (часто в сочетании с другими методами, повышая их точность и информативность).

Несмотря на многочисленные проведенные исследования, вопрос, связанный с точностью и автоматизацией оценки динамики ПВ, а, следовательно, и проблема неинвазивного безманжетного измерения АД и определения артериальной ригидности, остаются актуальными и по сей день.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своим научным руководителям, Н.К. Чемерису и А.А. Гриневичу, за ценные советы при планировании исследования и рекомендации по оформлению статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. И. Агеева, Г. А. Александрова, Н. М. Зайченко и др., в сб. *Здравоохранение в России*, под ред. И. Н. Шаповал и С. Ю. Никитина (Росстат, Москва, Россия, 2019), сс. 20–24.
2. S. S. Virani, A. Alonso, E. J. Benjamin, et al., *Circulation*, **141** (9), e139 (2020).
3. A. Virdis, S. Masi, E. Casiglia, et al., *Hypertension*, **75** (2), 302 (2020).
4. S. Noureddine, N. Y. Dumit, and H. Maatouk, *Nurs. Health. Sci.*, **22** (1), 49 (2020).
5. И. А. Мизева, А. А. Думлер и Н. Г. Муравьев И. А., *Рос. журн. биомеханики*, **2** (56), 83 (2012).
6. А. Н. Рогоза, Т. В. Балахонова и Н. М. Чихладзе, *Современные методы оценки состояния сосудов у больных артериальной гипертензией* (Атмосфера, М., 2008).
7. И. Б. Матросова, И. В. Елисеева, Н. А. Борисова и др., *Изв. высш. уч. зав. Поволжский рег. Мед. науки*, **1**, 45 (2008).
8. О. В. Илюхин и Ю. М. Лопатин, *Вестн. ВолГМУ*, **1** (17), 3 (2006).
9. A. Adjani and M. F. O'Rourke, in *The handbook of cuffless blood pressure monitoring*, Ed. by J. Solà and R. Delgado-Gonzalo (Springer Cham, New York, USA, 2019), pp. 15–30.
10. M. Belau, W. Scheffer, and G. Maret, *Biomed. Opt. Express.*, **8** (7), 3493 (2017).
11. R. R. Townsend, I. B. Wilkinson, E. L. Schiffrin, et al., *Hypertension*, **66** (3), 698 (2015).
12. L. M. V. Bortel, S. Laurent, P. Boutouyrie, et al., *J. Hypertens.*, **30** (3), 445 (2012).
13. G. Mancia, R. Fagart, K. Narkiewicz, et al., *Eur. Heart J.*, **34** (28), 2159 (2013).
14. A. Milan, G. Zocaro, D. Leone, et al., *J. Hypertens.* **37** (8), 1547 (2019).
15. D. Buxi, J.-M. Redouté, and M. R. Yuce, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **64** (4), 917 (2016).
16. X. Ding and Y.-T. Zhang, *Biomed. Eng. Lett.*, **9** (1), 37 (2019).
17. Д. Д. Кульминский, Е. И. Боровкова, В. С. Хорев и С. А. Миронов, *Bul. Med. Internet Conf.*, **4** (7), 962 (2014).
18. L. Yibin, G. Yangyu, L. Shenlong, et al., in *The 15th Int. Conf. on Biomedical Engineering*, Ed. by J. Goh (Springer Cham, New York, USA, 2014), pp. 842–844.
19. Y.-L. Zheng, X.-R. Ding, C. C. Y. Poon, et al., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **61** (5), 1538 (2014).
20. G. Parati, C. Torlasco, M. Pengo, G. Bilo, and J. E. Ochoa, *Hypertens. Res.*, **43** (7), 609 (2020).
21. Д. И. Рошупкин, Е. Е. Фесенко и В. И. Новоселов, *Биофизика органов* (Наука, М., 2000).
22. M. E. Safar, R. Asmar, A. Benetos, et al., *Hypertension*, **72** (4), 796 (2018).
23. M. H. N. van Velzen, A. J. Loeve, E. G. Mik, and S. P. Niehof, *J. Med. Dev.*, **12** (1), 011006 (2018).
24. M. E.-S. El-Naggar, *Egypt. J. Bronchol.*, **12**, 114 (2018).
25. M. S. Dhillon and M. J. Banet, in *The handbook of cuffless blood pressure monitoring*, Ed. by J. Solà and R. Delgado-Gonzalo (Springer Cham, New York, USA, 2019), pp. 43–59.
26. А. А. Гриневич, Б. Г. Гарамян и Н. К. Чемерис, *Докл. РАН. Науки о жизни*, **504** (3), 223 (2022).
27. Б. Г. Гарамян, А. А. Гриневич, А. А. Хадарцев, Н. К. Чемерис, *Вестн. новых мед. технологий*, **27** (3), 92 (2020).
28. R. Mukkamala and J.-O. Hahn, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **65** (6), 1410 (2017).
29. X.-R. Ding, Y.-T. Zhang, J. Liu, et al., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **63** (5), 964 (2015).
30. Z. Tang, T. Tamura, M. Sekine, et al., *IEEE J. Biomed. Health Inform.*, **21** (5), 1194 (2016).

31. J. Lee, J. Sohn, J. Park, et al., *Biomed. Eng. Online*, **17** (1), 81 (2018).
32. В. А. Дудко и Р. С. Карпов, *Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика, лечение* (Изд-во СГТУ, Томск, 1998).
33. R. Asmar, A. Benetos, J. Topouchian, et al., *Hypertension*, **26** (3), 485 (1995).
34. Ю. В. Котовская, *Кардиология: Новости. Мнения. Обучение*, **1** (1), 34 (2013).
35. О. В. Илюхин и Ю. М. Лопатин, *Вестн. ВолГМУ*, **1** (17), 3 (2006).
36. И. Т. Муркамилов, К. А. Айтбаев и Ф. А. Юсупов. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*, **16** (4), 83 (2017).
37. K. Matsushita, Y. Sang, S. H. Ballew, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **34** (8), 1770 (2014).
38. H. Watanabe, S. Ohtsuka, M. Kakihana, and Y. Sugishita, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **21** (6), 1497 (1993).
39. Д. А. Усанов, А. В. Скрипаль, А. Ю. Вагарин и А. П. Рытик, *Методы и аппаратура для диагностики состояния сердечно-сосудистой системы по характеристикам пульсовой волны* (Изд-во Саратовского ун-та, Саратов, 2009).
40. В. А. Корнева и Т. Ю. Кузнецова, *Совр. мед.: традиц. и иннов.*, **1**, 88 (2013).
41. Н. А. Белоконов и М. Б. Кубергер, *Болезни сердца и сосудов у детей: Руководство для врачей* (Медицина, М., 1987).
42. S. Laurent, J. Cockcroft, L. V. Bortel, et al., *Eur. Heart J.*, **27** (21), 2588 (2006).
43. S. C. Millasseau, R. P. Kelly, J. M. Ritter, and P. J. Chowienzyk, *Clin. Sci. (Lond.)*, **103** (4), 371 (2002).
44. I. B. Wilkinson and C. M. McEniery, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31** (11), 795 (2004).
45. P. A. Roberts, B. R. Cowan, Y. Liu, et al., *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, **17** (1), 86 (2015).
46. Н. Г. Головкин и Т. Н. Божук, *Наука-2020*, **1** (12), 98 (2017).
47. Н. Г. Головкин, В. Д. Богачев, О. А. Плужников, *Теория и практика физ. культуры*, **7**, 52 (2012).
48. P. Albaladejo, X. Copie, P. Boutouyrie, et al., *Hypertension*, **38** (4), 949 (2001).
49. R. Asmar, A. Rudnichi, J. Blacher, et al., *Am. J. Hypertens.*, **14** (2), 91 (2001).
50. S. Dehghanojamahalleh and M. Kaya, *IEEE J. Transl. Eng. Health Med.*, **7**, 1900607 (2019).
51. M. L. Ford, L. A. Tomlinson, T. P. E. Chapman, et al., *Hypertension*, **55** (5), 1110 (2010).
52. C. M. Giachelli, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15** (12), 2959 (2004).
53. Д. Л. Теплый, Ю. В. Нестеров, Е. В. Курьянова и др., *Физиология человека и животных* (Астраханский ун-т, Астрахань, 2017).
54. H. Fok, B. Jiang, B. Clapp, and P. Chowienzyk, *Hypertension*, **60** (5), 1220 (2012).
55. J. Steppan, V. Barodka, D. E. Berkowitz, and D. Nyhan, *Cardiol. Res. Pract.* 2011., **263585**, 1 (2011).
56. A. P. Avolio, T. Kuznetsova, G. R. Heyndrickx, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1065**, 153 (2018).
57. M. H. N. van Velzen, A. J. Loeve, M. C. Kortekaas, et al., *Physiol. Meas.*, **37** (1), 52 (2016).
58. H. Xiao, I. Tan, M. Butlin, D. Li, and A. P. Avolio, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **312** (6), H1185 (2017).
59. Y. Çağır, M. Altay, B. B. Çağır, et al., *Endocr. Pract.*, **24** (9), 815 (2018).
60. J. J. Murad, B. Pannier, J. Blacher, et al., *Kidney Int.*, **59** (5), 1834 (2001).
61. R. M. A. Henry, P. J. Kostense, A. M. W. Spijkerman, et al., *Circulation*, **107** (16), 2089 (2003).
62. А. А. Гриневич, А. В. Танканаг, В. Г. Сафронова и Н. К. Чемерис, *Докл. РАН*, **468** (3), 342 (2016).
63. А. А. Гриневич, А. В. Танканаг, и Н. К. Чемерис, *Math. Biol. Bioinf.*, **11** (2), 233 (2016).
64. А. А. Гриневич, А. В. Танканаг и Н. К. Чемерис, *Матем. биология и биоинформатика*, **9** (2), 341 (2014).
65. C. Crim, J. A. Anderson, P. M. A. Calverley, et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **201** (10), 1307 (2020).
66. A. Milan, G. Zocaro, D. Leone, et al., *J. Hypertens.*, **37** (8), 1547 (2019).
67. H. Obeid, H. Khettab, L. Marais, et al., *J. Hypertens.*, **35** (8), 1618 (2017).
68. Ю. И. Гурфинкель, Н. В. Кацэ, Л. М. Парфенова и др., *Рос. кардиол. журн.*, **2** (76), 38 (2009).
69. V. Regnault, J. Lagrange, A. Pizard, et al., *Hypertension*, **63** (1), 105 (2014).
70. Q. Zhong, M.-J. Hu, Y.-J. Cui, et al., *Angiology*, **69** (7), 617 (2018).
71. Я. А. Орлова, Э. Ю. Нуралиев, Е. Б. Яровая и др., *Сердце*, **8** (5), 261 (2009).
72. T. Miyoshi, M. Doi, S. Hironata, et al., *J. Atheroscler. Thromb.*, **17** (3), 249 (2010).
73. О. В. Илюхин, М. В. Илюхин, Д. Л. Тарасов и др., *Рос. кардиол. журн.*, **5** (103), 12 (2013).
74. А. С. Алиева, М. А. Бояринова, Е. В. Могучая и др., *Артер. гипертензия*, **21** (3), 241 (2015).
75. R. R. Townsend, I. B. Wilkinson, E. L. Schiffrin, et al., *Hypertension*, **66** (3), 698 (2015).
76. D. Buxi, J.-M. Redoute, and M. R. Yuce, *Physiol. Meas.*, **36** (3), R1 (2015).
77. J. Lee, S. Yang, S. Lee, and H. C. Kim, *J. Clin. Med.*, **8** (11), 1773 (2019).

78. G. Slapničar, N. Mlakar, and M. Luštrek, *Sensors* (Basel), **19** (15), 3420 (2019).
79. S. Omboni, I. N. Posokhov, Y. V. Kotovskaya, et al., *Curr. Hypertens. Rep.*, **18** (10), 72 (2016).
80. H. Wu, J. Zhong, and M. Li, *Sensors*, **19** (24), 5543 (2019).
81. Ю. Ф. Осмоловская, В. Ю. Мареев, А. М. Глечан и Т. В. Балахонова, *Журн. сердечной недостаточности*, **12** (5), 270 (2011).
82. M. D. Rienzo, E. Vaini, and P. Lombardi, *Annu. Int. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2015**, 7184 (2015).
83. C. W. Tsao, A. Lyass, M. G. Larson, et al., *J. Am. Heart Assoc.*, **4** (11), e002189 (2015).
84. L. Rouch, P. Cestac, B. Sallerin, et al., *Hypertension*, **72** (5), 1109 (2018).
85. A. Johansson, C. Ahlstrom, T. Lanne, and P. Ask, *Med. Biol. Eng. Comput.*, **44** (6), 471 (2006).
86. L. M. Nilsson, *Anesth. Analg.*, **117** (4), 859 (2013).
87. X.-R. Ding, Y.-T. Zhang, H. K. Tsang, and W. Karlen, *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2016**, 4240 (2016).
88. A. Mol, C. G. M. Meskers, S. P. Niehof, et al., *Exp. Gerontol.*, **135**, 110938 (2020).
89. T. Okamoto, Y. Hashimoto, and R. Kobayashi, *Aging Clin. Exp. Res.*, **31** (10), 1451 (2019).
90. I. Ikonomidis, S. Katsanos, H. Triantafyllidi, et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, **49** (2), e13049 (2019).
91. A. Diaz, M. Tringler, S. Wray, et al., *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*, **20** (2), 258 (2018).
92. C. Li, H. Xiong, S. Pirbhulal, et al., *Medicine (Baltimore)*, **94** (51), e2343 (2015).
93. N. Kulsum-Mecchi, C. Goss, B. A. Kozel, et al., *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*, **19** (3), 221 (2017).
94. T. Ohkuma, H. Tomiyama, T. Ninomiya, et al., *Circ. J.*, **81** (10), 1540 (2017).
95. R. Lithovius, D. Gordin, C. Forsblom, et al., *Diabetologia*, **61** (9), 1935 (2018).
96. L. A. P. R. Resende, M. A. V. Silva, J. A. M. Resende, et al., *Medicine*, **98** (50), e18100 (2019).
97. R. Garcia-Carretero, L. Vigil-Medina, O. Barquero-Perez, and J. Ramos-Lopez, *J. Med. Syst.*, **44** (1), 16 (2020).
98. J. J. Drinkwater, F. K. Chen, A. M. Brooks, et al., *Diabet. Med.*, **38** (4), e14407 (2021).
99. J. Liu, K. Wang, H. Liu, et al., *Endocr. J.*, **66** (7), 629 (2019).
100. M. H. Kristiansen, A. M. Banghøj, E. Laugesen, and L. Tarnow, *Diabet. Med.*, **35** (10), 1391 (2018).
101. B. N. Link, C. Eid, M. H. Bubltz, et al., *Sleep*, **42** (5), zsz022 (2019).
102. C. R. Amirtharaj, L. C. Palmeri, G. Gradwohl, et al., *J. Perinatol.*, **38** (9), 1220 (2018).
103. L. Mokotedi, S. Gunter, C. Robinson, et al., *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **12** (6), 580 (2019).
104. Е. А. Троицкая, С. В. Вельмакин, С. В. Виллевальде и Ж. Д. Кобалова, *Кардиология*, **58** (7S), 46 (2018).

Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials on the Speed of Pulse Wave Propagation

B.G. Gharamyan

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

This paper presents a theoretical analysis of the literature on the speed of pulse wave propagation using a combination of ECG and PPG signals. The diagnostic value of pulse wave velocity in medical practice is use of this indicator for non-invasive measurement of blood pressure and also for determination of arterial stiffness. Some studies have shown an association of pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease. The speed of pulse wave propagation is an early marker and predictor of cardiovascular risk both in individuals with normal blood pressure and people with hypertension and is used as the "gold standard" for assessing arterial stiffness; however, the question about accuracy and automation of the measurement of the speed of pulse wave propagation still remains to be answered.

Keywords: pulse wave, speed of pulse wave propagation, pulse transit time, photoplethysmogram, arterial stiffness, arterial pressure

ПЬЕЗОПУЛЬСОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ У ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. В.П. Нестеров*,[#], А.И. Бурдыгин*, К.Б. Иванов*, К.В. Соболев*, И.В. Шемарова*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия*

[#]E-mail: nesterov@iephb.ru

Поступила в редакцию 22.08.2023 г.

После доработки 11.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Рассмотрены примеры практического применения разработанного компьютерного метода артериальной пьезопульсометрии для неинвазивного экспресс-анализа функционального состояния сердечно-сосудистой системы и характера ее автономной регуляции у пациентов, отличающихся по возрасту и состоянию своего здоровья. Оценивается участие и роль сократительного компонента миоцитов левого желудочка сердца в качестве универсального мышечного эффектора, обеспечивающего как основную насосную функцию сердца, так и реализацию автономной регуляции его сокращений с помощью периферических нейрогуморальных механизмов, поддерживающих оптимальный уровень кардиогемодинамики. Такой анализ обеспечивает высокую прогностическую значимость ранней индивидуальной неинвазивной пульсометрической диагностики функционального состояния и характера регуляции сердечно-сосудистой системы у человека в ходе его онтогенеза. Эти знания способствуют выявлению риска снижения сложившейся в процессе его эволюции способности сердечно-сосудистой системы к поддержанию динамического равновесия, саморегуляции и адаптации к изменяющимся условиям среды обитания, что связано с нарушением гомеостаза организма.

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система, онтогенез, диагностика, кардиогемодинамика, нейроэндокринная регуляция, артериальное давление крови.

DOI: 10.31857/S0006302923060194, EDN: PTVQBJ

В ходе эволюции у человека сформировалась весьма совершенная способность его сердечно-сосудистой системы (ССС) адаптироваться к непрерывно изменяющимся условиям существования, используя различные регуляторные механизмы. В то же время сердечные заболевания у современных людей лидируют среди причин смертности в развитых странах мира. Это определяет актуальность и социальную значимость разработки новых, наиболее точных и, по возможности, неинвазивных методов раннего (доклинического) физиологического контроля состояния СССР у человека, когда возможна наиболее эф-

фективная терапия. Способом, сочетающим в себе экспрессность, простоту и точность получаемой информации, является инструментальная пульсовая диагностика [1]. Одним из ее примеров может служить разрабатываемый нами метод артериальной пьезопульсометрии (DPP) для неинвазивной оценки показателей функционального состояния СССР и характера автономной (нейрогуморальной) регуляции пульсового давления крови при ее выбросе в аорту сокращающимся миокардом у человека. В ходе создания этого метода был сконструирован компьютерный комплекс «Пьезопульсар» и написано программное обеспечение, с помощью которых были исследованы параметры графиков волн DPP, которые несут информацию об общем состоянии СССР и особенностях функционирования механизмов автономной регуляции системного кровообращения, обеспечивающего оптимальный уровень кардиогемодинамики у человека. На основе полученных результатов было сформулировано представление о том, что механизмы регуляции в условиях нарастания ишемии и гипоксии у пациентов в

Сокращения: СССР — сердечно-сосудистая система, DPP — дифференциальная артериальная пьезопульсометрия, ПАДК — пульсовое артериальное давление крови, ЛЖС — левый желудочек сердца, МЭ — мышечные эффекторы, ВНС — вегетативная нервная система, Vpp — скорость изменения пульсового давления крови, TNN — длительность кардиоцикла, PPn — нормализованное пульсовое давление крови, VmaxPP — максимальная скорость роста пульсового давления, AIx% — индекс аугментации DPP, RW — обратная (отраженная) волна (reflected wave).

процессе их естественного старения, а также при воздействии на них различных экстремальных и стрессорных факторов, могут изменяться в сторону ухудшения. Нарушение нормального функционирования регуляторных механизмов снижает соответствие системного кровотока потребностям организма в кислороде и питательных веществах и уменьшает сложившуюся в процессе эволюции человека способность его ССС к поддержанию динамического равновесия и адаптации к изменяющимся условиям среды обитания.

Литературные данные также свидетельствовали о том, что даже у условно «здоровых» пациентов можно обнаружить признаки уменьшения эффективности и ухудшения регуляции функций их ССС, например, из-за возрастного снижения плотности β_1 -адренорецепторов в саркомерме кардиомиоцитов (« β -adrenergic desensitization» [2]), в связи с недостаточностью митохондриальных механизмов защиты миокарда от возрастного нарастания тканевой гипоксии [3], при увеличении жесткости стенок артериальных сосудов (*arterial stiffness*), связанном, например, с развитием атеросклероза у стареющих пациентов [4], а также при воздействии других негативных факторов. Совершенствование нашего метода, отражаемое в соответствующих публикациях, каждый раз сопровождалось решением какого-либо конкретного биомедицинского вопроса с определенным выводом о возможностях данной разработки. В данной статье делается попытка объединить эти заключения и представить единую картину, более полно характеризующую диагностические возможности метода DPP. Актуальность такого обобщения полученных результатов связана с тем, что ухудшение функционирования механизмов автономной регуляции ССС увеличивает риск развития таких типичных для пожилых людей болезней, как деменция, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, болезнь Альцгеймера, а также других патологий. Поэтому вызывает определенный интерес появление работы, говорящей о необходимости создания базы современных данных, включающих результаты анализа биологических сигналов высокого разрешения для выявления не только патогенных, но и естественных для «здорового» человека признаков старения, негативно влияющих на функциональное состояние его ССС [5]. Авторы этой работы использовали для создания своей базы только выверенный метод электрокардиографии, поскольку знали об ограничениях в точности другого, широко распространенного пульсометрического метода «объемной сфигмографии» [6], что связано с возможным неконтролируемым изменением объема тканевых структур между прижатым датчиком и пульсирующей артерией. В начальный период работы по созданию нового пульсометрического метода неинвазивной диа-

гностики функционирования ССС нами был создан исходный вариант одноканального метода дифференциальной пьезопульсометрии, который был успешно внедрен в исследование влияния острой экспериментальной гипоксии на вариабельность сердечного ритма [7] у обследуемых молодых добровольцев. Позднее мы усовершенствовали метод, сделав его двухканальным и направленным в основном на исследование модуляций структуры волн пульсового артериального давления крови (ПАДК). В результате были разработаны новые биотехнологические алгоритмы решения фундаментальной для человека *in vivo* задачи — создания наиболее точного на сегодняшний день метода неинвазивной экспресс-диагностики функционального состояния его ССС и характера автономной регуляции этой системы. Комплексы колебательных процессов на участках поверхности тела над близко подступающими пульсирующими артериями отражают общие свойства циклических волнообразных выбросов ударного объема крови из левого желудочка сердца (ЛЖС) в аорту. При этом на параметры волн DPP могут воздействовать через мембранные рецепторы сигналы со стороны эфферентного звена системы автономной (нейроэндокринной) регуляции, усиливающие или ослабляющие мощность и скорость сокращения миоцитов ЛЖС. Усиление может осуществляться за счет симпатoadреналовой активации мышечных эфферентов (МЭ) ССС эфферентными симпатическими волокнами вегетативной нервной системы (ВНС), а также гуморальными катехоламинами, выделяющимися из мозгового вещества коры надпочечников. Противоположное негативное регулирующее воздействие могут оказывать парасимпатические эфферентные волокна ВНС, ингибирующие процесс сокращения МЭ ССС. Основной задачей данной работы являлось подведение итогов серии проведенных нами исследований и выявление возможных закономерностей формирования в онтогенезе человека механизмов, с помощью которых регулирующие синаптические сигналы от периферических окончаний эфферентных волокон ВНС и гуморальные сигналы от коры надпочечников могут реализовываться посредством тех же мышечных эфферентов ССС, которые обеспечивают выброс крови из ЛЖС в аорту в результате выполнения нормальных процессов электромеханического сопряжения в миоцитах. Прикладной задачей данной работы являлось подтверждение возможности применения разработанных алгоритмов и способов метода DPP для медицинской неинвазивной экспресс-диагностики функционального состояния ССС и характера регуляции этой системы у пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано более 150 условно-здоровых (без патологии ССС в анамнезе) мужчин и женщин в возрасте от 18 до 89 лет в нормальных условиях физического и эмоционального покоя. Было выполнено более 330 сеансов регистрации графиков дифференциальных пьезопульсограмм. Сеансы длились от 2 до 5 мин при контурном анализе и от 5 до 10 мин при спектральном анализе после предварительного (10–15 мин) отдыха. При таком обследовании в одну сессию регистрации в среднем анализировали от 120 до 300 (контурный анализ) и от 300 до 800 (спектральный анализ) пульсовых волн DPP, что обеспечивало необходимую статистическую точность измерения. Результаты индивидуальных анализов при необходимости объединяли в соответствующие по возрасту группы и в них определяли средние значения для выявления возрастной и гендерной специфики изменения анализируемых показателей DPP в процессе онтогенеза человека. Все обследуемые дали информированное согласие на добровольное участие в исследовании. Учитывая уровень завершенности данной разработки, было решено внести коррективы в название некоторых используемых нами показателей, например, более правильно именовать наш метод не методом артериальной пьезопульсометрии, как в ряде предыдущих работ, а методом DPP.

Исходя из результатов анализа литературных и собственных данных, нами были разработаны алгоритмы и способы нового двухканального метода анализа параметров дифференциального графика DPP по скорости изменения пульсового давления крови (V_{pp}) от времени t для неинвазивного изучения функционального состояния и характера автономной регуляции ССС у человека. Предполагалось и подтвердилось, что с помощью этого метода можно получить сведения о центральных и периферических нейрогуморальных механизмах регуляции системного кровообращения путем измерения модуляции частоты и силы сердечных сокращений у обследуемых лиц.

Вначале в диагностическое устройство вносились индивидуальные данные конкретного пациента (ФИО, возраст, пол), а также другие необходимые исходные данные, например, систолическое и диастолическое артериальное давление, измеренное с помощью стандартного сфигмоманометра. Затем с помощью датчиков, персонального компьютера и разработанного программного обеспечения выполнялся предварительный контурный анализ, при котором автоматически регистрировались разнообразные показатели кардиогемодинамики, которые вычислялись и также выводились на монитор персонального компьютера: HR (частота сердечных сокращений), TNN (длительность кардиоциклов), ED

(ejection duration — длительность изгнания крови из ЛЖС), PP (пульсовое давление крови), PPn (нормализованное пульсовое давление крови), VmaxPP (максимальная скорость роста пульсового давления), AIx% (индекс аугментации DPP), I_{ao} , I_{ag} и другие показатели со своими стандартными ошибками. Контурный анализ графиков DPP давал общие сведения о сократительных свойствах миокарда, об особенностях кардиогемодинамики, об эластических свойствах стенок сосудов артериального русла и других функциональных показателях системы кровообращения у человека. Далее с помощью спектрального анализа вариабельности параметров волн DPP оценивалась активность (т.е. уровень действия, реактивность) периферических структур, обеспечивающих нервные и гуморальные регуляторные влияния на сокращение МЭ ССС, опосредуемые стимуляцией β_1 -адренорецепторов и М-холинорецепторов со стороны ВНС, а также воздействием катехоламинов, выделяемых из коры надпочечников. В основе метода DPP лежит компьютеризированный комплекс для дифференциальной пьезопульсометрии, аппаратную базу которого составляют два синхронно функционирующих пьезокерамических датчика и адаптер-преобразователь, осуществляющий интерфейс между ними и персональным компьютером. Локальные механические толчки пульсирующей сонной или лучевой артерии воздействуют на мембрану аппланационного пьезодатчика, где они сразу преобразовываются в соответствующие электрические сигналы, отражающие при этом исходную динамическую структуру волн ПАДК. Такие сигналы после их оцифровки и усиления математически обрабатываются с помощью разработанного программного обеспечения, визуализируются и регистрируются в виде волнообразных графиков пьезопульсограмм на мониторе персонального компьютера, представляя собой новый биомедицинский способ неинвазивной диагностики ССС, названный нами методом дифференциальной пьезопульсометрии — DPP (Патенты РФ на изобретения, полученные д.б.н. В.П. Нестеровым и его коллегами в 2006–2020 гг.; гос. регистрация программы ЭВМ — RU2023618213). Опытные образцы этого комплекса прошли клинические испытания в НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава РФ, а также в Санкт-Петербургской клинической больнице РАН. Испытания показали, что данный метод достоверно и неинвазивно оценивает параметры пульсовых волн DPP у человека и не оказывает негативного воздействия на его организм.

На рис. 1а для сравнения приведены графики основных пульсометрических методов анализа пульсового артериального давления крови — дифференциальной пьезопульсометрии (рис. 1а, график I) и объемной сфигмографии (рис. 1а, график II), где по оси У отложены значения амплиту-

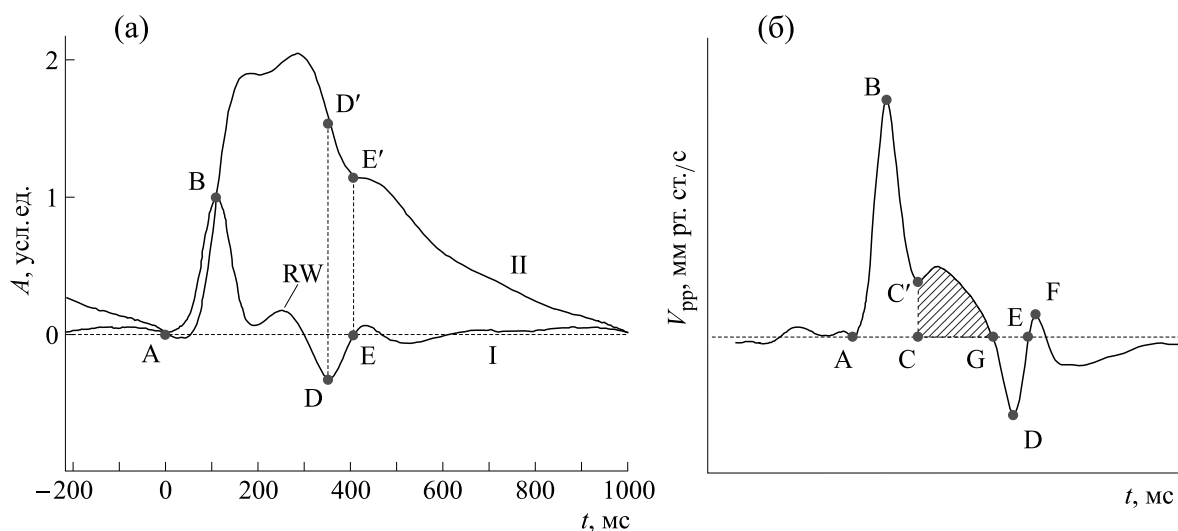


Рис. 1. (а) — График DPP (I) и соответствующая сфигмограмма (II), зарегистрированные с *a. radialis* испытуемого М. (возраст 82 года); точки D — момент начала, а E — момент полного закрытия аортального клапана; по оси ординат — амплитуда волн (усл. ед.). (б) — График усредненного кардиоцикла зависимости скорости V_{pp} от t с расчетными точками, заштрихованная часть — накладка отраженной волны RW. Основа рисунков взята из работ [8, 9].

ды волн в усл. ед., а по оси X — время t в мс. На рис. 1б представлен усредненный график зависимости изменения скорости V_{pp} от t с размерностью мм рт. ст./с. Величина $PPсф = САДсф - ДАДсф$, где $PPсф$ — пульсовое артериальное давление крови (ПАДК (англ. *PP — pulse pressure*), $САДсф$ — систолическое, а $ДАДсф$ — диастолическое артериальное давление крови). График DPP является первой производной графика зависимости V_{pp} от t ($V_{pp} = dPP/dt$). Это определяет математически однозначное расположение на графике расчетной точки A как точки начала фазы изгнания крови из ЛЖС в аорту, соответствующей моменту открытия аортального клапана. В этой точке величина ПАДК равна диастолическому артериальному давлению крови, что позволяет провести через эту точку горизонтальную (нулевую) изолинию, определяющую площадь под или над кривой графика и отражающую прирост или уменьшение артериального давления крови в ЛЖС. Используется принятая в медицине размерность артериального давления в мм рт. ст. График DPP каждого кардиоцикла имеет вид волнообразного контура с характерными перегибами и пересечениями с нулевой линией, что позволяет с более высокой точностью, по сравнению с объемной сфигмографией, анализировать динамику амплитудно-временных параметров таких графиков на основе разработанных устойчивых компьютерных алгоритмов выделения расчетных (кодирующих) точек. На рис. 1б представлен вариант расстановки этих точек на дифференциальном графике пульсовой волны DPP, используем в нашей работе.

Учитывали, что сократительные характеристики МЭ ССС отражают не только особенности их электромеханического сопряжения и воздействия со стороны регуляторного эфферентного звена, но и то, что сократительная функция самих МЭ ССС количественно отражается в величинах параметров волн DPP. Существенным являлось то, что дифференциальная функция V_{pp} от аргумента t (времени) практически не зависела от неуправляемых колебаний объема тканей под датчиком. Эти и другие представления легли в основу нашего выбора дифференциальной пьезопульсометрии как современного аналитического способа, который можно было использовать для наиболее точной неинвазивной оценки персональных общих характеристик кардиомиоцитов ЛЖС, а также выявления специфики формирования «online» реактивности периферических механизмов автономной (нейроэндокринной) регуляции сократительной функции МЭ ССС у обследуемых. К настоящему времени накоплен значительный опыт проведения многочисленных (сотни) обследований разных по возрасту и состоянию здоровья пациентов. В данной статье эти разрозненные результаты собраны вместе в виде реальных готовых примеров биотехнологических разработок, демонстрирующих диагностические возможности метода DPP. Использовали персонафицированный подход к изучению формирования периферических регуляторных механизмов эфферентного звена, обеспечивающих оптимальное и устойчивое кровоснабжение органов и тканей у человека в процессе его онтогенеза.

Как было указано выше, разработанное программное обеспечение визуализирует локальные

изменения ПАДК в виде волновых графиков DPP, где расчетная точка А обозначает момент начала фазы изгнания крови из ЛЖС в аорту, соответствующий моменту открытия аортального клапана. Однако в качестве универсального параметра при оценке время-зависимых аналитических показателей кардиогемодинамики использовалась более устойчивая при измерениях точка В абсолютного положительного экстремума на графике DPP. Амплитуда этой точки оценивает максимальную скорость роста систолической волны артериального давления — $V_{\max PP}$. На эту точку никогда не накладывается отраженная от общего сосудистого сопротивления обратная волна RW (reflected wave; на рис. 1б — заштрихованная часть графика, ее величина определяется путем интегрирования по площади между точками С и G), а ошибка ее определения при частоте дискретизации сигнала, равной 1 кГц, составляет ± 1 мс. Эти свойства точки В позволяют наиболее точно, неинвазивно и удобно оценивать сократительную способность миокарда ЛЖС (инотропная функция сердца) по ординате этой точки, а по ее абсциссе — момент достижения наибольшей скорости роста величины V_{pp} . Точка С — момент достижения максимальной величины пульсового давления крови в фазу изгнания крови из ЛЖС, если площадь $CG \leq 0$; экстремальная точка D — момент развития максимальной скорости снижения величины пульсового давления на катакритическом участке графика пульсовой волны DPP, на котором ПАДК в ЛЖС сначала выравнивается с величиной артериального давления на входе в аорту, а затем из-за превышения артериального давления в аорте над внутривентрикулярным АД створки аортального клапана начинают закрываться до момента его полного перекрытия, который обозначен точкой Е. С этого момента начинается рост дикротической (внешней отраженной) волны артериального давления крови, максимальная скорость прироста которой обозначена точкой F. Точка G — момент достижения максимальной величины пульсового давления крови в ЛЖС перед ее изгнанием, если интеграл площади $CG > 0$. В этом случае пульсовое давление из-за наложения RW увеличивается относительно его нормализованной величины на долю, пропорциональную RW в процентах, и это учитывается при компьютерной калибровке сигнала с помощью сфигмоманометра. Интервал времени В—В (аналог RR-интервала комплексов QRS при электрокардиографии) в данной работе в соответствии с международными стандартами [10] называется TNN. Все сказанное свидетельствует о высокой точности метода DPP как при контурных общих оценках средних результатов с их стандартными отклонениями при анализах колебаний параметров пульсовых волн, так и при спектральном анализе вариабельности их фрагментов

в определенных частотных диапазонах общего спектра. Соотнося измеренную сфигмоманометром величину $PP_{сф}$, которая включает и возможную добавку RW к ПАДК, со средней величиной пульсового давления, вычисленной в этот же период путем интегрирования по площади ABC при $CG \leq 0$ или ABG при $CG > 0$ (при наложении RW на волну ПАДК), в условных единицах компьютерной «оцифровки», определяли калибровочный коэффициент пропорциональности. С его помощью эти единицы автоматически с помощью персонального компьютера пересчитывали и выражали величины PP, PP_n и RW в соответствующих им единицах измерения артериального давления — мм рт. ст. Аналогично, используя вычисленную значимость единиц «оцифровки», автоматически пересчитывали величины параметра $V_{\max PP}$ в мм рт. ст./с для дальнейшего анализа. Полученные величины показателей волн DPP использовали в качестве физиологических индикаторов или маркеров выявления возможных признаков возникновения риска сердечно-сосудистых заболеваний. При оценке показателей кардиогемодинамики использовали только положительные величины аугментации волн DPP (над изолинией). Это уточняло смысл определения индекса аугментации $AIx\% = RW \cdot 100 / PP [\%]$ как показателя, который указывает на сколько процентов в среднем увеличивается каждая нормализованная волна PP_n из-за наложения на нее RW. Вертикальный разброс (вариабельность) расчетных точек В на графиках, сложенных по одной и той же абсциссе, отражает реактивность периферических механизмов системы регуляции величины $V_{\max PP}$. Горизонтальный разброс точек В на графиках, сложенных таким же образом, но по одной и той же ординате, отражает вариабельность сердечного ритма (расчет по величине TNN). Вариабельность этого параметра оценивали посредством измерения спектральной мощности колебаний интервала времени кардиоцикла между двумя соседними точками В по частотным диапазонам, рекомендованным международными стандартами для оценки вариабельности сердечного ритма. При этом исходили из собственных, а также ранее установленных данных литературы, свидетельствующих о сходстве волновой структуры колебаний TNN и ПАДК [11]. Анализировали сверхвысокочастотный диапазон (VHF; 0.4–0.5 Гц), отражающий мощность колебаний возможных экстрасистол; высокочастотный диапазон (HF; 0.15–0.4 Гц), отражающий мощность колебаний дыхательных волн; низкочастотный диапазон (LF; 0.04–0.15 Гц), отражающий мощность колебаний вазомоторных волн с частотой близкой к 0.1 Гц, и ультранизкочастотный диапазон (ULF; 0.003–0.04 Гц), отражающий мощность колебаний параметров наиболее медленных волн ПАДК, который обычно связывают с

психоэмоциональными воздействиями. В ULF-диапазоне реализуется и основная регуляторная активность гуморальных катехоламинов — адреналина и норадреналина, выделяющихся из мозгового вещества коры надпочечников и воздействующих на те же адренорецепторы миоцитов ЛЖС, на которые действует и нейромедиатор симпатических эфферентных нервных волокон. Гуморальные катехоламины высвобождаются, как мы полагаем, в виде определенных «порций» молекул, которые условно можно для краткости назвать квантами гуморальных катехоламинов. Эти кванты, не дожидаясь равновесного распределения в крови, сразу взаимодействуют с β_1 -адренорецепторами миоцитов CCC и волнами с длительностью от ~33 с до ~6.5 мин увеличивают амплитуду колебаний параметров DPP.

Сердечная недостаточность является основной причиной смерти при развитии патологий CCC, а также при старении организма человека. Ишемическая болезнь сердца сопровождается увеличением жесткости стенок артериальных сосудов (arterial stiffness) и соответствующим ускорением распространения пульсовых волн артериального давления крови по аорте и артериям как в направлении от сердца, так и обратно к сердцу, в виде волны RW, отраженной от места общего сосудистого сопротивления. При превышении определенного порога скорости волна RW может успеть попасть в полость ЛЖС волны DPP еще до полного закрытия аортального клапана и наложиться на ее катакроду. Величина RW при этом признается основной детерминантой дополнительного прироста PP и рассматривается как предиктор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, инсульта и др.) при значительном накоплении RW в PP. Физиологическим маркером повышенной жесткости стенок артерий служат величины скоростей V_{ao} и V_{ag} («Золотой стандарт»), которые оцениваются с помощью калибровочных кривых сравнения «жесткость/возраст» у пациентов [12]. Два синхронно работающих канала в нашем методе [13] не сложно по выполнению и точно оценивают эту жесткость по скорости пробега экстремальной точки В волны DPP между двумя пьезодатчиками.

Значительное внимание в данной работе уделено изучению периферических механизмов важнейших систем автономной регуляции CCC. Каждый из выбранных для спектрального анализа параметров пульсовых волн DPP ($*V_{maxPP}$, $*PP$ и $*TNN$; отмечены звездочками) во все выделенные периоды жизни обследуемых обладает собственным спектром частот колебаний $*TP_f$ с определенной мощностью. Из них с целью более подробного анализа реактивности конкретных периферических механизмов были выделены

укороченные фрагменты $*P_f$, входящие в виде суммы в величины $*TP_f$ и соответствующие принятым частотным диапазонам — $*P_f(HF)$, $*P_f(LF)$ и $*P_f(ULF)$. Вариабельность этих фрагментов, как мы полагаем, отражает функционирование определенных механизмов важнейших систем автономной регуляции CCC. Разброс их колебаний в границах соответствующих диапазонов частот дает возможность отдельной оценки функциональной активности этих фрагментов, отражающих процессы синаптической передачи регуляторных сигналов от окончаний симпатических и парасимпатических эфферентных волокон ВНС, а также сигналов от нейроэндокринной системы, непосредственно переносимых гуморальных катехоламинов. В данной работе было решено ограничиться изучением одного, наиболее устойчивого параметра графика DPP — $*V_{maxPP}$. Он отражал динамику функционирования механизмов, образующих волновой график DPP, у него не было накладок, как у параметра $*PP$, в виде RW, что повышало точность его анализа. Спектральная мощность колебаний параметра $*V_{maxPP}$ в данной работе представлена как суммарный результат спектрального анализа колебаний фрагментов $*P_f$ сотен пульсовых волн пьезопульсограммы каждого сеанса регистрации пульса у пациента. Это обеспечивает высокую точность анализов величин, характеризующих спектральную мощность вариабельности показателей в каждом диапазоне частот для данного параметра с одной размерностью — мм рт.ст./с. Учитывая высокий уровень и медицинской, и коммерческой изученности вариабельности сердечного ритма у человека [14], и то, что параметр $*TNN$ использует другие механизмы регуляции, было решено основное внимание в данной работе уделить новому способу анализа параметров и механизмов менее исследованных волн с модуляцией структуры ПАДК, участвующих в выполнении инотропной функции сердца. В результате были разработаны новые биотехнологические алгоритмы решения фундаментальной для человека *in vivo* задачи — создания наиболее точного на сегодняшний день метода неинвазивной пьезопульсометрической экспресс-диагностики функционального состояния его CCC и характера ее автономной регуляции. При спектральном анализе использовали метод математического преобразования по Lomb-Scargle (Lomb-Scargle periodogram) [15]. Этот метод позволял более точно, по сравнению с распространенным методом Фурье (Fast Fourier transform), оценивать участие гуморальных катехоламинов в автономной регуляции CCC у обследуемых лиц. Основные результаты представлены в виде средней величины $\pm$ стандартная ошибка среднего; о статистической достоверности различий между средними значениями суди-

Таблица 1. Показатели функционального состояния ССС (*a. carotis*).

Объекты и показатели	$V_{\max PP}$, мм рт. ст.	PP , мм рт. ст.	V_{ao} , м/с	AIx , %	PPn , мм рт. ст.
Ж., 20 л. ($n = 5$)	340 ± 33	35.3 ± 3.2	6.04 ± 0.17	13.6 ± 4.5	27.8 ± 3.5
М., 82 г. ($n = 15$)	$631 \pm 25^{*\uparrow}$	$60.1 \pm 4.5^{*\uparrow}$	$9.03 \pm 0.41^{*\uparrow}$	$27.4 \pm 2.18^{*\uparrow}$	$44.3 \pm 3.4^{*\uparrow}$

ли по t -критерию Стьюдента, различия считали достоверными при $*p < 0.05$.

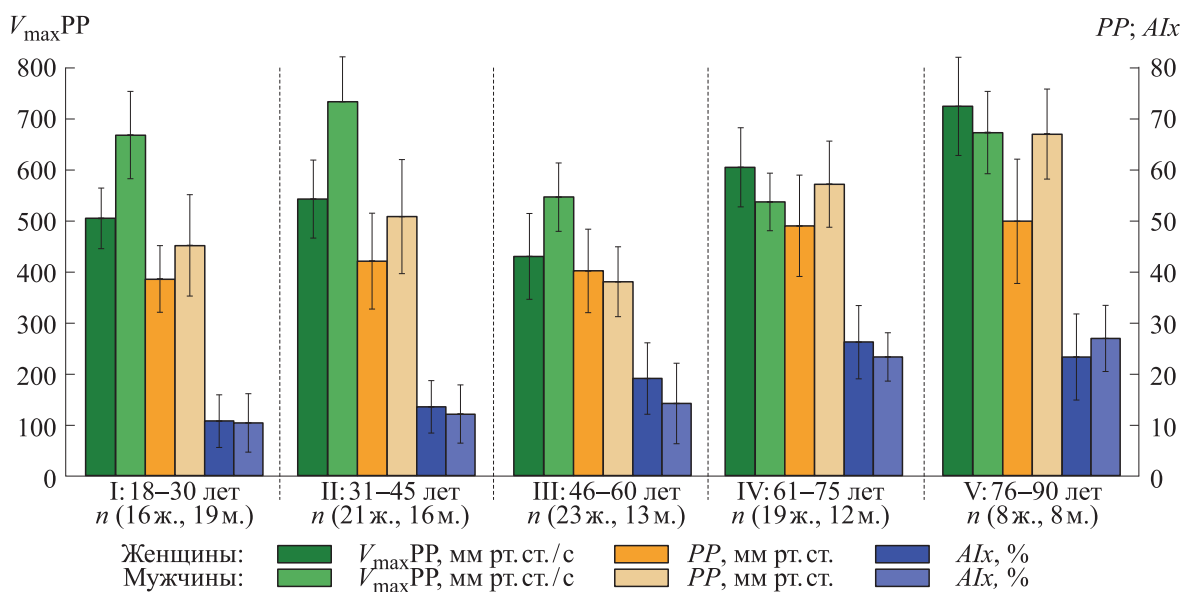
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из формируемых возрастных групп пациентов в качестве примеров контурного анализа функционального состояния ССС были выбраны результаты обследования наших двух коллег, которые отличались по возрасту и, в то же время, соответствовали средним величинам в своих группах. В табл. 1 представлены ряды усредненных (n — число проведенных сессий измерений) показателей кардиогемодинамики для сравнительной оценки характеристик состояния ССС у этих обследуемых путем контурного анализа их пульсовых волн DPP.

Можно видеть, что обследуемые статистически достоверно отличались между собой по всем сравниваемым показателям: а) величина частоты сердечных сокращений у пожилого М. была существенно снижена, по сравнению с молодой Ж. (57 ± 3 и 74 ± 3 уд./мин соответственно), что было компенсировано увеличением максимальной скорости прироста пульсового давления —

$V_{\max PP}$; б) у пожилого М. возросла, по сравнению с Ж., скорость возврата отраженной волны RW (V_{ao}), свидетельствуя о повышенной жесткости стенок его аорты и магистральных артерий, что подтверждается значительным ростом индекса аугментации $AIx\%$, отражающего нарастание величины пульсового давления относительно нормализованной PPn из-за наложения RW. Сказанное говорит о том, что контурный анализ характеристик пульсовых волн DPP позволяет неинвазивно оценивать основные общие показатели кардиогемодинамики у пациентов. Эти результаты мотивировали проведение более широкого изучения изменений параметров DPP в ходе онтогенеза обследуемых.

На рис. 2 показано, что на всех изученных возрастных этапах при указанных количествах (n) обследованных пациентов сохраняются гендерные различия показателей графиков волн DPP. Стоит обратить внимание на то, что в молодых возрастных группах (I–III) величины параметров $V_{\max PP}$ у мужчин значительно ($p < 0.05$) превышали таковые у женщин. В более старших группах (IV и V) было выявлено обратное соотношение величин этих параметров. Можно отметить,

Рис. 2. Возрастные изменения параметров волн DPP (*A. carotis*).

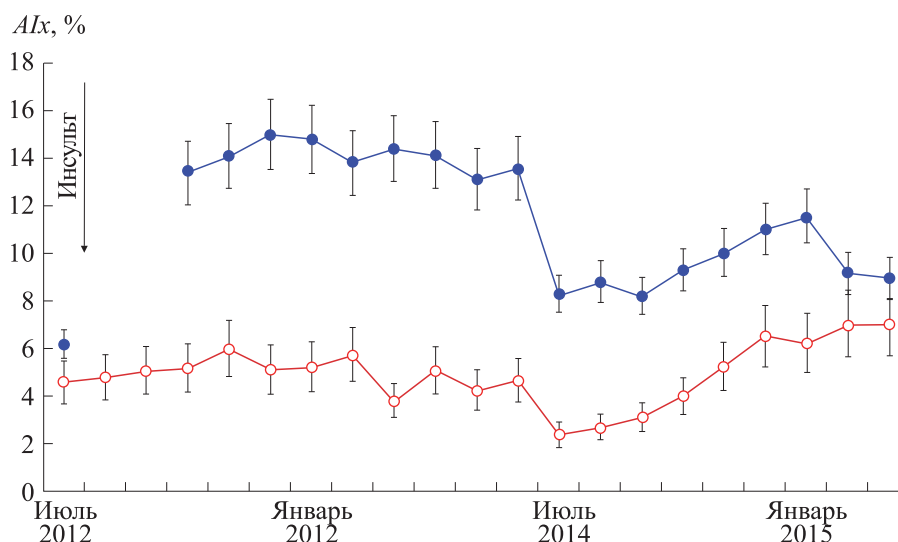


Рис. 3. Возрастные изменения $AIx\%$ пульсовых волн DPP от лучевых артерий левой (контрольной — пустые кружки) и правой (после инсульта — заполненные кружки) рук. По оси абсцисс — период восстановительного лечения после инсульта с месячным дискретом обследований (ускоренное снижение величин $AIx\%$ в июле 2014 г. было связано с прохождением испытуемым М. дополнительного курса восстановительной терапии). Основа рисунка взята из работы [13].

что после относительного снижения величины параметра $V_{\max PP}$ в группе III (46–60 лет) произошло значительное увеличение этих параметров в старших (IV и V) группах, возможно из-за нарастания жесткости артериальных стенок, о чем свидетельствует соответствующий прирост величин их показателя $AIx\%$.

Представляло интерес провести изучение особенностей изменения показателей кардиогемодинамики у пожилых пациентов во время их сердечно-сосудистых заболеваний. Такая возможность появилась при развитии у коллеги М. в возрасте 79 лет острой сосудистой патологии, вызванной ишемическим инсультом с правосторонним гемипарезом. После интенсивной госпитальной терапии он приступил к обычной деятельности и продолжает работать до настоящего времени, постоянно принимая соответствующие лекарственные средства. Вскоре после выписки из больницы у него было начато сравнительное исследование показателей кардиогемодинамики лучевых артерий (*a. radialis*), синхронно регистрируемых с обеих рук — от парализованной доминантной правой, а также от левой руки, как контрольной (рис. 3). Вычисленные показатели рассматривались в качестве маркеров устойчивости стенок артерии к факторам развития данной патологии. Одновременная двухканальная регистрация пульсовых волн DPP позволила установить значительный рост величины $AIx\%$ и скорости распространения пульсовой волны V_{ag} в парализованной правой руке, по сравнению с контрольной левой рукой ($p < 0.05$). Следует отметить, что в доминантной правой руке пациента

М. и до заболевания наблюдали незначительное превышение величины $AIx\%$ по сравнению с левой рукой, что, видимо, было связано с повышенным базальным миогенным тонусом гладкомышечных клеток в стенках артерии более напряженной руки. Таким образом, динамика ломаных кривых зависимости величин индекса аугментации от продолжительности болезни М. свидетельствовала [13], что по данному маркеру полутора-двух лет восстановительного лечения оказалось достаточно для его выздоровления.

В качестве другого примера практического биомедицинского применения метода DPP для анализа функционального состояния ССС на рис. 4 представлены усредненные графики индивидуальных кардиоциклов того же пожилого мужчины М. в возрасте 85 лет в нормальных условиях (контроль) и при воздействии острого болевого стресса, вызванного переломом ребра при механической травме. Боль индуцировала негативную стресс-реакцию, проявляемую как искажение нормального контура волны DPP, сопровождаемое значительным увеличением пульсового давления крови (от 63 до 96 мм рт.ст.). Это связано с аномальным ростом скорости его развития из-за усиленного сокращения миоцитов ЛЖС (величина $V_{\max PP}$ возросла от 625 до 2117 мм рт.ст./с), которое, как можно полагать, отражает нарушение автономной регуляции ССС [16]. Острая боль (8 из 10 по шкале боли), проявляемая волнообразными приступами, не оказала заметного воздействия на величину частоты сердечных сокращений (соответствующие величины TNN: в контроле — 1086 ± 22 мс, при боли —

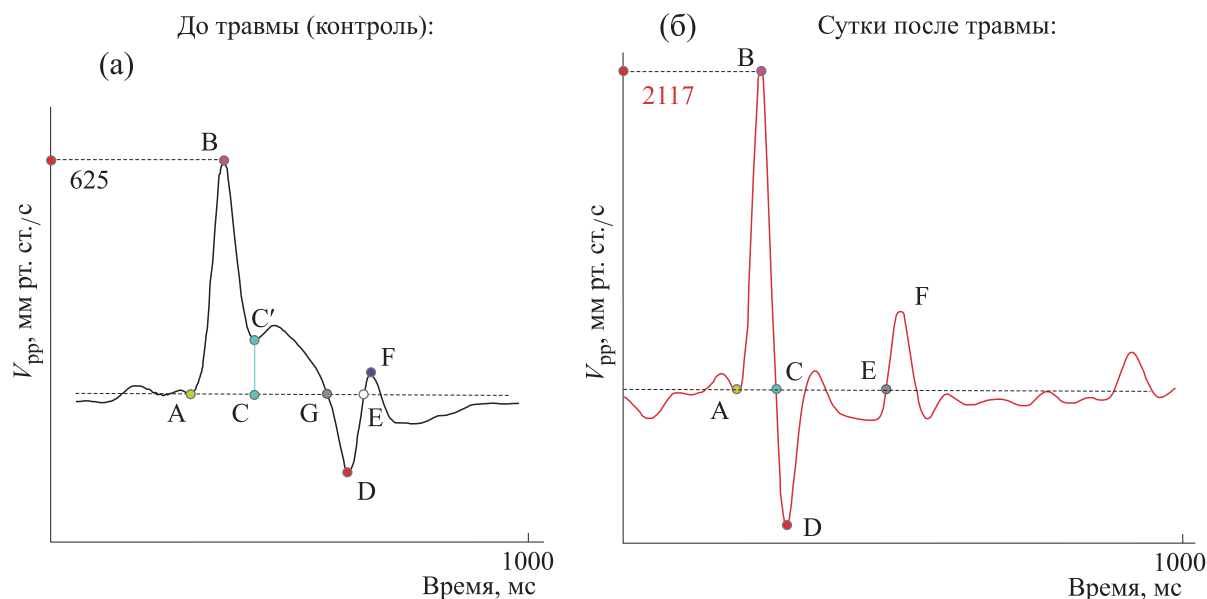


Рис. 4. Реакция мышечных эффекторов CCC у пожилого испытуемого М. на стрессовое воздействие острой боли при механической травме. Величины показателей указаны в тексте статьи и на рисунке.

1076 ± 142 мс). Однако резкое уменьшение периода изгнания крови из ЛЖС (от 346 мс в контроле до 115 мс при стрессовом воздействии) стало причиной изменения локализации волны RW на графике DPP. Отраженная волна рассеяла свою энергию, частично наложившись на катакrotическую часть этого графика в зоне диастолического артериального давления и сформировав ди-кrotическую волну с повышенной относительно контроля максимальной скоростью прироста артериального давления крови в точке F (рис. 4).

Представляло интерес выяснить, какие периферические механизмы автономной регуляции CCC были использованы при развитии в организме пожилого М. стресс-реакции на воздействие острой болевой травмы. Как было указано ранее, каждый из выбранных нами параметров графика DPP обладает собственным спектром частот колебаний — $*P_f$ с определенной мощностью, из которого можно выделить отдельные фрагменты ($*P_f$), соответствующие частотным поддиапазонам, активирующим функционирование разных, но также определенных периферических молекулярных механизмов автономной регуляции сокращений МЭ CCC. С этой целью был выполнен спектральный анализ вариабельности параметра $V_{\max PP}$ графиков DPP коллеги М. [17]. Вариабельность фрагментов $*P_f$, как мы полагаем, количественно отражает мощность ответных сократительных реакций миоцитов ЛЖС, активированных ионами Ca^{2+} , высвобождаемыми из

саркоплазматического ретикулума и других источников. Эти вбросы ионов кальция в миоплазму опосредованы воздействием трансмиссеров на соответствующие мембранные рецепторы, инициирующие последующие процессы электро-механического сопряжения. Таким образом, разброс колебаний спектральной мощности фрагментов $*P_f$ позволяет нам пока еще недостаточно выясненным способом оценивать состояние внутриклеточных механизмов, запускающих дополнительные сокращения или, наоборот, ингибирующих сократительную функцию миоцитов ЛЖС, и, тем самым, регулирующих системное кровообращение. На рис. 5 в качестве примера представлены графики спектрального анализа колебаний фрагментов параметра $V_{\max PP}$, зарегистрированных от *a. carotis* до травмы (контроль), в первые сутки после травмы и спустя 25 суток после травмы. Можно видеть существенные количественные и качественные изменения в характере вовлечения периферических механизмов регуляции сокращения МЭ CCC. До травмы у пожилого М. основным активирующим регулятором были внесинаптические гуморальные катехоламины (в основном — адреналин) в частотном диапазоне ULF с общей регуляторной активностью, равной 202 усл. ед., и пиковой величиной, которая доходила до 183 усл. ед. (условная единица = 1 (мм рт. ст./с)²). Через сутки после травмы главную регуляторную роль стал

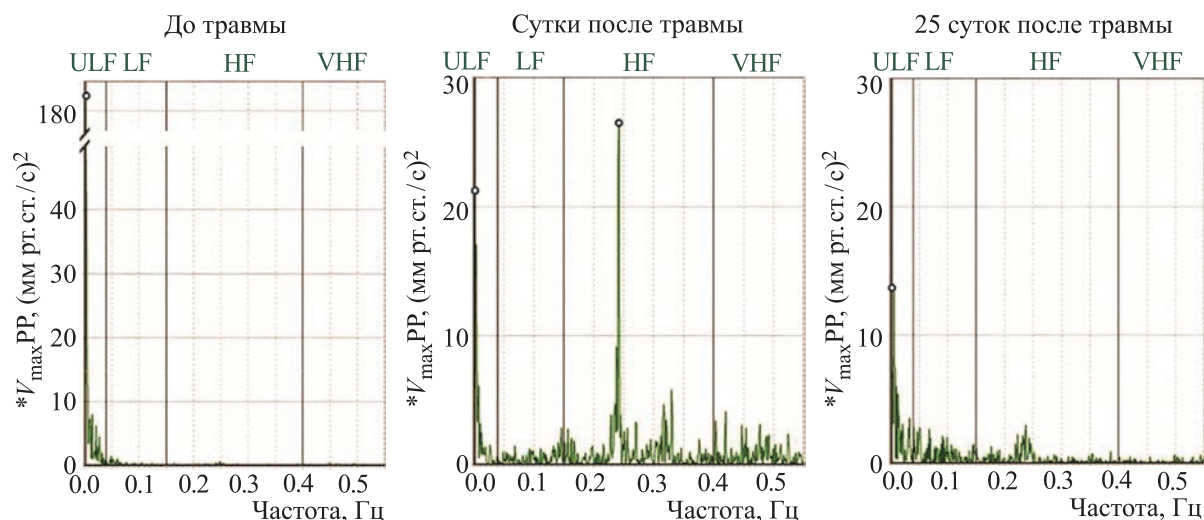


Рис. 5. Результаты пьезопульсометрического анализа спектральной мощности вариальности параметра $V_{\max PP}$ пульсовой волны DPP, определяемой воздействием нейроэндокринного регуляторного комплекса у испытуемого М. Основа рисунка взята из работы [16].

играть синаптический ингибирующий медиатор ацетилхолин в совокупности со своими М-холинорецепторами в постсинаптической мембране (в сарколемме миоцитов ЛЖС) в частотном диапазоне HF с общей активностью равной 280 усл. ед. и пиковой активностью равной усл. ед. При этом заметно возросла активность низкочастотных (диапазон LF), а также сверхвысокочастотных (диапазон VHF) колебаний (экстрасистол и др.). Через 25 суток после травмы активность механизмов, обеспечивающих защитную антитрессовую регуляцию параметров пульсовой волны DPP в диапазоне HF, существенно снизилась и начала восстанавливаться исходная повышенная активность катехоламинов в частотном диапазоне ULF (к этому времени пиковая активность гуморальных катехоламинов регистрировалась уже на уровне 14 единиц).

Для большей полноты картины, представляющей результаты спектрального анализа вариальности параметров пульсовых волн графиков DPP пожилого травмированного мужчины, были добавлены данные, полученные в нормальных условиях при обследовании функционального состояния и характера автономной регуляции сокращений ЛЖС на примере сонной артерии молодой (20 лет) здоровой женщины. Оказалось, что в покое основным активирующим регулятором сокращений ее кардиомиоцитов являлись симпатические эфферентные волокна ВНС, использующие нейромедиатор нервных волокон для быстрой передачи возбуждающего сигнала на β_1 -адренорецепторы постсинаптической мембраны

(сарколеммы миоцитов ЛЖС). Функциональная активность этой передачи в частотном диапазоне LF оценивалась в данном случае в 329 усл. ед. Доминирующая роль этого диапазона частот, определяющих вариальность параметра $V_{\max PP}$ волн DPP, была характерна для большинства обследованных молодых пациентов.

Сравнительные неинвазивные исследования особенностей организации периферической системы автономной регуляции сердечных сокращений у пациентов разного возраста показали [17], что характер вовлечения разных клеточных регуляторных механизмов в обеспечение оптимального кровообращения отражает особенности и качество здоровья конкретных пациентов и, таким образом, является в основном функционально обусловленным. Векторы последовательного онтогенетического развития периферических механизмов автономной регуляции ССС у человека проявлялись до уровня вариальности основных параметров пульсовых волн DPP, оцениваемых в целом характерными для них величинами $*TP_f$ с суммарной мощностью их колебаний, определяющей максимальную силу и скорость сокращений. Специфика распределения реактивности окончаний эфферентных симпатических и парасимпатических волокон ВНС, а также гуморальных катехоламинов, выделяющихся из коры надпочечников, отражает в основном индивидуальные особенности регуляции соответствующих механизмов у конкретных пациентов, связанные с влиянием на них различных факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют заключить, что создан новый, более точный по сравнению с распространенными коммерческими устройствами, метод для неинвазивной пульсовой экспресс-диагностики функционального состояния ССС у пациентов. Новым при разработке метода стало использование дифференциальной пульсометрии, применение двухканальной синхронной записи сигналов от двух пьезокерамических датчиков и разработка оригинального программного обеспечения для персонального компьютера. Сравнительное изучение пульсовых волн DPP показало, что для каждого пациента возможно выполнить профилактический неинвазивный экспресс-анализ специфического для него функционального состояния ССС, а также характера ее автономной регуляции. Это может помочь врачу выбрать верную стратегию дальнейшего (если необходимо) лечения пациента. На основе полученных результатов данного исследования можно прийти к заключению о возможных проявлениях онтогенетических особенностей вовлечения разных физиологических механизмов и способов в обеспечение оптимального и регулируемого кровообращения. Выявленные гендерные различия при указанных количествах обследуемых не достаточны для вывода о принципиальных, статистически достоверных отличиях женской и мужской кардиогемодинамики, эти различия просто следует учитывать. Например, стоит обратить внимание на то, что в более молодых возрастных группах (I–III, рис. 2) величины параметров $V_{\max}PP$ у мужчин значительно превышали ($p < 0.05$) таковые у женщин. В старших группах (IV и V) было выявлено обратное соотношение величин этих параметров.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность всем коллегам за бескорыстную помощь в сборе необходимой пульсометрической информации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00967-23-00, дополнительная финансовая поддержка отсутствовала.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей в соответствии с принципами

биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования. Использованный метод прошел клинические испытания в НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава РФ и в Санкт-Петербургской клинической больнице РАН, которые показали, что данный метод не оказывает негативного воздействия на организм человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Методы исследования сердечно-сосудистой системы, Руководство по кардиологии* (под ред. Е.И. Чазова), **2** (М. 1982), Т. 2.
2. N. Ferrara, K. Komici, G. Corbi, et al., *Front Physiol.*, **4**, 396 (2014).
3. I. V. Shemarova, V. P. Nesterov, L. V. Emelyanova, et al., *Front. Bioscience-Scholar*, **13** (2), 105 (2021).
4. G. F. Mitchell, H. Parise, E. J. Benjamin, et al., *Hypertension*, **43**, 1239 (2004).
5. A. Schumann and K. Bär, *PhysioNet*, DOI: 10.13026/2hsy-t491 (2021).
6. Н. Р. Палеев и И. М. Каевицер, *Атлас гемодинамических исследований в клинике внутренних болезней* (Медицина, М., 1975).
7. S. V. Nesterov, *Human Physiol.*, **31** (1), 70 (2005).
8. В. П. Нестеров, А. И. Бурдыгин и С. В. Нестеров, *Физиология человека*, **43** (6), 54 (2017).
9. В. П. Нестеров, А. И. Бурдыгин, К. Б. Иванов и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **31** (6), 433 (2019).
10. *Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use*, *Eur. Heart J.* **17** (3), 354 (1995).
11. J. A. Taylor and D. L. Eckberg, *Circulation*, **93** (8), 1527 (1996).
12. W. N. Wilmer, J. D. Scott, I. B. Wilkinson, et al., *J. Clin. Hyperten.*, **10** (4), 295 (2008).
13. В. П. Нестеров, М. Ф. Баллюзек, А. О. Конради и др., *Успехи геронтологии*, **29** (1), 107 (2016).
14. С. А. Котельников, А. Д. Ноздрачев, М. М. Одинок и др., *Физиология человека*, **28** (1), 130 (2002).
15. J. H. Skotte and J. Kristiansen, *Biomed. Eng. Online*, **13**, 138 (2014).
16. V. P. Nesterov, A. I. Burdygin, K. B. Ivanov, et al., *Adv. Gerontology*, **12** (2), 147 (2022).
17. V. P. Nesterov, A. I. Burdygin, K. B. Ivanov, et al., *Biophysics*, **68** (1), 21 (2023).

Piezopulsometric Analysis of the Functional State of Human Cardiovascular System

V.P. Nesterov*, A.I. Burdygin*, K.B. Ivanov*, K.V. Sobol*, and I.V. Shemarova*

**I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

This paper expounds how to apply in practice the developed computer method of arterial piezopulsometry, with examples, for non-invasive express analysis of the functional state and the nature of autonomic regulation of the cardiovascular system in patients of different ages and health conditions. The participation and role of the contractile component of myocytes of the left ventricle of the heart is assessed as a universal muscle effector, providing both the basic pumping function of the heart and the implementation of the autonomic regulation of heart contraction using peripheral neurohumoral mechanisms that maintain the optimal level of cardiac hemodynamics. This analysis enhances the predictive value of early non-invasive pulsometric diagnostics of the individual functional state and nature of regulation of human cardiovascular system during ontogenesis. This knowledge helps identify the risk of reducing the ability of the cardiovascular system, which has developed during its evolution, to maintain dynamic balance, self-regulation and adaptation to changing environmental conditions, which is associated with a violation of the body's homeostasis.

Keywords: cardiovascular system, ontogenesis, diagnostics, cardiac hemodynamics, neuroendocrine regulation, blood pressure

УДК 612.13; 612.15; 612.17

АНАЛИЗ КОЛЕБАТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ В ОТВЕТ НА ЛОКАЛЬНЫЙ НАГРЕВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА

© 2023 г. И.В. Тихонова*, А.В. Танканаг*, И.Е. Гусева**, А.А. Гриневич*,#

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

**Больница Пушкинского научного центра РАН, Институтская ул., 1, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: grin_aa@mail.ru

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Проведен комплексный спектральный анализ variability сердечного ритма и кожной перфузии конечностей у больных сахарным диабетом 2-го типа в ответ на локальный нагрев и выявление значимых предикторов патофизиологических изменений в сердечно-сосудистой системе. Были измерены электрокардиограмма и кожная перфузия на предплечье и стопе методом лазерной доплеровской флоуметрии в покое и при локальном нагреве у здоровых индивидуумов и больных диабетом. Сигналы лазерной доплеровской флоуметрии и variability сердечного ритма (по электрокардиографическим данным) подвергали вейвлет-анализу. Для оценки значимых предикторов использовали ROC-анализ. У больных по сравнению со здоровыми выявлено: 1) снижение резерва кожного кровотока на стопе при нагреве, 2) уменьшение амплитуд колебаний сердечного ритма в покое и при нагреве, 3) увеличение амплитуд колебаний ЛДФ-сигналов на предплечье в респираторном и кардиоинтервалах в покое и при нагреве, 4) снижение амплитуд колебаний ЛДФ-сигналов на стопе в миогенном интервале в покое и в кардиоинтервале при нагреве. Выявлены параметры сердечно-сосудистой системы (энергии колебаний сердечного ритма в низкочастотном и лазерной доплеровской флоуметрии на предплечье в респираторном интервалах) с высокой дискриминационной мощностью для различия больных и здоровых в ответ на локальный нагрев, которые могут служить маркерами для ранней диагностики микрососудистых нарушений.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа; колебания кожного кровотока; variability сердечного ритма; локальный нагрев, вейвлет-анализ.

DOI: 10.31857/S0006302923060200, EDN: RLUCMI

Известно, что при метаболических нарушениях, приводящих к развитию сахарного диабета 2-го типа (СД2Т), происходят патофизиологические изменения в сердечно-сосудистой системе (ССС), связанные как с кардиомиопатией, атеросклерозом, повреждениями микрососудов, включая микрососуды кожи, так и с диабетической нейропатией [1–3]. Кроме того, следствием хронической гипергликемии является снижение васкуляризации кожи [4]. В результате возникающая ишемия тканей приводит к поражению сосудов и тканей конечностей, преимущественно нижних, обусловленному развитием гнойно-некротиче-

ских осложнений вплоть до диабетической стопы [5].

Реакция ССС на тепловой стресс является важным показателем работы механизмов, регулирующих как сердечную деятельность, так и кожную микроциркуляцию, и играющих ключевую роль в терморегуляции организма [6]. Так, у здорового человека увеличение температуры кожи выше 38°C может приводить к изменению сердечного выброса [7], а реакция кожного кровотока характеризуется ранним кратковременным пиком (быстрое увеличение кровотока), главным образом за счет нейрогенных факторов (рефлекса-аксона), и длительным вторичным подъемом до плато (медленное расширение сосудов), в основном, за счет местных химических факторов (преимущественно NO, а также других сосудорасширяющих агентов) [5, 8]. При развитии сахарного

Сокращения: СД2Т — сахарный диабет 2-го типа, ССС — сердечно-сосудистая система, ВСР — variability сердечного ритма, ЭКГ — электрокардиограмма, ЛДФ — лазерная доплеровская флоуметрия, ПМ — показатель микроциркуляции, РКК — резерв кожного кровотока.

диабета реакция на тепловой стресс меняется. В частности, у людей с диабетом снижается кожная перфузия и реакция потоотделения во время теплового воздействия, что связано с нарушениями регуляторных процессов в ССС [9]. Также показано снижение вазодилатации в ответ на локальный нагрев у диабетических больных [10–12]. Кроме того, механизмы, определяющие терморегуляцию, могут меняться на ранних стадиях метаболических нарушений. Показано, что у лиц с риском развития СД2Т наблюдается измененная терморегуляция стоп по сравнению со здоровыми [13]. К тому же нарушения регуляторных механизмов, во многом, обусловлены нейропатическими осложнениями, вызванными дисфункцией мелких С-волокон. Это может приводить к аномальному расширению сосудов нижних конечностей в ответ на ионофорез нитропруссид натрия или нагрев, а также к аномальной ранней реакции кожного кровотока стоп и значительному снижению амплитуды колебаний температуры кожи стоп в миогенном, нейрогенном и эндотелиальном интервалах в ответ на локальный нагрев [14–16].

Распространенными методами оценки работы регуляторных механизмов в ССС, которые определяют различные колебательные процессы в ней, в норме и при сахарном диабете являются анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) и анализ колебаний скорости кожного кровотока в сочетании с функциональными тестами, включая тепловой [5, 17–19]. Например, локальный нагрев применяется для изучения нейроваскулярной дисфункции кожи при сахарном диабете [5, 12, 20]. В большинстве исследований по оценке функциональных изменений в ССС у больных сахарным диабетом анализировались преимущественно интегральные параметры кожной перфузии, в то время как механизмы регуляции колебаний периферического кровотока в комплексе с анализом ВСР у больных СД2Т в ответ на локальный нагрев исследованы фрагментарно.

Ранее мы выявили изменения спектральных характеристик ВСР и колебаний кожного кровотока при постуральном тесте у пациентов с СД2Т [21]. Мы предполагаем, что комплексный анализ спектров колебаний в ССС при локальном нагреве верхних и нижних конечностей позволит выявить новые параметры, характеризующие наиболее значимые изменения в механизмах регуляции ВСР и колебаний периферического кровотока (кожной перфузии) у пациентов с СД2Т, которые могут быть полезными для развития новых эффективных инструментов диагностики ранних патофизиологических нарушений при развитии данной патологии. Целью исследования был комплексный анализ спектральных характеристик ВСР и колебаний кожной перфузии верхних и нижних конечностей у больных СД2Т в

ответ на локальный нагрев, а также выявление наиболее значимых предикторов, характеризующих основные патофизиологические изменения в ССС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования. В исследовании принимали участие 22 пациента (5 мужчин и 17 женщин, средний возраст 66 ± 2 года, стаж заболевания 10 ± 1 лет), проходивших стационарное обследование и лечение в условиях терапевтического отделения больницы Пущинского научного центра РАН. Диагноз — сахарный диабет 2-го типа — устанавливался согласно критериям Всемирной организации здравоохранения по борьбе с СД2Т на основании клинических показателей (полидипсия, полиурия, сухость/зуд кожи и/или слизистых, изменение веса тела) и лабораторных анализов (диагностические критерии для сахарного диабета: концентрация глюкозы натощак в плазме крови >7.0 ммоль/л или в цельной крови >6.1 ммоль/л, повышение концентрации глюкозы в плазме венозной крови >11.1 ммоль/л при случайном измерении, уровня гликозилированного (гликированного) гемоглобина $HbA_{1c} \geq 6.5\%$) [22]. Пациенты с СД2Т имели сопутствующую гипертоническую болезнь II стадии. Кроме того, у 60% больных была выявлена диабетическая полинейропатия. В исследование не включались больные с острыми заболеваниями и/или тяжелыми обострениями хронических заболеваний (бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, глубокая анемия, кишечные и респираторные инфекции, онкозаболевания, психические/неврологические расстройства), а также беременные женщины и пациенты с изменениями кожи в местах контакта с датчиками приборов. На базе терапевтического стационара все испытуемые проходили комплексное общеклиническое обследование (осмотр, измерение артериального давления, ЭКГ, клинический и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, измерение гликемии). Лечение включало комплекс диетических мер, подбор гипотензивной терапии, пероральные сахароснижающие средства и в 20% случаев дополнительная инсулинотерапия, а также курс альфа-липоевой кислоты.

Параллельно была сформирована группа контроля (условно здоровые добровольцы) из 22 человек (8 мужчин и 14 женщин, средний возраст 53 ± 2 года), у которых на момент исследования не диагностирован диабет и/или гипертоническая болезнь, отсутствовали хронические и острые заболевания. Критериями исключения были курение, прием лекарственных препаратов, а также кофеин- или алкогольсодержащих напитков за 12 ч до измерения.

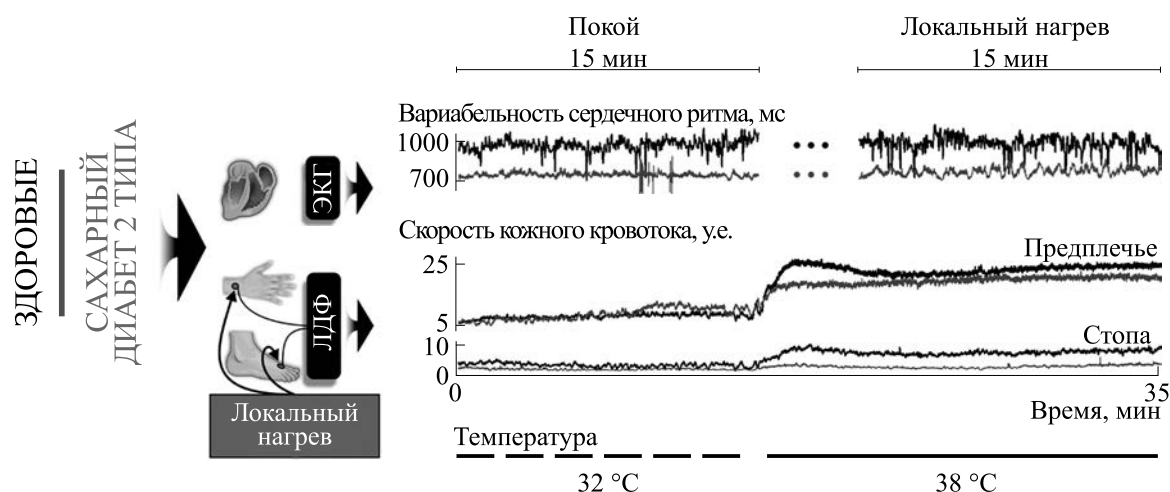


Рис. 1. Дизайн исследования.

Измерения. Измерения проводили при одинаковых условиях: время суток, комнатная температура ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) и период адаптации (15 мин), чтобы избежать возможных отклонений. Артериальное давление и частоту сердечных сокращений измеряли за 10 мин до проведения процедур, как описано ранее [23]. Схема исследования показана на рис. 1. Одновременно для каждого участника в положении лежа регистрировали три сигнала: электрокардиограмму (ЭКГ) и измеренный с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) кожный кровоток с двух участков – наружной поверхности правого предплечья вблизи лучезапястного сустава (ЛДФрк) и тыльной поверхности правой стопы между головками 1-й и 2-й плюсневых костей (ЛДФнг). ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении с помощью аппаратно-программного комплекса «ВНС-Микро» («Нейрософт», Россия) с частотой дискретизации 1000 Гц. Затем сигналы ЭКГ анализировали для определения последовательности RR-интервалов (ритмограммы), которые были подвергнуты повторной равномерной дискретизации с частотой 20 Гц. Кожный кровоток или показатель микроциркуляции (ПМ), характеризующий скорость потока эритроцитов в единицу времени [24], регистрировали с помощью двухканального лазерного доплеровского анализатора ЛАКК-02 («ЛАЗМА», Россия) с частотой дискретизации 20 Гц при длине волны 1.06 мкм и мощности излучения 1.2 мВт). Локальный нагрев осуществляли управляемым нагревателем, состоящим из элемента Пельтье и термистора (датчика температуры). Площадь поверхности нагрева составляла 201 мм², в центре располагался ЛДФ-зонд. Нагрев осуществлялся со скоростью 6°C/мин для сокращения времени переходных процессов и времени регистрации сигналов. Максимальная температура нагрева со-

ставляла 38°C для исключения болевых эффектов из-за быстрого нагревания и для исключения вовлечения мышечного кровотока [8, 25–28]. Для дальнейшего анализа использовали первые (покой) и последние (локальный нагрев) 15 мин каждого записанного сигнала (рис. 1), чтобы исключить быстрый переходный процесс, соответствующий аксон-рефлексу.

Анализ данных. Для каждого испытуемого оценивали интегральные показатели микроциркуляции как усредненные за 15-минутные временные интервалы значения мгновенных ПМ в покое и при локальном нагреве. Резерв кожного кровотока (РКК) оценивали как выраженное в процентах отношение интегрального ПМ, измеренного при локальном нагреве, к интегральному ПМ в покое.

Сигналы ВСР и ЛДФ были подвергнуты спектральному вейвлет-анализу, который широко используется для изучения нестационарных колебаний в ССС [12, 29]. Расчеты выполняли с использованием алгоритма адаптивного вейвлет-преобразования и материнской вейвлет-функции Морле [30]. В качестве интегральных параметров спектрального анализа использовали абсолютные $E_{i,j}$ и нормированные $\hat{E}_{i,j}$ энергии колебаний, которые рассчитывали как

$$E_{i,j} = \int_{f_{i,j,L}}^{f_{i,j,R}} A^2(f) df, \quad (1)$$

$$\hat{E}_{i,j} = \frac{\int_{f_{i,j,L}}^{f_{i,j,R}} A^2(f) df}{\int_{f_L}^{f_R} A^2(f) df}, \quad (2)$$

где $A(f)$ – амплитуда спектральной компоненты на частоте f , $f_{i,j,L}$ и $f_{i,j,R}$ – это левая и правая границы для i -го сигнала j -го частотного интервала со-

Таблица 1. Медианные значения показателей микроциркуляции в покое и при локальном нагреве

	ПМ _{предплечье} , усл. ед.			ПМ _{стопа} , усл. ед.		
	покой	нагрев	РКК, %	покой	нагрев	РКК, %
Контроль (<i>n</i> = 22)	8.1 (5.6÷9.9)	19.1 [#] (14.7÷19.6)	225.8 (187.1÷325.0)	2.8 [^] (2.3÷6.1)	10.0 ^{^#} (6.7÷12.8)	244.8 (196.4÷358.9)
Больные СД2Т (<i>n</i> = 22)	7.9 (5.8÷10.2)	17.3 [#] (14.9÷19.4)	214.4 (181.4÷248.0)	3.0 [^] (2.1÷4.7)	7.0 ^{^#} (5.0÷9.9)	184.0* (169.9÷249.5)

Примечание. Достоверные различия между: * – группами по критерию Манна–Уитни, $p < 0.05$; # – покой и нагрев внутри одной группы по критерию Уилкоксона, $p < 0.001$; ^ – предплечье и стопа внутри одной группы по критерию Манна–Уитни, $p < 0.001$. Данные представлены в виде медиан с 25 и 75 перцентилями.

ответственно, индекс i соответствовал ВСР, ЛДФ_{рк} и ЛДФ_{нг}, а индекс j соответствовал очень низкочастотному (VLF, 0.008–0.04 Гц), низкочастотному (LF, 0.04–0.15 Гц) и высокочастотному (HF, 0.15–0.4 Гц) интервалам для ВСР; эндотелиальному (E, 0.008–0.021 Гц), нейрогенному (N, 0.021–0.056 Гц), миогенному (M, 0.056–0.145 Гц), респираторному (R, 0.145–0.6 Гц) и кардио- (C, 0.6–2 Гц) интервалам для ЛДФ, f_L и f_R – это левая и правая границы анализируемых частотных диапазонов: 0.008–0.4 Гц для ВСР и 0.008–2.0 Гц для ЛДФ.

С помощью ROC-анализа оценивали дискриминационную способность интегральных параметров спектров (предикторов, абсолютных $E_{i,j}$ и нормированных $\hat{E}_{i,j}$ энергий колебаний) различать группы испытуемых между собой. ROC-анализ проводили для линейной комбинации предикторов с помощью обобщенного алгоритма линейной регрессии и логистической модели с биномиальным распределением и последующим выявлением наиболее значимых предикторов, для которых строились ROC-кривые [21].

Все расчеты и статистический анализ были выполнены с использованием программного обеспечения Matlab (MathWorks, США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Оценку параметров логистической модели и наиболее значимых предикторов проводили в программе Matlab с помощью функций fitglm и stepwiseglm соответственно. ROC-кривые строили с помощью функции perfcurve.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физиологические параметры. Между группами участников не было различий в артериальном давлении (систолическом и диастолическом): 129 ± 3 и 77 ± 2 мм рт. ст. у больных и 124 ± 3 и 80 ± 2 мм рт. ст. в контрольной группе. Пациенты с СД2Т по сравнению с добровольцами контрольной группы характеризовались: повышенным ин-

дексом массы тела (32 ± 1 и 26 ± 1 кг/м²), уровнем глюкозы (8.8 ± 0.7 и 5.3 ± 0.1 ммоль/л), HbA1c ($8.0 \pm 0.5\%$ и $5.5 \pm 0.1\%$) и триглицеридов (2.4 ± 0.3 и 1.1 ± 0.1 ммоль/л). Кроме того, возраст добровольцев контрольной группы (53 ± 2 года) отличался от возраста пациентов (66 ± 2 года). Однако в связи с постепенным и слабо выраженным снижением кожного кровотока после ~35–45 лет [31–34] мы предположили, что возрастные различия между группами принципиально не влияли на изменение параметров ССС.

Частота сердечных сокращений и кожная перфузия. Частота сердечных сокращений не различалась между группами в состоянии покоя: 61 ($57 \div 69$) уд/мин в контрольной группе по сравнению с 70 ($59 \div 79$) уд/мин у пациентов. Локальный нагрев не изменил этот параметр: 60 ($57 \div 68$) уд/мин в контрольной группе относительно 69 ($58 \div 78$) уд/мин у пациентов. Данные представлены в виде медиан, 25% и 75%.

Значения ПМ на предплечье и на стопе не отличались между группами в состоянии покоя, а локальный нагрев привел к значительному увеличению обоих этих параметров (табл. 1). ПМ на стопе был ниже как в покое, так и при локальном нагреве в обеих группах по сравнению с соответствующими показателями на предплечье (табл. 1). Также у больных ПМ на стопе при локальном нагреве был значительно ниже соответствующего параметра у здоровых добровольцев. Значения РКК на предплечье достоверно не различались между группами, в то время как данный параметр на стопе был достоверно ниже у пациентов по сравнению с контрольной группой (табл. 1), что указывает на нарушение функции микрососудов стопы при СД2Т.

Спектральные характеристики. Анализ показал достоверные различия спектров ВСР между пациентами и здоровыми участниками. Спектральные компоненты ВСР были ниже в VLF и LF интервалах в диапазоне 0.008–0.15 Гц в покое и в VLF-, LF- и частично в HF-интервалах в диапазо-

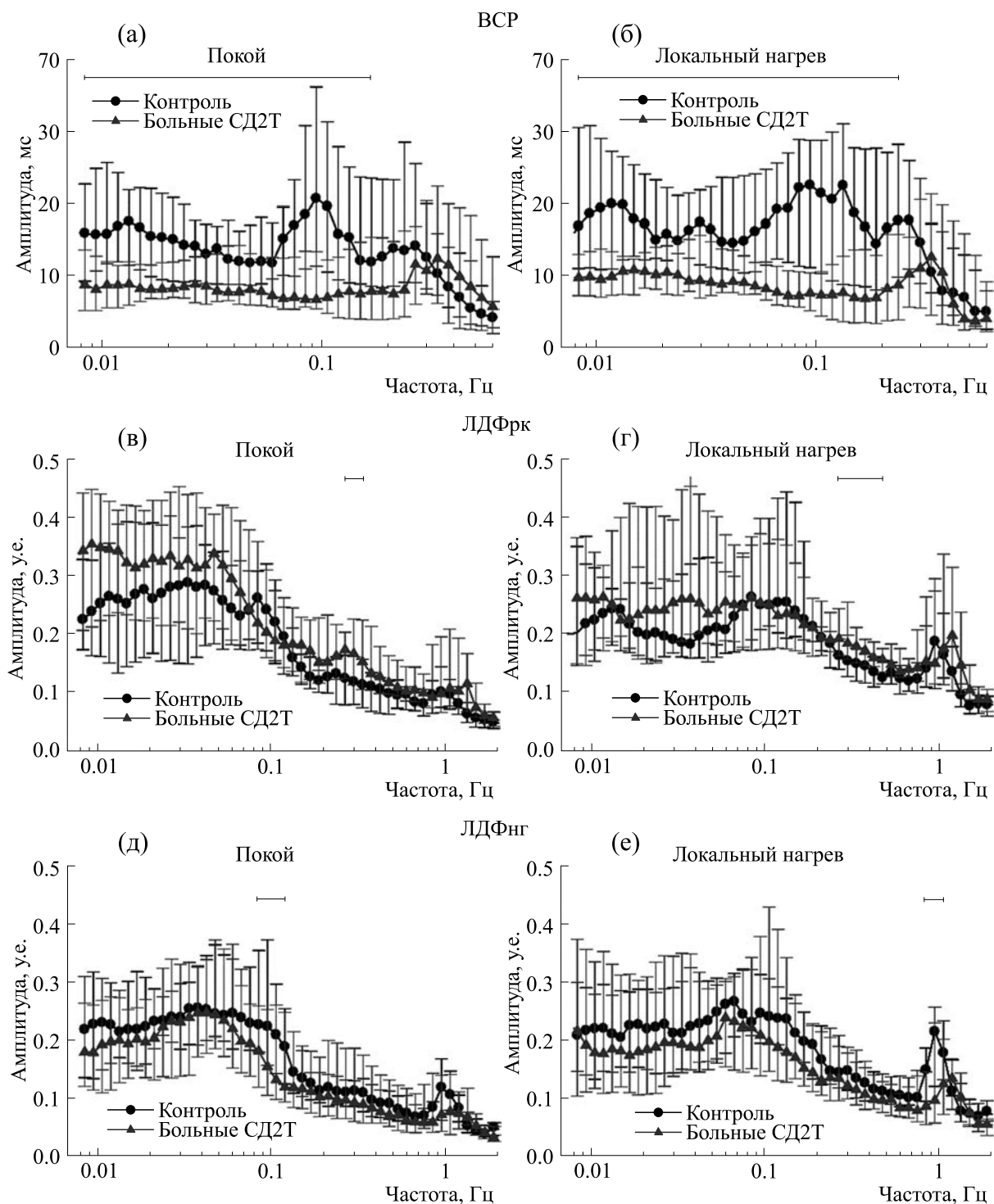


Рис. 2. Спектральные характеристики анализируемых сигналов: (а, б) – вариабельность сердечного ритма (ВСР), колебания кровотока в коже (в, г) – предплечья и (д, е) – стопы в покое и во время локального нагрева, соответственно, у контрольной группы и пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (больные СД2Т). Черными горизонтальными линиями отмечены области достоверных различий между группами по критерию Манна–Уитни, $p < 0.05$. Данные представлены в виде медиан с 25 и 75 процентиллями.

не 0.008–0.24 Гц при локальном нагреве у пациентов по сравнению с контрольной группой (рис. 2а,б, табл. 2).

Спектры колебаний кожного кровотока верхних и нижних конечностей также достоверно различались между группами испытуемых. Амплиту-

Таблица 2. Абсолютные энергии ($E_{i,j}$) колебаний спектральных компонент анализируемых сигналов в покое и при локальном нагреве

	Контроль ($n = 22$)		Больные СД2Т ($n = 22$)	
	Покой	Локальный нагрев	Покой	Локальный нагрев
BCP				
VLF	7.4 3.0÷12.9	8.8 [#] 4.9÷18.4	2.2* 1.4÷5.1	3.3* [#] 2.1÷6.5
LF	25.5 11.5÷71.0	48.3 13.6÷82.0	6.1* 2.7÷17.6	6.9* 3.5÷13.8
HF	41.1 20.5÷136.9	60.2 20.2÷154.5	29.9 10.3÷81.4	31.4 8.0÷73.9
ЛДФрк ($\times 10^{-4}$)				
E	9.8 3.2÷20.6	6.4 4.2÷10.9	14.9 6.0÷21.3	8.2 [#] 3.8÷24.2
N	28.2 10.0÷50.6	13.6 9.6÷36.6	36.3 17.6÷64.4	23.0 16.1÷69.4
M	44.8 25.0÷72.8	60.3 [#] 38.9÷138.0	36.6 26.7÷84.8	66.6 28.3÷106.0
R	53.3 31.8÷83.9	137.0 [#] 94.6÷153.0	94.7* 59.5÷201.0	144.0 110.0÷246.0
C	79.4 48.1 ÷169.0	228.0 [#] 107.0÷372.0	146.0* 92.3÷313.0	413.0* [#] 268.0÷540.0
ЛДФнг ($\times 10^{-4}$)				
E	6.4 3.8÷15.0	5.9 3.3÷9.3	5.1 2.3÷9.0	4.2 1.5÷15.1
N	21.5 13.1÷36.5	18.8 7.1÷30.8	18.3 11.3÷43.5	12.4 7.6÷35.1
M	38.3 20.8÷77.4	49.9 33.8÷76.8	23.9 13.8÷57.7	36.9 [#] 17.8÷150.0
R	47.5 30.0÷69.9	94.7 [#] 57.6÷161.0	33.3 15.9÷112.0	56.4 35.1÷128.0
C	88.6 62.5÷120.0	240.0 [#] 144.0÷318.0	71.0 35.5÷191.0	177 [#] 86.6÷296.0

Примечание. Достоверные различия между: * — группами по критерию Манна–Уитни, $p < 0.05$; # — покой и нагрев внутри одной группы по критерию Уилкоксона, $p < 0.05$. Данные представлены в виде медиан с 25 и 75 перцентилями.

ды или абсолютные энергии колебаний кровотока предплечья были выше в респираторном (R) и кардио- (C) интервалах в покое и при локальном нагреве у пациентов по сравнению с соответствующими параметрами в контрольной группе (рис. 2в,г, табл. 2). На стопе, наоборот, эти параметры были ниже в миогенном (M) интервале в покое и в кардио- (C) интервале при локальном нагреве у пациентов по сравнению с контролем (рис. 2д,е).

Локальный нагрев достоверно изменял абсолютную энергию колебаний в анализируемых сигналах. Так, наблюдалось увеличение абсолютной энергии колебаний BCP в VLF-интервале в обеих группах испытуемых (табл. 2). Для ЛДФрк этот параметр увеличивался в миогенном (M), ре-

спираторном (R) и кардио- (C) интервалах в контроле, снижался в эндотелиальном (E) и увеличивался в кардио- (C) интервалах у пациентов (табл. 2). Для ЛДФнг наблюдалось увеличение этого параметра в респираторном (R) и кардио- (C) интервалах в контроле и в миогенном (M) и кардио- (C) интервалах у пациентов (табл. 2).

Для выявления изменений пропорциональных соотношений между спектральными компонентами, характеризующих спектральный состав анализируемых сигналов, были оценены нормированные энергии колебаний. Сравнение пациентов с контролем показало, что у пациентов наблюдается достоверное снижение этого параметра (табл. 3): 1) для BCP в LF-интервале при локальном нагреве; 2) для ЛДФрк в миогенном

Таблица 3. Нормированные энергии ($\hat{E}_{i,j}$) колебаний спектральных компонент анализируемых сигналов в покое и при локальном нагреве

	Контроль ($n = 22$)		Больные СД2Т ($n = 22$)	
	Покой	Локальный нагрев	Покой	Локальный нагрев
BCP				
VLF	0.9 0.6÷1.3	0.9 0.5÷1.6	0.7 0.3÷1.7	0.9 [#] 0.5÷1.8
LF	3.3 1.8÷5.3	3.0 1.9÷5.2	2.3 1.4÷3.6	2.4* 1.8÷3.3
HF	5.2 4.2÷7.2	5.0 3.7÷7.0	6.8 4.8÷8.1	6.2 5.2÷7.6
ЛДФрк				
E	0.33 0.19÷0.53	0.16 [#] 0.09÷0.20	0.42 0.23÷0.62	0.15 [#] 0.06÷0.23
N	1.08 0.54÷1.60	0.37 [#] 0.22÷0.57	1.03 0.56÷1.70	0.52 [#] 0.17÷0.73
M	1.79 1.07÷2.22	1.77 0.93÷2.36	1.37* 0.75÷1.58	1.08* 0.55÷1.66
R	2.57 1.71÷3.14	2.66 2.14÷3.45	2.65 1.82÷3.44	2.54 2.14÷3.30
C	3.64 3.09÷5.11	5.16 [#] 3.85÷5.91	3.79 3.10÷4.83	5.65 [#] 4.39÷6.56
ЛДФнг				
E	0.34 0.15÷0.49	0.11 [#] 0.07÷0.27	0.19 0.10÷0.54	0.16 0.09÷0.21
N	0.95 0.54÷1.72	0.36 [#] 0.20÷0.73	0.80 0.54÷1.72	0.58 [#] 0.31÷0.92
M	1.82 1.20÷2.63	1.38 0.77÷2.21	1.35* 1.04÷1.60	1.27 0.87÷2.09
R	1.98 1.26÷2.69	2.40 1.83÷3.30	2.06 1.08÷4.20	2.45 1.65÷3.04
C	4.29 2.49÷5.04	5.43 [#] 3.51÷6.32	3.77 2.90÷6.37	5.10 3.89÷6.40

Примечание. Достоверные различия между: * — группами по критерию Манна–Уитни, $p < 0.05$; # — покой и нагрев внутри одной группы по критерию Уилкоксона, $p < 0.05$. Данные представлены в виде медиан с 25 и 75 перцентилями.

(М) интервале в покое и при нагреве; 3) для ЛДФнг в миогенном (М) интервале в покое. Локальный нагрев достоверно изменял соотношения между спектральными компонентами анализируемых сигналов внутри групп по сравнению с покоем следующим образом (табл. 3): 1) для ВСП увеличивал энергию колебаний в VLF-интервале у пациентов; 2) для ЛДФрк снижал энергию колебаний в эндотелиальном (Е) и нейрогенном (N) и увеличивал ее в кардио- (С) интервалах у обеих групп испытуемых; 3) для ЛДФнг у здоровых участников снижал энергию колебаний в эндотелиальном (Е) и нейрогенном (N) и увеличивал ее в кардио- (С) интервалах, а у пациентов снижал этот параметр в нейрогенном (N) интервале.

ROC-анализ. ROC-анализ позволил выявить наиболее значимые предикторы, различающие контрольную группу и пациентов с СД2Т в покое и при локальном нагреве (рис. 3). Показано, что наибольшей дискриминационной мощностью, характеризуемой площадью под ROC-кривыми (AUC), обладают абсолютная энергия колебаний кожного кровотока на предплечье в кардио- (С) интервале $E_{\text{ЛДФрк,С}}$ и нормированная энергия колебаний ВСП в LF-интервале $\hat{E}_{\text{BCP, LF}}$ в покое ($\text{AUC} \geq 0.66$, рис. 3а). Локальный нагрев усилил дискриминационную мощность ($\text{AUC} \geq 0.69$) и изменил предикторы, связанные с абсолютными энергиями колебаний, но не повлиял на предикторы, связанные с нормированными энергиями

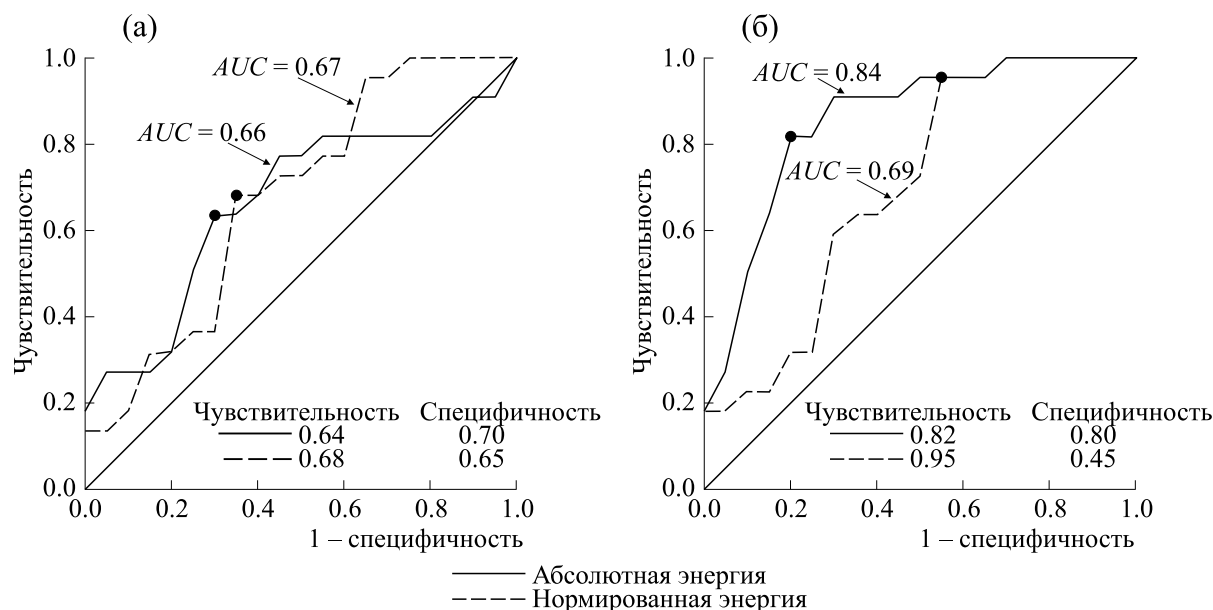


Рис. 3. ROC-кривые для $E_{\text{ЛДФРК,С}}$ и следующих наиболее значимых предикторов, различающих контрольную группу и пациентов с СД2Т: (а) – в покое – (сплошная линия) и $\hat{E}_{\text{ВСР, LF}}$ (пунктирная линия); (б) – при локальном нагреве – линейная комбинация $E_{\text{ВСР, VLF}}$, $E_{\text{ВСР, LF}}$, $E_{\text{ЛДФРК, R}}$ (сплошная линия) и $\hat{E}_{\text{ВСР, LF}}$ (пунктирная линия); AUC – площадь под кривой.

колебаний (рис. 3б). При локальном нагреве наиболее значимыми предикторами были $E_{\text{ВСР, VLF}}$, $E_{\text{ВСР, LF}}$, $E_{\text{ЛДФРК, R}}$ и $\hat{E}_{\text{ВСР, LF}}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы показали изменение спектральных параметров колебательных процессов в ССС при системном воздействии (постуральный тест) у больных СД2Т по сравнению с контрольной группой [21]. В настоящей работе мы исследовали изменение спектральных характеристик колебаний в ССС при локальном воздействии (локальный нагрев верхних и нижних конечностей) у пациентов с СД2Т.

Были выявлены следующие изменения у пациентов по сравнению с контролем: 1) сниженный РКК на стопе; 2) сниженная амплитуда/энергия колебаний ВСР в VLF-, LF- и HF-интервалах в покое и при локальном нагреве, при этом нагрев изменял структуру спектра ВСР, увеличивая относительный вклад колебаний в VLF-интервале; 3) увеличенная амплитуда/энергия колебаний кожного кровотока на предплечье в респираторном и кардиоинтервалах в покое и при нагреве; 4) сниженная амплитуда колебаний кожного кровотока на стопе в миогенном интервале в покое и в кардиоинтервале при локальном нагреве. При этом последний воздействовал на структуру спектра ЛДФнг отличным от контроля образом. Были выявлены наиболее значимые предик-

торы, различающие контрольную группу и пациентов с СД2Т в покое и при локальном нагреве, которые связаны с энергией колебаний в низкочастотном диапазоне для ВСР и в высокочастотном диапазоне для кожного кровотока предплечья.

Снижение РКК у пациентов по сравнению с контрольной группой указывает на нарушение перфузии крови на нижних конечностях при СД2Т. Это может быть связано с тем, что повышенный уровень глюкозы в крови при СД2Т приводит к повреждению сосудов, в первую очередь дистальных отделов нижних конечностей, и, таким образом, к ухудшению кровоснабжения тканей. Снижение реакции перфузии кожи на локальное нагревание на тыльной стороне стопы у пациентов с СД2Т также было показано в работах других авторов [12, 35]. Однако есть исследования, где наблюдались также низкая кожная перфузия крови в покое, но высокая гиперемическая реакция на тепловую стимуляцию на подошвенной стороне большого пальца правой стопы у пациентов с СД1Т [36]. Различия в результатах могут быть связаны как с различными типами диабета, так и с различными участками измерения на коже. Например, подошвенная сторона стопы содержит большее количество артериовенозных анастомозов чем тыльная и, следовательно, имеет другую регуляцию кожного кровотока [8].

Ранее мы продемонстрировали снижение спектральных компонентов ВСР в LF- и HF-интервалах в покое и во время постурального воз-

действия при СД2Т [21]. Здесь мы получили те же результаты как в покое, так и в ответ на локальный нагрев, которые согласуются с другими исследованиями и указывают на нарушение симпатической и парасимпатической регуляции ВСР из-за негативного влияния высокого уровня глюкозы в крови [37–39]. При этом локальный нагрев изменял структуру спектра ВСР у пациентов, увеличивая вклад колебаний в VLF интервале, в отличие от контроля, где структура спектра не менялась. Это может свидетельствовать о том, что у больных СД2Т снижен резерв кожного кровотока для локальной терморегуляции и задействуются системные регуляторные механизмы [9].

Наше исследование показало более высокие респираторные и кардиоколебания кожного кровотока предплечья и более низкие миогенные колебания кожного кровотока стопы в покое у пациентов по сравнению с контрольной группой. Это согласуется с другими данными, касающимися более низкой спектральной плотности миогенного компонента у пациентов с гипергликемией и указывающими на серьезное нарушение активности гладкомышечных клеток при гипергликемии [40]. При нагревании различия амплитуд колебаний кожного кровотока между пациентами и контролем на предплечье сохранялись, а на стопе нет. Различия в миогенном интервале исчезали, тогда как в кардио-интервале появлялись и характеризовались сниженной амплитудой колебаний у пациентов по сравнению с контрольной группой. Другие авторы показали аналогичные изменения спектральной энергии на частоте 1 Гц во время локального теплового теста [12]. Это может быть связано с тем, что нагрев индуцирует вазодилатацию и, следовательно, увеличивает скорость кожного кровотока, что приводит к увеличению кардио-колебаний у здоровых людей. Однако у больных СД2Т локальный нагрев не влиял на спектральные параметры стопы из-за снижения резервов и скорости кожного кровотока.

Структура спектров колебаний кожного кровотока конечностей также менялась при локальном нагреве. На предплечье у пациентов эти изменения были аналогичны контрольной группе, характеризующейся снижением вклада локальных (эндотелиальный, нейрогенный) и увеличением вклада центральных (кардио-) регуляторных механизмов. Однако на стопе у больных СД2Т структура спектра колебаний кожного кровотока менялась иным образом, нежели в контроле, где изменения были аналогичны изменениям на предплечье. У пациентов локальный нагрев приводил к снижению вклада только нейрогенного компонента, что свидетельствует о нарушении вазомоторных функций микрососудистого русла нижних конечностей.

ROC-анализ показал, что максимально эффективными предикторами с высокой дискриминационной мощностью ($AUC \geq 0.69$) являются энергия колебаний ВСР и кожного кровотока в низкочастотном и респираторном диапазонах при локальном нагреве. Однако эти параметры оказались менее эффективными предикторами, чем значения флуоресценции кожи, уровень перфузии крови, скорость эритроцитов, РКК и площадь между кривыми кумулятивных сумм в ответ на локальный нагрев, выявленные другими авторами и позволяющие различать пациентов с СД2Т и контрольную группу [35, 41]. Несмотря на это, спектральные компоненты, характеризующие колебательные процессы, связанные с регуляторными механизмами в ССС, могут быть хорошими маркерами для выявления патологических микрососудистых изменений при СД2Т, и вместе с другими параметрами повышать чувствительность и специфичность тестов, использующих локальный нагрев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен комплексный анализ спектральных характеристик физиологических сигналов (ВСР, ЛДФ), отражающих работу регуляторных механизмов в ССС, в покое и при локальном нагреве верхних и нижних конечностей у больных СД2Т и у условно здоровых добровольцев. Показано, что спектральные компоненты и структура спектров у больных отличаются от аналогичных параметров в контрольной группе, а локальный нагрев меняет их отличным от контроля образом. Результаты свидетельствуют о нарушенной терморегуляции, а также изменениях в локальной и системной регуляции микрогемодинамики кожи конечностей у больных. Выявлены параметры, обладающие высокой дискриминационной мощностью для различия больных СД2Т и здоровых добровольцев при локальном нагреве, которые могут быть хорошими маркерами для обнаружения патологических микрососудистых изменений при развитии сахарного диабета на ранних стадиях с использованием неинвазивных тестов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят всех участников исследования (здоровых добровольцев и пациентов).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00215).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и протоколом локального этического комитета Больницы Пушкинского научного центра РАН № 2 от 10.04.2014. Все испытуемые давали добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. De Rosa, B. Arcidiacono, E. Chieffari, et al., *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 2 (2018).
2. I. Eleftheriadou, A. Tentolouris, P. Grigoropoulou, et al., *J. Diabetes Complications*, **33** (2), 165 (2019).
3. I. V. Tikhonova, A. A. Grinevich, A. V. Tankanag, et al., *Biophysics (Oxford)*, **67** (4), 647 (2022).
4. A. Adamska, A. Araszkiwicz, S. Pilacinski, et al., *Microvasc. Res.*, **121**, 46 (2019).
5. J. L. Cracowski and M. Roustit, *Compr. Physiol.*, **10** (3), 1105 (2020).
6. A. A. Romanovsky, *Handbook Clin. Neurol.*, **156**, 3 (2018).
7. T. H. Chou and E. F. Coyle, *Temperature (Austin)*, **10** (3), 326 (2023).
8. J. M. Johnson, C. T. Minson and D. L. Kellogg, Jr., *Compr. Physiol.*, **4** (1), 33 (2014).
9. G. P. Kenny, R. J. Sigal and R. McGinn, *Temperature (Austin)*, **3** (1), 119 (2016).
10. D. D. Sandeman, C. A. Pym, E. M. Green, et al., *Brit. Med. J.*, **302** (6785), 1122 (1991).
11. F. Khan, T. A. Elhadd, S. A. Greene, et al., *Diabetes Care*, **23** (2), 215 (2000).
12. I. Mizeva, E. Zharkikh, V. Dremin, et al., *Microvasc. Res.*, **120**, 13 (2018).
13. J. Francisco and C. Renero, *Med. Hypotheses*, **176**, 111086 (2023).
14. A. Caselli, L. Uccioli, L. Khaodhiar, et al., *Microvasc. Res.*, **66** (2), 134 (2003).
15. P. R. Vas, A. Q. Green, and G. Rayman, *Diabetologia*, **55** (3), 795 (2012).
16. A. Parshakov, N. Zubareva, S. Podtaev, et al., *Adv. Skin Wound Care*, **30** (4), 158 (2017).
17. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology., *Circulation*, **93** (5), 1043 (1996).
18. J. E. Ortiz-Guzman, S. Molla-Casanova, O. J. Arias-Mutis, et al., *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, **10** (5), (2023).
19. Y. K. Jan, *Diagnostics (Basel)*, **12** (3), (2022).
20. S. Smith, P. Normahani, T. Lane, et al., *Life (Basel)*, **12** (8), (2022).
21. I. V. Tikhonova, A. V. Tankanag, I. E. Guseva, et al., *Biomed. Signal Processing and Control*, **79**, 104222 (2023).
22. World Health Organization, <https://www.who.int/health-topics/diabetes> (дата обращения 28.08.2023).
23. I. V. Tikhonova, A. A. Grinevich, I. E. Guseva, et al., *Microcirculation*, **28** (1), e12655 (2021).
24. P. A. Oberg, T. Tenland and G. E. Nilsson, *Acta Med. Scand. Suppl.*, **687**, 17 (1984).
25. A. W. Guy, J. F. Lehmann, and J. B. Stonebridge, *Proc. IEEE*, **62** (1), 55 (1974).
26. J. M. Johnson, G. L. Brengelmann, and L. B. Rowell, *J. Appl. Physiol.*, **41** (6), 826 (1976).
27. D. M. Keller, M. Sander, B. Stallknecht, et al., *J. Physiol.*, **588** (Pt 19), 3799 (2010).
28. I. Heinonen, R. M. Brothers, J. Kemppainen, et al., *J. Appl. Physiol.*, **111** (3), 818 (2011).
29. A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **46** (10), 1230 (1999).
30. A. Tankanag and N. Chemeris, *Phys. Med. Biol.*, **53** (21), 5967 (2008).
31. L. Li, S. Mac-Mary, J. M. Sainthillier, et al., *Gerontology*, **52** (3), 142 (2006).
32. I. V. Tikhonova, A. V. Tankanag, and N. K. Chemeris, *Skin Res. Technol.*, **19** (1), e174 (2013).
33. K. Jin, *Aging Dis.*, **10** (3), 676 (2019).
34. C. Aliani, E. Rossi, P. Francia, et al., *Physiol. Meas.*, **42** (12), (2021).
35. A. I. Zhherebtsova, V. V. Dremin, I. N. Makovik, et al., *Front. Physiol.*, **10**, 416 (2019).
36. M. Sorelli, P. Francia, L. Bocchi, et al., *Microvasc. Res.*, **124**, 91 (2019).
37. A. Gottsater, A. R. Ahlgren, S. Taimour, et al., *Clin. Auton Res.*, **16** (3), 228 (2006).
38. S. C. de Moura-Tonello, A. Porta, A. Marchi, et al., *PLoS One*, **11** (3), e0148903 (2016).
39. T. Benichou, B. Pereira, M. Mermillod, et al., *PLoS One*, **13** (4), e0195166 (2018).
40. T. Mastantuono, M. Di Maro, M. Chiurazzi, et al., *Transl. Med. UniSa.*, **15**, 1 (2016).
41. I. Kozlov, E. Zhherebtsov, G. Masalygina, et al., *Diagnostics (Basel)*, **11** (2), 267 (2021).

Analysis of Oscillatory Processes in the Cardiovascular System in Response to Local Heating in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

I.V. Tikhonova*, A.V. Tankanag*, I.E. Guseva, and A.A. Grinevich***

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

***Hospital of Pushchino Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 1, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

A comprehensive spectral analysis was used to assess heart rate variability and skin perfusion pattern of limbs in patients with type 2 diabetes mellitus in response to local heating and to identify significant predictors of physiological and pathological changes in the cardiovascular system. An electrocardiogram and skin perfusion on the forearm and foot were measured using Laser Doppler flowmetry at rest and during local heating in both healthy volunteers and patients with type 2 diabetes. The wavelet analysis was applied to Laser Doppler signals and heart rate variability (based on electrocardiogram signals). ROC analysis was used to evaluate significant predictors. The analysis results of patients with type 2 diabetes were compared with healthy controls. The following changes were observed in patients 1) impairment of skin blood flow reserve on the foot during heating, 2) lower amplitude oscillations in heart rate at rest and during heating, 3) an increase in amplitude of oscillations in the skin blood flow from the forearm in intervals related to respiration and heart activity at rest and during heating, 4) a decrease in amplitude of oscillations in the skin blood flow on the foot in the interval related to myogenic activity at rest and in cardio-interval during heating. The parameters of cardiovascular system (energies of heart rate variability at low-frequencies recorded by laser Doppler flowmetry on forearm in intervals related to respiration activity) with high discriminative power were revealed to distinguish patients from healthy subjects in response to local heating; these parameters can be used as markers for early diagnosis of microvascular disorders.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; skin blood flow oscillations; heart rate variability; local heating, wavelet analysis

ДИСКУССИИ

УДК 577.353

К ВОПРОСУ О ПУТИ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ ТИТИНА

© 2023 г. Л.Г. Бобылёва*, Т.А. Урюпина*, М.А. Тимченко*, С.Н. Удальцов**,
И.М. Вихлянецв*, ***, А.Г. Бобылёв*,#

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

#E-mail: bobylev1982@gmail.com

***Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения – обособленное подразделение ФИЦ
«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 2, Пущино Московской области, 142290, Россия*

****Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета,
Казань, 420012, Россия*

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 16.11.2023 г.

Процесс амилоидной агрегации достаточно сложный и малоизученный. В данной работе, обобщив полученные ранее результаты по агрегации мультидоменного гладкомышечного белка титина, мы постарались дополнить представление о его амилоидной агрегации, представив новый, на наш взгляд, возможный механизм. Основной вывод заключается в том, что способность титина формировать аморфные агрегаты представляется единственно возможным путем агрегации этого белка. В образовании амилоидной структуры у аморфных агрегатов гладкомышечного титина участвуют, по всей видимости, лишь отдельные участки молекул, а не весь белок. Эта особенность, учитывая большие размеры молекулы белка, отличает титин от остальных амилоидных или амилоидо-подобных белков. Обсуждается возможный энергетический ландшафт, лежащий в основе образования амилоидных агрегатов титина.

Ключевые слова: титин, агрегация, олигомеры, амилоидные агрегаты, аморфные агрегаты, энергетический ландшафт

DOI: 10.31857/S0006302923060212, EDN: PSSSND

Амилоидная агрегация — это частный случай агрегации белков. Известно, что основное свойство всех амилоидных агрегатов — это наличие преобладающей четвертичной кросс- β -структуры, с отдельными слоями, ориентированными параллельно главной оси роста фибрилл (рис. 1а) [1–5]. Именно особенностью структуры определяются свойства амилоидных фибрилл, такие как высокая прочность, устойчивость к ферментативному расщеплению и низкая растворимость в большинстве растворителей. Наличие кросс- β -структуры определяется методом рентгеновской дифракции (рис 1).

Наличие общих свойств, характерных для всех амилоидов, вместе с доказательством того, что амилоидные фибриллы могут быть образованы из разных полипептидных последовательностей, привели к предположению, что амилоидные фибриллы представляют собой общую широкую группу белков и пептидов, имеющих определенную, характерную только для них структуру. Это

противоречит представлению о том, что нативная структура белка напрямую зависит от его аминокислотной последовательности. Таким образом, возникает вопрос о природе взаимодействий, которые стабилизируют амилоидные фибриллы. Экспериментально было показано, что наиболее важными параметрами, определяющими внутреннюю механическую прочность амилоидных фибрилл, являются межмолекулярные силы между β -листами и β -стрендами [6]. В то же время теоретическая работа [7] показала, что ключевым моментом для механических свойств амилоидных фибрилл является сильное упорядочение водородных связей между β -стрендами, при котором данные водородные связи действуют как химический клей, в результате чего увеличивается механическая прочность фибрилл. Действительно, измерение механических свойств отдельных структур, формирующихся в процессе образования фибрилл, таких как олигомеры, протофибриллы и зрелые фибриллы, выявило как для α -си-

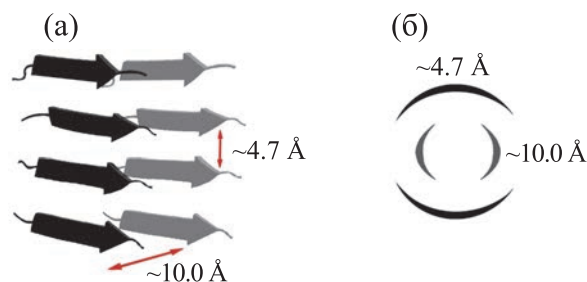


Рис. 1. Схематические изображения амилоидной кросс- β -структуры (а) и картина дифракции рентгеновских лучей на типичных амилоидных фибриллах (б). Рефлексы, расположенные по вертикали (меридиональное направление), соответствуют периодическим структурам с характерным размером 4.7–4.8 Å, т.е. участкам β -структуры, расположенным перпендикулярно оси фибриллы на расстоянии 4.7–4.8 Å друг от друга. Рефлексы, расположенные по горизонтали дифракционной картины (экваториальное направление), соответствуют периодическим структурам с характерным размером 10–11 Å, т.е. β -листам, расположенным на расстоянии 10–11 Å друг от друга [4, 5].

нуклеина, вовлеченного в патогенез болезни Паркинсона, так и для пептида $A\beta(1-42)$, вовлеченного в патогенез болезни Альцгеймера, постепенное увеличение модуля Юнга по мере того, как увеличивается содержание β -складчатой структуры [8].

Известно, что помимо амилоидных фибрилл белки могут образовывать другие типы агрегатов, например, растворимые олигомеры и аморфные агрегаты. Аморфные агрегаты обычно образуются за более короткие промежутки времени, чем фибриллы. Для их образования не требуется какой-то особой укладки (конформации) белковой молекулы. Многие белки с неупорядоченной структурой, а также частично развернутые белки формируют аморфные агрегаты. Для образования упорядоченных фибрилл, напротив, необходимы особые условия (определенные значения pH, определенный денатурант, разные значения ионной силы, температуры, времени инкубации), способствующие формированию специфической укладки в амилоидную структуру. Данная специфическая укладка может появляться уже на стадии формирования растворимых олигомеров [9].

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВ

Способность белков сворачиваться *de novo* в свои функциональные состояния — одно из наиболее фундаментальных свойств полипептидов в природе. С момента появления первых работ, описывающих процесс сворачивания белков [10], были проведены многочисленные исследования процесса сворачивания белков и получены важные данные о механизмах данного процесса, включая структурный, кинетический и термодинамический анализ промежуточных и переходных состояний. Эти данные были получены с помощью разных подходов — экспериментального, теоретического, а также математического моде-

лирования [11]. В настоящее время процесс превращения полностью развернутого полипептида в нативную структуру белка или в какие-то другие состояния, включая амилоидные структуры, принято иллюстрировать движением по условному двумерному энергетическому ландшафту (рис. 2). Структура этого ландшафта уникальна для каждой полипептидной последовательности, зависит от условий среды и определяется как термодинамическими, так и кинетическими свойствами сворачивающейся полипептидной цепи.

Исторически сворачивание белка рассматривалось как серия последовательных шагов между более близких к нативному белку формами, до момента формирования окончательной нативной структуры. Основываясь на понимании того, что развернутое и частично свернутое состояния конформационно неоднородны и что не существует единого пути к нативному состоянию, модели сворачивания теперь превратились в ландшафтный взгляд на сворачивание белка [12], в котором развернутое состояние — полипептидная цепь — ищет нативную конформацию на чаще всего неровной энергетической поверхности или «ландшафте» до тех пор, пока не сформируется уникальная нативная структура. Предполагается, что нативные взаимодействия между аминокислотными остатками более стабильны, чем ненативные контакты, и по мере формирования более стабильных нативных контактов количество доступных конформаций уменьшается, перемещая полипептидную цепь в сторону нативной структуры.

Небольшие однодоменные белки (например, <100 аминокислот в длину), как правило, сворачивающиеся в нативное состояние за доли секунды, были в центре внимания многих экспериментальных и теоретических исследований сворачивания белков [15]. Ландшафт сворачивания этих белков обычно не имеет сильных неровностей, в результате чего во время реакции сворачивания

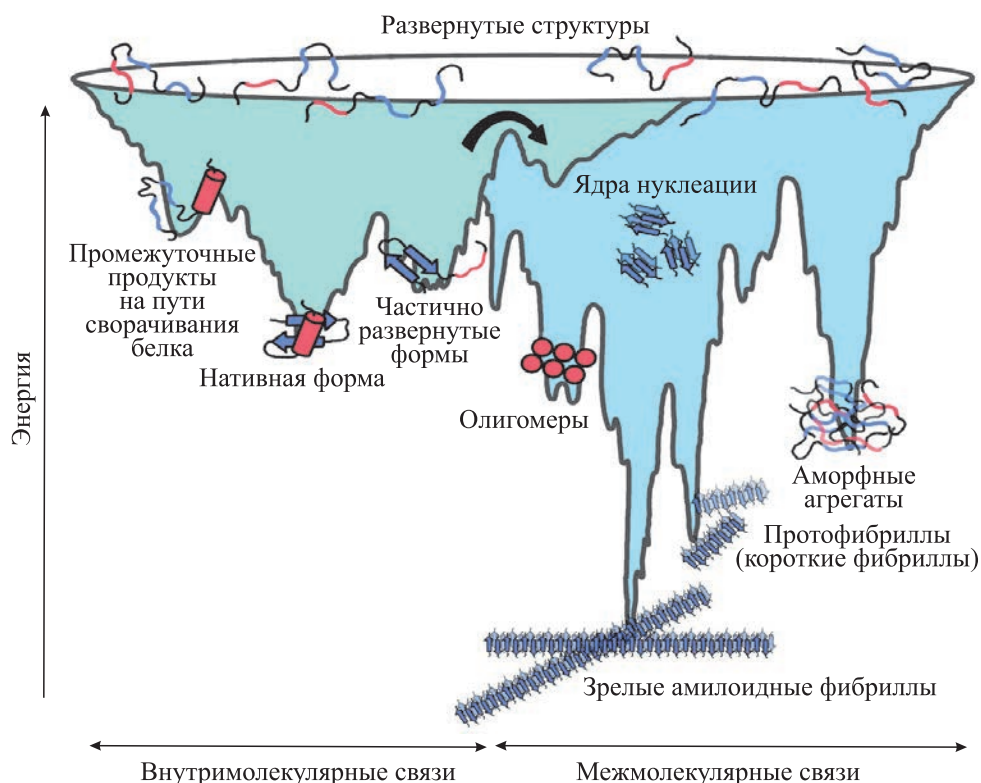


Рис. 2. Условный двумерный энергетический ландшафт сворачивания (фолдинга) и агрегации белка. Показаны возможные, уже известные промежуточные состояния на пути к нативному состоянию белка, а также на пути к образованию амилоидных фибрилл [11, 13]. Черной стрелкой показан энергетический барьер, который должны преодолеть структуры белка перед тем, как начнут формироваться агрегаты (для глобулярных белков это может произойти под действием высоких температур, низких значений pH, добавления денатуранта). Воспроизведено из работы [14].

стабильно присутствуют только ансамбль развернутых структур и нативный белок (механизм двух состояний) [16].

Белки длиной более 100 аминокислотных остатков складываются на гораздо более шероховатой энергетической поверхности, на которой обычно находятся промежуточные продукты сворачивания на пути к нативному состоянию. Причина этого, по-видимому, заключается в том, что из-за гидрофобного эффекта в водном растворе более крупные полипептидные цепи имеют высокую склонность к образованию компактных состояний, которые могут содержать значительное количество элементов нативной структуры. Реорганизация контактов между аминокислотными остатками (включая как нативные, так и ненативные взаимодействия) в этих компактных состояниях может включать высокий барьер свободной энергии, что приводит к переходному появлению частично свернутых или «промежуточных» состояний (рис. 2). В больших мультидоменных белках происходит параллельное сворачивание различных областей, а в заключи-

тельный этап сворачивания формируются все нативные внутри и межмолекулярные контакты, которые определяют окончательную функциональную форму [17], возможно, отображая последовательные события сворачивания белка на рибосоме *in vivo* [18].

Частично свернутые состояния на этом ландшафте могут быть по своей природе склонны к агрегации, а межмолекулярные контакты могут привести к их ассоциации/агрегации [10, 11]. Механизмы, лежащие в основе этих специфических событий агрегации, в последние годы вызвали сильный интерес в сообществе специалистов по сворачиванию белков. Фокус внимания исследователей сместился на центральную проблему, связанную с агрегацией, для того чтобы лучше понимать механизмы развития амилоидозов и образования функциональных амилоидных агрегатов в клетках. При этом амилоидозы являются наиболее часто исследуемым нарушением белковой агрегации.

Амилоидные фибриллы образуются зависимым от нуклеации способом, при котором моно-

мерная форма белка переходит в фибриллярную форму через формирование временной структуры — ядра нуклеации [13, 19]. Также известно, что в случае глобулярных белков, фибриллы обычно образуются в условиях, в которых нативное состояние дестабилизировано (добавлением денатурирующего агента, низким pH, высокой температурой или заменами аминокислот) [20]. Все эти условия, необходимые для перехода в агрегированную форму, указаны на энергетическом ландшафте (рис. 2) как барьер, для перехода которого нужна энергия.

Здесь следует отметить, что большинство исследований путей агрегации белков проводились в основном на белках с относительно небольшой молекулярной массой. В случае с гигантскими полипептидами, способными формировать амилоидные или амилоидо-подобные агрегаты, исследований практически нет. Одним из таких белков является титин, различные изоформы которого имеют молекулярные массы от 500 кДа до 3800 кДа [21–23]. Далее речь пойдет именно об этом белке, агрегация которого нами была достаточно подробно изучена.

ОСОБЕННОСТИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ТИТИНА

В наших предыдущих исследованиях мы показали, что различные изоформы гладкомышечного титина формируют аморфные агрегаты, которые имеют амилоидную природу [24–27]. Амилоидная природа аморфных агрегатов гладкомышечного титина была подтверждена с помощью красителей тирофлавина Т и Конго красного, а также методом рентгеновской дифракции, выявившей наличие специфической для всех амилоидных агрегатов четвертичной кросс-β-структуры. Этот результат расходится с общепринятой научной точкой зрения, заключающейся в том, что амилоидными могут быть только высокоупорядоченные фибриллы. Тем не менее, в литературе описаны другие белки, аморфные агрегаты которых также проявляют амилоидные свойства [28–30]. В указанных работах исследуемые белки могли формировать как аморфные агрегаты, так и фибриллы в зависимости от условий. Однако гладкомышечный титин по нашим данным способен формировать только аморфные агрегаты. В литературе также существуют исследования, проведенные для Ig-подобного домена I27 титина, в которых показано, что данный домен тоже формирует амилоидные аморфные агрегаты [31]. При этом, как утверждают авторы цитируемой работы, агрегаты данного домена титина остаются аморфными в течение длительного времени и не проявляют никаких признаков перестройки в зрелые фибриллы даже

через четыре месяца инкубации в растворе, содержащем 28% трифторэтанола [31].

Обнаруженная особенность к формированию стабильных амилоидных аморфных агрегатов, формируемых как из одного Ig-подобного домена I27 титина [31], так и из целых его молекул [24–27], поднимает вопрос об изменениях, происходящих на структурном уровне при агрегации этого белка. Мы показали, что при формировании амилоидных агрегатов гладкомышечного титина не происходит изменений во вторичной структуре [25, 27], в то время как для большинства исследуемых белков при формировании амилоидных агрегатов наблюдается увеличение процента содержания β-структуры [34]. Формирование межмолекулярных связей между молекулами гладкомышечного титина, по нашему предположению, происходит за счет частичного раскрытия доменов белка и последующего взаимодействия между аминокислотными цепями открытых участков доменов разных молекул. Это предположение основывается на данных, в которых описывается частичное раскрытие отдельных доменов титина [35, 36], причем это раскрытие происходит при низких затратах энергии [36]. Кроме того, проведенные нами ранее исследования показали, что среди аморфных агрегатов гладкомышечного титина встречаются отдельные нити, которые по параметрам являются молекулами этого белка [27]. Это может свидетельствовать о том, что при агрегации гладкомышечного титина часть молекулы белка остается стабильной, а часть участвует в формировании межмолекулярной связи по типу амилоидной. Косвенно на это указывает наличие способности к обратимой агрегации гладкомышечного титина [25, 27], отсутствие увеличения содержания во вторичной структуре β-складчатости [25, 27], а также выявленная методом дифференциально-сканирующей калориметрии относительно низкая стабильность амилоидных агрегатов титина, не сильно отличающаяся от таковой у неагрегированной формы этого белка [27].

Принимая во внимание данные о возможном частичном раскрытии отдельных доменов титина, а также наши данные об олигомеризации отдельных молекул гладкомышечного титина в растворе с высокой ионной силой (более 0.6, см. рис. 3а), формирование водородной связи между этими открытыми участками теоретически возможно, как это показано схематически на рис. 3б. При изменении условий, в частности, при снижении ионной силы, данный процесс ускоряется. Таким образом, агрегация титина может происходить очень быстро, поскольку уже присутствуют олигомеры этого белка, которые, как известно, дополнительно ускоряют процесс агрегации [37]. Учитывая наши данные, можно заключить, что титин является уникальным объектом, кото-

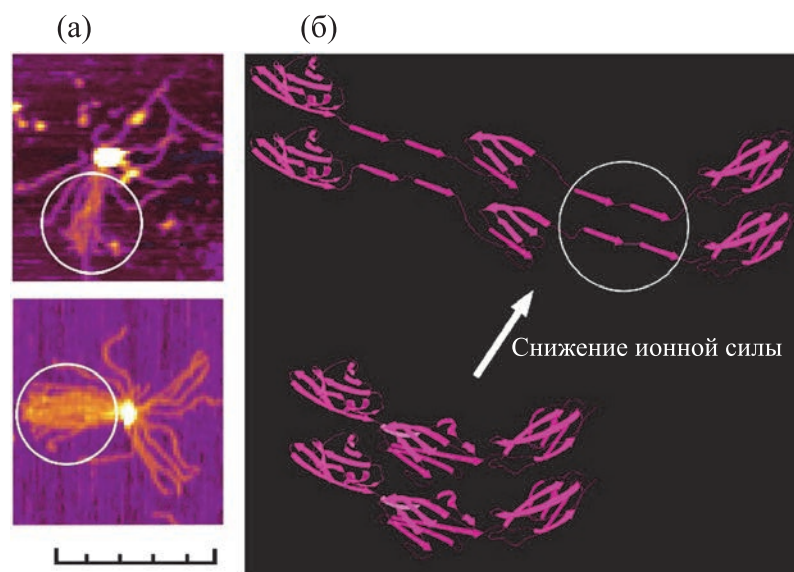


Рис. 3. (а) — Атомно-силовая микроскопия олигомера гладкомышечного титина в растворе с высокой ионной силой (более 0.6); опубликовано ранее в работе [27]. Внутри белого круга показаны молекулы титина, которые наиболее близко прилегают друг к другу. Шкала 500 нм. (б) — Схематичное представление возможного формирования межмолекулярных связей между частично развернутыми доменами двух расположенных рядом молекул титина. На схеме частичный анфолдинг представлен для среднего домена. Внутри белого круга схематично показана вероятная структура, напоминающая кросс- β -структуру, которая возможна для агрегатов гладкомышечного титина. Формирование амилоидо-подобных структур, наподобие представленных на схеме, ранее было предложено для доменов титина I27–I28, формирующих промежуточные структуры неправильной укладки, получившие название «внутримолекулярный амилоид» [32]. Схема представлена на примере трех доменов титина (двух иммуноглобулин-подобных и одного фибронектин III-подобного), расположенных в А-диске саркомера. Источник: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WZ42>. Частичное раскрытие домена на схеме показано на основании данных работы [33].

рый может одновременно формировать внутри и межмолекулярные связи, причем последние — амилоидной природы. И это без преувеличения указывает на новый механизм агрегации, включая особые структурные, кинетические и термодинамические характеристики промежуточных продуктов агрегации титина и почти полное отсутствие переходных состояний. Далее рассмотрим агрегацию гладкомышечного титина с точки зрения теории энергетического ландшафта.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ ТИТИНА

Прежде чем приступить к описанию особенности энергетического ландшафта титина, следует дать краткое обозрение следующей информации. В случае сворачивания белка «вне пути» (*англ.* «off pathway») форма графика энергетического ландшафта схожа с формой графика сворачивания «на пути» (*англ.* «on pathway»), напоминающей «воронку», но из-за появления межмолекулярных взаимодействий и их конкуренции с внутримолекулярными взаимодействиями, повышается изрезанность (неровность) графика ландшафта агрегации [38] (рис. 2). В случае сво-

рачивания «вне пути» амилоидные фибриллы, как считается, находятся в наиболее стабильном термодинамическом состоянии, присутствующим в энергетическом ландшафте [39–43]. Считается, что энергетический ландшафт амилоидных фибрилл может характеризоваться множеством пиков из-за различных морфологических конформаций амилоидных фибрилл.

Во время процесса сворачивания «на пути» и «вне пути» конкуренция между межмолекулярными и внутримолекулярными взаимодействиями играет ключевую роль. Чтобы предотвратить сворачивание «вне пути» эволюция предоставила живым системам стратегии уменьшения взаимодействий между различными молекулами на всем пути сворачивания белка до завершения процесса его сворачивания.

Молекула титина имеет огромные (по отношению к другим белкам) размеры и с трудом представляется его способность полного или значительного разворачивания при формировании межмолекулярных связей «вне пути». Тем не менее, мы попытались изобразить возможный энергетический ландшафт агрегации данного белка на основе полученных нами экспериментальных данных.

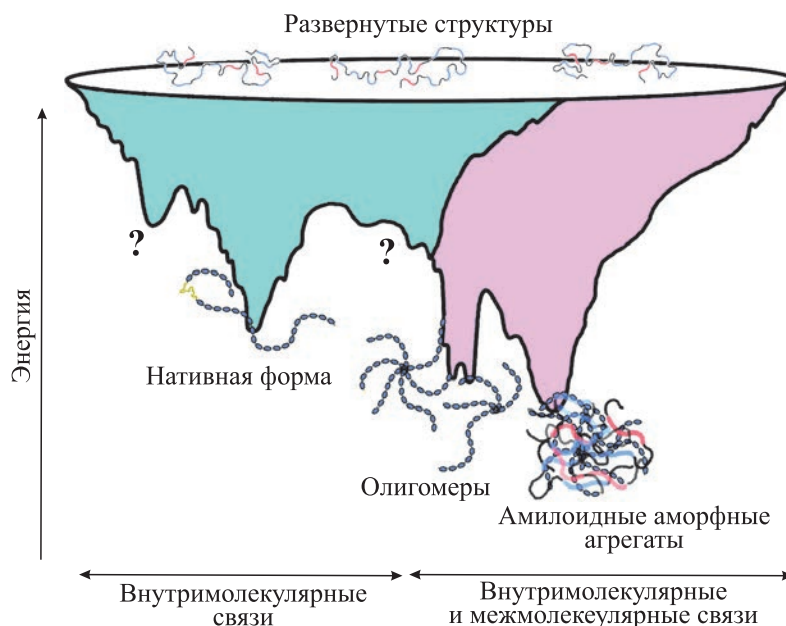


Рис. 4. Условный двумерный энергетический ландшафт сворачивания (фолдинга) и агрегации гладкомышечного титина. Поскольку мы не имеем достаточной информации о наличии частично свернутых и частично развернутых состояниях белка, то на схеме данные состояния отмечены знаком вопроса. Также на схеме отсутствует предполагаемый для большинства белков высокий энергетический барьер, необходимый для перехода от мономеров белка к олигомерам и агрегатам. Отсутствуют также ядра нуклеации.

На рис. 4 представлены три основные формы титина — это нативный белок, его олигомеры и аморфные амилоидные агрегаты. Между этими формами практически отсутствуют энергетические барьеры и не имеется промежуточных форм. Это связано с тем, что олигомеры титина уже формируются в условиях высокой ионной силы, при которых большинство молекул этого белка находится в мономерной форме. Олигомеризация ускоряет процесс агрегации титина. Амилоидные аморфные агрегаты гладкомышечного титина на рисунке в энергетическом ландшафте представляют собой наиболее стабильное термодинамическое состояние (рис. 4), однако менее стабильное, чем, например, амилоидные фибриллы других белков (рис. 2).

Предположение о минимальных различиях в стабильности различных структур на энергетическом ландшафте титина было сделано на основе полученных нами температур плавления молекулярной формы белка (где присутствуют и его олигомеры), а также его агрегатов [27]. Мы показали, что стабильность неагрегированной формы гладкомышечного титина была ниже (T_m составляла 317.7 K), чем стабильность его агрегатов (T_m составляла 321.7 K). Однако разница максимальной температуры пика теплопоглощения между агрегированной и неагрегированной формами белка не была столь существенна как в случае с истинными амилоидными белками. Также практиче-

ски не наблюдалось разницы между значениями калориметрической энтальпии перехода.

Другой особенностью агрегации титина, которую мы учли и постарались отобразить в энергетическом ландшафте, является наличие как внутримолекулярных, так и межмолекулярных связей при сворачивании «вне пути». На это указывают прямые экспериментальные данные электронной микроскопии, показывающие частичную агрегацию его молекул [27], а также отсутствие изменений во вторичной структуре титина в процессе его агрегации [25, 27].

Таким образом, наши данные показывают, что при агрегации титина могут одновременно формироваться и внутри, и межмолекулярные связи, причем последние — амилоидной природы. Эти данные указывают на новый механизм белковой агрегации. Предложенный энергетический ландшафт отображает этот механизм агрегации гладкомышечного титина и расширяет наши представления о процессе агрегации белков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00805).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Li, J. Adamcik, and R. Mezzenga, *Nat. Nanotechnol.*, **7** (7), 421 (2012). DOI: 10.1038/nnano.2012.62
2. R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, et al., *Nature*, **435** (7043), 773 (2005).
3. M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, et al., *Nature*, **447** (7143), 453 (2007). DOI: 10.1038/nature05695
4. D. Eisenberg and M. Jucker, *Cell*, **148** (6), 1188 (2012). DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.022
5. H. Wille, W. Bian, M. McDonald, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (40), 16990 (2009). DOI: 10.1073/pnas.0909006106
6. T. P. Knowles, A. W. Fitzpatrick, S. Meehan, et al., *Science*, **318** (5858), 1900 (2007). DOI: 10.1126/science.1150057
7. S. Ketten and M. J. Buehler, *Nano Lett.*, **8** (2), 743 (2008). DOI: 10.1021/nl0731670
8. F. S. Ruggeri, J. Adamcik, J. S. Jeong, et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **54** (8), 2462 (2015). DOI: 10.1002/anie.201409050
9. V. N. Uversky, *FEBS J.*, **277**, 2940 (2010).
10. C. B. Anfinsen, *Science*, **181**, 223 (1973).
11. M. Vendruscolo and C. M. Dobson, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **363**, 433 (2005).
12. P. G. Wolynes, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **363**, 453 (2005).
13. J. C. Rochet and P. T. Lansbury Jr, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 60 (2000).
14. T. R. Jahn, S. E. Radford, *FEBS J.*, **272** (23), 5962 (2005). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.05021.x
15. V. Daggett and A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 18 (2003).
16. A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1525 (2000).
17. S. E. Radford, C. M. Dobson, and P. A. Evans, *Nature*, **358**, 302 (1992),
18. D. Baram and A. Yonath, *FEBS Lett.*, **579**, 948 (2005).
19. T. M. Phan and J. D. Schmit, *Biophys J.*, **121** (15), 2931 (2022). DOI: 10.1016/j.bpj.2022.06.031
20. V. N. Uversky and A. L. Fink, *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 131 (2004).
21. J. K. Freundt and W. A. Linke, *J. Appl. Physiol.*, **126** (5), 1474 (2019). DOI: 10.1152/jappphysiol.00865.2018.
22. I. M. Vikhlyantsev and Z. A. Podlubnaya, *Biophys. Rev.*, **9** (3), 189 (2017). DOI: 10.1007/s12551-017-0266-6
23. K. Kim and T. C. Keller 3rd, *J. Cell Biol.*, **156** (1), 101 (2002). DOI: 10.1083/jcb.200107037
24. A. G. Bobylev, O. V. Galzitskaya, R. S. Fadeev, et al., *Biosci. Rep. Biosci. Rep.*, **36** (3), e00334 (2016). DOI: 10.1042/BSR20160066
25. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36** (9), 2237 (2018). DOI: 10.1080/07391102.2017.1348988
26. A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, et al., *Mol. Biol. (Moscow)*, **54** (4), 643 (2020). DOI: 10.31857/S0026898420040047
27. A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (2), 1056 (2023). DOI: 10.3390/ijms24021056
28. M. R. Krebs, G. L. Devlin, and A. M. Donald, *Biophys. J.*, **96** (12), 5013 (2009).
29. H. H. J. de Jongh, T. Gröneveld, and J. de Groot, *J. Dairy Sci.*, **84**, 562 (2001).
30. M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, S. S. Rogers, and A. M. Donald, *Biophys. J.*, **88**, 2013 (2005).
31. M. B. Borgia, A. A. Nickson, J. Clarke, M. J. Hounslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **135** (17), 6456 (2013). DOI: 10.1021/ja308852b
32. A. Borgia, K. R. Kemplen, M. B. Borgia, et al., *Nat. Commun.*, **6**, 8861 (2015).
33. H. Lu, B. Isralewitz, A. Krammer, et al., *Biophys. J.*, **75** (2), 662 (1998). DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77556-3
34. J. Waeytens, J. Mathurin, A. Deniset-Besseau, et al., *Analyst*, **146** (1), 132 (2021). DOI: 10.1039/d0an01545h
35. E. C. Eckels, S. Haldar, R. Tapia-Rajo, et al., *Cell Rep.*, **27**, 1836 (2019).
36. J. A. Rivas-Pardo, E. C. Eckels, I. Popa, et al., *Cell Rep.*, **14**, 1339 (2016).
37. S. Kumar and J. Walter, *Aging (NY)*, **3** (8), 803 (2011). DOI: 10.18632/aging.100362
38. J. Gsponer and M. Vendruscolo, *Prot. Pept. Lett.*, **13** (3), 287 (2006). DOI: 10.2174/092986606775338407
39. T. Eichner and S. E. Radford, *Mol. Cell.*, **43** (1), 8 (2011). DOI: 10.1016/j.molcel.2011.05.012
40. K. W. Tipping, P. van Oosten-Hawle, E. W. Hewitt, and S. E. Radford, *Trends Biochem. Sci.*, **40** (12), 719 (2015). DOI: 10.1016/j.tibs.2015.10.002
41. A. K. Buell, A. Dhulesia, D. A. White, et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **51** (21), 5247 (2012). DOI: 10.1002/anie.201108040
42. A. J. Baldwin, T. P. Knowles, G. G. Tartaglia, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (36), 14160 (2011). DOI: 10.1021/ja2017703
43. E. Gazit, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **41** (2), 257 (2002). DOI: 10.1002/1521-3773(20020118)41:2<257::aid-anie257>3.0.co;2-m

About the Pathway of Amyloid Aggregation of Titin

L.G. Bobyleva*, T.A. Uryupina*, M.A. Timchenko*, S.N. Udaltsov**,
I.M. Vikhlyantsev*, ***, and A.G. Bobylev*

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

***Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, ul. Karla Marksa 76, Kazan, 420012 Russia*

The process of amyloid aggregation is quite complex and poorly understood. In this work, having summarized previously obtained results on the aggregation of the multidomain smooth muscle protein titin, an attempt has been made to expand understanding of this process, and a new possible mechanism by which amyloid aggregation of titin may occur is delineated. Our main conclusion is that the ability of titin to form amorphous aggregates seems to be the only possible way of aggregation of this protein. Most likely, only separate parts of the molecules, but not the whole protein, are involved in the formation of the amyloid structure in amorphous aggregates of smooth muscle titin. This feature, given the large size of the protein molecule, distinguishes titin from other amyloid or amyloid-like proteins. The paper discusses the potential energy landscape underlying the formation of titin amyloid aggregates.

Keywords: titin, aggregation, oligomers, amyloid aggregates, amorphous aggregates, energy landscape